

不同品种红花 HPLC 指纹图谱及其化学成分差异性研究

黄亚威¹, 周慧娟¹, 刘旭云², 王沛琦², 胡尊红², 杨谨², 胡学礼^{2*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 江苏南京 210029; 2. 云南省农业科学院经济作物研究所, 云南昆明 650205)

摘要: 目的 采用 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价不同品种红花 *Carthamus tinctorius* L. 质量。方法 建立 HPLC 指纹图谱, 采用 HPLC-Q-TOF-MS 法对共有峰进行鉴定, 结合聚类分析、偏最小二乘判别分析进行质量评价, 筛选差异成分。结果 43 批样品指纹图谱中有 12 个共有峰, 鉴定出 6-羟基山柰酚-3, 6, 7-三-O-β-D-葡萄糖苷、烟花苷等 11 种成分, 相似度为 0.919~0.998。不同品种样品聚为 3 类, 9, 12, 13-三羟基-10-十八碳烯酸等 6 种成分为质量差异标志物。结论 该方法可有效识别不同品种红花成分差异, 为该药材选育及质量控制提供依据。

关键词: 红花; HPLC 指纹图谱; 品种; 化学成分; HPLC-Q-TOF-MS; 聚类分析; 偏最小二乘判别分析

中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2023)01-0155-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.028

HPLC fingerprints and chemical constituent differences for *Carthamus tinctorius* from different cultivars

HUANG Ya-wei¹, ZHOU Hui-juan¹, LIU Xu-yun², WANG Pei-qi², HU Zun-hong², YANG Jin², HU Xue-li^{2*}

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Industrial Crop Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan 650205, China)

KEY WORDS: *Carthamus tinctorius* L.; HPLC fingerprints; cultivars; chemical constituents; HPLC-Q-TOF-MS; cluster analysis; partial least squares discriminant analysis

红花是菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 功效活血化瘀、通经止痛, 具有显著的扩张血管^[1]、改善认知^[2-3]、降血糖^[4]、抗氧化损伤等作用, 临幊上常用于心脑血管^[5-6]、肾脏^[7]等相关疾病的治疗, 它作为外来栽培植物主要种植于我国西部(新疆)、中部(山西、河南等)地区。近年来随着社会发展, 红花种植区域出现了较大变化, 传统产区仅新疆维持着较高的种植面积, 而云南则异军突起, 在种植、新品培育等方面成果显著。

红花的品种选育可以解决诸多问题, 但前期工作中大多以外观性状(有刺无刺、色素高低)、产量、成熟期、抗病性等为指标, 忽略了化学成分变化。中药材作为一类特殊的经济作物, 其微小的成

分变化经过数代的品种选育后可能产生质变, 并导致药效发生变化, 故如何进行更科学的选种成为当前迫切需要解决的难题。本实验建立不同品种红花的 HPLC 指纹图谱, 并结合化学模式识别及高分辨质谱研究其差异性, 以期为该药材品种选育奠定基础。

1 材料

SCIEX Exion LC 联合 5600 Q-TOF 液质联用仪(美国 AB 公司); Agilent1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); BP-211D 电子分析天平(德国赛多利斯公司); Milli-Q Academic 纯水仪(美国密理博公司); HH-6 数显恒温水浴锅(常州国华仪器制造有限公司)。

收稿日期: 2022-03-22

基金项目: 自治区区域协同创新专项(2020E02103); 技术创新人才培养对象项目(202105AD160009); 江苏省中医院院级课题(Y21034)

作者简介: 黄亚威(1986—), 男, 硕士, 副主任中药师, 从事中药饮片质量控制和炮制研究。E-mail: deweyhuang@163.com

*通信作者: 胡学礼(1978—), 男, 硕士, 研究员, 从事红花新品种选育及产业化关键技术研究。E-mail: hxl426516@163.com

羟基红花黄色素 A 对照品（批号 200612，南京森贝伽生物科技有限公司，纯度≥98%）。红花共 43 批，编号 S1~S43，其中 S1~S9 购于市场，S10~S43 为云南省农业科学院经济作物研究所培育品种，经江苏省中医院主任中药师刘志辉鉴定为

菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花，具体见表 1。甲醇为色谱纯（批号 21035173，美国 Tedia 公司）；乙腈为色谱纯（批号 21065327，美国 Tedia 公司）；其他试剂均为分析纯；水为超纯水（自制）。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	品种	特点	产地
S1~S9	滇红三号	市场主要品种；耐干旱、花蕾大，花绒多，种子产量高，但分枝少，花绒短	新疆塔城
S10~S16	滇红花一号	药用型新品种；无刺，果球上无苞片，果球大，羟基红花黄色素 A 含量高	云南楚雄
S17~S21	云红一号	色素药用兼用新品种；无刺，红色素色价高，花色红，羟基红花黄色素 A 含量高	云南楚雄
S22~S30	云红花九号	药油兼用新品种；无刺，亚油酸含量高，羟基红花黄色素 A 含量高	云南楚雄
S31~S43	云红花七号	药油兼用新品种；无刺，分枝多、花丝紧凑、长，易采收，适应性广，产量高、品质好，羟基红花黄色素 A 含量高	云南楚雄

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液 取药材粉末（过 3 号筛）约 0.2 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入 25% 甲醇 25 mL，称定质量，静置过夜后超声处理 40 min，放冷，25% 甲醇补足减失的质量，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取羟基红花黄色素 A 对照品适量，25% 甲醇制成每 1 mL 含 0.424 mg 该成分的溶液，即得。

2.2 色谱条件 Agilent EC-C₁₈ 色谱柱（150 mm×4.6 mm，4 μm）；流动相甲醇（A）-0.4% 磷酸（B），梯度洗脱（0~15 min，15% A；15~28 min，15%~25% A；28~48 min，25%~35% A；48~58 min，35%~45% A；58~69 min，45%~65% A；69~80 min，65% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 °C；检测波长 264 nm。

2.3 HPLC-Q-TOF-MS 分析条件 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）；流动相 0.1% 甲酸（A）-乙腈（B），梯度洗脱，程序见表 2；体积流量 0.3 mL/min；柱温 35 °C；进样量 2 μL；电喷雾离子源（ESI）；正负离子检测；扫描范围 *m/z* 100~1 000；气帘气体积流量 35 L/min；离子源电压 4 300 V；离子源温度 430 °C；去簇电压 50 V；碰撞能 35 V。

2.4 方法学考察 参考文献 [8-9] 报道。

2.4.1 精密度试验 取供试品溶液（编号 S33）适量，在“2.2”项色谱条件下进样测定 6 次，以羟基红花黄色素 A 为参照，测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.1%，相对峰面积 RSD 均小于 3.5%，表明仪器精密度良好。

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution programs

时间/min	A 0.1% 甲酸/%	B 乙腈/%
0	95	5
5	92	8
11	70	30
18	20	80
20	5	95
24	5	95
24.5	95	5
27	95	5

2.4.2 重复性试验 取药材（编号 S33）适量，按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，以羟基红花黄色素 A 为参照，测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.1%，相对峰面积 RSD 均小于 5.5%，表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液（编号 S33）适量，于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.2”项色谱条件下进样测定，以羟基红花黄色素 A 为参照，测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.5%，相对峰面积 RSD 均小于 3.3%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 HPLC 指纹图谱建立

2.5.1 图谱生成 取 43 批样品，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，将色谱图积分处理后以 AIA 格式导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”，以 S1 为参照，选择平均数作为对照指纹图谱生成方法，时间窗口宽度设置为 0.1，采用多点校正的方法对色谱峰进行全谱匹配，并生成对照图谱，结果见图 1。

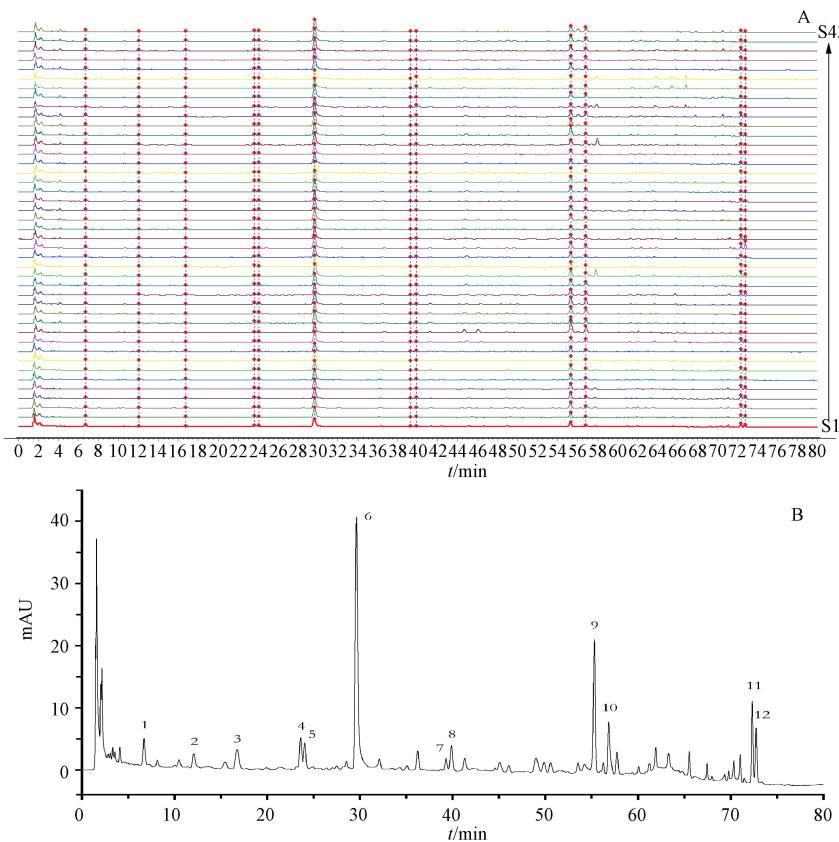


图1 43批样品HPLC指纹图谱(A)及对照图谱(B)

Fig. 1 HPLC fingerprints for forty-three batches of samples (A) and reference chromatogram (B)

由此可知，不同批次样品指纹图谱中有12个共有峰，约占总峰面积的70%；与对照品比对后，确认6号峰为羟基红花黄色素A，峰面积约占总峰面积的30%，并且峰形理想，响应值高，分离度好，故以其为参照峰，测得各共有峰相对保留时间RSD均小于0.1%，但相对峰面积RSD在12.9%~55.0%范围内，表明不同品种药材中各成分含量存

表3 共有峰鉴定结果

在较大差异。

2.5.2 共有峰鉴别 结合一级、二级质谱及对照品进行鉴别，结果见表3，可知共有峰以黄酮类为主，与文献[10]报道存在一定的差异。

2.5.3 相似度评价 不同批次样品相似度均大于0.90，见表4。

Tab. 3 Results of common peak identification

编号	成分	分子式	加合离子	相对分子质量	误差($\times 10^{-6}$)	碎片信息 m/z
1	hydroxysafflor yellow A isomer (B/C)	$C_{27}H_{32}O_{16}$	[M-H] ⁻	611.1624	3.11	491, 473, 403, 328, 283
2	色氨酸	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	[M+H] ⁺	205.0969	-1.46	188, 170, 146, 143, 125, 118, 115
3	未知成分	—	—	—	—	—
4	6-羟基山柰酚-3,6-二-O-葡萄糖-7-葡萄糖醛酸苷	$C_{33}H_{38}O_{23}$	[M+H] ⁺	803.1848	-3.61	641, 479, 303
5	6-羟基山柰酚-3,6,7-三-O-β-D-葡萄糖苷	$C_{33}H_{40}O_{22}$	[M+H] ⁺	789.2049	0	627, 465, 303
6	羟基红花黄色素A*	—	—	—	—	—
7	6-羟基山柰酚-6,7-二-O-β-D-葡萄糖苷	$C_{27}H_{30}O_{17}$	[M-H] ⁻	625.1423	0.48	463, 439, 301, 299, 298
8	6-羟基山柰酚-3-O-β-芸香糖-6-O-β-D-葡萄糖苷	$C_{33}H_{40}O_{21}$	[M-H] ⁻	771.2018	2.72	609, 463, 301
9	flavone derivative	$C_{42}H_{42}O_{21}$	[M+H] ⁺	883.2285	-0.68	721, 433, 415, 343, 313, 289, 235, 193
10	烟花苷	$C_{27}H_{30}O_{15}$	[M-H] ⁻	593.1529	1.85	285, 243, 227
11	9, 10, 13-三羟基-11-十八碳烯酸	$C_{18}H_{34}O_5$	[M-H] ⁻	329.2339	1.82	311, 293, 275, 263, 201, 171
12	9, 12, 13-三羟基-10-十八碳烯酸	$C_{18}H_{34}O_5$	[M-H] ⁻	329.2339	1.82	311, 293, 229, 211, 171, 139

注：*为与对照品比对。

表4 43批样品相似度

Tab. 4 Similarities of forty-three batches of samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.983	S12	0.957	S23	0.997	S34	0.997
S2	0.996	S13	0.978	S24	0.994	S35	0.975
S3	0.996	S14	0.950	S25	0.998	S36	0.998
S4	0.989	S15	0.973	S26	0.996	S37	0.976
S5	0.994	S16	0.986	S27	0.994	S38	0.979
S6	0.997	S17	0.995	S28	0.997	S39	0.996
S7	0.996	S18	0.997	S29	0.998	S40	0.995
S8	0.997	S19	0.998	S30	0.997	S41	0.993
S9	0.996	S20	0.979	S31	0.994	S42	0.997
S10	0.955	S21	0.994	S32	0.980	S43	0.996
S11	0.919	S22	0.992	S33	0.997		

2.6 化学模式识别 由表4可知,不同批次样品HPLC指纹图谱与对照指纹图谱的相似度差异不大,但各成分含量(峰面积)有显著差异,故其成分差异也是区分不同品种的关键所在。

2.6.1 聚类分析 以共有峰峰面积为变量,导入

SPSS 23.0 软件进行聚类分析,采用瓦尔德法,以平方欧式距离为区间测量公式,结果见图2。由此可知,当平方欧式距离为15时,43批样品大致可分为3类,市售红花、云红一号为第1类,云红花七号、云红花九号为第2类,滇红花一号为第3类。

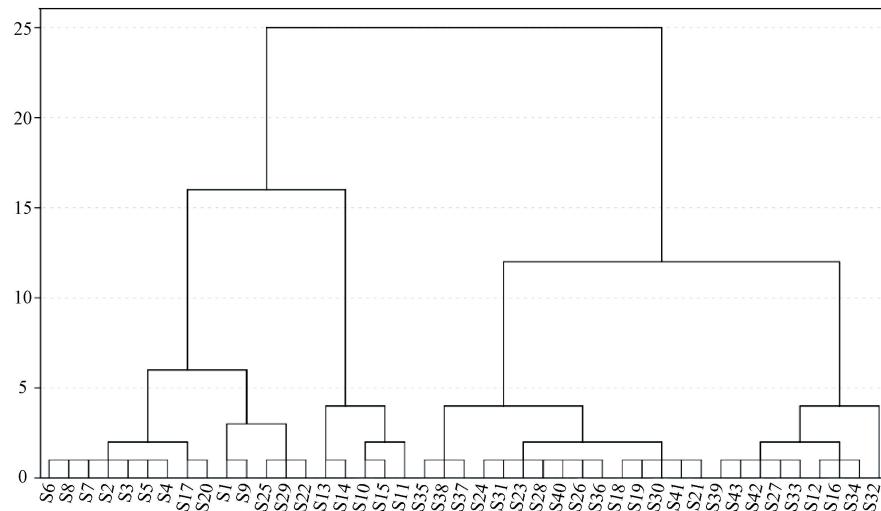


图2 43批样品聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis plot for forty-three batches of samples

2.6.2 偏最小二乘判别分析 为了寻找差异性成分,将共有峰面积归一化处理后导入SIMCA 14.1软件进行有监督模式的偏最小二乘判别分析^[11-12],结果见图3。由此可知,不同品种所含化学成分存在一定的差异,其中云红一号、市售红花位于t1轴的右侧,云红花七号、云红花九号沿t1轴分布,而滇红花一号位于左侧;图中横坐标表示主要成分的得分值,云红一号与市售品的相似度最高,云红花九号与云红花七号次之,滇红花一号最低,并且云红花九号与云红花七号也具有较高的相似度,与聚类分析结果一致。另外,累积解释能力参数分别

为0.785、0.698,预测能力参数为0.539,均大于0.4,表明该模型稳定可靠,预测能力强,可用于区分不同品种。

再计算共有峰变量投影重要性(VIP)值,结果见图4,以VIP值>1.0为标准得到6个共有峰,分别为4号峰(6-羟基山柰酚-3,6-二-O-葡萄糖-7-葡萄糖醛酸苷)、6号峰(羟基红花黄色素A)、3号峰(未知成分)、12号峰(9,12,13-三羟基-10-十八碳烯酸)、10号峰(烟花苷)、11号峰(9,10,13-三羟基-11-十八碳烯酸),均可作为质量差异标志物。

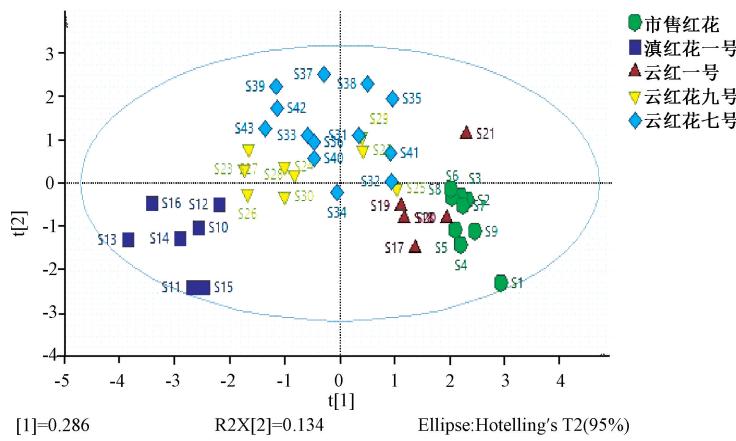


图3 43批样品 PLS-DA 图

Fig. 3 PLS-DA plot for forty-three batches of samples

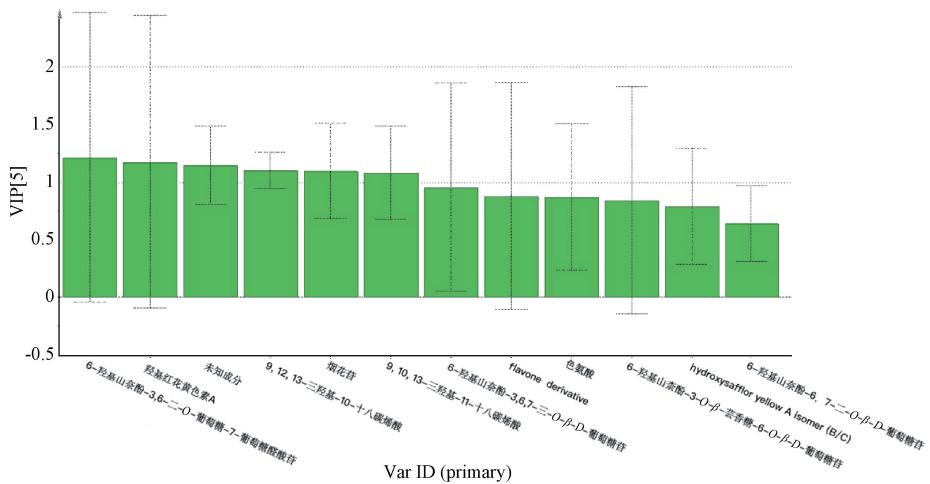


图4 共有峰 VIP 图

Fig. 4 VIP plot for common peaks

2.6.3 统计学分析 采用SPSS23.0软件对共有峰峰面积进行单因素方差分析,结果见表5。由此可知,羟基红花黄色素A、烟花苷、9,12,13-三羟

基-10-十八碳烯酸、9,10,13-三羟基-11-十八碳烯峰面积在不同品种中有显著差异($P<0.05$),以滇红花一号更明显。

表5 共有峰峰面积单因素方差分析($\bar{x}\pm s$)Tab. 5 One-way analysis of variance for peak areas of common peaks ($\bar{x}\pm s$)

共有峰	市售样品	滇红花一号	云红一号	云红花九号	云红花七号
hydroxysafflor yellow A isomer (B/C)	75.26±10.59 ^a	78.30±12.49 ^a	82.62±13.92 ^a	76.42±8.84 ^a	70.31±26.79 ^a
色氨酸	44.14±5.21 ^c	52.64±5.75 ^{ba}	55.61±8.80 ^a	47.07±4.42 ^{bc}	52.67±8.74 ^{ab}
未知成分	83.57±6.50 ^a	46.30±8.28 ^c	78.09±21.34 ^a	63.02±10.48 ^b	85.05±10.09 ^a
6-羟基山柰酚-3,6-二-O-葡萄糖-7-葡萄糖醛酸苷	81.97±4.97 ^{ab}	93.78±23.85 ^a	48.73±6.82 ^d	67.14±8.35 ^e	78.30±15.16 ^{bc}
6-羟基山柰酚-3,6,7-三-O-β-D-葡萄糖苷	62.47±3.64 ^{bc}	82.33±14.51 ^a	49.79±10.78 ^c	80.26±18.50 ^a	79.53±21.84 ^{ab}
羟基红花黄色素A	790.90±76.50 ^c	898.46±138.76 ^b	895.16±23.23 ^b	895.11±100.93 ^b	1 013.03±70.65 ^a
6-羟基山柰酚-6,7-二-O-β-D-葡萄糖苷	26.96±1.96 ^a	32.16±4.27 ^a	29.60±3.34 ^a	29.04±6.56 ^a	28.07±4.06 ^a
6-羟基山柰酚-3-O-β-芸香糖-6-O-β-D-葡萄糖苷	66.28±13.97 ^a	56.55±6.53 ^a	48.36±20.67 ^a	47.44±25.07 ^a	61.38±16.44 ^a
flavone derivative	340.74±40.55 ^b	455.32±72.14 ^a	340.06±70.02 ^b	292.88±59.24 ^b	324.05±114.20 ^b
烟花苷	141.67±24.16 ^c	293.05±66.62 ^a	184.22±17.99 ^b	162.22±27.10 ^{bc}	178.74±38.68 ^b
9,10,13-三羟基-11-十八碳烯酸	140.33±20.04 ^a	50.42±7.47 ^d	111.79±24.06 ^b	54.07±18.02 ^d	79.47±24.68 ^c
9,12,13-三羟基-10-十八碳烯酸	100.49±14.07 ^a	27.97±10.38 ^c	98.00±8.03 ^a	38.97±7.45 ^{bc}	42.23±14.94 ^b

注: 同一行不同小写字母表示有显著差异($P<0.05$)。

3 讨论与结论

本实验在全波长扫描时发现, 264 nm 处色谱峰响应较高, 峰数量较多, 故选择其作为检测波长。再考察了 25%、50%、75% 甲醇及甲醇对提取效果的影响, 发现不同溶剂下指纹峰数量一致, 但某些峰面积有一定差异, 其中 25% 甲醇对各主要色谱峰的提取情况均较好, 同时参考 2020 年版《中国药典》及文献 [13-15] 中对红花含量测定样品的处理方法, 最终选择 25% 甲醇作为提取溶剂。

前期报道, 红花中化学成分达二百多种^[16]。本实验在 43 批红花的 HPLC 指纹图谱中确认了 12 个共有峰, 通过对照品比对及质谱分析指认出 11 个, 其峰面积约占总峰面积的 70%, 即为主要成分。同时发现, 不同选育品种红花的大类成分基本一致, 未发现特异性成分, 故品种鉴别只能以某一种或数种成分含量为指标; 不同品种 HPLC 指纹图谱相似度均大于 0.9, 表明该方法无法进行品种区分, 需结合化学模式识别。

综上所述, 本实验建立不同品种红花 HPLC 指纹图谱, 并通过化学模式识别及高分辨质谱分析对其进行区分, 获得质量差异标志物, 可有效弥补传统育种方法的不足, 从而为该药材质量控制提供参考, 并能为其他中药材品种选育提供思路。

参考文献:

- [1] 杨 蓉, 赵焕新, 季新燕, 等. 羟基红花黄色素 A 通过激活 Kv 通道舒张大鼠冠状动脉 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(3): 439-443.
- [2] 王 琼, 刘茂竹, 陈梦园, 等. 羟基红花黄色素 A 对缺血再灌注脑损伤小鼠皮层 COX-2/PGD₂/DPs 途径的影响 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(8): 1063-1067.
- [3] Yu L, Duan Y, Zhao Z, et al. Hydroxysafflor yellow A

(HSYA) improves learning and memory in cerebral ischemia reperfusion-injured rats via recovering synaptic plasticity in the hippocampus [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 371.

- [4] Zhao Y, Sun H, Li X, et al. Hydroxysafflor yellow A attenuates high glucose-induced pancreatic β -cells oxidative damage via inhibiting JNK/c-jun signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 353-359.
- [5] 田 华. 国医大师朱良春教授治疗缺血性中风病的学术思想及临床经验 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [6] 李媛媛, 刘莎莎, 孙晓东, 等. 注射用红花黄色素治疗急性脑梗死的 Meta 分析 [J]. 中成药, 2019, 41(6): 1472-1475.
- [7] 莫清莲, 林 怡, 陈晓林, 等. 国医大师班秀文从肾论治妇科疾病经验探析 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 755-757.
- [8] 康 璞, 李钰洁, 王 晓, 等. 兴安升麻 UPLC 指纹图谱及 4 种酚酸类质量标志物测定 [J]. 中成药, 2022, 44(2): 469-474.
- [9] 陈良妮, 程雪梅, 王 琳, 等. HPLC 指纹图谱结合模式识别分析评价风湿骨痛胶囊的批间一致性 [J]. 中成药, 2021, 43(12): 3446-3449.
- [10] 范 莉, 濮 润, 赵海誉, 等. 红花药材的 HPLC 指纹图谱及质量研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 37-39.
- [11] 蒋家璐, 康 安, 李 琴, 等. UHPLC-QTRAP-MS 结合化学计量学分析半枝莲中多指标成分 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(2): 437-443.
- [12] 江华娟, 李敏敏, 何 瑶, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和化学模式识别的经典名方桃红四物汤制备过程质量评价研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1000-1010.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 157.
- [14] 吴 晶, 杨怀镜, 周 萍. 红花中 5 种成分的含量测定 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(11): 82-87.
- [15] 王 洁, 苏少锋, 姚仁川, 等. 红花保存年限、有效成分含量和颜色值的相关性分析 [J]. 中国药房, 2020, 31(5): 554-558.
- [16] 濮宗进. 红花资源化学与质量标准研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.