

UPLC 结合化学计量学方法的胡黄连指纹图谱研究

张可佳^{1,2,3}, 孙宁宁^{1,2,3}, 杨雪^{2,3}, 耿婉丽^{2,3}, 鄂秀辉^{2,3}, 蔡楠^{2,3}, 侯文彬⁴, 李天祥⁵, 何毅^{2,3*}, 李萍^{1*}

1. 中国药科大学 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009
2. 天士力控股集团有限公司研究院 现代中药开发中心, 天津 300410
3. 天士力制药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410
4. 天津药物研究院 新药评价研究中心, 现代中药研究中心, 天津 300193
5. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 建立胡黄连 UPLC 指纹图谱, 为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。方法 采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以 0.5% 乙酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min, 柱温为 32 °C, 检测波长为 295 nm, 对 25 批以胡黄连名称出售的药材进行检测。通过相似度评价, 结合聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA), 对不同批次胡黄连药材进行质量评价。ESI-Q-TOF/MS 正、负 2 种离子模式扫描对其化学成分定性分析。结果 22 批胡黄连药材与 3 批混淆品的指纹图谱明显不同。通过建立的 22 批胡黄连药材 UPLC 指纹图谱确证了 16 个共有峰, 并对 12 个共有峰进行了明确化学成分指认; 胡黄连药材的相似度为 0.939~0.998; 通过聚类分析可大致聚成 3 类; PCA 结果支持了 HCA 结果; 并结合偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 方法发现区分胡黄连样品的 4 个标志性化合物, 指认出 1、9、12 号峰分别为藏黄连酚苷 C、胡黄连苷 I 和胡黄连苷 III。结论 胡黄连的 UPLC 指纹图谱的构建和化学模式的识别为药材质量控制提供更全面的参考。

关键词: 胡黄连; 混淆品; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 相似度分析; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法
中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0685-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.026

Fingerprint study of *Picrorhiza scrophulariiflora* by UPLC coupled with chemometrics method

ZHANG Ke-jia^{1,2,3}, SUN Ning-ning^{1,2,3}, YANG Xue^{2,3}, GENG Wan-li^{2,3}, E Xiu-hui^{2,3}, CAI Nan^{2,3}, HOU Wen-bin⁴, LI Tian-xiang⁵, HE Yi^{2,3}, LI Ping¹

1. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China
2. Research Center of Modern Chinese Medicine, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China
3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China
4. Research Center for New Drug Evaluation, Research Center for Modern Chinese Medicines, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
5. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprint for effective quality control and scientific evaluation of *Picrorhiza scrophulariiflora*. **Methods** The analysis was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), using acetonitrile-0.5% glacial acetic acid aqueous solution as mobile phase for gradient elution, with the flow rate at 0.3 mL/min, the column temperature at 32 °C, and the detection wavelength at 295 nm. Total of 25 batches of *P. scrophulariiflora* and its adulterants were analyzed. Similarity evaluation combined with hierarchical clustering analysis (HCA) and principal components analysis (PCA) were used to evaluate the quality of herbs from different batches. Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) was used for qualitative analysis in the positive and negative

收稿日期: 2017-10-09

作者简介: 张可佳 (1994—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药新药开发。E-mail: Zhangkejia_3@163.com

*通信作者 李萍, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药活性成分群发现与质量评价研究。E-mail: liping2004@126.com

何毅, 女, 博士, 研究方向为中药新药研发、中药现代化及国际法规与注册。E-mail: heyi@tasly.com

ion modes. **Results** There were significant differences in fingerprint chromatogram among *P. scrophulariiflora* and its adulterants. There were 16 common peaks in UPLC fingerprint of 22 batches of *P. scrophulariiflora*, and 12 peaks among which were carried out for chemical components identification with the similarity at 0.939—0.998. Twenty-two samples could be classified into three clusters. The PCA result was consistent with that of HCA. The four symbolic compounds in samples were verified by PLS-DA analysis, which identified that No.1, 12, 9 peaks were picroside I, picroside III, and scrophenoside C. **Conclusion** The establishment of UPLC fingerprint and the recognition of chemical pattern of *P. scrophulariiflora* can provide a more comprehensive reference for the quality control of herbs.

Key words: *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell; adulterant; UPLC; fingerprint; similarity evaluation; hierarchical clustering analysis; principal components analysis; partial least squares discrimination analysis

胡黄连为玄参科植物胡黄连 *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell 的干燥根茎, 是我国传统中药之一, 最早记载于唐《新修本草》: “主骨蒸劳热, 补肝胆, 明目治冷热泄痢……厚肠胃。治妇人胎蒸虚惊, 治三消、五痔、大人五心烦热。”宋·《开宝本草》载: “生胡国, 似干杨柳, 心黑外黄。胡黄连具有退虚热、除痞热、清湿热之功效^[1]。70 年代以前, 胡黄连一直依赖于印度进口, 后在我国西藏和云南发现了野生胡黄连^[2], 其野生资源主要分布于中国西藏南部、云南西北部等 3 600~4 400 m 高山雪线附近, 生境特殊, 分布区域狭窄, 自然资源极少^[3]。目前对胡黄连已有引种栽培的研究, 丽江胡黄连栽培及规范种植技术较成熟, 生产的胡黄连药材质量较稳定^[4]。《中华本草》蒙药卷中胡黄连又有别名为“洪连”, 而《中国药典》2015 年版中洪连为玄参科植物短筒兔耳草 *Lagotis breviflora* Maxim. 的干燥全草。其与胡黄连的主要产地均在西藏, 又同为玄参科植物, 二者容易混淆^[5]。

胡黄连中所含化学成分主要有环烯醚萜类、葫芦素类、苯乙醇糖苷类和酚苷类^[2]。目前对胡黄连的质量评价还主要是着重于检测其中主要活性成分胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 的量^[6-8], 然而实际上胡黄连药材体现的各种药理活性是多个化学成分综合作用的结果, 仅用单一或某几个化合物为指标无法全面地评价药材质量。中药指纹图谱是中药整体性的化学表征, 能够反映中药材尽量多的组分, 对药材的质量控制具有整体性。目前, 已有报道胡黄连药材 HPLC 指纹图谱, 虽能较全面反映该药材的整体质量, 但分析时间长达 70 min, 不能实现快速检测和分析。为了高效、快速地评价胡黄连药材质量, 减少品种混乱情况, 本实验收集了河北安国和安徽亳州以胡黄连名称出售的药材 25 批, 经生药学鉴定, 其中 22 批为胡黄连正品, 3 批为混淆品。采用 UPLC 法, 建立市售不同产地胡黄连的指纹图谱, 在数据处理的基础上, 结合相似度评价、聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA)

的方法, 进行药材的质量分析和评价。该研究结果为完善胡黄连药材质量标准奠定基础, 对其进一步研究、开发和利用具有重要意义。

1 仪器与材料

超高效液相色谱 (Waters ACQUITY UPLC, 包括二元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、Empower3 工作站), Masslynx 色谱工作站 (Waters, 美国); Waters Q-TOF Premier 质谱仪 (Waters MS Technologies 公司, 英国); XS205 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); MF10 粉碎机 (德国 IKA 公司); Milli-Q 超纯水系统 (Millipore 公司); KQ-500DV 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

乙腈 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 乙腈 (质谱纯, 德国 Merck 公司); 超纯水 (Milli-Q 制备); 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 冰乙酸 (色谱级, 天津康科德科技有限公司); 冰乙酸 (质谱级, 美国 ACS 恩科) 公司; 0.22 μm 微孔滤膜 (天津津腾实验设备有限公司)。对照品胡黄连苷 I (批号 111727-200501, 质量分数为 95.6%)、胡黄连苷 II (批号 111596-201103, 质量分数为 96.2%)、香草酸 (批号 110776-201503, 质量分数为 99.8%)、没食子酸 (批号 110831-201204, 质量分数为 90.8%)、梓醇 (批号 110808-201210, 质量分数为 98.1%) 均购于中国药品生物制品检定所; 草夹竹桃苷 (批号 ZZS17032709)、龙胆苦苷 (批号 ZZS17032710), 购自上海甄准生物科技有限公司, 质量分数均 ≥ 98%; 6-阿魏酰梓醇 (批号 BBP01656)、米内苷 (批号 BBP01933)、黄金树苷 (批号 BBP01750), 购自云南西力生物技术有限公司, 质量分数均 ≥ 95%; 胡黄连苷 III (批号 17041901, 质量分数为 98.8%), 购自北京北纳创联生物技术研究; 胡黄连苷 IV (批号 PS010209, 质量分数为 99.1%), 购自成都曼思特生物科技有限公司; 云杉苷 (批号 CDXA-14-7407), 购自美国 ChromaDex 公司; 獐牙

菜昔 (批号 3533, 质量分数为 99.5%), 购自上海诗丹德标准技术服务有限公司; 桃叶珊瑚昔 (批号 wkq16022205, 质量分数为 99.4%), 购自四川省维克奇生物科技有限公司; 香草乙酮 (批号 A727200, 质量分数为 98%), 购自多伦多研究化学品公司。

25 批胡黄连药材购自安徽亳州药材市场和河北安国药材市场, 见表 1。所有药材经天津中医药大学李天祥教授鉴定, 其中 22 批 (批号 S2、S4~S17、S19~S25) 为玄参科胡黄连属植物胡黄连 *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell 的干燥根茎, 3 批 (批号 S1、S3、S18) 为胡黄连易混品洪连 (玄参科植物短筒兔耳草 *Lagotis breviflora* Maxim. 的干燥根茎。

表 1 药材信息

Table 1 Information of sample batches

批次	产地	批次	产地	批次	产地
S1	西藏 1	S10	四川 1	S19	西藏 13
S2	西藏 2	S11	西藏 8	S20	西藏 14
S3	印度	S12	西藏 9	S21	西藏 15
S4	西藏 3	S13	不丹 1	S22	西藏 16
S5	西藏 4	S14	西藏 10	S23	西藏 17
S6	西藏 5	S15	西藏 11	S24	尼泊尔
S7	进口	S16	不丹 2	S25	西藏 18
S8	西藏 6	S17	西藏 12		
S9	西藏 7	S18	四川 2		

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。流动相为 0.5% 冰乙酸水溶液 (A)-乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~6 min, 8%~10% B; 6~10 min, 10%~11% B; 10~16 min, 11%~13% B; 16~19 min, 13%~18% B; 19~26 min, 18%~23% B; 26~28 min, 23%~95% B; 28~29 min, 95%~8% B; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 295 nm; 柱温 32 °C; 进样量 4 μL。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源 (ESI), MSE 扫描正、负离子模式检测, 扫描范围 *m/z* 50~1 200, 毛细管电压负离子模式 2.3 kV, 正离子模式 2.8 kV, 锥孔电压为 40 V, 雾化气为高纯度氮气, 碰撞气为氩气, 雾化器体积流量 50 L/h, 脱溶剂气体积流量 600 L/h, 脱溶剂温度为 350 °C, 离子源温度为 120 °C。低能量扫描时 trap 电压为 6 eV, 高能量扫描时 trap 电压为 15~55 eV。用亮氨酸脑啡

肽 (ES⁻: *m/z* 554.261 5, ES⁺: *m/z* 556.277 1) 作校正液, 进行质量实时校正, 其质量浓度为 200 pg/μL, 体积流量为 22 μL/min。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取各对照品适量, 置量瓶中, 加甲醇适量, 超声使溶解, 放冷, 加甲醇定容至刻度, 制得质量浓度为 8.0~15.0 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取胡黄连药材粉末 (过 3 号筛) 约 0.15 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 10% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 10% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 2 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加 10% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取胡黄连药材 (S12) 的供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件, 连续进样 6 针, 记录保留时间和峰面积。以胡黄连昔 II 色谱峰 (10 号峰) 峰为参照峰, 结果表明, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.12%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.57%, 说明该方法精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取胡黄连药材 (S12), 分别按“2.3”项下方法平行制备 6 份胡黄连药材的供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件进样, 记录保留时间和峰面积。以胡黄连昔 II 色谱峰 (10 号峰) 为参照峰, 结果表明, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.17%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.28%, 说明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取胡黄连药材 (S12) 的供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样, 记录保留时间和峰面积。以胡黄连昔 II 色谱峰 (10 号峰) 为参照峰, 结果表明, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.12%, 相对峰面积的 RSD 均小于 4.44%, 说明供试品溶液在室温条件下 12 h 内稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 胡黄连药材 UPLC 指纹图谱的考察 分别取 22 批胡黄连药材各 0.15 g, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图 (图 1)。将所得的 22 批胡黄连药材 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入国家药典委员会研

制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A) 软件, 以 S11 药材图谱作为参照谱进行指纹匹配, 确定了 16 个共有峰, 该 16 个共有峰的总面积占总峰面积的 90% 以上。经与对照品溶液色谱图比对后, 确认样品图谱中 10 号峰为胡黄连苷 II, 是胡黄连药材的主要活性成分^[2]。从图 1 中可以看出胡黄连苷 II 的色谱峰分离度较好, 峰面积所占比例较大且相对稳定, 因此选择连胡黄连苷 II (10 号峰) 为参照峰, 建立胡黄连药材的对照指纹图谱, 见图 2。

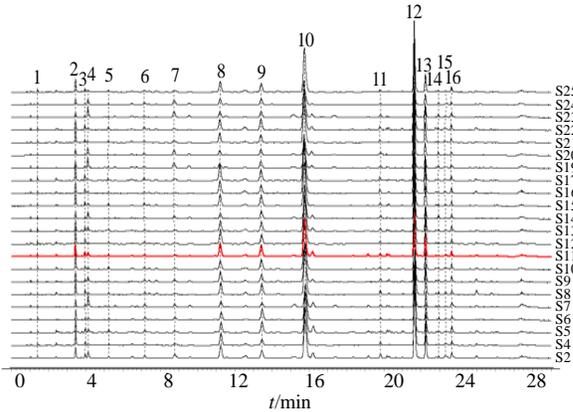
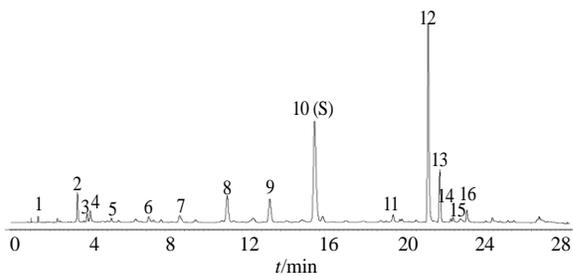


图 1 22 批胡黄连药材 UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of 22 batches samples of *P. scrophulariiflora*



- 1-藏黄连酚苷 C 2-草夹竹桃苷 4-香草酸 6-梓醇 6-咖啡酸酯
- 7-藏黄连酚苷 D 8-胡黄连苷 IV 9-胡黄连苷 III 10-胡黄连苷 II
- 12-胡黄连苷 I 13-米内苷 14-藏黄连苷 H 16-藏黄连苷 B
- 1-scrophenoside C 2-androsin 4-vanillic acid 6-verminoside
- 7-scrophenoside D 8-picroside IV 9-picroside III 10-picroside II
- 12-picroside I 13-minecoside 14-scroside H 16-scroside B

图 2 22 批胡黄连药材的共有模式图

Fig. 2 Mutual pattern of UPLC fingerprints of *P. scrophulariiflora*

2.5.2 相似度评价 将 22 批胡黄连样品指纹图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A), 利用中位数法, 以 S11 号样品色谱图为参照图谱, 采用全谱峰匹配, 生成对照图谱, 以此作为胡黄连药材的对照指纹图谱, 进行相似度评价,

其相似度结果见表 2。各批次样品相似度在 0.939~0.998, 表明各批次胡黄连质量相对稳定; 由图 1、2 可知各产地胡黄连内在成分与对照指纹图谱基本相似, 表明各化学成分基本一致, 但部分峰的峰面积有所差异, 表明部分成分的量有所不同。从表 2 可以看出, 样品 S10、S20、S23 相似度相对较低, 其余各样品相似度较高。

表 2 22 批胡黄连药材相似度分析结果

Table 2 Results of similarity of 22 batches of *P. scrophulariiflora*

批次	相似度	批次	相似度	批次	相似度
S2	0.994	S11	0.995	S20	0.958
S4	0.990	S12	0.984	S21	0.995
S5	0.967	S13	0.980	S22	0.994
S6	0.996	S14	0.985	S23	0.939
S7	0.978	S15	0.998	S24	0.977
S8	0.992	S16	0.995	S25	0.994
S9	0.996	S17	0.983		
S10	0.958	S19	0.982		

2.5.3 混淆品的鉴别 对 3 批 (批次 S1、S3、S18) 以胡黄连出售但实际为洪连 (玄参科植物短筒兔耳草 *Lagotis brevītuba* Maxim.) 的样品按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项 2 色谱条件进行检测, 得到 3 批混淆品的 UPLC 图。

以 22 批胡黄连共有模式为基准, 计算 3 批混淆品的图谱与胡黄连共有模式的相似度, 结果相似度为 0.078~0.114。3 批混淆品的 UPLC 色谱图与胡黄连药材共有模式的比较见图 3。

从图 3 可以看出, 3 批混淆品的 UPLC 图的峰形、各主要峰的绝对保留时间、相对峰面积都比较一致; 而与胡黄连的共有模式对比, 色谱峰的峰形、主要色谱峰数目等都有巨大差异。说明混淆品在化

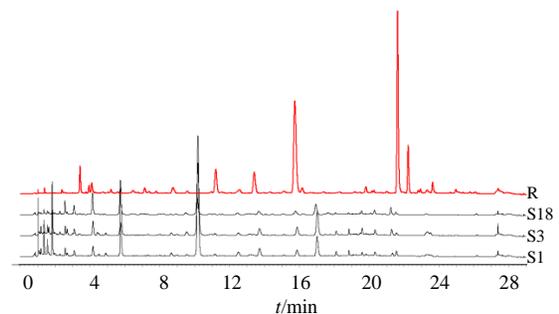


图 3 3 批混淆品的 UPLC 图与胡黄连药材共有模式的比较

Fig. 3 Comparison on UPLC fingerprint of three batches of adulterant and mutual pattern of *P. scrophulariiflora*

学成分组成上与胡黄连有明显的差异。目前从根茎的长度及维管束数目疑似为洪连，后续将通过指标成分的定性定量分析对其进行进一步鉴定。结果表明，所建立的指纹图谱方法能较好地地区分胡黄连药材与其混淆品。

2.6 化学成分研究

国内外研究结果表明^[2,9-10]，胡黄连植物中主要成分是环烯醚萜苷、苯乙醇苷和酚苷。虽然绝大多数环烯醚萜在正、负离子模式下均有离子信号，但在负离子模式下更利于 MSⁿ 的裂解规律分析，胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 在负离子模式下碎片信息更丰富^[11]；酚类化合物则正离子模式较负离子模式更灵敏^[12]；故采用正、负离子分别对供试品溶液进行扫描（图 4）。结合文献数据^[13-22]和对照品比对，鉴定出 28 个化合物，12 个环烯醚萜苷类化合物、4 个苯乙醇苷类化合物、9 个酚苷类化合物、1 个咖啡酸苷类化合物及 2 个芳香酸类化合物。其中 15 个化合物为对照品比对鉴定。

28 个化合物的分子式、母离子测定值、理论值、误差、二级碎片信息数据见表 3。

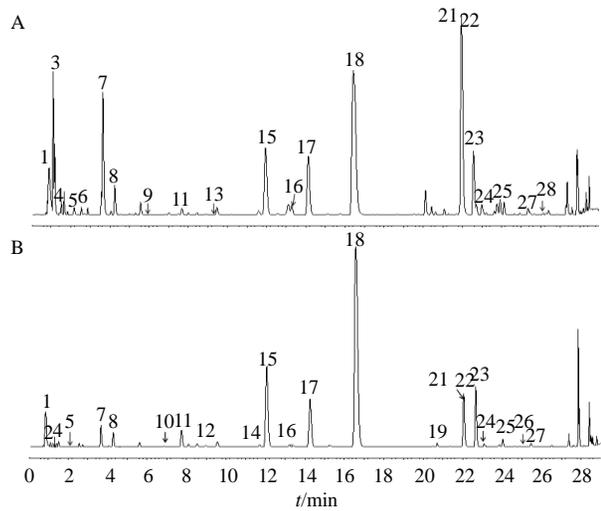


图 4 胡黄连样品正 (A)、负离子模式 (B) BPI 图
Fig. 4 *P. scrophulariiflora* samples in positive (A) and negative (B) ion mode

表 3 胡黄连药材化学成分 UPLC-Q-TOF-MS 数据及鉴定结果

Table 3 Information of identified compounds in *P. scrophulariiflora* by UPLC-Q-TOF-MS

化合物	tr/min	母离子测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 (×10 ⁻⁶)	分子式	鉴定结果	MSE 碎片信息	文献
1	0.83	665.213 9 [M-H] ⁻ 689.212 6 [M+Na] ⁺	665.171 8 689.169 4	—	C ₃₀ H ₃₄ O ₁₇	藏黄连咖啡酸苷 A	(-) 503.160 6, 179.051 7, (+) 543.133 3, 527.158 8, 365.106 3	13
2*	1.10	361.112 6 [M-H] ⁻	361.113 5	-2.49	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	梓醇	(-) 199.057 7, 169.040 3, 181.049 8, 151.039 4	14
3*	1.17	345.118 6 [M-H] ⁻ 369.115 9 [M+Na] ⁺	345.118 6 369.116 2	0 -0.81	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	桃叶珊瑚苷	(+) 185.005 7, 167.032 5, 149.052 4, 137.056 3	15
4*	1.29	169.012 1 [M-H] ⁻	169.013 7	-9.47	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸	(-) 125.076 5, 97.023 3	16
5	2.28	329.092 0 [M-H] ⁻ 353.121 2 [M+Na] ⁺	329.123 6 353.121 2	— 0	C ₁₅ H ₂₂ O ₈	藏黄连酚苷 C	(-) 167.033 4	17
6*	2.54	321.094 5 [M+Na] ⁺	321.095 0	-1.56	C ₁₄ H ₁₈ O ₇	云杉苷	(+) 137.062 1	12
7*	3.61	327.106 1 [M-H] ⁻ 351.105 0 [M+Na] ⁺	327.108 0 351.105 6	-5.81 -1.71	C ₁₅ H ₂₀ O ₈	草夹竹桃苷	(-) 165.053 6, 150.031 7 (+) 167.074 7	18
8*	4.23	167.034 0 [M-H] ⁻	167.034 4	-2.39	C ₈ H ₈ O ₄	香草酸	—	12
9*	5.95	379.099 3 [M+Na] ⁺	379.100 5	-3.17	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	龙胆苦苷	(+) 268.998 0, 177.037 3, 149.011 8, 132.953 7	19
10	7.02	529.157 2 [M-H] ⁻ 553.153 2 [M+Na] ⁺	529.155 7 553.153 3	2.83 -0.18	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₄	pikuroside	(-) 511.138 9, 349.085 6, 167.031 8, 123.044 2	20
11	7.69	523.145 2 [M-H] ⁻ 547.142 7 [M+Na] ⁺	523.145 2 547.142 8	0.00 -0.18	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₃	verminoside	(-) 323.070 4, 179.029 2, 161.023 3, 133.027 6	14
12	8.95	641.164 7 [M-H] ⁻ 665.166 5 [M+Na] ⁺	641.171 8 665.169 4	-11.07 -4.36	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₇	藏黄连酚苷 D	(-) 501.097 9, 479.111 8, 311.066 6, 167.009 4	14
13*	9.21	167.071 4 [M+H] ⁺	167.070 8	3.59	C ₉ H ₁₀ O ₃	香草乙酮	(+) 167.071 4	12
14	11.64	633.179 0 [M+Na] ⁺	633.179 5	-0.79	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	藏黄连酚苷 F	(+) 313.059 6	12
15*	12.01	507.149 9 [M-H] ⁻ 531.147 5 [M+Na] ⁺	507.150 3 531.147 9	-0.79 -0.75	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₂	胡黄连苷 IV	(-) 307.080 2, 265.061 0, 163.036 7, 145.026 9	14

续表 3

化合物	t_R/min	母离子测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	鉴定结果	MSE 碎片信息	文献
16	13.29	663.189 6 [M+Na] ⁺	663.190 1	-0.75	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	藏黄连酚苷 A	(+) 313.087 3	12
17*	14.21	537.160 3 [M-H] ⁻	537.160 8	-0.93	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₃	胡黄连苷 III	(-) 337.090 0, 193.042 8, 175.036 6	21
		561.158 6 [M+Na] ⁺	561.158 4	0.36				
18*	16.52	511.145 3 [M-H] ⁻	511.145 3	0.20	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃	胡黄连苷 II	(-) 349.090 4, 235.058 9, 167.033 0, 163.038 6	14
		535.143 2 [M+Na] ⁺	535.142 8	0.75				
19*	20.65	507.150 0 [M-H] ⁻	507.150 3	-0.59	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₂	黄金树苷	(-) 345.081 1, 231.061 0, 163.048 0, 145.028 7	14
20	21.35	653.206 2 [M-H] ⁻	653.208 2	-3.06	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₆	1-[2-(4-(3,4-dihydroxycinnamoyl)-3-glucosyl)glucosyl]ethy-3-hydroxy-4-methoxybenzene	(-) 491.123 1, 161.020 6	14
21*	21.98	491.155 4 [M-H] ⁻	491.155 3	0.20	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₁	胡黄连苷 I	(-) 199.061 7, 147.040 5	21
		515.153 1 [M+Na] ⁺	515.152 9	0.39				
22*	22.05	537.161 3 [M-H] ⁻	537.160 8	0.93	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₃	6-阿魏酰梓醇	(-) 375.104 7, 261.074 6, 193.046 9, 175.037 8	21
23*	22.60	537.160 6 [M-H] ⁻	537.160 8	-0.37	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₃	米内苷	(-) 375.108 8, 261.074 9, 193.048 0, 175.019 0	14
24	23.16	813.281 0 [M-H] ⁻	813.281 7	-0.86	C ₃₇ H ₅₀ O ₂₀	藏黄连苷 H	(-) 637.213 7, 491.175 8, 329.088 2, 175.042 0	14
25	24.02	667.223 9 [M-H] ⁻	667.223 8	0.15	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₆	藏黄连苷 B	(-) 491.158 9, 175.036 2, 193.045 7	14
26	25.04	829.275 0 [M-H] ⁻	829.276 6	-1.93	C ₃₇ H ₅₀ O ₂₁	藏黄连苷 A	(-) 667.216 9, 193.002 7, 175.015 5, 491.138 8	14
27	25.46	473.143 4 [M-H] ⁻	473.144 8	-2.96	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₀	scrophuloside A	(-) 307.078 4, 165.052 4, 163.046 8, 145.024 4	14
28	26.12	527.151 9 [M+Na] ⁺	527.152 9	-1.90	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₁	藏黄连新苷 A	(+) 177.052 7, 149.026 9, 105.001 5	22

*为经过对照品确证的成分

* is composition confirmed after reference substance

2.7 化学计量学分析

完全从相似度差别上很难全面反应映不同批药材间的异同。故进一步采用 IBM SPSS 19.0 软件和 SIMCA 13.0 软件对不同批胡黄连药材指纹图谱的原始数据进行 HCA 和 PCA。

2.7.1 聚类分析 将各个共有峰相对于参比峰的峰面积量化,得到 22×16 阶数据矩阵,导入 SPSS 19.0 版软件,以组间平均链锁距离 (between groups linkage) 及欧氏距离 (euclidean distance) 作为样品测度,采用 Q 型聚类进行 HCA。

结果显示,当判别条件距离为 15 时,22 批胡黄连样品被分为 3 大类:第 1 类包括 S2、S4、S7~9、S14、S16、S19、S21、S24;第 2 类包括: S20、S23;第 3 类包括: S5、S6、S10~13、S15、S17、S22、S25。结果表明,样品分类存在产地交叉现象,各产地胡黄连药材之间的相关性与相似度分析结果较为一致。分成 3 类的原因可能是在部分化学成分的量上具有一定的差异导致。

2.7.2 PCA 采用 SPSS 19.0 统计软件对 22 批胡黄连药材的指纹图谱数据进行 PCA,求出相关矩阵的特征值及其方差,见表 4。以特征值 (VIP) > 1 为提取标准,得到前 4 个主成分的累计方差贡献率为 84.344% (>80%),故选取前 4 个主成分即可进行评价,它代表了胡黄连药材中 16 个成分量的 84.344% 的信息量,具有很好的代表性,足以评价胡黄连药材的品质。

根据因子荷载矩阵,推测影响胡黄连药材质量差异的并不是单一成分,而是多成分作用的结果。从表 5 看出,第 1 主成分的信息主要来自于色谱峰 4、6、7、9、11~16;第 2 主成分主要来自色谱峰 1、2、5;第 3 主成分主要来自色谱峰 8;第 4 主成分主要来自色谱峰 3 的信息。

用 SIMCA 13.0 分析软件得到 PCA 得分图 (图 5),可以看出样品的分类结果与 HCA 结果一致。以第 1~3 主成分得分做散点图,图中 22 批胡黄连药材整体分布较近,说明质量差异不大。PCA 结果与 HCA 的结果相互得以印证。

表 4 特征值和方差贡献率

Table 4 Characteristic value and variance contribution rate

峰号	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差的贡献率/%	累积贡献率/%	合计	方差的贡献率/%	累积贡献率/%
1	7.632	50.879	50.879	7.632	50.879	50.879
2	2.026	13.505	64.384	2.026	13.505	64.384
3	1.696	11.309	75.693	1.696	11.309	75.693
4	1.298	8.651	84.344	1.298	8.651	84.344
⋮	⋮	⋮	⋮			
16	0.015	0.098	100.000			

表 5 初始因子载荷矩阵

Table 5 Component matrix

峰号	主成分			
	1	2	3	4
1	0.544	0.607	-0.149	-0.317
2	0.161	0.641	0.380	-0.340
3	-0.516	0.371	0.330	0.656
4	0.913	0.005	-0.131	0.283
5	-0.058	0.598	-0.589	0.345
6	0.782	0.336	-0.091	0.226
7	0.969	0.057	-0.070	-0.025
8	0.310	0.389	0.788	0.025
9	0.713	0.370	-0.344	-0.287
11	0.809	-0.365	0.000	0.094
12	0.836	-0.384	0.224	0.025
13	0.858	0.054	0.299	0.246
14	0.926	-0.184	-0.222	-0.129
15	0.640	-0.131	0.335	-0.247
16	0.834	-0.108	-0.045	0.410

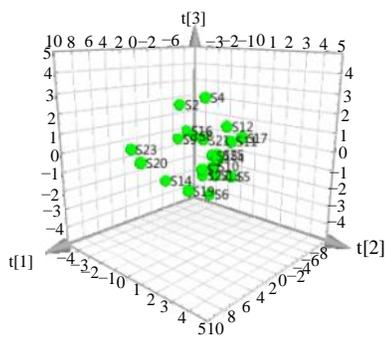
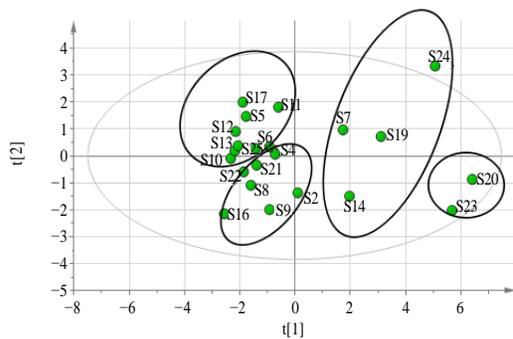


图 5 胡黄连药材 PCA 结果

Fig. 5 PCA results of *P. scrophulariiflora*

2.7.3 偏最小二乘判别分析 PCA 和 PLS-DA 得分图 (图 6-A 表明 22 批胡黄连之间有一定的区别, 说明不同批胡黄连在部分化学成分量上具有一定的差异性。根据 PLS-DA 模型的 VIP 值来筛选导致差异性的主要化学成分。一般认为 $VIP > 1$ 的变量对分类起着关键作用。结果见图 6-B。5、1、12、9 号峰的 VIP 均大于 1。说明它们为造成样品组间差异的主要色谱峰。经指认 1、12、9 号峰分别为藏黄连酚苷 C、胡黄连苷 III 和胡黄连苷 I, 5 号峰还有待鉴别确认。

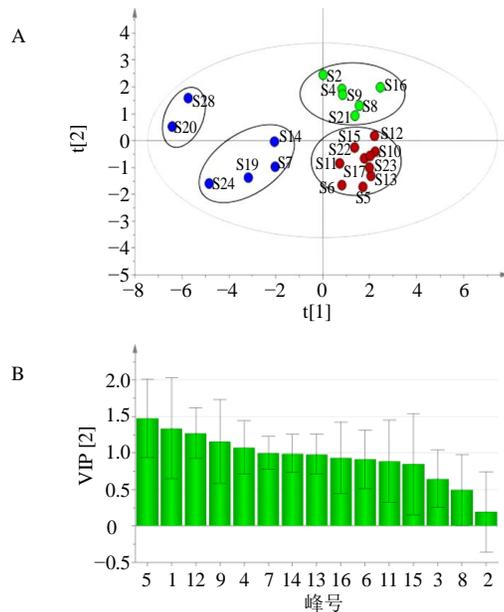


图 6 胡黄连药材 PLS-DA 得分图 (A) 和 VIP 图 (B)

Fig. 6 PLS-DA (A) and VIP (B) results of *P. scrophulariiflora*

3 讨论

3.1 实验条件的优化

本实验对供试品溶液制备中提取溶剂、提取时间、提取料液比均进行了考察, 以色谱峰数、峰分离度和基线平稳程度为主要因素, 同时考虑节约能源, 选择样品量 0.15 g, 10% 甲醇超声提取 30 min 作为供试品溶液的制备方法。

考察了不同有机相(乙腈、甲醇),不同水相(0.1%甲酸、0.5%乙酸、2 mmol/L 乙酸铵),不同的色谱柱温度(30、32、35、37、40 °C),不同的色谱柱 [Acquity UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、Acquity UPLC BEH C1 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Cortecs UPLC C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm)]对指纹图谱的影响,最终选择乙腈为有机相,0.5% 乙酸为水相进行梯度洗脱,色谱柱温度为 32 °C,Acquity UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)为色谱柱,此条件下基线较平稳,色谱峰峰数较多,峰形较好,分离效果较佳。采用 PDA 检测器对样品进行全波长扫描,比较各波长下指纹图谱的峰数、基线及响应值,最终选择 295 nm 为检测波长。

3.2 胡黄连识别方法的比较

22 批样品建立不同产地胡黄连指纹图谱,共确认 16 个共有峰,从所得图谱可知各批次药材的共有峰保留时间差异较小,但峰面积却有一定差异,表明不同批次胡黄连之间部分化学成分的量有所不同。但根据其相似度可以看出,22 批药材的相似度计算结果均大于 0.93,说明各批次药材质量相对稳定,有较好的一致性。且 PCA 三维得分图也显示各批样品质量差异不大。HCA 将 22 批胡黄连药材聚为 3 类,分类存在产地交叉现象,说明分类结果与产地无关。分析原因可能是在化学成分的量上具有一定的差异导致。通过 PLS-DA 分析找出了影响样品分组的 4 个差异性较大的成分。这样能更全面地反映出样品与样品、样品与变量之间关系。其中文献报道胡黄连苷 I 和胡黄连苷 III 具有保肝、降酶的作用^[23],藏黄连苷 C 推测有抗哮喘作用^[2]。主成分的分类结果与聚类结果基本保持一致,S20 和 S23 较偏离其他样品,这与 22 批样品的相似度结果基本一致,进一步验证了所建指纹图谱的可靠性和准确性。

3.3 小结

本实验首次建立胡黄连药材 UPLC 指纹图谱,明显缩短了分析时间,样品的出峰数目、强度及分离度均较理想,可以较全面反映出样品的化学成分信息,且能较好的区分胡黄连与其混淆品,符合指纹图谱研究的技术要求。结合色谱信息及质谱信息对胡黄连中 28 个成分进行了鉴定,为深入研究胡黄连的物质基础和质量标准的提升提供有力的技术支持。进一步结合相似度计算、聚类分析和 PCA 对指

纹图谱进行的综合评价,较之单一的测定更为全面准确,可用于胡黄连药材质量的评价和控制。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘志春. 西藏胡黄连的化学成分研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2010, 28(5): 321-324.
- [3] 刘小莉, 李 戈, 杨礼攀, 等. 濒危藏药胡黄连的资源现状和保护对策 [J]. 云南中医学院学报, 2008, 31(6): 3-6.
- [4] 杨少华, 徐中志, 孙 蓉, 等. 云南栽培胡黄连与野生胡黄连有效成份分析 [J]. 云南中医学院学报, 2009, 32(4): 37-39.
- [5] 吴艳苹. 洪连与胡黄连的比较 [J]. 继续医学教育, 2014, (6): 49-50.
- [6] 王 菁, 张朝晖, 戴永健, 等. HPLC 测定胡黄连中胡黄连甙-II 的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(5): 368-370.
- [7] 鄢国庆, 张小茜. 胡黄连质量评价方法的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(12): 1886-1888.
- [8] 周 菲, 倪 健. HPLC 法测定市售胡黄连中胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II [J]. 中草药, 2010, 41(4): 658-660.
- [9] 何希瑞, 李 倩, 张春玲, 等. 胡黄连化学成分及单体化合物药理活性研究新进展 [J]. 环球中医药, 2012, 5(9): 708-713.
- [10] Li J X, Li P, Tezuka Y, et al. Three phenylethanoid glycosides and an iridoid glycoside from *Picrorhiza scrophulariiflora* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(3): 537.
- [11] 李存满, 骆亚薇, 田宝勇. 环烯醚萜类化合物的质谱裂解规律研究进展 [J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2015(6): 522-526.
- [12] 刘时乔, 张新鑫, 单 淇, 等. 胡黄连中酚类化合物的分离及 UPLC-ESI-MS 分析 [J]. 天津中医药, 2012, 29(6): 583-587.
- [13] Zhu T F, Huang K Y, Deng X M, et al. Three new caffeoyl glycosides from the roots of *Picrorhiza scrophulariiflora* [J]. *Molecules*, 2008, 13(4): 729-739.
- [14] Li C, Liu Y, Abdulla R, et al. Characterization and identification of chemical components in *Neopicrorhiza scrophulariiflora* roots by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(11): 3634-3643.
- [15] Wu Q, Yuan Q, Liu E H, et al. Fragmentation study of iridoid glycosides and phenylpropanoid glycosides in *Radix Scrophulariae* by rapid resolution liquid chromatography with diode-array detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry

- [J]. *Biomedical Chromatography*, 2010, 24(8): 808-819.
- [16] 胡云飞, 裴月梅, 吴虹, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术研究不同产地牡丹皮药材化学成分的差异 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 2984-2992.
- [17] 黄胜雄. 西藏胡黄连的化学成分和提取工艺研究 [D]. 成都: 中国科学院成都生物研究所, 2004.
- [18] Pan S, Hong J L, Gang W, *et al.* Analysis of flavonoids and phenolic acids in *Iris tectorum* by HPLC-DAD-ESI-MS [J]. *Chin J Nat Med*, 2010, 8(3): 202-207.
- [19] 陈千良, 石张燕, 涂光忠, 等. 陕西产秦艽的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(19): 1519-1522.
- [20] Jia Q, Hong M F, Minter D. Pikuroside: A novel iridoid from *Picrorhiza kurroa* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(6): 901-906.
- [21] Kumar V, Mehrotra N, Lal J, *et al.* Pattern profiling of the herbal preparation picroliv using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatography A*, 2004, 1045(1/2): 145-149.
- [22] 谢智勇, 胡红侠, 孔德云, 等. 西藏胡黄连中两个新化合物的鉴定 [J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(3): 221-226.
- [23] Zhu J, Xue B, Ma B, *et al.* A pre-clinical pharmacokinetic study in rats of three naturally occurring iridoid glycosides, Picroside-I, II and III, using a validated simultaneous HPLC-MS/MS assay [J]. *J Chromatography B*, 2015, 993/994(8): 47-59.