

★论著★

小花鬼针草的毛细管电泳特征图谱研究*

李玉兰^{1,2}, 李军², 刘敏², 王乃利¹, 姚新生^{1**}

(1. 沈阳药科大学, 沈阳 110015; 2. 深圳市药品检验所, 深圳 518029)

摘要 目的: 建立不同产地小花鬼针草药材的毛细管指纹图谱相似度的研究方法。方法: 采用毛细管区带电泳法, 以 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂水溶液 - $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸水溶液 (2:1) 为背景电解质 (BGE) 溶液, 运行电压 20 kV, 紫外检测波长 254 nm, 流体力学进样 10 s (压力, $5 \times 10^3 \text{ Pa}$); 记录小花鬼针草的毛细管电泳特征图谱; 并以“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004 A 版)”相似度计算软件和“SPSS 计算软件”进行评价。结果: 将 28 批药材分为 3 类, 其分类情况基本与产地相符合, 在方法的精密性、重复性及稳定性试验中, 各特征峰的相对迁移时间的 RSD 小于 6%, 相对峰面积的 RSD 小于 10%。结论: 2 种评价方法的结果基本一致, 说明本方法能够有效评价小花鬼针草药材的相似性, 由分类结果可以看出, 不同产地的药材存在差异性。

关键词: 小花鬼针草; 毛细管区带电泳; 特征指纹图谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0179-05

Study on specific chromatogram of *Bidens parviflora* Willd. by HPCE*LI Yulan^{1,2}, LI Jun², LIU Min², WANG Naili¹, YAO Xincheng^{1**}

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015 China; 2. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518029 China)

Abstract Objective To develop a method to study the specific chromatogram similarity of *Bidens parviflora* Willd from different area by HPCE. **Method** The background electrolyte (BGE) was a $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium borate solution (add 50% $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ borate solution); The UV detection wavelength was 254 nm and a voltage of 20 kV was applied. And evaluated with the similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (Version 2004 A) and the evaluation system of SPSS. **Results** The 28 batches were divided into 3 types, which perfectly consistent with the distribution by areas. The CE specific chromatogram had acceptable precision and reproducibility with the RSD of the relative migration time less than 6% and the RSD of the relative peak area less than 10%.

Conclusions The evaluations by two different methods were similar, and from which we can speculate that this method can effectively evaluated the similarity of *Bidens parviflora* Willd from different areas.

Key words *Bidens parviflora* Willd; capillary electrophoresis (CE); specific chromatogram

小花鬼针草 (*Bidens parviflora* Willd) 为菊科鬼针草属植物, 药用部位为干燥全草, 具有清热解毒、散瘀消肿的功效, 主治咽喉肿痛、泄泻、痢疾, 近年来有临床研究表明鬼针草合剂治疗前列腺增生有明显的效果, 用鬼针草液还可以治疗慢性前列腺炎^[1-3]。文献报道从小花鬼针草中已分离得到黄酮类、酚酸类、脂溶性、挥发性类等化合物, 其中以黄酮类化合物最常见^[4,5]。中药的色谱特征图谱质量控制技术是对中药进行整体、宏观分析的有效手段, 其中应用最多的是 HPLC 特征图谱, 但中药提取物常损害色

谱柱, 消耗大量的有毒有机溶剂, 导致 HPLC 特征图谱法分析成本高且污染环境, 而毛细管电泳法因其低消耗、无污染、柱效高、样品处理简单而日益受到重视^[6,7]。本课题组在抗前列腺增生细胞活性筛选中, 发现小花鬼针草 60% 乙醇水溶液提取物具有较强的抑制前列腺癌细胞 (LnCap 细胞) 分泌前列腺特异性抗原 (PSA) 活性 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抑制率 $R = 0.54$)。本文以毛细管区带电泳法对小花鬼针草药材的 60% 乙醇水溶液提取物进行毛细管电泳特征图谱的初步研究, 用于小花鬼针草药材质量的有效

* 深圳市 2005 年自然科学基金资助项目

** 通讯作者 Tel: (020) 85225849; E-mail: yaoxincheng@vip.tcm.com

评价。

1 仪器与试剂

HP^{3D} CE 高效毛细管电泳仪 (美国安捷伦科技有限公司), G1600-60210 石英毛细管 (美国安捷伦科技有限公司), PTS-1002 超声仪 (深圳博达超声设备有限公司)。

硼酸 (广东汕头市西陇化工厂)、硼砂 (广东汕头市西陇化工厂)、氢氧化钠 (广州化工分厂)、磷酸二氢钠 (广州化工分厂)、磷酸氢二钠 (广州化工分厂) 均为分析纯, 甲醇 (天津四友公司)、乙腈 (Merck 公司) 为色谱纯, 水 (Millipore-Q 自制超纯水); 对照品芦丁、水杨酸、金丝桃苷均购自中国药品生物制品检验所, 批号分别为 100080-200306, 100106-200303, 111521-200303。

小花鬼针草药材分别采自辽宁、黑龙江、吉林、山东、山西、甘肃、陕西、河南、四川、重庆、广西、广东等 28 个产地, 经沈阳药科大学学生药教研室吴立春高级工程师鉴定为小花鬼针草药材。

2 溶液的制备

2.1 供试品溶液 将 28 批不同产地的小花鬼针草药材于 60 °C 下干燥 30 min, 剪碎, 分别精密称取 5.0 g 加 60% 乙醇水溶液 100 mL 加热回流提取 2 次, 提取液合并, 滤纸过滤, 滤液减压浓缩至 80 mL, 静置 24 h 滤纸过滤, 滤液再减压浓缩至干, 残渣用甲醇 20 mL 溶解, 并转移至 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 然后用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液备用。

2.2 对照品溶液 另取对照品水杨酸、芦丁和金丝桃苷适量, 精密称定, 分别加水溶解并定量稀释成每 1 mL 约含 100 μg 的单一成分溶液, 精密吸取上述单一成分溶液各 10 mL, 置同一 50 mL 量瓶, 加水稀释至刻度, 即得。

3 电泳条件

G1600-60210 石英毛细管 (64.5 cm × 50 μm, 有效长度 56 cm, 美国安捷伦科技有限公司), 以 50 mol·L⁻¹ 硼砂溶液 - 100 mmol·L⁻¹ 硼酸溶液 (2:1) 为背景电解质 (BGE) 溶液, 运行电压为 20 kV, 紫外检测波长 254 nm, 流体力学进样 10 s (压力, 5 × 10³ Pa)。每次进样前先用 0.10 mmol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液冲洗毛细管 5 min, 再用去离子水冲洗 3 min, 用 BGE 溶液平衡 8 min 后进样分析。

4 图谱中色谱峰的归属

将“2”项下配制的供试品溶液及对照品溶液分别进样分析, 记录电泳图 (见图 1); 与对照品溶液的

迁移时间比较, 指出供试品溶液中迁移时间为 9.46 min 的峰为芦丁, 10.35 min 的峰为水杨酸, 11.22 min 的峰为金丝桃苷, 3 个峰的理论塔板数分别为 207283, 22672, 105835。由于芦丁与相邻组分均达到基线分离, 其峰面积及迁移时间适中, 因此被选为小花鬼针草 CEFP 的参照物峰。

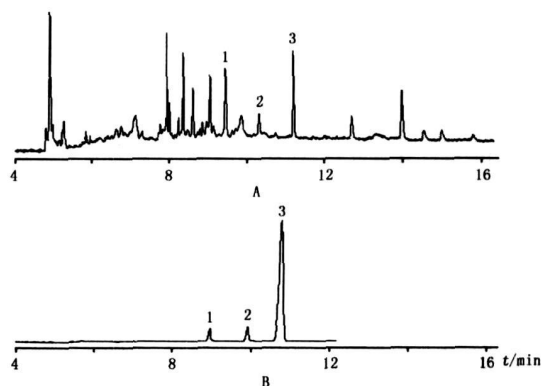


图 1 供试品溶液 (A) 和对照品溶液 (B) 的毛细管电泳图

Fig 1 Electropherograms of sample from Liaoning Chaoyang (A) and reference substances (B)

1. 芦丁 (rutin) 2. 水杨酸 (salicylic acid) 3. 金丝桃苷 (hyperoside)

5 方法学考察

5.1 精密度试验 按“3”项下所述电泳条件将辽宁朝阳产小花鬼针草药材供试品溶液连续进样 5 次, 记录电泳色谱图。结果各特征峰相对迁移时间的 RSD 小于 3.8%, 相对峰面积的 RSD 小于 7%, 表明进样精密度合格。

5.2 稳定性试验 按“3”项下所述电泳条件将辽宁朝阳产的小花鬼针草药材供试品溶液每隔 2 h 间断进样 5 次, 记录电泳色谱图。结果各特征峰相对迁移时间的 RSD 小于 6%, 相对峰面积的 RSD 小于 8.6%, 表明供试品溶液基本稳定。

5.3 重复性试验 将按“3”项所述方法制备的辽宁朝阳产小花鬼针草的供试品溶液 5 份, 依次进样分析, 记录电泳色谱图。结果各特征峰相对迁移时间的 RSD 小于 4.2%, 相对峰面积的 RSD 小于 10%, 表明本方法的重复性基本满足特征图谱的要求。

6 小花鬼针草毛细管电泳特征图谱的分析

6.1 运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004 A 版)”相似度计算软件进行分析 将 28 批不同产地的小花鬼针草药材供试品溶液分别在毛细管电泳仪上分析, 记录电泳色谱图, 其中辽宁抚顺、辽宁朝阳、河南焦作、吉林通化 4 个产地的小花鬼针草的电泳图见图 2。通过国家药典委员会颁布的

“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”软件^[8]计算 28批不同产地的小花鬼针草毛细管电泳特征图谱的相似度,结果见表 1。

表 1 28批小花鬼针草药材的毛细管电泳指纹图谱的相似度

Tab 1 Similarities between each set of CE chromatograms of the 28 batches

样品号 (sample No)	产地 (place of production)	相似度 (similarity)
1	辽宁沈阳 (Shenyang Liaoning)	0.79
2	辽宁朝阳 (Chaoyang Liaoning)	0.82
3	辽宁辽阳 (Liaoyang Liaoning)	0.80
4	辽宁锦州 (Jinzhou Liaoning)	0.76
5	辽宁铁岭 (Tieling Liaoning)	0.81
6	辽宁抚顺 (Fushun Liaoning)	0.79
7	黑龙江大庆 (Daqing Heilongjiang)	0.65
8	黑龙江佳木斯 (Jiamusi Heilongjiang)	0.62
9	吉林通化 (Tonghua Jilin)	0.78
10	吉林长春 (Changchun Jilin)	0.82
11	吉林四平 (Siping Jilin)	0.77
12	吉林延吉 (Yanji Jilin)	0.80
13	山东泰安 (Taian Shandong)	0.76
14	山东济南 (Jinan Shandong)	0.71
15	山东淄博 (Zibo Shandong)	0.73
16	山西太原 (Taiyuan Shanxi)	0.65
17	山西临汾 (Linfen Shanxi)	0.71
18	甘肃兰州 (Lanzhou Gansu)	0.71
19	陕西西安 (Xi'an Shanxi)	0.37
20	河南衡水 (Hengshui Henan)	0.61
21	河南开封 (Kaifeng Henan)	0.70
22	河南焦作 (Jiaozuo Henan)	0.79
23	四川绵阳 (Mianyang Sichuan)	0.81
24	四川成都 (Chengdu Sichuan)	0.82
25	重庆 (Chongqing)	0.69
26	广西百色 (Baise Guangxi)	0.37
27	广东深圳 (Shenzhen Guangdong)	0.63
28	广东广州 (Guangzhou Guangdong)	0.67

表 2 28批药材系统聚类分析分级结果

Tab 2 The results of grading by Hierarchical Cluster analysis

级别 (grade)	样品号 (sample No)
I	1 2 3 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
II	6 9 13 15
III	4 5 7 8 10 11 12 14 16

6.2.2 相似度计算 相似度计算是先通过足够代表性的基准样本的色谱特征图谱建立共有模式,再通过样品特征图谱与共有模式的相似度的计算,提供定性、定量的评价信息,为中药质量控制提供依据。常用的相似度计算方法的测度主要有距离测度和相关系数测度。本研究采用欧氏距离 (d_r)、相关系数 (r_r)和夹角余弦 (C_r)作为测度,对样品进行相

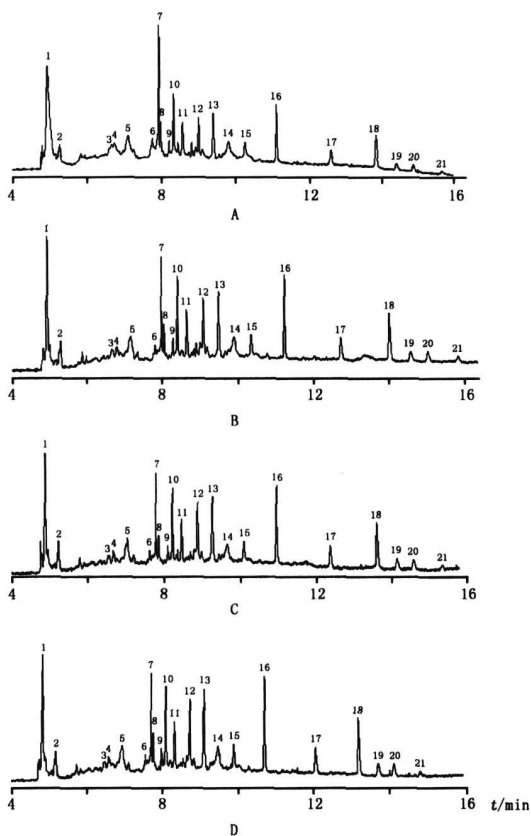


图 2 辽宁抚顺 (A)、辽宁朝阳 (B)、河南焦作 (C)、吉林通化 (D) 产小花鬼针草药材的毛细管电泳图谱

Fig 2 CE chromatograms of samples from Liaoning Fushun (A), Liaoning Chaoyang (B), Henan Jiaozuo (C) and Jilin Tonghua (D)

6.2 运用“SPSS软件”进行分析

6.2.1 系统聚类分析 聚类分析是用计算机自动寻找大量样本谱图的统计规律,再根据所建立的规律对待测谱图进行归类,它们给出的答案是一种分类的信息,可以反映样品之间的亲疏程度。本研究以 28批不同产地的小花鬼针草药材为对象,进行特征图谱研究,获得包括芦丁 ($t_R = 9.07$ min)在内的 21个色谱峰。通过公式 $C_c = A_{ij} / M_i$ (C_c : 样品中化合物的表观含量; A_{ij} : 第 i 个样品,第 j 个色谱峰的峰面积; M_i : 第 i 个样品的称样质量)计算小花鬼针草样品中各色谱峰的表观含量,获得 28×21 阶原始数据矩阵,运用“SPSS软件”对其进行系统聚类分析,采用离差平方和法 (Ward's Method),利用欧氏距离的平方 (Squared Euclidean Distance)作为样品的测度。聚类分析将 28批小花鬼针草药材分为 3类,分类结果见表 2 聚类谱系图见图 3。

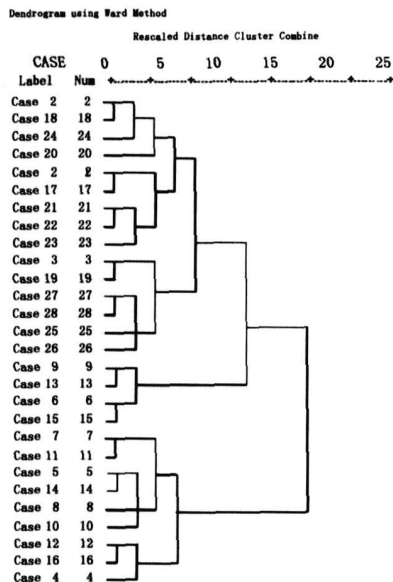


图 3 28批小花鬼针草药材聚类谱系图

Fig 3 Hierarchical clustering analysis figure of *Bidens parviflora* Willd

似度计算, 计算公式分别为:

$$d_{ir} = \sqrt{\sum_{k=1}^m (X_{ik} - X_{rk})^2}$$

$$r_{ir} = \frac{\sum_{k=1}^m (X_{ik} - \bar{X}_i)(X_{rk} - \bar{X}_r)}{\sqrt{\sum_{k=1}^m (X_{ik} - \bar{X}_i)^2 \sum_{k=1}^m (X_{rk} - \bar{X}_r)^2}}$$

$$C_{ir} = \frac{\sum_{k=1}^m X_{ik} \cdot X_{rk}}{\sqrt{(\sum_{k=1}^m X_{ik}^2) (\sum_{k=1}^m X_{rk}^2)}}$$

d_{ir} : 欧氏距离; r_{ir} : 相关系数; C_{ir} : 夹角余弦;

X_{ik} : 第 i 个样品, 第 k 个特征变量 ($k = 1, 2, \dots, m$);

X_{rk} : 共有模式均值向量第 k 个特征变量 ($k = 1, 2, \dots, m$);

\bar{X}_i : 第 i 个样品所有变量的均值;

\bar{X}_r : 共有模式所有变量的均值。

依据 28 批药材的色谱特征图谱建立共有模式, 然后计算各样品特征图谱与共有模式之间的相似度来判断药材质量, 结果见表 3。

7 讨论

7.1 试验中分别考察磷酸盐、硼酸、硼砂、硼砂-硼酸构成的 BGE 溶液, 电泳色谱图显示采用硼砂-硼酸为 BGE 溶液时的电泳峰分离较好; 考察不同配比的硼砂-硼酸为 BGE 溶液时的电泳色谱峰, 发现以 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液和 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸溶液按 2:1 比例的混合液为 BGE 溶液时的电泳峰最多,

表 3 28批药材的相似度分析结果

Tab 3 The results of similarity analysis

样品号 (sample No.)	欧式距离计算 (similarity by d_{ir})	夹角余弦计算 (similarity by C_{ir})	相关系数计算 (similarity by r_{ir})
1	0.381	0.643	0.779
2	0.307	0.636	0.775
3	0.553	0.570	0.743
4	0.656	0.613	0.770
5	0.376	0.614	0.765
6	0.438	0.643	0.783
7	0.441	0.605	0.762
8	0.390	0.587	0.749
9	0.417	0.639	0.777
10	0.399	0.617	0.767
11	0.439	0.632	0.774
12	0.452	0.599	0.758
13	0.413	0.639	0.778
14	0.342	0.631	0.775
15	0.496	0.612	0.760
16	0.566	0.595	0.757
17	0.379	0.644	0.779
18	0.307	0.636	0.775
19	0.553	0.564	0.741
20	0.671	0.586	0.755
21	0.337	0.624	0.771
22	0.345	0.624	0.771
23	0.335	0.631	0.774
24	0.323	0.632	0.776
25	0.389	0.625	0.771
26	0.384	0.618	0.767
27	0.438	0.605	0.762
28	0.387	0.614	0.768

分离度较好, 因此选其为背景电解质溶液; 考察 pH 变化对电泳色谱图的影响, 发现 pH 变化对电泳色谱峰没有明显改变; 考察了运行时电压分别为 10 15 18 20 24 kV 时电泳峰的分离情况, 结果以 20 kV 时分离效果最佳。

7.2 本文利用高效毛细管电泳技术对 28 批不同产地的小花鬼针草药材的化学成分进行分析, 通过对照比较法, 指认了其中含量较大且在各批药材中均含有的 3 个色谱峰, 它们分别为芦丁、水杨酸和金丝桃苷。

7.3 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004 A 版)”和“SPSS 计算软件”对不同产地小花鬼针草药材指纹图谱的相似度进行评价, 发现两者的判定结果基本吻合。由评价结果可以看出, 不同产地小花鬼针草药材的指纹图谱整体面貌基本一

致,但不同产地药材中芦丁、水杨酸、金丝桃苷的含量存在一些差异:其中以辽宁朝阳产小花鬼针草中芦丁的含量最高,广西百色最低;辽宁抚顺产药材中水杨酸含量最高,广东广州最低;吉林通化产药材中金丝桃苷含量最高,广东深圳最低。各产地小花鬼针草特征图谱与对照特征图谱相似性良好,反映了药材的同源性,可以用作小花鬼针草药材的定性鉴别。

参考文献

- 1 SU Jun(舒俊). Clinic study on prostatic hypertrophy treatment with Guizhencao mistura(鬼针草合剂治疗前列腺肥大的临床分析). *Med J West China*(西部医学), 2005, 17(5): 505
- 2 WANG Bing(王冰), LI Fan-zhu(李范珠), XU Xin-jia(徐兴家). Pharmacognostical identification of *Bidens parviflora* Willd(小花鬼针草的生药鉴定). *Chin J China Mater Med*(中国中药杂志), 1995, 20(9): 521
- 3 Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). The Traditional Chinese Medicine Lexicon(中药大辞典). Volume 1(上册). Shanghai(上海): Shanghai People's Publishing House(上海人民出版社), 1986. 1694
- 4 ZHANG Yan-chang(张延昌), ZHANG Yong-ming(张永明).

Current situation about the *Bidens bipinnata* research and prospect(鬼针草的研究现状与应用前景). *J Shandong Educ Inst*(山东教育学院学报), 2004, 4(104): 79

- 5 GU Hai-zhu(顾海珠), SONG Jin-bin(宋金斌), ZHU Yu-feng(朱育凤). Advanced research on *Bidens bipinnata* L(鬼针草的现代研究). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国药研究), 1998, 9(2): 179
- 6 AN Chun-zhi(安春志), LIU Li(刘莉), XING Xue-feng(邢学锋), et al Recent development of traditional Chinese medicine fingerprints research(中药指纹图谱的现状和研究进展). *J Brandt Campus First Med Univ*(第一军医大学分校学报), 2005, 28(2): 197
- 7 ZHOU Xiao-guang(周晓光), YOU Tian-yan(由天艳), WANG Er-kang(汪尔康). Chinese herb medicines analyses by capillary electrophoresis with an permetric detection(毛细管电泳安培检测法在中草药分析中的应用). *Prog Chem*(化学进展), 2006, 18(2/3): 331
- 8 LI Xiang-meng(李晓蒙), XU Wei-liang(徐位良), HE Xin-rong(何新荣). HPLC for fingerprint analysis of flavone glycosides from *Houttuynia cordata* Thunb(鱼腥草药材中黄酮苷类成分的 HPLC 指纹图谱研究). *J Guangdong Coll Pharm*(广东药学院学报), 2005, 21(2): 140

(本文于 2007 年 11 月 22 日收到)

《药物分析杂志》稿件在线管理系统已开通

本刊于 2008 年 10 月 23 日开通稿件在线管理系统。从即日起,凡投稿本刊,请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 进行网上投稿。

该系统采用 E-mail 作为用户名进行注册。

网上投稿的同时需寄单位介绍信及稿件处理费 50 元。

作者在线投稿后,可在线了解稿件情况:编辑-送审-待修改-退修-待发表-已刊出等。

20080580 号以前的作者可与编辑部联系修改用户名后,登录此系统。

读者可在线查看本刊目录,了解本刊编委及其他信息,也可在线订阅本刊。

投稿过程中如遇技术问题,请与技术支持联系:010-69296712。

谢谢合作!

《药物分析杂志》编辑部