

白花蛇舌草超高效液相色谱特征图谱研究 I ——非强极性组分特征谱研究*

李存满^{1,2}, 梁鑫淼¹, 薛兴亚^{1*}, 张秀莉¹, 章飞芳¹

(1. 中科院大连化学物理研究所, 大连 116023; 2. 河北科技大学分析测试中心, 石家庄 050018)

摘要 目的: 发展中药白花蛇舌草的超高效液相色谱 (UPLC) 特征图谱, 考察富集后的非强极性化合物特征图谱较总提物特征图谱在药材质量控制方面的优势。方法: 对不同产地白花蛇舌草及其伪品水线草的总提物及其非强极性组分特征图谱进行相似度考察和主成分分析。结果: 不同产地白花蛇舌草原药材包括对照药材利用总提物特征图谱进行分析, 尽管能得到一定的聚类效果, 但并不是很明显。而将其中的强极性组分有效去除, 再对非强极性组分进行特征图谱统计分析时, 不同产地不同品种的原药材聚类效果很好。结论: 非强极性组分特征图谱较含有强极性组分的总提物特征图谱, 更有利于中药材及其制剂的质量控制。

关键词: 白花蛇舌草; UPLC; 特征图谱, 非强极性组分

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)02-0253-06

Specific chromatograms analysis of *Hedyotis diffusa* Willd by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) I — Studies on mild hydrophilic components*

LI Cun-man^{1,2}, LIANG Xin-miao¹, XUE Xing-ya^{1*}, ZHANG Xiu-li¹, ZHANG Fei-fang¹

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

2. Hebei Research Centre of Analysis and Testing, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract Objective To develop specific chromatograms of *Hedyotis diffusa* Willd by ultra-performance liquid chromatography-diode array detection (UPLC/DAD), and to investigate the more advantages of specific chromatograms analysis with mild hydrophilic components of *Hedyotis diffusa* than that only with the total extract. **Methods** The similarity and principle components analysis (PCA) methods were applied to study the UPLC fingerprint of the total extract and mild hydrophilic components for quality control in *Hedyotis diffusa* and its substitutes from different places. **Results** The obvious effect of hierarchical clustering has not obtained by UPLC fingerprint analysis with the total extracts of *Hedyotis diffusa* herbs from different places including reference herb. But when the highly hydrophilic components were effectively removed, the mild hydrophilic components were statistically analyzed and obtained favorable hierarchical clustering with the herbs of different places and different species. **Conclusion** Specific chromatograms analysis with non-highly hydrophilic components shows more advantages for quality control of *Hedyotis diffusa* than that only with the total extract obviously.

Key words *Hedyotis diffusa* Willd; UPLC; specific chromatograms; non-highly hydrophilic components

特征图谱技术已广泛地用来鉴别中药材的真伪, 区分优劣, 同时也可以区分不同产地、采收季节、炮制方法和用药部位的同种药材。中药化学特征图谱目前最常用的是色谱特征图谱, 其主要集中于中

药中等极性 or 弱极性化合物的研究。目前, 高效液相色谱 (HPLC)^[1~3] 及其联用技术^[4,5] 已广泛应用于中药材的质量控制。而超高效液相色谱 (UPLC) 特征图谱应用较少, Li 等人^[6] 用 UPLC 特征图谱质

* 科技部国际合作项目 (20071816)

** 通讯作者 Tel (0411) 84379529 E-mail: xuexy@dicp.ac.cn

量控制方法对不同产地丹参中的亲水性和亲脂性组分同时进行了研究。利用 UPLC 方法较 HPLC 大大减少了分析时间和溶剂消耗, 而且提高了灵敏度和分离效率。

中药白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa* Willd.) 的色谱特征图谱研究很少^[7], 而且未见 UPLC 特征图谱的报道。另一方面, 在广东、广西等地将水线草等耳草属植物混称为白花蛇舌草^[8], 在产地民间习用或混杂于白花蛇舌草之中, 所以利用色谱特征图谱技术加强对白花蛇舌草原药材的质量控制是非常重要和必要的。

本文以 12 种不同产地白花蛇舌草及其代用品

水线草为研究对象, 建立了白花蛇舌草总提物和非强极性组分的 UPLC 特征图谱, 目的是考察富集后的非强极性化合物特征图谱较总提物特征图谱在药材质量控制方面的优势。

1 仪器试剂与材料

UPLC 色谱仪 (Waters 公司, 美国); 乙腈 (色谱纯) 购自 Fisher Scientific 公司, 甲酸 (色谱纯) 购自美国 Acros Co Ltd 公司, 实验用水为 Milli-Q 水 (Millipore, Billerica MA, 美国)。其他试剂均为分析纯。

白花蛇舌草 12 份不同产地的原药材及其混滑品水线草的编号、来源及其拉丁名等见表 1。

表 1 样品来源

Tab 1 Sources of samples

编号 (No.)	名称 (sample name)	拉丁名 (Latin name)	来源 (source)
HD01	白花蛇舌草	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	湖南衡东 (Hengdong Hunan)
HD02	白花蛇舌草	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	湖南邵阳 (家种) (Junyang Hunan domestic)
HD03	白花蛇舌草	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	河南确山 (家种) (Queshan Henan domestic)
HD04	白花蛇舌草	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	湖南衡阳 (野生) (Hengyang Hunan wild)
HD05	白花蛇舌草	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	河南汝南 (家种) (Runan Henan domestic)
HD06	小花白花蛇舌草	—	安徽岳西 (Yuesi Anhui)
HD07	白花蛇舌草	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	河南确山 (Queshan Henan)
HD08	白花蛇舌草	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	湖南 (野生) (Hunan wild)
HD9	水线草	<i>H. corymbosa</i> (L.) Lam.	江苏徐州 (Xuzhou Jiangsu)
HD10	水线草	<i>H. corymbosa</i> (L.) Lam.	江苏吴江 (Wujiang Jiangsu)
HD11	水线草	<i>H. corymbosa</i> (L.) Lam.	江苏常州 (Changzhou Jiangsu)
HD12	白花蛇舌草对照药材	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	中国药品生物制品检验所 (National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products)

2 样品制备

精确称取白花蛇舌草 (全草) 原药材的干燥粉末约 1.0 g 回流提取 2 次, 每次 1 h。第 1 次用 20 mL 水提取, 第 2 次用 70% 的甲醇 20 mL 提取, 合并提取液, 并定容至 50 mL。取总提液 1 mL 作为白花蛇舌草总提物的特征图谱研究样品; 其余总提液减压浓缩至干, 用 2 mL 水溶解, 取其中 1 mL 水溶液加入乙腈使乙腈浓度达 70%, 冰箱放置过夜, 此上清液作为白花蛇舌草非强极性组分特征图谱研究的样品。

3 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC™ BEH Shield RP 18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈 (A) 和 0.1% 甲酸水 (B); 流速: 0.25 mL · min⁻¹; 柱温: 25 °C; 检测波长: 254 nm; 梯度洗脱条件: 3% A 起始, 保持 3 min, 10 min 内升至 15% A, 然后在 10 min 内

升至 30% A, 最后在 7 min 内升至 95% A, 并保持 2 min。

4 数据处理软件

相似度分析采用中南大学的计算机辅助相似度评价系统软件; 主成分 (PCA) 分析用 SIMCA-P 11.5 Demo 软件。

5 结果与讨论

5.1 提取方式的选择 本实验对 2 种常用的提取方式: 超声提取和回流提取进行了比较。分别精密称取白花蛇舌草干燥粉末 (HD-01, 约 1 g) 2 份, 1 份超声 (200 W, 40 kHz) 提取 2 次, 每次加入水 20 mL, 超声提取 1 h, 合并提取液, 用水定容至 50 mL, 备用; 另 1 份回流提取 2 次, 每次加入水 20 mL, 回流提取 1 h, 合并提取液, 用水定容至 50 mL, 备用。结果发现, 尽管超声提取有其很大的优势: 操作简单, 重复性更好。但是相比较回流提取来说, 其提取

效率较低。即使将药材粉末先浸泡过夜,再超声提取,其效率也比回流提取低。故本实验选用水浴回流提取,提取2次,每次1 h。

5.2 提取溶剂的选择 实验用5种溶剂:纯水、70%乙醇、95%乙醇、70%甲醇和纯甲醇对白花蛇舌草药材的提取效率进行了比较。取白花蛇舌草干燥药材(HD-01)粉末1 g精密称定。分别加入20 mL以上5种溶剂,回流提取2次,每次1 h。合并提取液,用30%甲醇定容至50 mL。测定结果见图1。结果表明纯水对极性组分的提取效率较高,而70%乙醇、70%甲醇和纯甲醇对中等极性组分提取效率差别不大。故本实验选择第1次提取用纯水作为提取溶剂,第2次提取用70%甲醇作为提取溶剂。

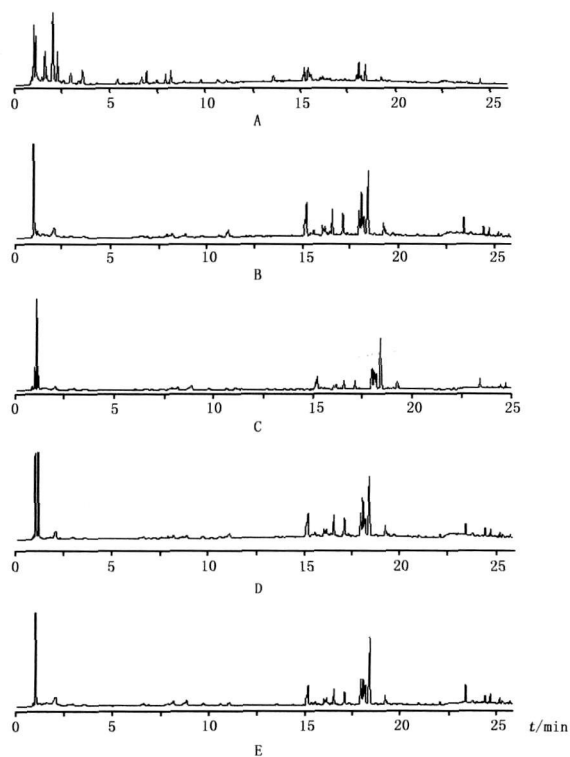


图1 白花蛇舌草(HD01)不同提取溶剂的色谱图

Fig 1 The chromatograms of HD-01 under different solvents by reflux
A. 水(water) B. 70%乙醇(70% ethanol) C. 95%乙醇(95% ethanol)
D. 70%甲醇(70% methanol) E. 甲醇(methanol)

5.3 总提物特征图谱

5.3.1 精密度试验 取药材HD04的总提物样品(HD04)在上述“3”项色谱条件下连续进样5次,19个共有峰的色谱相对保留时间(RRT)和色谱峰相对峰面积(RPA)的RSD分别小于0.18%和2.1%(以峰6为参考峰)。结果表明仪器精密度良好。

5.3.2 稳定性试验 同样取样品HD04按“3”项下条件,在0.1、2、6、12、24、48 h分别进样,考察19

个共有峰的RRT和RPA的稳定性。结果19个共有峰的RRT和RPA的RSD分别小于0.76%和4.5%(以峰6为参考峰)。说明在测定的48 h内各特征图谱保持稳定。

5.3.3 重复性试验 同时取HD04药材5份,按“2”项下方法制备各分析样品,分别得到各总提物样品,非强极性组分样品。取其中5个总提物平行样品按“3”项下条件测定,19个共有峰的RRT和RPA的RSD分别小于0.41%和7.4%(以峰6为参考峰)。说明方法的重复性良好。

5.3.4 特征图谱相似度考察 利用相关系数和夹角余弦2种方法分别以对照药材的特征图谱作为参考特征图谱计算了各样品特征图谱的相似度。结果见表2。从表2看到,其他11个药材与对照药材(HD-12)的相似度,除HD02外,均<0.60(相关系数)和<0.75(夹角余弦);而其他药材间的相似度却相差不大。从该表数据分析,对照药材和其他药材的差别较大,而其他药材间总提物的差别用相似度计算很难判别出来。

表2 不同产地药材特征图谱的相似度分析

Tab 2 The similarities of the samples collected in different locations

编号 (No.)	相似度(similarity)	
	相关系数 (correlation coefficient)	夹角余弦 (cosine)
HD01	0.4053	0.5956
HD02	0.7984	0.8566
HD03	0.4389	0.6253
HD04	0.5935	0.7122
HD05	0.5886	0.7248
HD06	0.4685	0.6404
HD07	0.4587	0.6420
HD08	0.4598	0.6316
HD09	0.4558	0.6294
HD10	0.3405	0.5396
HD11	0.4729	0.6474
HD12	1.000	1.000

5.3.5 主成分分析

为了进一步对白花蛇舌草各药材总提物指纹谱进行分析,采用了主成分分析(PCA)方法。PCA方法是一种有效的数据降维分析方法,它能将原始变量线性组合成一组新的变量,即一组主成分,仅用部分主成分就可表达原有变量的主要信息。利用这一特性,可以实现色谱流出曲线数据的线性降维投影显示,从而使人们能直观的从二维或三维图中观察

到色谱图的主要特征和聚类情况。

在对各药材的总提物进行 PCA 分析前, 首先选取各药材中峰面积大于 0.5% (面积归一化法) 的色谱峰作为特征峰。12 个药材 (包括其伪品) 典型的特征图谱见图 2。由于药材伪品 HD06 HD09 HD10 和 HD11 含有的共有色谱峰少于 10 个, 同其他样品差异明显, 故直接将其剔除。只对另外 8 个药材的总提物特征图谱进行分析。由于强极性组分在反相模式下分离不理想, 故本分析只考虑保留时间大于 5 min 的色谱峰。对 8 个白花蛇舌草正品药材 (HD01~ 05, 07, 08, 12) 特征图谱中的 19 个共有峰进行 PCA 分析, 其 PCA 的二维投影图见图 3。从图 3 中可看出, 河南产药材 (HD03 HD05 和 HD07) 明显聚为一类, 而其他湖南产药材和对照药材的聚类效果不很明显。

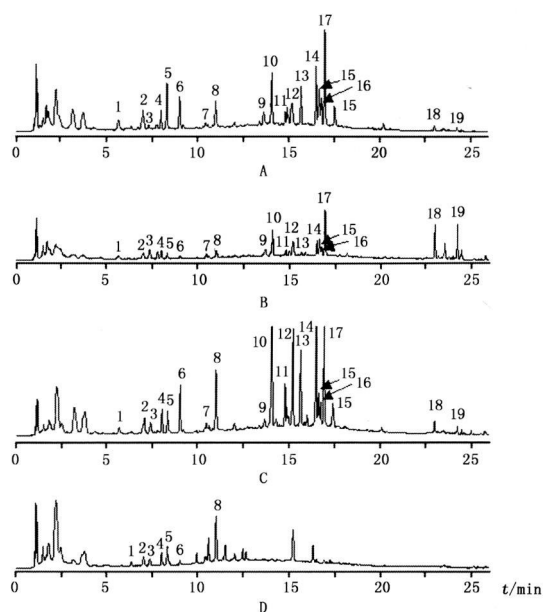


图 2 白花蛇舌草药材及其伪品代表性的总提物 UPLC 色谱特征图谱

Fig 2 Representative UPLC fingerprint chromatograms of the total extract from *Hedyotis diffusa* and its substitute

A. HD04 B. HD05 C. reference herb D. HD09

5.4 非强极性组分特征图谱研究 由于总提物中既包含亲水性的强极性组分, 又含有相对亲脂性成分, 使得其分析效果并不理想, 我们希望通过这两部分组分进行单独分析, 得到更有用的信息。所以我们利用“2”项下的样品处理方法, 本实验首先对非强极性组分进行了富集。典型样品的非强极性组分特征图谱见图 4。从图 4 中可看出, 非强极性组分得到了富集, 而强极性组分被除去。这样更有利于该类组分的聚类分析。

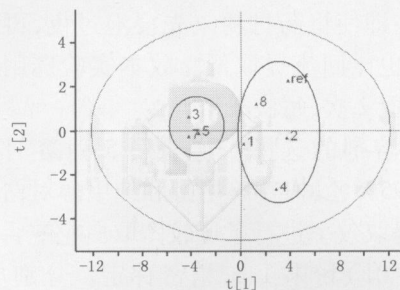


图 3 白花蛇舌草药材总提物 PCA 二维投影图

Fig 3 PCA plot of the total extract of *Hedyotis diffusa*

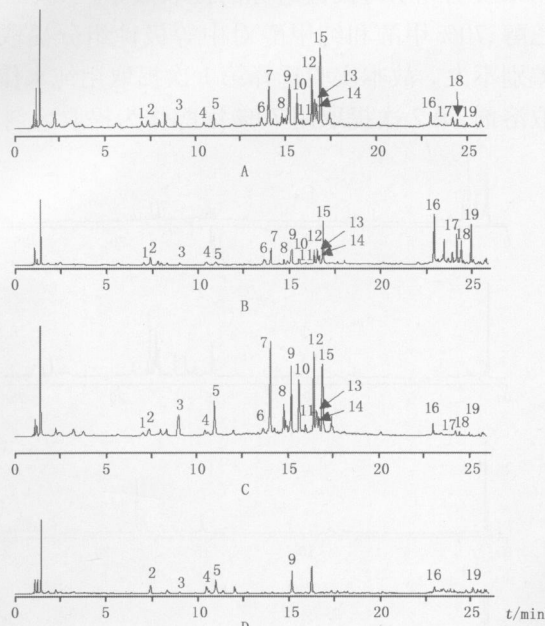


图 4 代表性白花蛇舌草及其伪品非强极性组分的特征图谱

Fig 4 Representative UPLC specific chromatograms of the middle polar components from *Hedyotis diffusa* and its substitute

A. HD04 B. HD05 C. 对照药材 (reference herb) D. HD09

5.4.1 方法学考察 同样取白花蛇舌草药材 HD04 的非强极性组分样品在“3”项色谱条件下, 对该组分特征图谱的精密性、稳定性和重复性进行了考察 (以峰 5 为参考峰)。当样品连续进样 5 次, 结果显示 19 个共有峰的 RRT 和 RPA 的 RSD 分别小于 0.23% 和 2.3%; 同样以该样品分别在 Q 2 8 12 24, 48 h 考察其稳定性, 结果其 19 个共有峰的 RRT 和 RPA 的 RSD 分别小于 0.33% 和 4.93%; 取该组分的 5 个平行样品按同样色谱条件测定, 结果 19 个共有峰的 RRT 和 RPA 的 RSD 分别小于 0.20% 和 5.5%。从以上结果表明, 本文所建立的白花蛇舌草非强极性组分的指纹谱具有很好的精密性、稳定性和重复性。

5.4.2 相似度分析 利用相关系数和夹角余弦 2 种算法以对照药材的特征图谱作为参考特征图谱计

算了各样品特征图谱图的相似度, 结果见表 3。从表 3 可看出, 不同产地不同品种之间差别很大。对于河南产药材其非强极性组分特征图谱与对照药材相似度介于 0.4~0.5(相关系数)和 0.5~0.6(夹角余弦)之间; 而湖南产药材其相似度较高, 介于 0.55~0.7(相关系数)和 0.6~0.75(夹角余弦); 伪品与对照药材的相似度只有 0.24~0.4(相关系数)和 0.30~0.45(夹角余弦)。从而, 可看出非强极性组分通过富集后, 其聚类效果较总提物明显提高。

表 3 不同产地药材特征图谱的相似度分析

Tab 3 The similarities of the samples collected in different locations

编号 (No.)	相似度 (similarities)	
	相关系数 (correlation coefficient)	夹角余弦 (cosine)
HD01	0.6580	0.6927
HD02	0.5922	0.6342
HD03	0.4509	0.5000
HD04	0.6812	0.7106
HD05	0.4323	0.5157
HD06	0.3838	0.4489
HD07	0.4525	0.5195
HD08	0.5589	0.6158
HD09	0.2554	0.3256
HD10	0.2414	0.3036
HD11	0.3007	0.3554
HD12	1.000	1.000

5.4.3 主成分分析研究

为了进一步证实相似度分析结果的可靠性, 对 8 个不同产地白花蛇舌草药材的非强极性组分的 19 个共有峰进行 PCA 分析。结果见图 5。从图 5 中看出, 河南产药材 (HD03, HD05, HD07)、湖南产药材 (HD01, HD02, HD04, HD08) 分别明显聚为一类, 对照药材却相隔较远。尽管对照药材产地不知, 但根据以上分析, 推测对照药材产地应该不是河南和湖南两省。

对 12 个不同产地药材 (包括白花蛇舌草伪品) 非强极性组分中的 7 个共有峰进行 PCA 分析。结果见图 6。有趣的是 12 个药材被明显地分成了 5 组。对这 5 组药材的来源分析后发现, 不同产地不同栽培方式的各药材被显著地聚类分开。药材 HD04 和 HD08 均产自湖南, 且为野生; 药材 HD03 和 HD05 均产自河南且为家种; 药材 HD01 和 HD02 均产自湖南, 前者栽培方式不详, 但从聚类结果推测其应为家种; 而白花蛇舌草伪品明显地聚为一类; 对

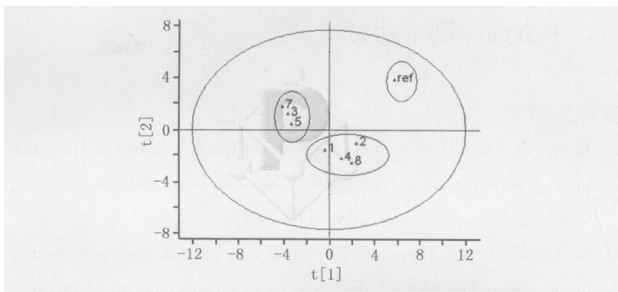


图 5 白花蛇舌草各药材非强极性组分特征图谱的 PCA 二维投影图

Fig 5 PCA plot of the middle polar components from *Hedyotis diffusa*

照品药材聚类效果不很明显, 但可进一步推断其应该不是产于河南和湖南两地。另外, 药材 HD07 同为河南产药材, 但与 HD03, HD05 相距较远, 推测其可能为野生药材。

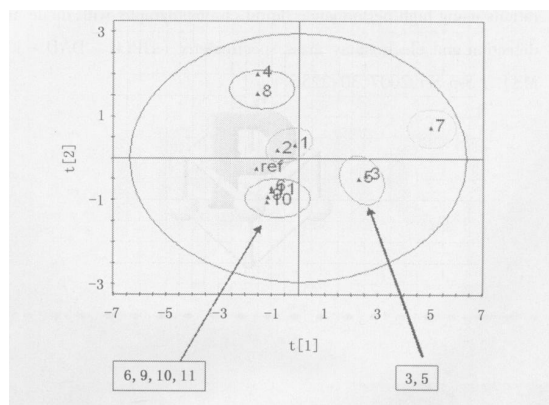


图 6 白花蛇舌草各药材 (包括伪品水线草) 中等极性组分特征图谱的 PCA 二维投影图

Fig 6 PCA plot of the middle polar components from *Hedyotis diffusa* and its substitutes

6 结论

本文发展了中药白花蛇舌草 UPLC 特征图谱, 同时建立了白花蛇舌草总提物、非强极性组分特征图谱。在常规的色谱特征图谱研究中, 常采用的是总提物特征图谱。但在本文实验中发现: 不同产地白花蛇舌草原药材包括对照药材利用总提物特征图谱进行分析, 尽管能得到一定的聚类效果, 但并不是很明显。而将其中的强极性组分有效去除, 再对非强极性组分进行特征图谱统计分析时, 不同产地不同品种的药材聚类效果很好。因此, 非强极性化合物特征图谱较含有强极性化合物的总提物特征图谱, 更有利于中药材及其制剂的质量控制。

在非强极性组分特征图谱中, 对白花蛇舌草及其伪品同时进行主成分分析时, 不同产地、不同品种 (正、伪品) 以及不同培养方式 (野生和家种) 的药材获得了明显的聚类效果, 进一步表明特征图谱技术

可以多方面控制中药材质量。

参考文献

- 1 Jiang FQ, Tao YD, Shao Y. Fingerprinting quality control of Qinghuo by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection *J Ethnopharmacol*, 2007, 111: 265
- 2 Ni YN, Zhang LS, Churchill J *et al* Application of high performance liquid chromatography for the profiling of complex chemical mixtures with the aid of chemometrics *Talanta*, 2007, 72: 1533
- 3 Liu L, Lu Y, Shao Q, *et al* Binary chromatographic fingerprinting for quality evaluation of Radix *Ophiopogonis* by high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet and evaporative light-scattering detectors *J Sep Sci* 2007, 30: 2628
- 4 Liu M, Li YG, Zhang F, *et al* Chromatographic fingerprinting analysis of Danshen root (*Salvia miltiorrhiza* Radix et Rhizoma) and its preparations using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS). *J Sep Sci* 2007, 30: 2256
- 5 Ni YN, Peng YY, Kokot S. Fingerprint analysis of Eucommia Bark by LC-DAD and LC-MS with the aid of chemometrics *Chromatographia*, 2008, 67: 211
- 6 Liu M, Li YG, Chou GX, *et al* Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb Radix *Salviae Miltiorrhizae* *J Chromatogr A*, 2007, 1157: 51
- 7 Liu Xiao-ping (刘小平), GAO Shen-rong (高申蓉), LIXiang-nan (李湘南), *et al* Identification herb *Adyotis diffusa* by HPLC fingerprint pattern method (白花蛇舌草的 HPLC 指纹图谱研究). *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28(2): 91
- 8 XU Gao-jun (徐国均), XU Luo-shan (徐珞珊), WANG Zheng-tao (王峥涛). *Pecies Adscription and Quality Research of Often Used Traditional Chinese Medicines* (常用中药材品种整理和质量研究). Vol 4 (第4册). Fuzhou (福州): Fujian Science and Technology Publishing House (福建科学技术出版社), 1994. 659

(本文于 2009 年 3 月 9 日收到)

您的包装能否确保产品的质量安全?

肉眼看得到的问题 您来解决
肉眼看不到的问题 Labthink 来解决



Labthink®

愈了解，愈信任！

历经生产、运输、仓储、上架销售等各个环节，如果包装存在任何质量隐患，都可能导致产品出现霉变、潮解、破损、保质期缩短等严重问题。Labthink 兰光——包装检测国际知名品牌，为您提供全方位包装质量与安全解决方案。

济南兰光机电技术有限公司
咨询热线: 0531-85053155
E-mail: labthink@labthink.cn
www.labthink.cn