

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.01.019

不同生长年限虎杖高效液相色谱指纹图谱研究

何风云, 彭珊艳[△], 周爽, 李有富

(湖北省襄阳市中心医院, 湖北 襄阳 441000)

摘要:目的 建立不同生长年限虎杖的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 比较其化学成分的差异。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 286 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 20 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版软件建立 25 批(采收时间分别为移植后第 1, 2, 3, 4, 5 年, 各 5 批)虎杖的 HPLC 指纹图谱, 计算相似度; 采用 SIMCA-P 14.1 软件建立偏最小二乘判别分析(PLS-DA)模型, 分析其中化学成分的差异。结果 共标定 19 个共有峰, 相似度为 0.906~0.993。不同生长年限虎杖明显聚为 5 类, 共筛选出 6 个差异标记物, 按影响大小依次为峰 15 > 峰 6(虎杖苷) > 峰 8(白藜芦醇) > 峰 17(大黄素) > 峰 5 > 峰 1。结论 HPLC 指纹图谱结合 PLS-DA 法能反映不同生长年限虎杖化学成分的差异, 可为其采收和质量评价提供参考。

关键词: 虎杖; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 偏最小二乘判别分析; 生长年限

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)01-0079-05

HPLC Fingerprint of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* with Different Growth Years

HE Fengyun, PENG Shanyan, ZHOU Shuang, LI Youfu

(Xiangyang Central Hospital, Xiangyang, Hubei, China 441000)

Abstract: Objective To establish the high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* with different growth years, and to compare their chemical components. **Methods** The chromatographic column was Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 286 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 20 μL. The HPLC fingerprint of 25 batches of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* (the harvest time was the first, second, third, fourth and fifth years after the transplantation, respectively, with five batches every year) was established by the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012 A), and the similarity was calculated. The partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) model was established by the SIMCA-P 14.1 software to analyze the difference of chemical components. **Results** A total of 19 common peaks were identified, and the similarity was in the range of 0.906-0.993. *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* with different growth years grouped into five clusters, and six different markers were screened, of which the marker that had the greatest impact on the difference of HPLC fingerprint of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* with different growth years was peak 15, followed by peak 6 (polydatin), peak 8 (resveratrol), peak 17 (emodin), peak 5 and peak 1. **Conclusion** The HPLC fingerprint combined with PLS-DA model can reflect the difference of chemical components of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* with different growth years, which can provide a reference for its harvest and quality evaluation.

Key words: *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*; HPLC; fingerprint; partial least squares-discriminant analysis; growth years

虎杖为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根, 味微苦, 性微寒, 具有利湿退黄、清热解毒、散瘀止痛、止咳化痰的功效, 用于治疗湿热黄疸、淋浊、带下、风湿痹痛、痈肿疮毒、水火烫伤、经闭、癥瘕、跌打损伤及肺热咳嗽^[1]。虎杖具有抗感染、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、脂质调节、改善阿尔茨海默病、预防艾滋病等药理学作用^[2-3], 主要含有蒽醌类、二苯乙烯类、黄酮类、香豆素类及脂肪酸类化合物^[4]。其中, 二苯乙烯类化合物主要包括虎杖苷和白藜芦醇等^[5]; 游离型蒽醌类化合物主要包括大黄素、大黄素甲醚、大黄素-

8-O-β-D-葡萄糖苷等; 黄酮类化合物主要包括芦丁、槲皮素、黄酮等; 白藜芦醇在保护心血管、聚集血小板、保护肝脏组织等方面疗效显著^[6]; 虎杖苷具有抗动脉粥样硬化^[7]、保护肝脏^[8]和肾脏^[9]、抗痛风^[10]及抑制宫颈癌 HeLa 细胞生长^[11]等功效; 大黄素甲醚被作为一种新型植物源农药使用^[12]。2020 年版《中国药典(一部)》中仅规定春、秋二季采挖, 对虎杖的生长年限、采收时间等无明确要求。研究显示, 虎杖采收时间为有性繁殖后至次年 3 月至 4 月或 11 月^[13]。已有文献仅报道生长年限对虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素

第一作者: 何风云, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药物化学, (电子信箱)865713195@qq.com。

[△]通信作者: 彭珊艳, 女, 主管药师, 研究方向为药物化学, (电子信箱)30692886@qq.com。

甲醚4种有效成分含量的影响研究^[14],尚无不同生长年限虎杖高效液相色谱(HPLC)指纹图谱的研究。虎杖为多年生草本植物,其品质与生长年限密切相关,二苯乙烯类和蒽醌类等主要药效成分呈动态变化^[15]。故确定不同生长年限虎杖指纹图谱的差异,并采用偏小二乘判别分析(PLS-DA)法等化学计量学方法精准预测与识别生长年限,对保障虎杖的质量保证临床用药的安全和有效至关重要^[16]。本研究中建立了不同生长年限虎杖的HPLC指纹图谱,并结合PLS-DA法分析其中化学成分含量的差异,以为虎杖的采收及质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Alliance acquity e2695型高效液相色谱系统(美国沃特世公司),配有e2695型分离单元、2998型光电二极管阵列检测器(PDA);Secura125-1CN型电子天平(德国赛多利斯公司,精度为0.01 mg);JP-100PLUS型高功率超声波清洗机(深圳市洁盟清洗设备有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz);JC-FW-100型高速小型粉碎机(青岛聚创环保集团有限公司,功率为800 W,转速为26 000 r/min)。

1.2 试剂

白藜芦醇对照品(批号为111535-201703,含量为99.4%),大黄素对照品(批号为110756-201913,含量为96.0%),大黄素甲醚对照品(批号为110758-201817,含量为99.2%),均购自中国食品药品检定研究院;虎杖苷(成都曼思特生物科技有限公司,批号为A0052,含量 \geq 99%);乙腈、甲醇均为色谱纯,甲酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水;虎杖采收于湖北省十堰市房县虎杖种植基地,采收时间分别为移植后第1年(编号为S1-S5)、第2年(编号为S6-S10)、第3年(编号为S11-S15)、第4年(编号为S16-S20)、第5年(编号为S21-S25),均为11月,各5批次,经湖北省襄阳市中心医院李有富副主任药师鉴定均为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相^[17]:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~7 min时10%A,7~20 min时10%A \rightarrow 25%A,20~25 min时25%A \rightarrow 45%A,25~35 min时45%A \rightarrow 60%A,35~50 min时60%A,50~60 min时60%A \rightarrow 90%A,60~65 min时90%A \rightarrow 10%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:286 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。

2.2 溶液制备

取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚对照品

适量,精密称定,置100 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,配制成质量浓度分别为220.63,217.58,254.36,229.17 μ g/mL的混合对照品溶液。样品去杂质,洗净,润透,切厚片,干燥,粉碎,过3号筛,取细粉1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加50%乙醇溶液40 mL,称定质量,90 $^{\circ}$ C水浴超声处理50 min^[18],放冷至室温,再称定质量,用50%乙醇溶液补足减失的质量,摇匀,0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:取样品(编号为S1)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定6次,以8号峰(白藜芦醇)为参照峰。结果其他各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别小于0.58%和0.67%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号为S1)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,室温放置0,4,8,12,16,24 h时,按2.1项下色谱条件进样测定,以8号峰(白藜芦醇)为参照峰。结果其他各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别小于0.43%和1.17%($n=6$),表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(编号为S1)适量,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以8号峰(白藜芦醇)为参照峰。结果其他各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别小于0.37%和1.62%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱建立

指纹图谱建立:取25批样品(编号为S1-S25),按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。将不同生长年限虎杖的HPLC图分别导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012A版软件,以样品(编号为S1)色谱图为参照图谱,设置对照图谱生成方法为中位数法,时间窗宽度为0.1,采用多点校正法进行全峰匹配,得到19个共有峰,且色谱峰保留时间一致。详见图1。

相似度评价:将25批样品HPLC指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012A版软件,以相关系数代表相似度,分别计算各生长年限虎杖的相似度。结果见表1。

共有峰指认:通过与混合对照品溶液色谱峰比对,共指认出4个共有峰,分别为6号峰(虎杖苷)、8号峰(白藜芦醇)、17号峰(大黄素)、18号峰(大黄素甲醚)。详见图2。

相对保留时间和相对峰面积计算:由图1可知,8号峰(白藜芦醇)保留时间较居中,与相邻色谱峰分离度较好,响应值适中,故作为参照峰计算其他共有峰相对保留

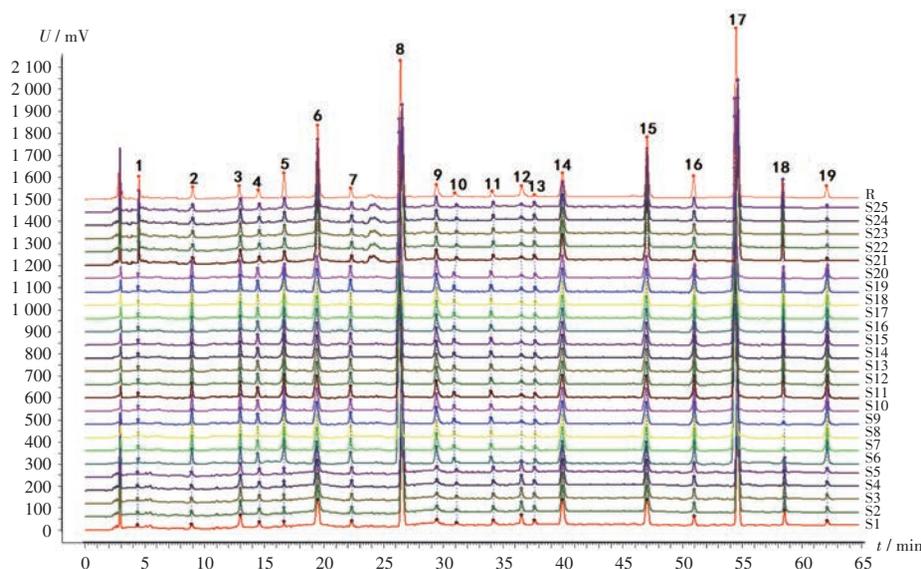


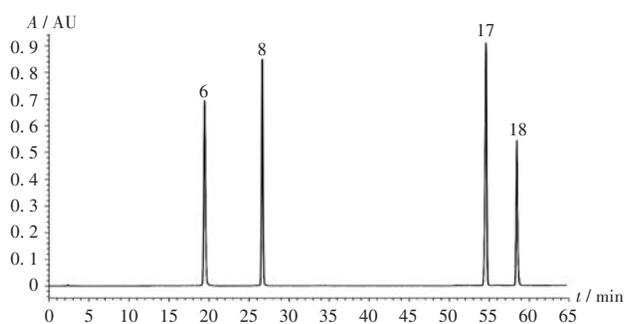
图1 25批虎杖高效液相色谱指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprint of 25 batches of Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix

表1 25批虎杖相似度评价结果

Tab.1 Similarity evaluation results of 25 batches of Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.911	S10	0.991	S19	0.952
S2	0.923	S11	0.979	S20	0.944
S3	0.917	S12	0.964	S21	0.936
S4	0.934	S13	0.987	S22	0.927
S5	0.906	S14	0.990	S23	0.945
S6	0.989	S15	0.993	S24	0.934
S7	0.993	S16	0.942	S25	0.939
S8	0.971	S17	0.947		
S9	0.985	S18	0.960		



6. 虎杖苷 8. 白藜芦醇 17. 大黄素 18. 大黄素甲醚

图2 混合对照品溶液高效液相色谱图

6. Polydatin 8. Resveratrol 17. Emodin 18. Physcion

Fig.2 HPLC chromatograms of mixed reference solution

时间和相对峰面积的RSD,结果分别为0.39%~1.48%和7.66%~32.51%。结果表明,5个生长年限虎杖的共有峰保留时间相对稳定,但化学成分峰面积相差较大。

2.6 PLS-DA

将19个共有峰峰面积导入SIMCA-P 14.1软件,

以此为变量进行PLS-DA,提取前5个主成分,自变量(X)模型解释率参数(R^2X)值和因变量(Y)模型解释率参数(R^2Y)值分别为0.980和0.984,模型预测能力参数(Q^2Y)值为0.974 (> 0.5),表明所建模型的稳定性及预测能力均较强。置换检验结果显示,累积方差值(R^2)和累积交叉有效性值(Q^2)分别为0.172和-0.494,表明所建模型不存在过拟合,能有效判别不同生长年限虎杖HPLC指纹图谱的差异。经PLS-DA模型分析,分别获得得分散点图(图3)、载荷散点图(图4)和变量重要性投影(VIP)图(图5)。

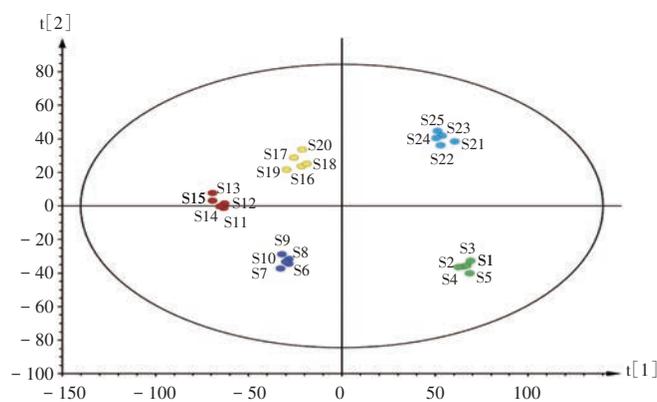


图3 25批虎杖的PLS-DA得分散点图

Fig.3 PLS-DA scoring plot of 25 batches of Polygoni Cuspidati

Rhizoma et Radix

由图3可知,所有点均在95%置信区间内,表明不同生长年限虎杖化学成分相似,根据生长年限不同明显聚为5类,表明不同生长年限虎杖化学成分含量存在差异。图4中每1个点代表1个共有峰,偏离原点越远,对模型的权重越大,对区分各批次样品的作用越大。VIP值可直观反映共有峰对样品差异的权重, $VIP > 1$,即为差异标记物。由图4和图5可知,共筛选出6个差异

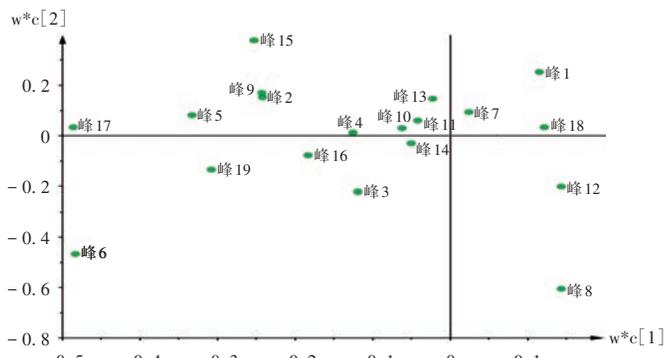


图4 25批虎杖的PLS-DA载荷散点图

Fig. 4 PLS-DA loading plot of 25 batches of Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix

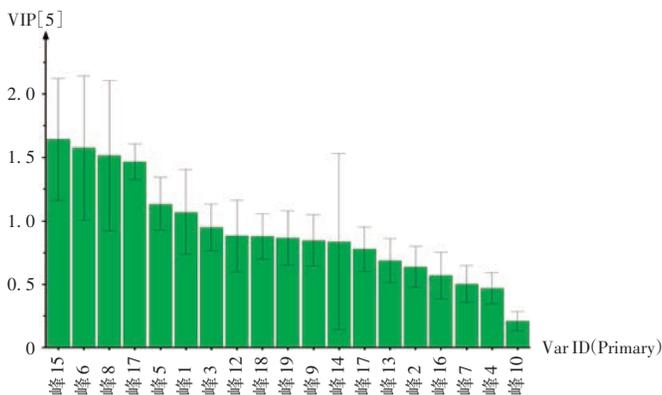


图5 25批虎杖的PLS-DA VIP图

Fig. 5 PLS-DA VIP plot of 25 batches of Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix

标记物,按影响大小依次为峰15 > 峰6(虎杖苷) > 峰8(白藜芦醇) > 峰17(大黄素) > 峰5 > 峰1。

3 讨论

3.1 提取方法优化

根据相关提取工艺^[19-20],曾考察不同提取方式(超声和回流)、不同提取溶剂(不同浓度的乙醇和甲醇)、不同提取时间、不同提取温度及不同料液比等因素对HPLC指纹图谱共有峰提取效果的影响,以提取方法的重复性,结果的准确性及HPLC指纹图谱色谱峰数量、响应值为指标,最终确定2.2项下供试品溶液制备方法。

3.2 色谱条件考察

采用PDA对供试品溶液进行全波长扫描分析,结果在286 nm波长处各成分峰形较好,共有峰数量较多,响应值较大,可满足HPLC指纹图谱建立要求,故选择286 nm为检测波长。二苯乙烯类和萘醌类成分均为多羟基化合物,具有一定酸性,故着重考察乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%冰醋酸水溶液3种不同体系的流动相,结果以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相时虎杖的HPLC指纹图谱色谱峰峰形及分离效果较理想,故选择此流动相。

3.3 结果分析

本研究中分别以不同生长年限的样品(编号分别

为S1,S6,S11,S16,S21)的HPLC图作为参考图谱,共有峰数量和相似度结果均一致;以样品(编号为S1)的色谱图作为参考图谱,25批虎杖HPLC指纹图谱相似度为0.906~0.993,提示HPLC指纹图谱可表示不同生长年限虎杖的特征。19个共有峰相对峰面积的RSD为7.66%~32.51%,差异较大,提示不同生长年限虎杖的化学成分含量存在差异。由HPLC指纹图谱及色谱峰峰面积可知,虎杖苷和白藜芦醇峰面积均在第2年最大;大黄素和大黄素甲醚峰面积均在第3年最大。经PLS-DA分析可知,5个不同生长年限虎杖样品分别聚为5类,影响聚类结果的主要化合物依VIP大小分别为峰15、峰6(虎杖苷)、峰8(白藜芦醇)、峰17(大黄素)、峰5、峰1。峰1、峰5及峰15的定性分析,6个差异标记物的定量分析及在不同生长年限中的含量变化规律,以及与虎杖药效学的相关性研究仍需借助液质联用、核磁共振等手段进一步研究。同时,本研究中发现,产地、采收期、含水量等因素对虎杖的HPLC指纹图谱影响较大,故需建立各个因素的分析方案,以更全面地为虎杖的采收及质量研究提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 217-218.
- [2] 夏婷婷, 杨璐超, 刘清源, 等. 虎杖药理作用研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2016, 26(3): 294-297.
- [3] 时圣明, 潘明佳, 王文倩, 等. 虎杖的化学成分及药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 313-317.
- [4] 陈黎, 黄良永, 叶方, 等. UPLC-MS/MS法同时测定虎杖中9种萘醌类和2种二苯乙烯类化学成分的含量[J]. 中南药学, 2020, 18(7): 1143-1146.
- [5] 梁明辉. 中药虎杖的研究进展[J]. 中国医药指南, 2019, 17(10): 47.
- [6] 彭彩云, 肖浩, 程文明, 等. 虎杖中白藜芦醇的研究进展[J]. 中医药导报, 2010, 16(8): 121-123.
- [7] 欧阳恩鸿, 刘君花, 贺志明, 等. 虎杖苷的抗动脉粥样硬化作用[J]. 邵阳学院学报(自然科学版), 2020, 17(5): 45-51.
- [8] 徐志广, 张朴花. 虎杖苷通过调控Nrf2/HO-1信号通路减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤[J]. 中成药, 2021, 43(2): 362-368.
- [9] 王达利, 孟凤仙, 商学征, 等. 虎杖有效成分对DN模型小鼠肾组织病理改变的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(4): 441-445.
- [10] 孔德暄. 虎杖饮片加工工艺及其活性成分对痛风性关节炎的作用研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [11] 陈佳权, 陈典, 方喜平. 虎杖苷对人工宫颈癌SiHa和HCC94细胞增殖与凋亡的影响[J]. 解剖学研究, 2019, 41(5): 425-429.
- [12] 元维军, 周忠雄, 刘美玲, 等. 0.8%大黄素甲醚悬浮种衣剂防治小麦纹枯病效果初探[J]. 湖北植保, 2020(6): 29-30.