

白花蛇舌草超高效液相色谱特征图谱研究 II ——强极性组分特征图谱研究*

李存满^{1,2}, 薛兴亚^{†*}, 章飞芳¹, 张秀莉¹, 梁鑫淼¹

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

摘要 目的: 发展中药白花蛇舌草强极性组分的超高效液相色谱 (UPLC) 特征图谱, 进一步加强中药材的质量控制。方法: 建立不同产地白花蛇舌草及其伪品水线草中强极性组分的 UPLC 亲水模式分析方法, 并对其特征图谱进行相似度考察和主成分分析。结果: 强极性化合物特征图谱增加了中药材特征图谱的信息量, 该组分特征图谱同非强极性组分特征图谱一样具有地域性。结论: 强极性组分特征图谱和非强极性组分特征图谱共同应用, 有利于提高中药材质量控制的水平。

关键词: 白花蛇舌草; UPLC; 特征图谱; 强极性组分

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)02-0259-04

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

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

(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 the ultra-performance liquid chromatography (UPLC) specific chromatograms basing on strong hydrophilic components in *Hedyotis diffusa* Willd in hydrophilic interaction chromatography (HIL-IC) mode and to investigate the more advantages when specific chromatograms analyzed of strong and mild hydrophilic components were together used for the quality control of *Hedyotis diffusa* than that only with the total extract.

Methods An UPLC method was established in hydrophilic interaction chromatography mode for the analysis of the strong hydrophilic components in *Hedyotis diffusa* and its substitutes from different places. The UPLC specific chromatograms was analyzed by the similarity and principle component analysis methods. **Results** The specific chromatograms of strong hydrophilic components greatly increased the specific chromatograms information. It can be applied to distinguish *Hedyotis diffusa* from different places and its substitutes. **Conclusion** The combinative specific chromatograms analyses of strong hydrophilic components with mild hydrophilic components can obviously improve the quality control level of traditional Chinese medicines.

Key words *Hedyotis diffusa* Willd; UPLC; strong hydrophilic components; specific chromatograms

近年来, 着重于从整体上进行质量控制的特征图谱技术得到了广泛的关注和应用, 并已被国际认可。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, 而对其中大量存在的强极性组分的研究严重缺乏, 强极性组分的分析目前仍是研究难题。但传

统中药多采用水煎的方法提取, 其中大部分成分为强极性化合物。因此, 研究中药强极性化合物特征图谱对中药的质量控制十分重要。

HPLC^[1,2]及其联用技术^[3]已广泛应用于中药材的质量控制。而 UPLC 特征图谱应用较少, Li 等人用 UPLC 特征图谱质量控制方法对不同产地丹参

* 科技部国际合作项目 (20071816)

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

中的亲水性和亲脂性组分同时进行了研究^[4]。近期 Liang 研究小组^[5]首次利用亲水作用色谱对丹参中强极性化合物特征图谱进行了研究。目前, 中药白花蛇舌草的色谱特征图谱研究很少^[6], 而且未见 UPLC 特征图谱, 尤其是对强极性组分特征图谱研究的报道。

本论文以 12 种不同产地白花蛇舌草及其代用品水线草为研究对象, 重点是发展白花蛇舌草强极性组分特征图谱的研究方法; 目的是考察富集后的不同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) 购自英国 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淆品水线草的编号、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 (sources)
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 (Yuexi 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)]
HD09	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定所 (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 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, 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, 残渣用 70% 甲醇 2 mL 溶解, 作为白花蛇舌草强极性组分特征图谱研究的样品。

3 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC™ HILIC (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相: 95% 乙腈水 (含 10 mmol 醋酸铵) (A) 和水 (B); 流速: 0.25 mL · min⁻¹; 柱温: 25 °C; 检测波长: 254 nm; 梯度洗脱条件: 100% A 起始, 20 min 内降至 88% A, 然后在 15 min 内降至 80% A。

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 强极性组分分析方法的建立 选取具有代表性的 HD07 药材的强极性组分样品作为该组分分析方法建立的对象。该样品在反相色谱模式下尽管流动相乙腈起始浓度只有 3%, 并在此浓度下保持了 3 min 但其大部分色谱峰保留时间 < 5 min。其色谱图见图 1-A (分析条件: 乙腈 (A) 和 0.1% 甲酸水 (B), 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), 故需要改用其他的分析模式。因此, 本节选用了亲水模式的分析方法, 为该组分的分析提供了可能, 并对其分析条件进行了优化, 其分析色谱图见图 1-B (分析条件同项 3)。

5.2 方法学考察 选取 HD04 的强极性组分供试样品作为方法精密度和稳定性考察, 选取 HD04 组分的 5 个平行样品作为方法重复性考察。在连续进样 5 次后 9 个共有峰的 RRT 和 RPA 的 RSD 分别小于 1.4% 和 4.7%; 在 0, 2, 4, 12, 24 h 的时间间隔内, 9 个共有峰的 RRT 和 RPA 的 RSD 分别小于

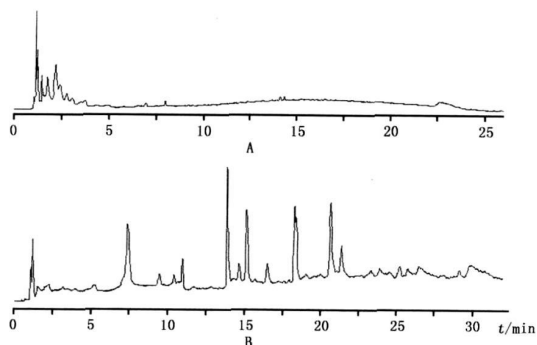


图 1 强极性组分反相模式下的色谱图 (A) 和亲水作用模式下的色谱图 (B)

Fig 1 The chromatograms of strong hydrophilic components in reverse phase mode (A), and in hydrophilic interaction mode (B)

1.7% 和 9.3%; 而 5 个平行样品中 9 个共有峰的 RRT 和 RPA 的 RSD 分别小于 1.7% 和 10.2% (以上均以峰 6 为参考峰)。由于亲水作用色谱尤其是 HILIC Si 柱稳定性较差一些, 故该方法的精密性、稳定性和重复性的 RSD 较大些, 但仍可以接受。

5.3 相似度分析 利用相关系数和夹角余弦 2 种算法只以对照药材的特征图谱作为参考特征图谱计算了 12 个样品强极性组分特征图谱的相似度, 结果见表 2。从表 2 看, 各个药材之间强极性组分的差别相对较小, 相似度集中于 0.45~0.78 (相关系数) 和 0.67~0.91 之间 (夹角余弦); 而且白花蛇舌草及其代用品之间没有明显的差别。强极性组分典型特征图谱见图 2。

表 2 不同产地药材强极性组分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 (similarities)	
	相关系数 (correlative coefficient)	夹角余弦 (cosine)
HD01	0.7746	0.9077
HD02	0.5670	0.8230
HD03	0.5848	0.8027
HD04	0.5077	0.8088
HD05	0.5843	0.8271
HD06	0.4554	0.6712
HD07	0.6300	0.8396
HD08	0.4976	0.7842
HD09	0.5262	0.8084
HD10	0.5013	0.7825
HD11	0.5004	0.7994
HD12	1.000	1.000

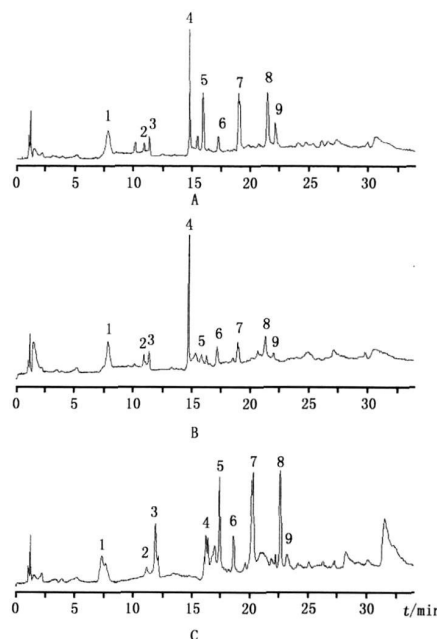


图 2 代表性白花蛇舌草及其伪品中强极性组分的亲水作用色谱特征图谱

Fig 2 Representative UPLC specific chromatograms of the strong hydrophilic components from *H. diffusa* and its substitute A. HD07 B. HD04 C. HD09

5.4 主成分分析 利用 PCA 分析进一步考察了各药材强极性组分之间的差异, 对 12 个药材 9 个共有峰进行了 PCA 分析 (图 3)。结果发现, 对于该类组分来说, HD06 样品和河南产药材 (HD03, HD05, HD07) 聚为了一类, 这可能是由于安徽和河南两地地域相近, 差异较小的原因; 其他药材的聚类效果不变。因此, 对于中药材的强极性组分来说, 不同产地不同种类的药材也具有一定的聚类效果。

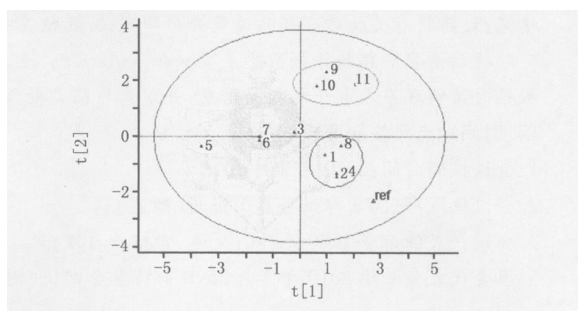


图 3 强极性组分的 PCA 分析二维投影图

Fig 3 PCA plot of the strong hydrophilic components from *H. diffusa* and its substitutes

6 结论

本文发展了白花蛇舌草强极性化合物亲水作用模式的 UPLC 特征图谱。实验表明, 强极性化合物特征图谱增加了中药材特征图谱的信息量, 其和非

强极性化合物特征图谱共同应用,有利于提高中药材质量控制的水平。

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 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

- 4 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
- 5 Jin Y, Liang T, Fu Q, *et al* Fingerprint analysis of *Ligusticum sinense* using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 2033
- 6 Liu Xiaoping (刘小平), GAO Shenrong (高申蓉), LIXiangnan (李湘南), *et al* Identification Herba *Hedyotis 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

(本文于 2009 年 3 月 13 日收到)

关于举办首届全国药品质量分析论坛的通知

为了不断提高药品质量,交流药物分析技术及方法,促进药品生产工艺改进,保障公众用药安全有效。中国药学会药物分析杂志编辑部定于 2010 年 3 月 11 日~12 日在河南省郑州市召开“首届全国药品质量分析论坛”。欢迎广大从事药品检验、药物分析、药品生产质量控制及相关领域人员参会交流和投稿。现将论坛有关事宜通知如下。

一、论坛主题

药品质量分析研究。

二、论坛形式

论坛将邀请专家做药品质量分析专题报告。本次会议为参会者提供充分的交流平台,与会者可参与大会报告、分会交流、壁报展览。

三、征文内容与要求

未在国内外公开发表的专项成果、研究论文、专题报告、综述评论等,内容包括:1. 化学药物、抗生素药品质量分析及研究;2. 中药、天然药物及制剂质量分析及研究;3. 生物技术药品、生化药品质量分析研究;4. 药用辅料与药品质量分析研究;5. 药物有关物质与药品质量分析研究;6. 其他有关药品质量控制研究;7. 本次论坛重点品种见附件 1。

投稿请登陆药物分析杂志主页 www.ywfxzz.cn 点击“在线投稿”,按提示要求上传稿件。投稿方向请选择“论坛”。投稿时请留联系人电子邮箱等信息,并注意与征文投稿联系人确认。

四、时间地点及注册要求

1. 会议报到时间: 2010 年 3 月 10 日;
2. 会议地点: 河南省郑州市嵩山饭店(暂定);
3. 会议代表注册费 1200 元/人;交通、住宿费自理;
5. 参会代表务必于 2010 年 2 月 25 日前将参会回执(附件 3)传真至论坛会务组。传真: 010-67012819; E-mail: ywfx@nicpbp.org.cn

五、征文投稿联系人

中国药品生物制品检定所 药物分析杂志编辑部 刘小帅 于宝珠

电话: 010-67095201, 010-67095775 传真: 010-67012819

E-mail: ywfx@nicpbp.org.cn

详细内容请访问中国药品生物制品检定所网站: <http://www.nicpbp.org.cn>

中国药学会药物分析杂志编辑部
2010 年 1 月 12 日