

红花 UPLC 法特征指纹图谱研究

李彤彤¹, 韩红园¹, 王宝丽¹, 张 博¹, 程 钱¹, 贾子尧¹, 李 鹏², 邹秦文³, 林瑞超^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 中药品质评价北京市重点实验室, 北京 100102

2. 福建医科大学药学院 天然药物学系, 福建 福州 350108

3. 北京联馨药业有限公司, 北京 102600

摘 要: 目的 建立红花 *Carthamus tinctorius* 超高效液相色谱 (UPLC) 指纹图谱, 为评价不同产地和不同品种红花的质量提供参考。方法 对产地来自新疆和河南共 34 批红花样品应用 UPLC 建立其指纹图谱, 按“中药指纹图谱相似度评价系统”建立对照图谱, 并进行相似度评价。运用 SAS 9.30 和 Matlab 软件对新疆不同品种和不同产地红花的 UPLC 指纹图谱特征峰进行聚类分析和主成分分析。结果 建立了红花药材的专属性 UPLC 指纹图谱, 确立了 26 个共有峰; 30 批新疆红花样品和 4 批河南红花样品质量差异较大, 新疆不同产地间和同一产地不同品种间具有一定差异。聚类分析和主成分分析均实现了新疆红花指纹图谱差异的识别。结论 该方法简便、高效、可靠, 为红花药材的质量控制提供了有效的快速评价方法。

关键词: 红花; 指纹图谱; UPLC; 质量控制; 相似性分析

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)05-0997-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.026

UPLC characteristic chromatographic profile of *Carthamus tinctorius*

LI Tong-tong¹, HAN Hong-yuan¹, WANG Bao-li¹, ZHANG Bo¹, CHENG Qian¹, JIA Zi-yao¹, LI Peng², ZOU Qin-wen³, LIN Rui-chao¹

1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Traditional Chinese Medicine Quality Evaluation of the Key Laboratory of Beijing, Beijing 100102, China

2. Natural Medicine Department of Fujian Medical University School of Medicine, Fuzhou 350108, China

3. Beijing Lianxin Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 102600, China

Abstract: Objective To establish fingerprint analysis method by UPLC for the quality control of *Carthamus tinctorius*, and provide comprehensive evaluation of their quality in different regions and different varieties. **Methods** The software “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCMs” (Version 2010A) was employed to generate the mean chromatogram and carry out the similarity analysis of the samples. Cluster analysis was adopted in combination with principal component analysis to study 30 batches from Xinjiang *C. tinctorius* characteristic common peaks and to differentiate the *Carthamus tinctorius* L resources. **Results** A specific UPLC fingerprint of *C. tinctorius* from Xinjiang province had been set up and established and 26 common peaks were designated. The results showed that the qualities of 30 batches of samples from Xinjiang province and four sets from Henan have significant differences and the samples collected different varieties from same region and different regions both had certainly differences. The difference among chromatographic fingerprints of *C. tinctorius* samples were identified by cluster analysis and principal component analysis. **Conclusion** UPLC fingerprint is an available, convenient, and reliable method, which can be used to access the quality of *C. tinctorius*.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; fingerprint; UPLC; quality control; similarity analysis

红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 夏季花由黄变红时采摘, 阴干或晒干^[1]。红花味辛, 性温, 归心、肝经, 有活血通经、散瘀止痛的功能, 用于闭经、痛经、恶露不行、症瘕痞

块、跌打损伤、疮疡肿毒^[2]。红花又名红蓝花 (《金匱要略》)、黄蓝 (《博物志》)、刺红花 (《四川中药志》)、草红花 (《陕西中药志》)^[3], 始载于《开宝本草》, 《神农本草经》中列为中品。

收稿日期: 2016-08-19

作者简介: 李彤彤 (1992—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药资源与质量控制。Tel: 17801085455 E-mail: 15142308558@163.com

*通信作者 林瑞超, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药化学成分及质量控制研究。Tel: (010)84738653 E-mail: linrch307@sina.com

红花易栽培,喜温暖气候,适应力较强,耐旱、耐盐碱、忌涝,主产于新疆、河南,另外四川、云南、安徽、江苏和浙江等省少量有产。自 20 世纪 80 年代起,新疆红花产量较大,高达 80%;河南自张骞出使西域以来一直作为最悠久的道地产区,品种培育和产量位于新疆之后。新疆红花主产区主要有 3 个地区:塔城地区、伊犁地区和昌吉州地区,新疆每年总种植面积约 4 万公顷左右,其中塔城地区种植最大,约占 60%~70%,种植面积达 2.5 万公顷,主要分布在 3 个县:裕民县、额敏县和托里县;其次为伊犁地区,种植面积 1.3 万多公顷;最后为昌吉地区,约 6 千多公顷。河南主要产区为新乡市卫辉县和延津县以及商丘市的宁陵县和柘城县,约几千公顷。然而从未见新疆产和河南产红花药材整体对比,红花和红花籽用途广泛,可用作药物、油料、食用、天然染料、饲料、化妆品等。由于红花独特的药用和保健价值,目前国内外对红花的需求量日益增加,因此控制红花药材的内在质量^[4]已成为当务之急。

近年来,液相指纹图谱技术已经广泛应用于中药材鉴别和质量评价研究,取得较好的效果^[5-8]。美国 FDA 近些年制定的植物草药指南中已经明确把指纹图谱作为这类混合物质群的质量控制方法。同样欧洲也将色谱指纹图谱作为植物药制剂的评价方法。已有报道红花药材 HPLC 指纹图谱,但信息量不大,分析时间过长,未能较为全面表征红花药材成分。因此本实验建立了红花药材 UPLC 指纹图谱分析方法,具有更高的分离速度、精确度与灵敏度,为高效、快速地评价红花药材的质量提供参考。本实验对新疆产 30 批、河南产 4 批不同产地的红花质量进行了对比。对 30 批新疆不同产地不同品种的红花进行了 UPLC 指纹图谱的对比研究,在数据化处理的基础上,结合相似度评价的方法,进行药材质量分析和评价,以期能更为全面地控制红花药材的质量。旨在为评价新疆和河南 2 个最主要产区红花的质量提供科学依据,为筛选出优良品种和红花产地奠定基础。

1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱系统,配有四元超高压溶剂系统、自动进样恒温样本管理器、柱温箱、PDA 检测器、Empover 色谱工作站;1/10 万电子分析天平(BT224S 型,德国赛多利斯科学

仪器公司);中药粉碎机(DFT-50 型,温岭市林大机械有限公司)。

乙腈为色谱纯;磷酸等试剂为分析纯;屈臣氏蒸馏水;0.22 μm 微孔滤膜(津腾公司);羟基红花黄色素(批号 111637-201308)。

红花药材于 2015 年 6~8 月采于新疆和河南原产地,经北京中医药大学林瑞超教授鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,采收后就地阴干 2~4 d 至恒定质量,密封保存,临用前过 60 目筛,红花样品信息见表 1。

2 方法

2.1 色谱条件

Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);流动相为 0.5%磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,0~2 min, 5%~10% B; 2~10 min, 10%~20% B; 10~16 min, 20%~40% B; 16~20 min, 40%~5% B;检测波长 275 nm;体积流量 0.2 mL/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 2 μL 。

2.2 对照品溶液制备

称取适量羟基红花黄色素 A 对照品置量瓶中,加蒸馏水制成质量浓度为 0.50 mg/mL 的溶液,0.22 μm 微孔滤膜滤过即得。

2.3 供试品溶液制备

取干燥的红花药材,粉碎后过 3 号筛,精密称定样品粉末 2.0 g,置平底烧瓶中,加蒸馏水 50 mL,称定质量,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中提取 1 h,称定质量,补足减失质量,滤过,量取续滤液 10 mL,微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 S1 号样品制备的供试品溶液连续进样 6 次,按“2.1”项色谱条件检测指纹图谱。以羟基红花黄色素 A 为参比峰,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性,结果表明各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 $<2\%$,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱的检测要求。

2.4.2 重复性试验 取 S1 号红花样品 6 份,按供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件检测,以羟基红花黄色素 A 的色谱峰为参比峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 $<3\%$,表明该方法具有较好的重复性。

表 1 药材来源
Table 1 Sources of materials tested

样品编号	药材产地	品种	采集时间	地形
S1	新疆乌鲁木齐米东区	云南红花	2015-07	旱地
S2	新疆乌鲁木齐米东区	吉红一号	2015-07	旱地
S3	新疆乌鲁木齐市水磨沟区	吉红一号	2015-07	旱地
S4	新疆昌吉州奇台县碧流河乡	云南大头	2015-07	旱地
S5	新疆昌吉州奇台县碧流河乡	云南大头	2015-07	旱地
S6	新疆昌吉州奇台县碧流河乡	云南大头	2015-07	旱地
S7	新疆昌吉州奇台县吉布库镇	云南大头	2015-07	旱地
S8	新疆昌吉州奇台县吉布库镇	云南大头	2015-07	旱地
S9	新疆昌吉州奇台县吉布库镇	云南大头	2015-07	水浇地
S10	新疆昌吉州吉木萨尔县二工乡	云南大头	2015-07	水浇地
S11	新疆昌吉州吉木萨尔县泉子街镇	云南大头	2015-07	旱地
S12	新疆塔城地区裕民县江格斯乡	云南大头	2015-07	旱地
S13	新疆塔城地区裕民县江格斯乡	云南矮大头	2015-07	旱地
S14	新疆塔城地区裕民县江格斯乡	云南大头	2015-07	旱地
S15	新疆塔城地区裕民县察汗托海牧场	云南大头	2015-07	旱地
S16	新疆塔城地区裕民县察汗托海牧场	云南大头	2015-07	旱地
S17	新疆塔城地区裕民县哈拉布拉乡	云南大头	2015-07	水浇地
S18	新疆塔城地区裕民县哈拉布拉乡	宾红三号	2015-07	水浇地
S19	新疆塔城地区裕民县哈拉布拉乡	云南大头	2015-07	旱地
S20	新疆塔城地区额敏县一六六团八连	云南红花	2015-07	旱地
S21	新疆塔城地区额敏县一六六团一连	云南矮大头	2015-07	旱地
S22	新疆塔城地区托里县多拉特乡	云南大头	2015-07	旱地
S23	新疆塔城地区托里县	宾红三号	2015-07	水浇地
S24	新疆塔城地区托里县一七零团五连	云南红花	2015-07	水浇地
S25	新疆塔城地区托里县乌雪特乡	云南大头	2015-07	水浇地
S26	新疆伊犁地区霍尔果斯市	宾红三号	2015-07	旱地
S27	新疆伊犁地区霍城县果子沟乡	云南大头	2015-07	旱地
S28	新疆伊犁地区霍城县芦草沟乡	云南大头	2015-07	水浇地
S29	新疆伊犁地区霍城县清水河镇	自留种子	2015-07	旱地
S30	新疆伊犁地区察布查尔锡伯自治州琼博拉乡	自留种子	2015-07	旱地
S31	河南省新乡卫辉市	卫辉红花	2015-06	水浇地
S32	河南省新乡市延津县	延津红花	2015-06	水浇地
S33	河南省商丘市宁陵县	自留种子	2015-06	水浇地
S34	河南省商丘市柘城县	自留种子	2015-06	水浇地

2.4.3 稳定性试验 取 S1 号红花样品制备的供试品溶液, 分别于 0、4、8、12、16、24 h 进样检测指纹图谱, 以羟基红花黄色素 A 的色谱峰为参比峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果表明, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均在 2% 以下, 表明样品溶液在 24 h 内稳定, 符合指纹图谱检测要求。

2.5 样品的测定

将 34 批红花样品按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定 UPLC 图。

2.6 数据处理

采用国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统 2012.1 版本》软件进行处理。S12 号样品色谱图中色谱峰形好、分离度良好, 基线平整, 故选

择其为参照指纹图谱。为减小极端数据的影响,选择中位数法作为对照指纹图谱生成方法,时间窗宽度设为 0.1,运用多点校正方法对色谱峰进行全谱峰匹配,并计算红花样品和红花对照图谱的相似度。应用 SAS 9.30 统计软件对新疆各产地指纹图谱数据进行聚类分析和主成分分析,用于实现红花 UPLC 指纹图谱差异的模式识别。

3 结果与分析

3.1 新疆和河南产红花 UPLC 图谱质量控制研究

3.1.1 新疆和河南红花质量评价 笔者采集新疆原产地样品 30 份,覆盖全新疆 80%以上红花资源,采集河南原产地样品 4 份,覆盖全河南 80%以上红花资源,34 批样品全谱峰匹配见图 1-A,并生成 30 批新疆产(图 1-B)和 4 批河南产(图 1-C)红花样品的对照图谱,4 批河南产红花的 UPLC 图谱与河南产红花对照图谱及新疆红花对照图谱的相似度结果见表 2。4 批河南产红花样本与河南红花对照图谱相似度均大于 0.950,可为河南产红花药材的质量评价研究提供参考。4 批河南产红花样品和新疆对照图谱相似性较低,均小于 0.790,亦说明河南红花和新疆红花 UPLC 指纹图谱存在着较大的差异。对所建立的新疆和河南的对照图谱进行分析比较,以河南产红花对照图谱为标记见图 1-C, a、b 峰在新疆样品中均未检测到, c、e 峰明显小于新疆样品, d 峰在河南产样品中此色谱条件下分离更好。以峰面积标示量,通过纵坐标响应值和积分面积观察河南和新疆产的差异主要在于各峰峰面积,可用于鉴别新疆和河南产红花药材。

3.1.2 新疆不同产地不同品种红花特征峰 选取 30 批样品 UPLC 图谱中共有的、稳定性好、在红花对照图谱中峰面积大于总色谱峰面积的 1%且分离度较好的峰作为特征峰,共 26 个(图 2)。其中 9 号峰为羟基红花黄色素 A,保留时间适中、分离效果较好且峰面积最大,因此选 9 号峰为参比峰。

3.1.3 新疆红花特征峰相对保留时间及相对峰面积 从 30 批红花样品的指纹图谱中共得到 26 个共有峰,见图 2,通过与对照品色谱图中的保留时间比对,初步可指认 1 个共有峰,其中羟基红花黄色素 A(9 号峰)分离度好,峰位居中、峰面积最大,又是红花中主要药理活性成分,故以其为参照峰,计算其余各共有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 1.36%,表明方法的重复性较好。相对峰面积 RSD 在 0~158.57%,相对峰面积差

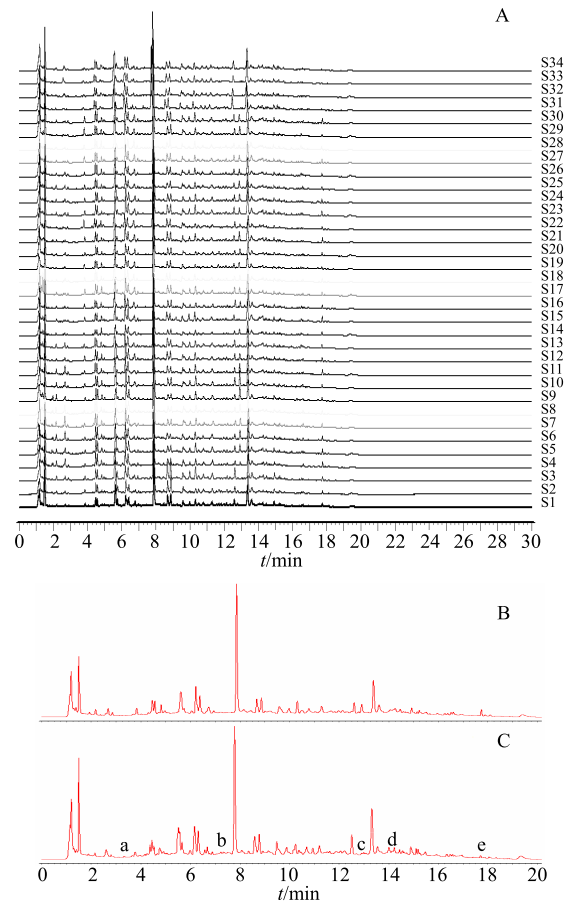


图 1 34 批新疆和河南产药材色谱峰匹配图 (A)、新疆 30 批对照图谱 (B) 和河南 4 批对照图谱 (C)

Fig. 1 UPLC match chromatograms of 34 batches of *C. tinctorius* (A) and UPLC contrast chromatograms of 30 batches from Xinjiang (B) and four batches from Henan (C)

表 2 河南红花各样品与新疆和河南对照图谱的相似度结果
Table 2 Results of similarity evaluation of *C. tinctorius* from Henan with two common UPLC fingerprints

编号	相似度	
	河南红花对照图谱	新疆红花对照图谱
S31	0.968	0.467
S32	0.958	0.774
S33	0.976	0.756
S34	0.980	0.787

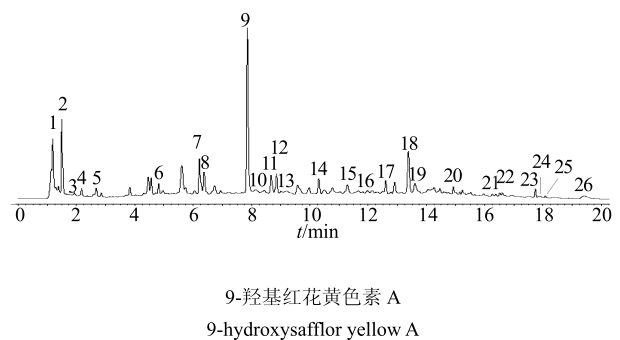


图 2 新疆产红花药材的共有模式图

Fig. 2 Total pattern diagram of *C. tinctorius* from Xinjiang

异较大, 表明各样品间差异较大。

3.1.4 新疆不同产地、不同品种红花指纹图谱相似度评价 30 批新疆红花药材的 UPLC 图谱相似度结果见表 3。30 批新疆红花药材与对照指纹图谱的相似度在 0.895~0.947, 相似性较好, 除 S21、S22、S28 外, 其余各产地的相似度均大于 0.900, 基本符合中国药典中药质量标准研究制定技术要求, 可作为新疆产红花的标准图谱。S21、S22、S28 所用

红花药材的产地分别为新疆塔城地区额敏县一六六团一连云南矮大头、新疆塔城地区托里县多拉特乡云南大头、新疆伊犁地区霍城县芦草沟乡云南大头。表明 3 个产地的红花较新疆其他产地的红花在质量上具有一定的差异性。其中, S2、S4、S6~S9、S11~S14、S16、S20、S23~S24 与对照指纹图谱的相似度均大于 0.930, 相似度较好, 质量较为均匀。

表 3 新疆红花药材指纹图谱相似度评价
Table 3 Fingerprint similarity of *C. tinctorius*

样品号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	R
S1	1																														
S2	0.940	1																													
S3	0.835	0.886	1																												
S4	0.860	0.900	0.922	1																											
S5	0.928	0.889	0.824	0.894	1																										
S6	0.875	0.889	0.862	0.892	0.864	1																									
S7	0.899	0.912	0.855	0.916	0.906	0.891	1																								
S8	0.892	0.928	0.874	0.935	0.899	0.89	0.965	1																							
S9	0.910	0.898	0.847	0.909	0.943	0.88	0.906	0.923	1																						
S10	0.908	0.891	0.829	0.882	0.934	0.861	0.908	0.911	0.958	1																					
S11	0.825	0.833	0.896	0.914	0.837	0.886	0.875	0.869	0.841	0.831	1																				
S12	0.875	0.892	0.849	0.874	0.874	0.941	0.896	0.886	0.882	0.888	0.886	1																			
S13	0.843	0.827	0.834	0.839	0.828	0.875	0.826	0.823	0.842	0.850	0.887	0.875	1																		
S14	0.886	0.863	0.839	0.863	0.899	0.88	0.895	0.877	0.913	0.912	0.882	0.901	0.884	1																	
S15	0.806	0.814	0.825	0.842	0.772	0.816	0.805	0.804	0.792	0.778	0.846	0.806	0.821	0.828	1																
S16	0.854	0.885	0.865	0.909	0.855	0.869	0.884	0.908	0.881	0.875	0.837	0.853	0.895	0.856	0.827	1															
S17	0.841	0.834	0.891	0.885	0.863	0.86	0.827	0.835	0.886	0.872	0.906	0.885	0.872	0.912	0.830	0.834	1														
S18	0.809	0.828	0.793	0.828	0.782	0.849	0.833	0.837	0.804	0.794	0.836	0.835	0.861	0.821	0.843	0.884	0.814	1													
S19	0.788	0.806	0.826	0.849	0.771	0.819	0.812	0.812	0.803	0.792	0.853	0.809	0.836	0.843	0.920	0.817	0.838	0.832	1												
S20	0.869	0.908	0.902	0.964	0.888	0.867	0.895	0.916	0.901	0.887	0.889	0.884	0.849	0.883	0.849	0.925	0.892	0.831	0.859	1											
S21	0.792	0.790	0.807	0.805	0.787	0.849	0.783	0.789	0.805	0.783	0.834	0.835	0.869	0.822	0.841	0.843	0.833	0.822	0.859	0.794	1										
S22	0.793	0.827	0.792	0.835	0.778	0.852	0.819	0.825	0.796	0.792	0.822	0.840	0.876	0.815	0.809	0.887	0.794	0.898	0.799	0.838	0.803	1									
S23	0.827	0.826	0.864	0.867	0.835	0.861	0.807	0.804	0.846	0.843	0.888	0.871	0.874	0.883	0.869	0.813	0.895	0.806	0.905	0.870	0.887	0.793	1								
S24	0.923	0.893	0.825	0.858	0.908	0.882	0.886	0.870	0.911	0.921	0.870	0.886	0.879	0.936	0.796	0.836	0.882	0.800	0.816	0.858	0.810	0.794	0.863	1							
S25	0.809	0.827	0.831	0.850	0.796	0.815	0.836	0.825	0.803	0.800	0.864	0.805	0.850	0.849	0.916	0.814	0.828	0.856	0.926	0.861	0.812	0.802	0.889	0.817	1						
S26	0.805	0.810	0.830	0.850	0.801	0.815	0.831	0.821	0.806	0.796	0.865	0.790	0.842	0.834	0.914	0.808	0.834	0.854	0.931	0.852	0.817	0.800	0.876	0.819	0.973	1					
S27	0.810	0.807	0.819	0.841	0.793	0.813	0.813	0.810	0.807	0.797	0.853	0.793	0.835	0.855	0.942	0.809	0.831	0.842	0.938	0.850	0.831	0.811	0.900	0.823	0.952	0.944	1				
S28	0.785	0.799	0.756	0.784	0.754	0.790	0.777	0.774	0.778	0.772	0.777	0.779	0.855	0.813	0.897	0.840	0.772	0.903	0.860	0.800	0.826	0.879	0.837	0.794	0.866	0.863	0.891	1			
S29	0.812	0.803	0.818	0.818	0.807	0.857	0.805	0.808	0.824	0.836	0.862	0.849	0.946	0.862	0.782	0.885	0.866	0.859	0.796	0.825	0.852	0.874	0.851	0.858	0.800	0.808	0.801	0.854	1		
S30	0.804	0.798	0.831	0.834	0.788	0.813	0.804	0.802	0.796	0.776	0.870	0.807	0.828	0.819	0.937	0.808	0.837	0.835	0.902	0.845	0.850	0.789	0.894	0.794	0.914	0.926	0.953	0.864	0.804	1	
R	0.924	0.931	0.918	0.947	0.921	0.935	0.934	0.936	0.934	0.927	0.936	0.933	0.931	0.941	0.913	0.932	0.929	0.907	0.916	0.947	0.895	0.895	0.932	0.931	0.923	0.920	0.922	0.891	0.909	0.914	1

3.2 UPLC 图谱品种识别研究

3.2.1 聚类分析 将新疆 30 份样品 26 个特征峰峰面积导入 SAS 9.30 软件, 形成 26×30 阶数据矩阵, 采用欧氏距离法类平均法作为样品聚类依据。聚类分析结果见图 3。

当判别条件距离为 15 时, 30 批红花样品被分为 2 大类: 一类包含 S3~S13、S23、S27、S30, 即新疆昌吉地区加塔城和伊犁 2 个产地红花被聚到

一类, 另一类包含 S1、S2、S14~S22、S24~26、S28、S 29, 即大部分塔城地区和伊犁地区红花被聚为一类。S12、S13、S23、S27、S30 未与其所属聚为一类, 表明即使是同一产地所产红花药材, 质量也不尽相同, 和指纹图谱相似度结果相似。

3.2.2 主成分分析 用 Matlab 软件对各共有峰峰面积进行标准化处理后, 对 30 批红花样品指纹图谱所得的 26 个共有峰进行主成分分析, 求出相关矩阵

的特征值及其方差,见表 4。前 3 个因子的累积方差贡献率达到 74.17%,大于 70%。样本间内在的相互关系可较好地表现出来,进而实现样本之间的分类。可代替红花指纹图谱 26 个共有峰的大部分信

息,故选取第 1、2、3 个因子分别作为主成分 1、2 和 3。

主成分载荷矩阵反映了各变量对主成分的贡献大小和方向。由表 5 可见,26 个变量对主成分 1 的

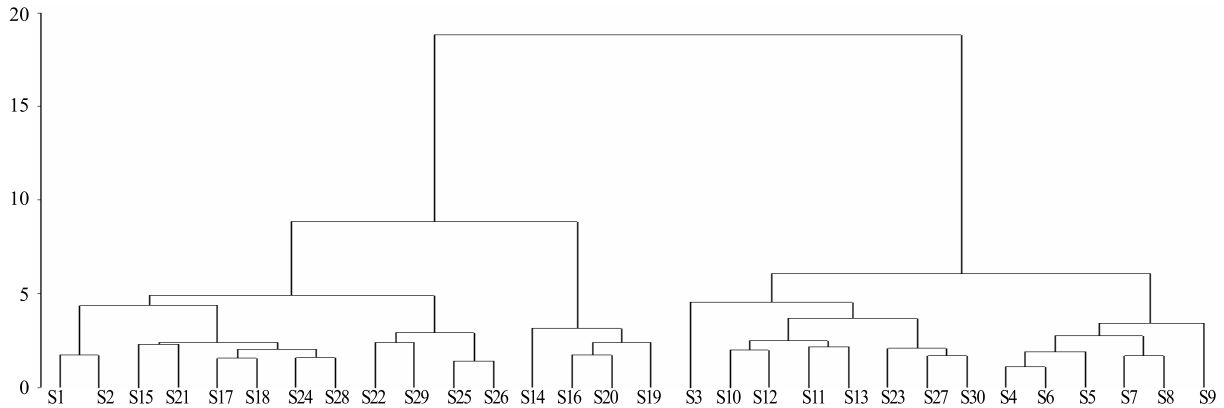


图 3 聚类分析结果

Fig. 3 Results of hierarchical cluster analysis

表 4 主成分特征值及方差

Table 4 Eigen value and total variance of principal component

峰号	特征根值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	13.948	53.65	53.65
2	3.067	11.80	65.44
3	2.269	8.73	74.17
...	...	...	...
26	0.000	0.00	1.00

正负相关,其中以共有峰 5、13 和 3 对其的贡献最大,且共有峰 13 和 3 与主成分 1 呈负相关;共有峰 5、9 和 12 对主成分 2 贡献最大;共有峰 17、7 和 14 对主成分 3 的贡献最大,且共有峰 14 与主成分 3 呈负相关。

对上述主成分载荷值进行计算,得出各主成分的线性模型,将各样本数据带入模型,得到各批次样本的主成分得分,见表 6;并以样品的第 1、2、3 主成分得分做三维散点图,见图 4。

图 4 中 30 批新疆样品整体分布较近,说明质量差异不大。其中样品 S4~S9、S10~S13 分布较近,说明昌吉州地区和部分塔城地区红花质量较为接近;S1~S3 样品分布较近,说明乌鲁木齐市产红花药材质量接近;而 S23 批产地为塔城托里县宾红三号样品分布位置较为独立。

4 讨论

4.1 实验条件的优化

本实验对供试品溶液制备中提取溶剂、提取方法、提取时间、提取液料比均进行了考察。结果显

表 5 主成分载荷矩阵

Table 5 Component matrix

共有峰	主成分		
	1	2	3
1	0.17	0.12	0.18
2	0.00	0.27	-0.25
3	-0.27	-0.14	-0.27
4	0.18	-0.03	-0.07
5	0.46	0.59	-0.14
6	-0.13	-0.04	-0.02
7	-0.18	0.07	0.41
8	0.16	0.13	0.13
9	-0.21	0.34	-0.05
10	-0.22	-0.16	0.23
11	-0.03	0.00	-0.07
12	-0.03	0.31	-0.22
13	-0.30	0.17	-0.14
14	-0.11	-0.04	-0.28
15	0.14	-0.22	-0.01
16	-0.06	0.11	0.08
17	-0.09	0.20	0.48
18	0.00	-0.03	-0.17
19	-0.23	0.11	-0.16
20	-0.40	0.21	-0.06
21	-0.13	0.23	0.24
22	0.08	-0.07	0.04
23	0.00	0.05	0.13
24	0.33	-0.14	-0.06
25	0.03	0.08	0.21
26	0.08	0.08	0.10

表 6 样本主成分得分
Table 6 PCA score of samples

样品号	主成分 1	主成分 2	主成分 3
1	-3.84	1.02	2.35
2	-2.99	2.46	0.53
3	2.82	5.04	2.05
4	4.94	-2.01	-0.96
5	5.12	-1.69	0.45
6	3.92	-1.63	-0.92
7	4.44	-0.14	-1.97
8	4.82	-0.68	-1.69
9	2.56	-3.63	0.06
10	3.39	0.54	-0.18
11	1.93	-0.98	0.05
12	1.68	-0.09	-1.27
13	0.03	0.06	0.23
14	-9.65	-2.35	0.42
15	-1.05	-0.89	2.28
16	-4.20	-0.76	0.69
17	-0.93	1.12	0.07
18	-1.73	-0.33	-0.22
19	-7.65	-0.51	-1.69
20	-5.57	-0.73	-0.71
21	-1.26	-0.90	1.68
22	-1.61	2.98	-3.53
23	3.64	-0.13	3.25
24	-0.27	-1.12	0.83
25	-1.43	-0.26	-1.87
26	-0.58	0.94	-1.50
27	0.89	0.39	0.45
28	-1.21	0.09	0.82
29	0.34	3.11	-1.06
30	3.44	1.11	1.36

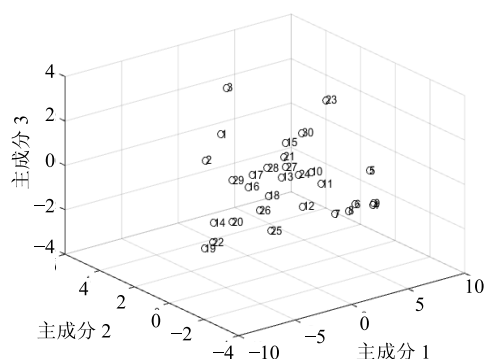


图 4 主成分得分图

Fig. 4 PCA score figure

示样品 90 ℃ 水浴回流 1 h, 指纹图谱信息量最大化, 峰数较多、峰形较好。

本实验比较了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.2%甲酸、乙腈-0.2%磷酸、乙腈-0.3%磷酸及乙腈-0.5%磷酸 6 种不同的流动相, 结果表明流动相乙腈-0.5%磷酸时检测出的色谱峰最多, 分离度最佳及峰对称性最好, 最终确定了洗脱条件。分析了 200~400 nm 全波

长扫描的图谱, 发现 275 nm 条件下的色谱峰较多且峰形较好, 故选择 275 nm 作为测定波长。考察了 25、30、35、40 ℃ 时柱温对色谱峰分离度的影响, 结果在 30 ℃ 柱温条件下, 分离效果较好。

羟基红花黄色素 A 在红花中质量分数最高, 是红花中主要有效成分, 因此选择羟基红花黄色素 A 为红花药材指纹图谱的参照峰。红花和红花注射制剂的质量标准, 一般是以羟基红花黄色素 A 的量为指标评价药材和制剂的质量, 但仅以羟基红花黄色素 A 作为指标不能客观地反映药材全貌。

UPLC 采用 1.7 μm 的超细色谱柱填料, 从而大大提高柱效, 具有高效、快速、灵敏的特点, 提高分析效率, 同时减少流动相消耗, 色谱峰易于匹配。本实验结果显示, UPLC 法可标示出 26 个共有峰, 且 UPLC 色谱方法的分离效果更好、灵敏度更高, 使红花药材中的物质在 20 min 内分离成为可能, 为快速评价红花药材的质量, 建立红花药材的 UPLC 特征指纹图谱分析方法, 完善红花的质量控制方法提供依据。

4.2 红花识别方法的比较

本实验在建立新疆产红花和河南产红花 UPLC 对照图谱的基础上, 比较了各样本的相似性。此方法较好地反映了新疆和河南红花 UPLC 指纹图谱的差异性。在此基础上, 应用聚类分析和主成分分析 2 种计量学方法对区分新疆红花不同品种展开了进一步研究, 将 UPLC 指纹图谱相似度评价与基于 UPLC 指纹图谱的数学识别模式结合起来使用, 可以相互补充和印证。实验结果也表明红花不同品种的化学成分存在一定的差异, 分析与红花原药材本身内在质量存在很大差异有关, 以及红花药材在加工、贮藏方法不一致有关。河南和新疆产的红花差异较大, 是由于新疆和河南种植品种不同, 并且主要由于 2 个产地地理位置相差较远, 气候特点、生长环境、栽培技术等各方面差别较大所致, 河南和新疆红花化学成分具有一定地域性, 以往研究仅以羟基红花黄色素 A 和山柰素量作为评价指标, 具有一定局限性。可以考虑在红花相关制剂生产中, 固定产地来源及药材品种等, 本研究建立的鉴别方法可为完善红花药材原材料及其制剂的行业标准提供实验依据, 进一步为红花的临床合理用药提供参考。对未知样品进行鉴别评价时, 只需按照本实验的色谱方法测定样品, 然后比较共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 值相近者则为该产区的红花药材,

该方法简单、快速。鉴于目前实验收集的样本数还相对较少,每个产品量不均衡,后续实验要进一步增加样本量,不断修正红花特征图谱;对于红花指纹图谱中共有峰的定性,还需要借助液质联用、核磁共振等手段进行进一步确认。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 肖培根. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [3] 曹学勤. 红花与藏红花 [J]. 内蒙古中医药, 2009, 23: 46-47.
- [4] Guidance for industry. *Botanical drug products* [M].

Draft Guidance: CDER/FDA, 2000.

- [5] 刘素香, 白雪, 刘毅, 等. 马鞭草 HPLC 指纹图谱建立及指标性成分的测定 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2069-2073.
- [6] 钟可, 王文全, 靳风云, 等. 知母的 HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2747-2750.
- [7] 田妍妍, 周桂荣, 霍志鹏, 等. UPLC 法测定羊耳菊中 7 种成分及其指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2353-2359.
- [8] 姚建标, 金辉辉, 何厚洪, 等. 西红花特征图谱研究及真伪鉴别 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1378-1380.