

基于超高效液相色谱指纹图谱和主成分分析法 评价不同主产地半枝莲的质量*

杨敏娟, 罗宇琴, 官永河, 朱德全

(广东一方制药有限公司 佛山 528244)

摘要:目的 建立半枝莲药材的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,综合比较不同主产区的半枝莲质量;方法 采用UPLC建立半枝莲药材的指纹图谱,应用超高效液相飞行时间高分辨质谱技术对色谱峰进行指认;应用PCA法对UPLC指纹图谱进行分析。结果 半枝莲药材UPLC指纹图谱共11个共有峰,其中4个为野黄芩苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、野黄芩素、芹菜素;产自河南、安徽和四川3个产地的半枝莲药材相似度为0.871-0.999;从主成分分析来看,野黄芩苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、成分1、4、6、7、8及10在半枝莲质量上起重大作用。结论 UPLC指纹图谱结合PCA可以客观地评价不同主产地半枝莲药材的质量及各成分对质量的贡献。

关键词:半枝莲 超高效液相色谱 指纹图谱 超高效液相飞行时间高分辨质谱技术 主成分分析

doi: 10.11842/wst.20180823002 中图分类号: R282.5 文献标识码: A

半枝莲为唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don的干燥全草。其性寒,味辛、苦,具有清热解毒,化瘀利尿的功能,临床主要用于疮疡肿毒,咽喉肿痛,跌扑伤痛,水肿,黄疸,蛇虫咬伤等^[1]。现代药理研究表明,半枝莲具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、增强免疫等生物活性^[2]。半枝莲含有多种化学成分,主要成分为黄酮类化合物(Flavonoids)和二萜类化合物(Diterpenoids),还有生物碱(Alkaloids)、甾体(Steroids)、多糖(Polysaccharids)等成分^[3]。

文献检索发现,半枝莲指纹图谱研究不多,主要涉及HPLC及GC等方法。如张同波^[4]建立了12份不同产地的半枝莲药材的HPLC指纹图谱,可能由于受产地、气候和生态环境等影响,不同产地的半枝莲药材所含成分产生较大的差异。林敬明等^[5]建立半枝莲单味药材的HPLC鉴定方法。对10份不同批次的半枝莲药材指纹图谱进行解析,确定了16个共有峰,对不同批次半枝莲样品HPLC指纹图进行相似度分析,

结果显示所有样品与对照指纹图谱相似度均在0.88以上。王慧彬等^[6]采用Discovery-C18柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以甲醇-0.05%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱,建立半枝莲的HPLC指纹图谱的方法。通过对10批不同产地半枝莲药材的研究建立了半枝莲药材的指纹图谱,其中确定13个色谱峰为共有峰。10批药材的相似度在0.985-0.744之间。该方法提取简单,具有很好的稳定性、重复性和可行性。赵伟伟等^[7]采用Agilent ZORBAX SB-C18色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相,建立了不同产地半枝莲药材的指纹图谱。该方法精密度、重现性以及稳定性良好。以野黄芩苷作为对照峰,确定了13个特征峰为其共有峰。采用中药色谱指纹图谱相似度软件进行测评,8份药材的相似度介于0.953~0.768。主成分分析获得2个主要成分,累积贡献率可达80.347%。应用指纹图谱并结合主成分分析,能够准确的评价半枝莲药材的质量。陈香爱等^[8]

收稿日期:2019-08-10

修回日期:2019-09-16

* 广东一方制药有限公司佛山市重大科技项目应用型核心技术攻关领域(2016AG100912):中药配方颗粒国家标准研究,负责人:魏梅。

** 通讯作者:杨敏娟,硕士,主要研究方向:质量标准研究。

采用反相高效液相色谱法,以甲醇-乙腈-0.05%磷酸溶液进行梯度洗脱,建立了30批不同来源半枝莲药材的HPLC-UV指纹图谱,确定了14个共有峰,并对30批半枝莲及其混淆品的进行了相似度分析。24批半枝莲药材的相似度均在0.7以上,6批混淆品均在0.4以下。该HPLC指纹图谱鉴别方法具有重复性好、特征性强、方法简便等特点,可作为半枝莲及其混淆品药材的鉴别方法。潘瑞景等^[9]采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术,结合化学计量学直观推导式演进特征投影法(HELP)和相似度分析(SA),对不同产地半枝莲及其混淆品白花蛇舌草和半边莲挥发性成分的指纹图谱进行了研究。分别从半枝莲、白花蛇舌草以及半边莲中定性定量出52、38、38种化合物。其中半枝莲和白花蛇舌草的共有峰48个,半枝莲与半边莲的共有峰52个。保留时间和每组分峰面积的相对标准偏差分别小于0.2%和6.1%。相似度计算结果显示9个不同产地的半枝莲的相关系数均在0.766 0以上,而混淆品的相关系数分别为0.419 9和0.405 9,可以有效判别半枝莲及其混淆品。

文献记载半枝莲主产河北,山东,陕西、河南,江苏,浙江,台湾,福建,江西,湖北,湖南,广东,广西,四川,贵州,云南等省区^[10]。90年代以前,半枝莲以野生为主,90年代初期,开始试种并栽培成功,逐步在各地发展种植。从“康美中药网”、“中药材天地网”、“药通网”可以查询到,截止2017年12月22日,目前产量比较大的,供应全国的半枝莲主产地有8个,分别分布在河南省驻马店市、河南省信阳市、湖南省邵阳市、安徽省阜阳市、四川省成都市双流县以及山东省济宁市,以上产地总产量占全国总产量的80%以上。

中药指纹图谱在一定分析技术的基础上,获得可以标示中药材的共有峰的色谱图^[11],具有整体性、模糊性和量化性的特点,能够全面体现中药材质量,已成为鉴别真伪、控制质量的重要方法^[12]。主成分分析法是一种降维的统计方法^[13],依据贡献率大小($\geq 85\%$)用具有代表性的因子代替多个原始变量。近年来已被广泛应用于中药,尤其是指纹图谱上^[14-17],是一种独具特色的多指标评价技术。本项目组深入产地,就地取材,收集了三大主产地的26批半枝莲,系统地对其指纹图谱进行研究,并结合主成分分析法,综合评价不同产地的半枝莲药材。

1 仪器与试药

表1 26批半枝莲药材信息

编号	产地	编号	产地	编号	产地
S1	四川省	S10	安徽省	S19	河南省
S2	河南省	S11	四川省	S20	河南省
S3	河南省	S12	四川省	S21	河南省
S4	河南省	S13	河南省	S22	河南省
S5	河南省	S14	河南省	S23	河南省
S6	安徽省	S15	河南省	S24	河南省
S7	安徽省	S16	河南省	S25	安徽省
S8	安徽省	S17	河南省	S26	安徽省
S9	安徽省	S18	河南省		

1.1 仪器

Vanquish超高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司),ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱仪(沃特斯公司);ACQUITY UPLC I-Class超高效液相飞行时间高分辨质谱联用系统(Waters Corporation, Milford, MA, USA),数据处理系统为MarkerLynx 4.1工作站(Waters, Manchester, U.K.),Acclaim C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm),万分之一天平(梅特勒-托利多公司),百万分之一天平(梅特勒-托利多公司),电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

1.2 试剂与试药

芹菜素-7-O-葡萄糖苷(纯度大于98%,四川省维克奇生物科技有限公司,批号:wkq17072708);野黄芩素(纯度大于98%,四川省维克奇生物科技有限公司,wkq17072710);芹菜素(纯度大于98%,四川省维克奇生物科技有限公司,wkq17032405);野黄芩苷(纯度91.3%,中国食品药品检定研究院,批号:110842-201508);半枝莲对照药材(中国食品药品检定研究院,批号:121293-201404);石油醚、甲醇、乙醇(分析纯);甲酸、磷酸、甲醇(色谱级);水为超纯水(实验室自制);26批半枝莲药材信息详见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Acclaim C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm);进样量为1 μl;柱温为30℃;检测波长为335 nm;流速为0.4 mL·min⁻¹;以甲醇(A)-0.2%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱,梯度为0-3 min, 25%→29%A; 3-10 min, 29%→34%A; 10-16 min, 34%A; 16-20 min, 34%→42%A; 20-28 min, 42%A; 28-35 min, 42%→75%A。

2.2 质谱条件

氮气作为质谱离子源的雾化、锥孔气;电喷雾电离正离子模式;毛细管电压:3.0 KV;锥孔电压:35 V;离子源温度:100℃;脱溶剂气温度:300℃;脱溶剂气流速:800 L·h⁻¹;扫描时间:0.5 s;扫描时间间隔:0.02 s;质荷比范围:50–1 500;数据采集模式:centroid;以甲酸钠溶液校正质量轴,以亮氨酸脑啡肽(Leucine-enkephalin)为内标校正质量精度,LockSpray™ 流速 5 μL·min⁻¹。

2.3 溶液制备

2.3.1 参照物溶液的制备

精密称取野黄芩苷对照品、芹菜素-7-O-葡萄糖苷对照品、野黄芩素对照品和芹菜素对照品适量,加甲醇溶解,制成质量浓度分别约为 100 μg·mL⁻¹的混合溶液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备

取半枝莲药材粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 25 mL,称定重量,回流 30 min,放冷,再称定重量,用 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验

取 S1 样品,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次,考察共有峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,该仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验

取 S1 样品,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件分别在 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 小时测定,考察共有峰的相对保留时间和相对峰面积的稳定性,显示,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,该供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验

取 S1 样品,按“2.3.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件分析,考察共有峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性,结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 2.0%,该方法重复性良好。

2.5 色谱峰的指认

取 S1 样品约 0.1 g,流动相为甲醇(A)–0.2% 甲酸溶液(B),其他同“2.3”、“2.1”和“2.2”项下的条件。通

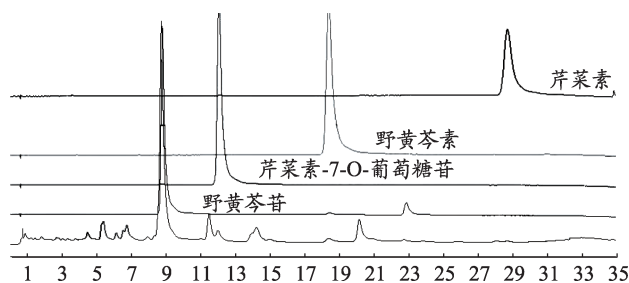


图1 半枝莲样品色谱峰的指认

过比对化合物的色谱峰保留行为、精确分子量以及对照品,半枝莲样品 UPLC 指纹图谱中 4 个色谱峰得到明确的指认,分别为野黄芩苷(峰 3)、芹菜素-7-O-葡萄糖苷(峰 5)、野黄芩素(峰 9)和芹菜素(峰 11),如图 1 所示;各色谱峰的峰号、保留时间、名称、CAS 号、分子式和结构式见表 2。

2.6 指纹图谱的建立和相似度评价

按“2.3.2”项下方法制备 26 批半枝莲药材供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件测定,对所得到的指纹图谱数据进行分析,结果见表 3;将结果导入国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”,以 S1 样品的图谱作为相似度计算校正的参照谱,时间窗宽度设为 0.10 s,建立共有模式和指纹图谱叠加图,并计算各批次与对照指纹图谱的相似度,结果见图 2、3 和表 4。结果表明,确定 26 批半枝莲样品中有 11 个共有峰,所有指纹峰的相对保留时间 RSD 均小于 2.0%,相对峰面积 RSD 范围为 31.0%–118.5%,说明 3 个产地半枝莲各成分含量存在一定差异;26 批半枝莲药材的相似度范围为 0.871–0.999,不同产地半枝莲中的各成分和比例较有一定的差异。

2.7 主成分分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对 26 批半枝莲药材共有峰的峰面积进行标准化处理,存为变量并作主成分分析,计算其主成分特征值累积贡献率、初始因子载荷矩阵及综合得分。

相关系数的特征值和方差贡献率见表 5,初始因子载荷矩阵见表 6。由表 5、6 可知,第 1 主成分的特征根为 6.328,累计贡献率为 57.528%,野黄芩苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、成分 1、4、6、7、8 及 10 在第 1 主成分上有较高载荷,说明第 1 主成分主要反映了以上 8 个成分的信息;第 2 主成分特征根为 1.833,累计贡献率为 16.662%,主要反映了野黄芩素和芹菜素的信息。以主成分为变量得到得分图 4,由图可知,距离原

表2 指认峰的相关信息

峰号	保留时间/min	名称	CAS号	分子式	结构式
峰3(S)	8.709	野黄芩苷	27740-01-8	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	
峰5	11.985	芹菜素-7-O-葡萄糖苷	29741-09-1	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	
峰9	18.337	野黄芩素	529-53-3	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	
峰11	28.041	芹菜素	520-36-5	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	

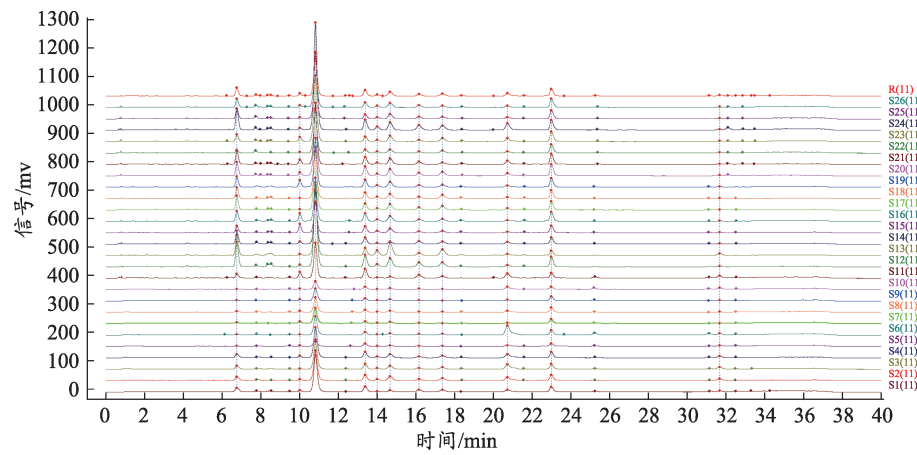


图3 26批半枝莲UPLC指纹图谱叠加图

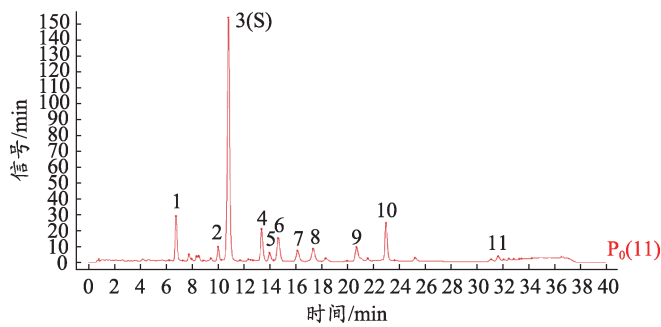


图2 半枝莲药材的UPLC共有模式图

点较远的几个点就是主成分1和2中权重值大的成分,其在决定产地差异上具重大作用。

表3 半枝莲药材指纹图谱共有峰相对保留时间和相对峰面积

峰号	相对保留时间RSD/%	相对峰面积RSD/%
1	0.827	49.8
2	0.408	91.8
野黄芩苷(3S)	0.0	0.0
4	0.328	49.7
5(芹菜素-7-O-葡萄糖苷)	0.416	45.0
6	0.373	33.6
7	0.448	33.5
8	0.426	31.0
9(野黄芩素)	0.513	118.1
峰10	0.543	39.8
11(芹菜素)	0.657	118.5

表4 不同产地半枝莲相似度评价结果

样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度
S1	0.995	S8	0.987	S15	0.982	S22	0.992
S2	0.996	S9	0.980	S16	0.991	S23	0.996
S3	0.985	S10	0.806	S17	0.997	S24	0.997
S4	0.994	S11	0.978	S18	0.997	S25	0.996
S5	0.920	S12	0.993	S19	0.996	S26	0.997
S6	0.871	S13	0.985	S20	0.999		
S7	0.989	S14	0.996	S21	0.998		

表5 特征值和方差贡献率

成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差百分比	方差累积值%	合计	方差百分比	方差累积值%
1	6.328	57.528	57.528	6.328	57.528	57.528
2	1.833	16.662	74.189	1.833	16.662	74.489
3	1.160	10.548	84.737	1.160	10.548	84.737
4	0.797	7.244	91.981			
5	0.454	4.123	96.104			
6	0.145	1.319	97.423			
7	0.139	1.261	98.684			
8	0.107	0.969	99.653			
9	0.028	0.259	99.912			
10	0.008	0.072	99.984			
11	0.002	0.016	100.000			

表6 初始因子载荷矩阵

峰号	成分		
	1	2	3
1	0.959	-0.059	-0.090
2	0.201	-0.394	0.720
野黄芩苷	0.957	-0.005	-0.030
4	0.868	0.090	0.359
5(芹菜素-7-O-葡萄糖苷)	0.856	0.004	-0.348
6	0.889	-0.035	-0.299
7	0.881	0.131	0.244
8	0.919	0.078	-0.193
9(野黄芩素)	0.006	0.811	0.366
10	0.714	-0.408	0.249
11(芹菜素)	0.209	0.903	0.028

用3个主成分计算半枝莲药材综合得分,结果如表7所示。整体来看,产自河南的半枝莲材质量相对较优;产自安徽产地的半枝莲药材综合得分排名靠后;产自四川产地的半枝莲排名波动较大,这可能是半枝莲实际情况,质量差异大,也可能因为采样区域性问题的,批次较少,缺乏代表性。

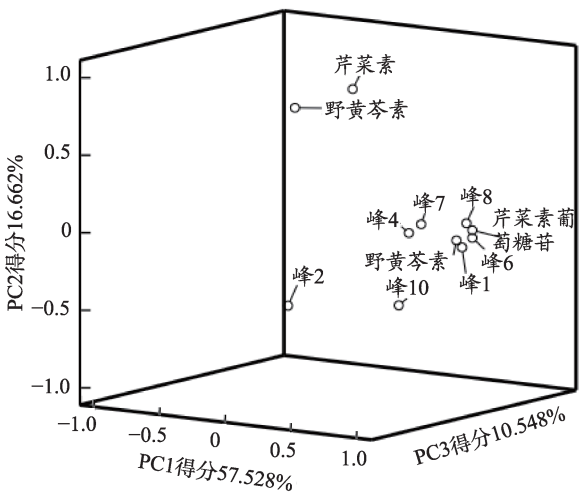


图4 不同产地半枝莲的载荷图

表7 26批半枝莲样品的综合得分排序

编号	综合得分	排名	编号	综合得分	排名	编号	综合得分	排名
S1	-0.68	19	S10	-2.18	22	S19	0.47	8
S2	-0.29	16	S11	0.43	10	S20	1.86	4
S3	-0.38	17	S12	3.15	2	S21	1.07	5
S4	-0.17	14	S13	2.85	3	S22	-0.93	20
S5	-2.66	26	S14	0.11	11	S23	0.58	7
S6	-1.21	21	S15	-0.47	18	S24	4.37	1
S7	-2.32	23	S16	0.47	9	S25	-0.08	13
S8	-2.33	24	S17	0.81	6	S26	-0.18	15
S9	-2.40	25	S18	0.10	12			

3 讨论

通过单因素分析,本研究考察了提取溶剂、提取方式及提取时间对半枝莲指纹图谱的影响;考察了半枝莲最佳吸收波长和流动相,确认了半枝莲药材UPLC指纹图谱的供试品处理方法以及最佳色谱条件。

本研究应用质谱共指认了4个共有峰,它们分别是野黄芩苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、野黄芩素及芹菜素。根据质谱信息,并结合文献,确定保留时间为25.236 min的色谱峰为木犀草素,推测峰4(保留时间:13.369 min)可能为黄芩素的同分异构体^[18];峰10(保留时间为22.974 min)可能为互为同分异构体的异野黄芩素-8-O-葡萄糖苷、5,8,2'-三羟基-7-O-葡萄糖醛酸黄酮苷或异高山黄芩素-8-O-β-D-葡萄糖苷^[19,20]。

从指纹图谱建立的过程中可知,不同产地同一色谱峰的峰高差异较大,这可能与半枝莲的生长环境、

地理环境等多种因素有关。因此,选择最适宜生长条件是建立半枝莲药材的基地,控制药材质量的稳定

性,生产出高质量中药材的关键环节。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:中国医药科技出版社, 2015:118-119.
- 2 刘婷, 王晓妍, 曹志群. 半枝莲药理作用及临床应用研究进展. 河南中医, 2013, 33(3): 424-426.
- 3 蒋小岗, 顾振纶. 半枝莲的化学成分和药理作用. 中国野生植物资源, 2004, 23(1): 3-5.
- 4 张同波, 张红芹. 半枝莲 HPLC 指纹图谱相似度分析. 中国医疗前沿, 2008, 3(22): 4-5.
- 5 林敬明, 蔡杏桩, 罗荣城. 半枝莲的 HPLC 指纹图谱研究. 中药材, 2006, 29(6): 550-552.
- 6 王慧彬, 王英锋, 刘锁兰. 半枝莲的 HPLC 指纹图谱研究. 药物分析杂志, 2007, 6: 847-850.
- 7 赵伟伟, 王颢颐, 任燕. 半枝莲高效液相色谱指纹图谱研究. 广州化工, 2017, 22: 100-102.
- 8 陈香爱, 袁志芳, 刘伟娜, 等. 不同产地半枝莲药材及其混淆品 HPLC 指纹图谱研究. 中成药, 2007, 10.
- 9 潘瑞景, 郭方迺, 卢红梅, 等. 不同产地半枝莲药材及其混淆品的气相色谱-质谱指纹图谱研究. 分析科学学报, 2011, 27(6): 715-718.
- 10 张祖成, 赵师成. 半枝莲的药用及栽培. 特等经济动植物, 2003, 6: 24.
- 11 邵建强. 中药指纹图谱的研究进展. 中草药, 2009, 40(6): 994-998.
- 12 曹玲, 王志刚, 王连芝. 色谱法在中药指纹图谱研究中的应用. 中国当代医药, 2012, 19(1): 16-17.
- 13 苏键, 陈军, 何洁. 主成分分析法及其应用. 轻工科技, 2012(9): 12-13.
- 14 吕琴. 苦杏仁液相色谱指纹图谱研究. 湖南:中南大学硕士研究生论文, 2012.
- 15 郝敏. 河南产连翘饮片的质量分析研究. 河南:河南中医药大学硕士研究生论文, 2016.
- 16 赖燕华. 液相色谱和光谱法结合化学计量学用于中药指纹图谱研究. 江西:南昌大学硕士研究生论文, 2010.
- 17 曹建军. 地黄基于 HPLC 指纹图谱的质量评价及种质资源利用研究. 陕西:西北农林科技大学硕士研究生论文, 2012.
- 18 任强. 半枝莲化学成分及药理作用研究进展. 济宁医学院学报, 2014, 37(3): 157-161.
- 19 王慧彬, 李琳, 张秀芝, 等. HPLC-MS/MS 法鉴定半枝莲指纹图谱共有峰. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(12): 1922-1925.
- 20 梁晨, 杨国春, 李丹慧, 等. 半枝莲化学成分研究. 中草药, 2016, 47(24): 4322-4325.

Study on Quality of *Scutellaria barbata* D.Don in Different Main Producing Areas Based on UPLC Fingerprint and Principal Component Analysis

Yang Minjuan, Luo Yuqin, Guan Yonghe, Zhu Dequan

(Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China)

Abstract: Objective To evaluate the quality of *Scutellaria barbata* D.Don in different main producing areas. Methods An Ultra Performance Liquid Chromatograph (UPLC) method was developed to establish the fingerprint of *Scutellaria barbata* D.Don. UPLC /High Resolution Mass Spectrometry were applied to identify common peaks, and PCA was used to analyze UPLC fingerprints. Results There were 11 common peaks in the UPLC fingerprint of all *Scutellaria barbata* D. Don, and the 4 peaks were scutellarin, apigenin-7-glucoside, scutellarein, apigenin. The similarity of *Scutellaria barbata* D. Don from Henan, Anhui and Sichuan was 0.871-0.999. According to PCA, scutellarin, apigenin-7-O-glucoside, components 1, 4, 6, 7, 8 and 10 played an important role in the quality of *Scutellaria barbata* D. Don. Conclusion The UPLC fingerprint combined with PCA can objectively evaluate the quality of *Scutellaria barbata* D.Don in different main producing areas, and the contribution of each component to quality.

Keywords: *Scutellaria barbata* D. Don, Ultra performance liquid chromatograph, Chromatographic fingerprint, Ultra Performance Liquid Chromatography /High Resolution Mass Spectrometry, Principal component analysis

(责任编辑: 周阿剑, 责任译审: 邹建华)