

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.23.016

不同生长阶段白花蛇舌草高效液相色谱指纹图谱及化学模式识别

黄家辉

(中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院药剂科,福建 福州 350000)

摘要:目的 建立生长期、开花期、结果期3个生长阶段白花蛇舌草的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并结合化学模式识别技术评价其质量。方法 色谱柱为Shiseido Capcell Pak MG C II - C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.15%醋酸溶液(梯度洗脱),流速为0.9 mL/min,检测波长为238 nm(去乙酰车叶草酸酐和车叶草苷)、306 nm(4-香豆酸)、323 nm(阿魏酸)、369 nm(槲皮素、芦丁及山柰酚),柱温为30℃,进样量为10 μL;并采用SPSS 24.0统计学软件和SIMCA 16.0软件对HPLC指纹图谱进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。结果 HPLC指纹图谱共标定出白花蛇舌草的17个共有峰,并指出7个色谱峰。PCA结果显示,白花蛇舌草3个生长阶段的综合质量排序为结果期>开花期>生长期。OPLS-DA模型可将3个生长阶段的样品进行分类,并筛选出导致不同生长阶段含量差异的6个标志物,分别为峰13、峰12(阿魏酸)、峰4、峰16(槲皮素)、峰3(去乙酰车叶草酸酐)、峰17(山柰酚)。结论 HPLC指纹图谱结合化学模式识别技术可反映白花蛇舌草不同生长阶段含量的差异,为其采收和质量评价提供参考。

关键词:白花蛇舌草;生长阶段;高效液相色谱法;指纹图谱;多成分分析;正交偏最小二乘判别分析法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)23-0071-04

HPLC Fingerprint and Chemical Pattern Recognition of *Hedyotis Diffusa* at Different Growth Stages

HUANG Jiahui

(Department of Pharmacy, The 900 Hospital of the Joint Logistics Support Force of Chinese PLA, Fuzhou, Fujian, China 350000)

Abstract: Objective To establish the high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of *Hedyotis diffusa* at three growth stages including growth phase, flowering phase and fruiting phase, and to evaluate its quality combined with the chemical pattern recognition technology. **Methods** The chromatographic column was Shiseido Capcell Pak MG C II - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.15% acetic acid solution (gradient elution), the flow rate was 0.9 mL/min, the detection wavelengths were 238 nm (deacetylation plantain anhydride and asperuloside), 306 nm (4-coumaric acid), 323 nm (ferulic acid), 369 nm (quercetin, rutin and kaempferol), the column temperature was 30℃ and the injection volume was 10 μL. The SPSS 24.0 statistical software and SIMCA 16.0 software were used to conduct the principal component analysis (PCA) and the orthogonal partial least squares - discriminant analysis (OPLS - DA) for the HPLC fingerprint. **Results** Seventeen common peaks and seven chromatographic peaks of *Hedyotis diffusa* were identified by the HPLC fingerprint. The results of PCA showed that the comprehensive quality of fruiting phase of *Hedyotis diffusa* was highest, followed by that of flowering phase and growth phase. The samples at three growth stages could be classified and the six markers that led to the content differences of the above samples could be screened out by the OPLS - DA model, and the six markers were peak 13, peak 12 (ferulic acid), peak 4, peak 16 (quercetin), peak 3 (deacetylation plantain anhydride) and peak 17 (kaempferol). **Conclusion** The HPLC fingerprint combined with the chemical pattern recognition technology can reflect the content differences of *Hedyotis diffusa* at different growth stages, which can provide a reference for its harvest and quality evaluation.

Key words: *Hedyotis diffusa*; growth stage; HPLC; fingerprint; multi-component analysis; orthogonal partial least squares - discriminant analysis

白花蛇舌草属茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* 的干燥全草,为民间常用传统中药材,味苦、甘,性寒,其叶形如舌,花白色,又名蛇舌癭、羊须草,主要分布于我国广西、湖南、云南等地^[1-2]。现代药理学研究表明,白花蛇舌草含环烯醚萜类(车叶草苷、去乙酰车叶草酸酐)、黄酮类(槲皮素、芦丁和山柰酚)、三萜类、有机酸类(阿魏酸、4-香豆酸)等成分,具有抗氧化及增强非特异性免疫作用,对多种肿瘤细胞有抑制作用^[3-4]。主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)

法是化学模式识别常用的技术手段,具有直观、可视化的分类效果和高精度的预测性,广泛应用于中药材的质量评价^[5]。白花蛇舌草化学成分复杂,毒副作用小,临床应用广泛,但缺乏法定的质量控制方法,仅收载于各省的中药材炮制规范。虽已有文献报道运用高效液相色谱(HPLC)法测定该药材中槲皮素、熊果酸、车叶草苷等多种成分的含量^[6-8],但未报道不同生长阶段白花蛇舌草化学成分的变化。为全面、整体监控白花蛇舌草整个生长阶段的质量,本研究中采用HPLC法分析白花

蛇舌草的生长期、开花期、结果期3个生长阶段指纹图谱的差异,筛选差异标志物,并通过PCA及OPLS-DA法分析白花蛇舌草的最佳采收期,为其质量控制提供理论支持。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

e2695-2998型高效液相色谱仪(美国沃特世公司),配有2998型二极管阵列检测器(DAD);AL105A型电子天平(梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司,精度为0.01 mg);Elmasonic P型超声波清洗器(德国Elma公司,功率为350 W,频率为40 kHz);QYSW-20A型超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 试剂

对照品车叶草苷(批号为181117,含量 $\geq 98.0\%$),去乙酰车叶草酸酐(批号为190121,含量 $\geq 96.0\%$),山柰酚(批号为180928,含量 $\geq 98.0\%$),均购于成都瑞芬思科技有限公司;对照品4-香豆酸(批号为112037-201801,含量以99.3%计),阿魏酸(批号为110773-202015,含量以99.2%计),槲皮素(批号为100081-202010,含量以98.3%计),芦丁(批号为100080-202012,含量以92.5%计),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇均为色谱纯,其他试剂均为分析纯;12批白花蛇舌草(编号为S1-S12)来源于安徽亳州皖北中药材种植基地,阴干,经福建中医药大学黄叶方教授鉴定均为正品。采收时间与生长阶段见表1。

表1 12批白花蛇舌草采收时间与生长阶段

Tab.1 Harvest time and growth stages of 12 batches of *Hedyotis diffusa*

编号	采收时间	生长阶段
S1-S4	2019年4月12日	生长期
S5-S8	2019年7月8日	开花期
S9-S12	2019年10月11日	结果期

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[9-11]

色谱柱:Shiseido Capcell Pak MG C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.15%醋酸溶液(B),梯度洗脱(0~19 min时6%A, 19~35 min时6%A→10%A, 35~42 min时10%A→35%A, 42~62 min时35%A→65%A);流速:0.9 mL/min;检测波长:238 nm(0~10 min时去乙酰车叶草酸酐, 19~35 min时车叶草苷), 306 nm(10~19 min时4-香豆酸), 323 nm(35~42 min时阿魏酸), 369 nm(42~62 min时槲皮素、芦丁及山柰酚);柱温:30℃;进样量:10 μ L。

2.2 溶液制备

分别取车叶草苷、去乙酰车叶草酸酐、4-香豆酸、

阿魏酸、槲皮素、芦丁、山柰酚对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为225.4, 196.8, 162.7, 200.1, 207.9, 151.5, 181.5 μ g/mL的混合对照品溶液。取粉碎过2号筛的白花蛇舌草1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,密塞,称定质量,超声提取(功率为350 W,频率为40 kHz,温度为30℃)40 min,放冷至室温,再次称定质量,并用甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:取白花蛇舌草(编号为S11)适量,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次。结果以11号峰车叶草苷为参照峰,17个共有峰相对保留时间的RSD为0.17%~0.65%($n=6$),相对峰面积的RSD为0.29%~1.02%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取白花蛇舌草(编号为S11)适量,依法制备供试品溶液,于室温下放置0, 5, 10, 15, 20, 24, 36 h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果以11号峰车叶草苷为参照峰,17个共有峰相对保留时间的RSD为0.28%~0.77%($n=7$),相对峰面积的RSD为0.46%~1.83%($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置36 h内稳定性良好。

重复性试验:取白花蛇舌草(编号为S11)适量,依法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定。结果以11号峰车叶草苷为参照峰,17个共有峰相对保留时间的RSD为0.67%~1.23%($n=6$),相对峰面积的RSD为0.89%~2.44%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4 HPLC 指纹图谱研究

参照峰选定:取12批(编号为S1-S12)白花蛇舌草各适量,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。结果色谱图中11号峰车叶草苷的保留时间适中,峰面积最大且分离度好,故以车叶草苷为参照峰。

相似度评价:采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012版分析12批(编号为S1-S12)白花蛇舌草的色谱图。以S11为参照图谱,多点校正全峰匹配,12批白花蛇舌草HPLC叠加指纹图谱见图1。标定了17个共有峰,以对照图谱为参照进行相似度计算,12批白花蛇舌草的相似度分别为0.735, 0.717, 0.755, 0.763, 0.862, 0.818, 0.835, 0.849, 0.942, 0.936, 0.953, 0.937,表明12批白花蛇舌草在生长期、开花期、结果期3个不同生长阶段间存在一定差异。

相对保留时间和相对峰面积:12批(编号为S1-S12)白花蛇舌草指纹图谱中,各共有峰相对保留时间的RSD为0.21%~1.83%,共有峰相对峰面积的RSD为

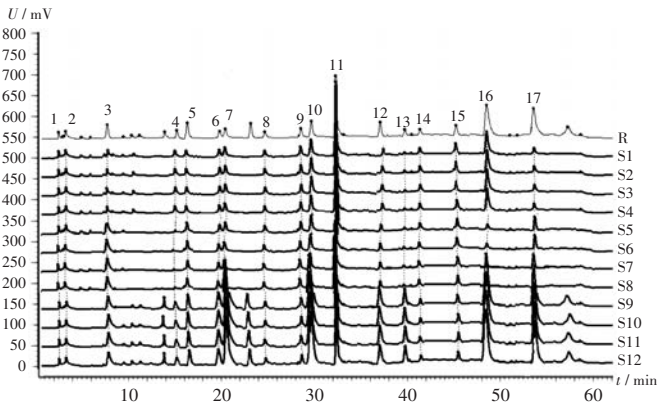
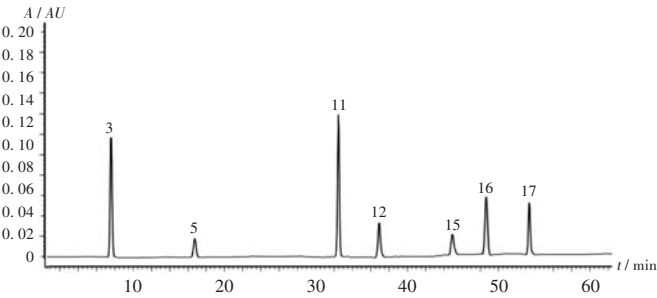


图1 12批白花蛇舌草高效液相色谱叠加指纹图谱
Fig.1 HPLC superimposed fingerprint of 12 batches of
Hedyotis diffusa



3. 去乙酰车叶草酸酐 5. 4-香豆酸 11. 车叶草苷 12. 阿魏酸
15. 芦丁 16. 槲皮素 17. 山柰酚
图2 混合对照品溶液高效液相色谱图
Fig.2 HPLC chromatograms of mixed reference solution
3. Deacetylation plantain anhydride 5. 4-Coumaric acid 11. Asperulo-
side 12. Ferulic acid 15. Rutin 16. Quercetin 17. Kaempferol

3. 73% ~ 39. 18%, 表明 12 批白花蛇舌草共有峰的出峰时间相对稳定, 峰面积相差较大, 白花蛇舌草不同生长阶段间存在差异。

共有峰指认及相关分析: 通过保留时间指认出 7 个色谱峰, 分别为 3 号峰去乙酰车叶草酸酐 (保留时间 7. 896 min)、5 号峰 4-香豆酸 (保留时间 17. 058 min)、11 号峰车叶草苷 (保留时间 32. 288 min)、12 号峰阿魏酸 (保留时间 37. 045 min)、15 号峰芦丁 (保留时间 45. 187min)、16 号峰槲皮素 (保留时间 48. 966 min)、17 号峰山柰酚 (保留时间 53. 884 min)。详见图 2。

2.5 PCA

采用 SPSS 24. 0 统计学软件分析, 导入 17 个共有指纹峰数据, 采用因子分析项下 PCA 分析 12 批不同生长阶段白花蛇舌草的主成分, 并生成因子得分系数 (FAC_n)。将提取的 3 个主成分 (特征值 $> 1. 0$) 通过权重系统组合, 可得综合得分公式 $F = 0. 513f_1 + 0. 196f_2 + 0. 102f_3$ (f 代表 3 个主成分得分)。 F 值越高, 白花蛇舌草指纹图谱综合得分越高。由表 2 可知, 白花蛇舌草 3 个生长阶段的综合质量排序为结果期 $>$ 开花期 $>$ 生长期。

表2 主成分因子得分系数及综合得分

样品编号	FAC_1	FAC_2	FAC_3	F (分)
S1	- 0. 185	1. 037	0. 993	0. 091
S2	0. 367	1. 286	- 0. 390	0. 037
S3	- 0. 280	1. 391	1. 082	0. 104
S4	1. 281	0. 232	- 1. 103	0. 112
S5	0. 314	- 0. 371	0. 871	0. 126
S6	1. 203	- 1. 925	- 0. 350	0. 213
S7	0. 281	0. 322	1. 095	0. 189
S8	1. 274	0. 013	- 1. 255	0. 148
S9	1. 289	0. 118	- 0. 661	0. 302
S10	1. 276	0. 015	- 1. 257	0. 275
S11	1. 282	0. 234	- 1. 106	0. 294
S12	1. 275	- 0. 219	1. 735	0. 389

2.6 OPLS - DA

为快速识别出 3 个不同生长阶段白花蛇舌草指纹图谱的相似性和差异性, 筛选出差异性成分, 将 17 个共有指纹峰面积导入 SIMCA 16. 0 软件, 对 12 批白花蛇舌草进行 OPLS - DA。结果见图 3 和图 4。为综合分析白花蛇舌草不同生长阶段的差异性, 提取 3 个主成分, 设置分类 Y 矩阵变量随机排列进行置换检验, 结果见图 5。模型解释率参数 (R^2) = 0. 984 $>$ 0. 5, 预测能力参数 (Q^2) = 0. 968 $>$ 0. 5, 表明所建模型预测能力较强; R^2 拟合直线和 Q^2 拟合直线在 Y 坐标轴的截距分别为 0. 041 1 和 - 0. 349 0, 表明所建模型不存在过拟合现象。

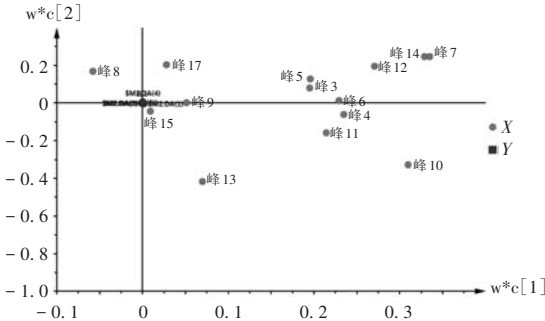


图3 OPLS - DA 荷载散点图

Fig.3 Loading plot of OPLS - DA

由图 3 可知, OPLS - DA 模型中所有数据点均在 95% 置信区间内, 表明生长期、开花期、结果期 3 个生长阶段白花蛇舌草的化学成分及含量存在一定差异, 但同一生长阶段样品的相似度高。由图 4 可知, 峰 13、峰 12、峰 4、峰 16、峰 3、峰 17 的变量重要性投影值 (VIP) 均大于 1, 分别为 2. 02, 1. 64, 1. 23, 1. 19, 1. 08, 1. 01, 即为差异标志物, 这 6 个化合物对结果权重的影响率大于 50%。因此, 引起不同生长阶段白花蛇舌草含量差异的主要标志性成分分别为峰 13、峰 12 (阿魏酸)、峰 4、峰 16 (槲皮素)、峰 3 (去乙酰车叶草酸酐)、峰 17 (山柰酚)。

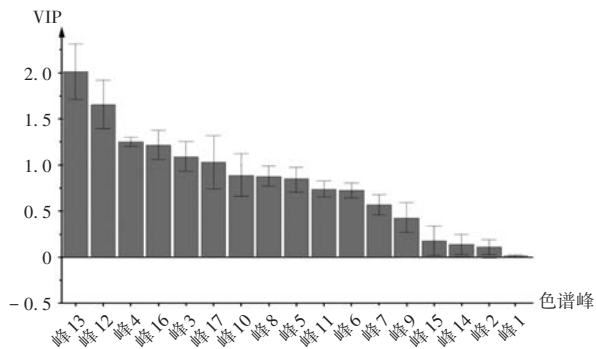


图4 OPLS-DA VIP图

Fig. 4 VIP plot of OPLS-DA

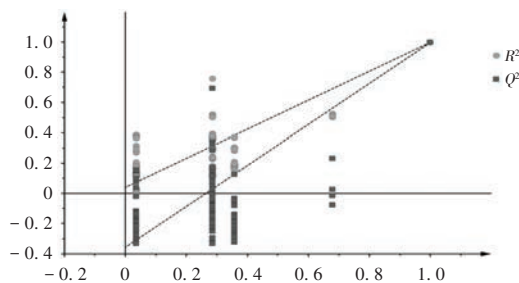


图5 OPLS-DA模型置换检验图

Fig. 5 Permutation test of OPLS-DA

3 讨论

3.1 色谱条件优化

最佳检测波长选择:用DAD对车叶草苷、去乙酰车叶草酸酐、4-香豆酸、阿魏酸、槲皮素、山柰酚对照品甲醇溶液的紫外-可见光(200~400 nm波长范围内)进行全波长扫描,得到最大波长分别为车叶草苷及去乙酰车叶草酸酐($\lambda_{\max} = 238$ nm),4-香豆酸($\lambda_{\max} = 306$ nm),阿魏酸($\lambda_{\max} = 323$ nm),槲皮素、芦丁及山柰酚($\lambda_{\max} = 369$ nm),故选择分段变换波长检测法检测上述7种成分。

流动相选择:由于白花蛇舌草中7种化学成分的极性相差较大,本研究选用不同流动相体系[乙腈-水溶液、甲醇-水溶液、乙腈-醋酸溶液(0.10%,0.15%,0.20%)]进行梯度洗脱,以优化色谱条件。结果表明,流动相体系为乙腈-醋酸溶液时对色谱峰峰形和保留时间均有明显影响。不加醋酸时,色谱峰出现不同程度拖尾;加入醋酸后,随着浓度的增加,色谱峰的对称性增加。考虑到色谱柱的耐酸范围,最终选择乙腈-0.15%醋酸溶液为流动相。

3.2 化学模式识别分析

指纹图谱作为一种综合的可量化技术手段,能反映中药内在化学成分的多变量信息和数据,但目前所采用的指纹图谱相似度评价系统缺乏多维立体性^[12-13]。化学模式识别技术可迎合指纹图谱的整体性和模糊性要求,利用统计学软件对所含成分进行分类,可对指纹图谱进行多维综合分析,实现数据的识别功

能^[14-15]。本研究中通过PCA模型间接反映了不同生长阶段白花蛇舌草的综合质量;OPLS-DA模型判别出白花蛇舌草生长期、开花期、结果期3个生长阶段的指纹图谱,筛选出6个差异标志物,并通过对照品比对确认出4种成分,分别为3号峰去乙酰车叶草酸酐、12号峰阿魏酸、16号峰槲皮素、17号峰山柰酚。

3.3 方法评价

本研究中建立了3个生长阶段白花蛇舌草的HPLC指纹图谱分析方法,确定出了17个共有指纹峰,经化学模式识别技术确定最佳采收期为结果期,并筛选出6个差异标志物,可为完善白花蛇舌草的质量标准提供参考。

参考文献

- [1] 韦胤寰. 白花蛇舌草研究进展[J]. 山西中医, 2018, 34(12):53-56.
- [2] 侯山岭. 中药白花蛇舌草化学成分及药理活性研究进展[J]. 中医临床研究, 2018, 10(6):140-141.
- [3] 李波. 白花蛇舌草的化学成分和药理作用研究进展[J]. 天津药学, 2016, 28(5):75-78.
- [4] 王骁, 范焕芳, 李德辉, 等. 白花蛇舌草的抗癌作用研究进展[J]. 中国药房, 2019, 30(10):1428-1431.
- [5] 邹妍, 鄢海燕. 基于PCA及PLS-DA算法分析决明子炒制前后化学成分的变化[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(19):2027-2030.
- [6] 王勇, 杨秀荣, 张丽, 等. HPLC法同时测定白花蛇舌草中槲皮素和东莨菪内酯的含量[J]. 中国药师, 2019, 22(9):1761-1763.
- [7] 刘慧妍, 黄馨慧, 张艳海. HPLC法快速测定8种中药中齐墩果酸和熊果酸[J]. 中草药, 2017, 48(10):1998-2001.
- [8] 李存满, 张志英, 王文淑. HPLC同时测定白花蛇舌草注射液5种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4):89-92.
- [9] 段和祥, 刘绪平, 陈希. HPLC法同时测定白花蛇舌草中6种有机酸类成分的含量[J]. 中药材, 2019, 42(8):1842-1845.
- [10] 陈建国, 张露, 李雪, 等. HPLC法测定诺尼果汁中两种环烯醚萜类成分的含量[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(2):142-145.
- [11] 翟学佳, 吕永宁. HPLC法同时测定白花蛇舌草中7种活性成分的含量[J]. 中国药师, 2016, 19(1):70-72.
- [12] 杨方良, 张晶, 孙国祥, 等. 中药组方指纹图谱研究方法和思路[J]. 色谱, 2016, 34(7):715-725.
- [13] 姚瑶, 赵淑淑, 姚俊霞, 等. 郁金配方颗粒HPLC指纹图谱及指标成分含量测定研究[J]. 中国药业, 2021, 30(10):57-60.
- [14] 黄卫娟, 韦卓纯, 姜松, 等. 不同产地姜黄药材高效液相色谱指纹图谱与化学模式识别研究[J]. 中国药业, 2019, 28(12):24-27.
- [15] 王露露, 孙倩怡, 杨慧海, 等. 模式识别及其在中药质量评价中的应用[J]. 中草药, 2016, 47(23):4282-4288.

(收稿日期:2021-12-27;修回日期:2022-07-20)