

# 基于 HPLC 指纹图谱和含量测定的不同产地半边莲药材质量评价研究

李振雨<sup>1,2\*</sup>, 刘晓霞<sup>1,2</sup>, 冯涌微<sup>1,2</sup>,  
位翠杰<sup>1,2</sup>, 何民友<sup>1,2</sup>, 陈向东<sup>1,2</sup>, 孙冬梅<sup>1,2</sup>, 罗文汇<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>广东一方制药有限公司; <sup>2</sup>广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244

**摘要:** 建立半边莲药材高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 并对有效成分地奥司明和蒙花苷的含量进行测定, 为不同产区半边莲药材的质量评价提供参考。HPLC 指纹图谱的建立采用 Thermo Acclaim C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液, 流速为 1.0 mL/min, 梯度洗脱, 检测波长为 340 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL; 通过质谱分析结合对照品比对, 对共有峰进行鉴定; 借助中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版本) 对指纹图谱进行相似度评价, 通过聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别式分析 (OPLS-DA) 比较不同产区半边莲药材的质量差异; 并对半边莲药材地奥司明和蒙花苷的含量进行测定。结果显示, 18 批半边莲药材指纹图谱具有 11 个共有峰, 质谱分析和对照品比对, 共确证 4 个共有峰, 分别为木犀草素 7-二葡萄糖苷酸、海常黄苷、地奥司明和蒙花苷; 与 mzCloud 标准数据库比对, 对另外 4 个共有峰进行了结构预测。相似度评价结果显示, 河南、安徽两个产区的半边莲药材较为相似, 另外 4 个产区的半边莲药材相似度较为一致。HCA 和 PCA 均将不同产区的半边莲药材分为两类, 其中河南、安徽两个产区的样品归为一类, 湖北、贵州、江西和湖南产区的样品归为另一类, 结果与相似度评价结果基本一致。OPLS-DA 发现 7 个差异性标志物, 根据 VIP 值排序, 分别为峰 2 > 峰 1 > 峰 10 > 峰 11 > 峰 3 > 峰 8 > 峰 5。含量测定结果显示, 3 批河南产区和安徽产区的半边莲药材地奥司明和蒙花苷的含量明显高于其他产区。该方法可以有效评价不同产区半边莲药材的质量差异性, 为其质量控制和药材选购提供参考。

**关键词:** 半边莲; HPLC 指纹图谱; 含量测定; 质量评价

中图分类号: R282.4; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)1-0001-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.1.001

## Study on quality evaluation of *Lobelia chinensis* Lour. from different habitats based on HPLC fingerprint and content determination

LI Zhen-yu<sup>1,2\*</sup>, LIU Xiao-xia<sup>1,2</sup>, FEGN Yong-wei<sup>1,2</sup>,  
WEI Cui-jie<sup>1,2</sup>, HE Min-you<sup>1,2</sup>, CHEN Xiang-dong<sup>1,2</sup>, SUN Dong-mei<sup>1,2</sup>, LUO Wen-hui<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd.;

<sup>2</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, China

**Abstract:** HPLC fingerprints of *L. chinensis* were established, and the contents of diosmin and linarin were determined to provide reference for the quality evaluation of *L. chinensis* in different production areas. The HPLC fingerprints were established by Thermo Acclaim C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) chromatographic column. The mobile phase was acetonitrile-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution. The flow rate was 1.0 mL per minute with gradient elution. Detection wavelength was 340 nm. The column temperature was 35 °C. The injection volume was 10 μL. The common peaks were identified by mass spectrometric analysis and comparison with reference substances. With the help of the similarity evaluation system of chromatographic fingerprints of traditional Chinese medicine (2012.130723), the similarity evaluation was carried out on the finger-

收稿日期: 2022-06-16 接受日期: 2022-10-10

基金项目: 国家工业和信息化部 2019 年产业技术基础公共服务平台项目 (2019-00902-1-2); 广东省基础与应用基础研究基金 (2020B1515120033)

\* 通信作者 Tel: 86-757-85128602; E-mail: lzy1083656123@126.com

prints. Cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to compare the quality differences of *L. chinensis* from different habitats. The contents of diosmin and linarin in *L. chinensis* were determined. The results showed that there were 11 common peaks in the fingerprints of 18 batches of *L. chinensis*. Four common peaks were confirmed by mass spectrometry analysis and comparison with the reference substance, namely luteolin 7-diglucoside, clerodendrin, diosmin and linarin. Compared with the mzCloud standard database, The structure of the other four common peaks were predicted. The results of similarity evaluation showed that the medicinal materials of *L. chinensis* in Henan and Anhui provinces were similar, and the medicinal materials of *L. chinensis* in the other four regions were similar. HCA and PCA divided *L. chinensis* from different production areas into two categories. The samples from Henan and Anhui provinces were classified into one category, and the samples from Hubei, Guizhou, Jiangxi and Hunan provinces were classified into the other category. The results were basically consistent with the similarity evaluation results. OPLS-DA found 7 differential markers. According to the VIP values, they were peak 2 > peak 1 > peak 10 > peak 11 > peak 3 > peak 8 > peak 5. The content determination results showed that the contents of diosmin and linarin in three batches of *L. chinensis* from Henan and Anhui provinces were significantly higher than those from other provinces. This method can effectively evaluate the quality difference of *L. chinensis* from different producing areas, and provide reference for its quality control and purchase of medicinal materials.

**Key words:** *Lobelia chinensis*; HPLC fingerprint; content determination; quality evaluation

半边莲为桔梗科植物半边莲 *Lobelia chinensis* Lour. 的干燥全草, 具有清热解毒, 利尿消肿之功效<sup>[1]</sup>, 主产于河南、安徽、江西、贵州等地, 是临床常用的抗癌中药<sup>[2]</sup>。现代化学成分和药理学研究表明, 半边莲含有黄酮、苯丙素、生物碱等多种有效成分, 具有抗癌、改善微循环、镇痛消炎、抗氧化、预防和纠正血液系统的损伤、抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶等多种药理活性<sup>[3,4]</sup>。2020 年版《中国药典》半枝莲药材主要质量控制指标为薄层鉴别和浸出物测定, 说明半边莲药材质量控制仍不完善, 阻碍了半枝莲药材资源的进一步开发和利用。指纹/特征图谱作为中药质量控制的常用手段, 研究较多<sup>[5,6]</sup>。但对半边莲指纹/特征图谱的研究仍然较少<sup>[7,8]</sup>, 对不同产区半边莲药材的质量评价研究仍未见报道。本次研究采用指纹图谱和含量测定相结合, 通过化学计量学分析, 对不同产区半边莲药材的质量进行评价, 为其质量控制提供参考, 也为半边莲药材资源的选购和进一步开发提供依据。

## 1 仪器和材料

### 1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪 (e2695, 沃特世公司); Thermo Acclaim C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱; Thermo Vanquish Flex 超高效液相-Thermo Fisher QE 高分辨质谱联用仪 (赛默飞公司); 万分之一天平 (ME204E, 梅特勒-托利多公司); 百万分之一天平 (XP26, 梅特勒-托利多公司); 超纯水系统 (Milli-Q Direct, 默克股份有限公司)。

### 1.2 试剂与试药

试剂: 甲醇 (西陇科学股份有限公司); 二甲基亚砜 (阿拉丁试剂有限公司); 磷酸二氢钾 (西陇科学股份有限公司) 均为分析级; 乙腈 (默克股份有限公司) 为色谱级; 乙酸铵 (默克股份有限公司) 为 LC-MS 级; 水为超纯水 (实验室自制)。

试药: 地奥司明 (批号: 101348-201802, 含量: 97.3%, 中国食品药品检定研究院); 蒙花苷 (批号: 111528-201911, 含量: 98.5%, 中国食品药品检定研究院); 木犀草素 7-二葡萄糖苷酸 (批号: STD210928082, 纯度大于 95.0%, 成都德思特生物技术有限公司)。

海常黄苷 (批号: B20210512, 纯度大于 98.0%, 四川维克奇生物科技有限公司); 实验所用 18 批半边莲药材均由广东一方制药有限公司采购管理部于产地购买和收集, 经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定为桔梗科植物半边莲 *L. chinensis* 的干燥全草。经广东一方制药有限公司质量中心检定合格, 均符合 2020 年版《中国药典》(一部)“半边莲”药材项下规定; 18 批半边莲药材产地信息详见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 指纹图谱的建立

#### 2.1.1 色谱条件

选择 Thermo Acclaim C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱; 以乙腈为流动相 A, 以 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相 B; 质谱分析时流动相 B 为

表 1 半边莲药材产地信息  
Table 1 Origin information of *L. chinensis*

序号 No.	产地 Origin	采收时间 Collecting time
S1	湖北黄冈市罗田县	2019.06
S2	湖北黄冈市罗田县	2019.06
S3	湖北黄冈市罗田县	2019.06
S4	贵州省安顺市西秀区	2019.05
S5	贵州省安顺市西秀区	2019.05
S6	贵州省安顺市西秀区	2019.05
S7	安徽省宣城市宣州区	2019.08
S8	安徽省宣城市宣州区	2019.08
S9	安徽省宣城市宣州区	2019.08
S10	湖南省邵阳市邵东县	2019.07
S11	湖南省邵阳市邵东县	2019.07
S12	湖南省邵阳市邵东县	2019.07
S13	江西省宜春樟树市	2019.08
S14	江西省宜春樟树市	2019.08
S15	江西省宜春樟树市	2019.08
S16	河南省驻马店市确山县	2019.07
S17	河南省驻马店市确山县	2019.07
S18	河南省驻马店市确山县	2019.07

0.05 mol/L 乙酸铵溶液;梯度洗脱(0 ~ 24 min, 10% → 14% A; 24 ~ 28 min, 14% → 22% A; 28 ~ 35 min, 22% A; 35 ~ 41 min, 22% → 30% A; 41 ~ 53 min, 30% → 33% A);流速为 1.0 mL/min;柱温为 35 °C;检测波长为 340 nm;进样量为 10 μL。

#### 2.1.2 对照品溶液的制备

精密称定木犀草素 7-二葡萄糖苷酸对照品、海常黄苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含木犀草素 7-二葡萄糖苷酸 22.266 μg、海常黄苷 4.234 μg 的混合溶液,作为对照品溶液 1;另取地奥司明对照品、蒙花苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含地奥司明 1.818 μg、蒙花苷 1.597 μg 的混合溶液,作为对照品溶液 2。

#### 2.1.3 供试品溶液的制备

取半边莲药材粉末(过二号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,称定重量,加热回流 30 min,取出,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

#### 2.1.4 方法学验证

##### 2.1.4.1 精密度考察

取半边莲药材(编号:S1)供试品溶液,按“2.1.1”项下确定的色谱条件下连续进样 6 次,分别测定指纹图谱,以 11 号峰地奥司明为参照峰 S,计算各共有指纹峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.05% ~ 1.31% 范围内,相对峰面积 RSD 值在 1.03% ~ 2.10% 范围内,均小于 3.0%,表明仪器精密度良好。

##### 2.1.4.2 重复性考察

取同一批半边莲药材(编号:S1)粉末(过二号筛)共计 6 份,按“2.1.3”项下确定的供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液,分别进样测定,分别测定 6 份样品指纹图谱,以 11 号峰地奥司明为参照峰 S,计算各共有指纹峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.52% ~ 1.50% 范围内,相对峰面积 RSD 值在 1.21% ~ 2.40% 范围内,均小于 3.0%,表明该方法重复性良好。

##### 2.1.4.3 稳定性考察

取半边莲药材(编号:S1)供试品溶液,分别在

0、2、4、6、8、12、24h 进样分析,分别测定样品指纹图谱,以 11 号峰地奥司明为参照峰 S,计算各共有指纹峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.15% ~ 0.97% 范围内,相对峰面积 RSD 值在 0.97% ~ 1.81% 范围内,均小于 3.0%,说明供试品溶液在 24 小时内稳定性良好。

### 2.1.5 指纹图谱的建立及共有峰标定

取 18 批半边莲药材样品,按“2.1.3”项下方法制备 18 份供试品溶液,分别按“2.1.1”项下确定的

色谱条件进行测定,记录各样品指纹图谱,并导出指纹图谱 CDF 格式,将 18 批半边莲药材指纹图谱 CDF 格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)》软件中,以编号为 S1 样品的指纹图谱为参照图谱,进行保留时间校正和全峰匹配,18 批半边莲药材指纹图谱共标识出 11 个共有指纹峰,以平均数法生成半边莲药材对照指纹图谱,18 批半边莲药材指纹图谱叠加图见图 1,半边莲药材指纹图谱共有模式见图 2。

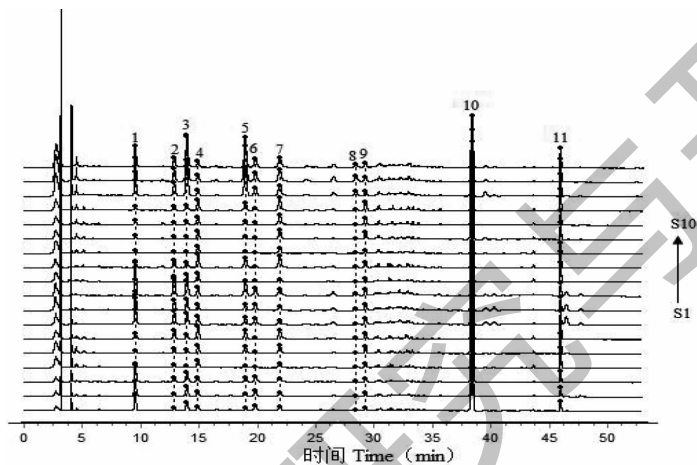


图 1 18 批半边莲药材指纹图谱叠加图

Fig. 1 Superimposed fingerprint of 18 batches of *L. chinensis*

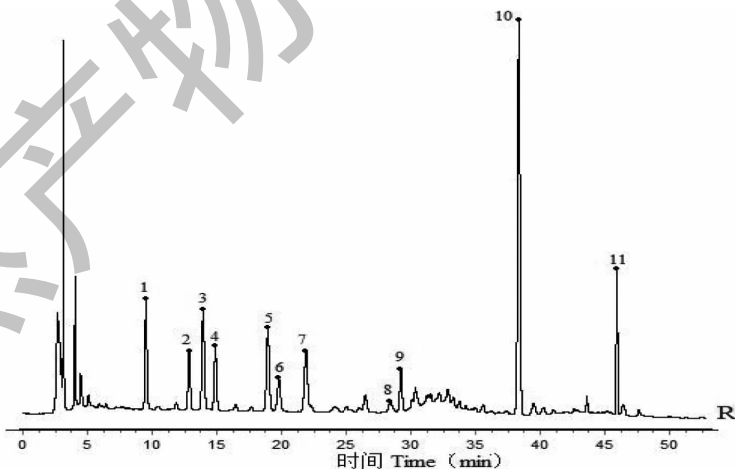


图 2 半边莲药材指纹图谱共有模式

Fig. 2 Common pattern of the fingerprint of *L. chinensis*

注:1:木犀草素 7-二葡萄糖苷酸;2:海常黄苷;10:地奥司明;11:蒙花苷。Note:1:Luteolin 7-diglucosidic acid;2:Clerodendrin;10:Diosmin;11:Linarin

### 2.1.6 相似度评价

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》计算 18 批半边莲药材指纹图谱与对照

指纹图谱的相似度,结果见表 2 所示,结果显示,18 批药材指纹图谱相似度均在 0.9 以上,说明 18 批半边莲药材指纹图谱整体相似度较高,其中编号 S7 ~

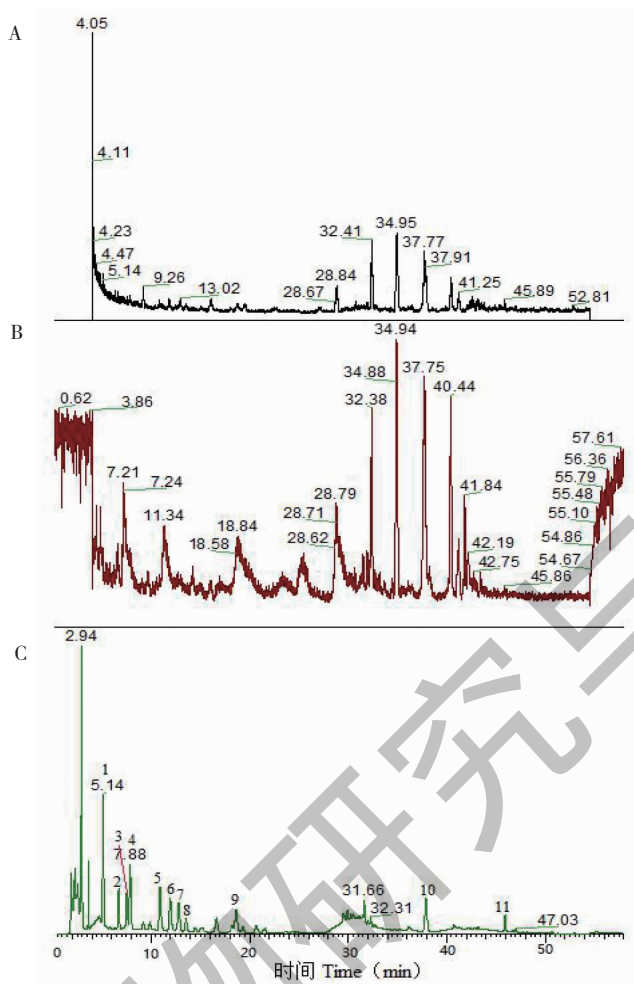


图3 半边莲药材色谱图

Fig. 3 The chromatograms of *L. chinensis*

注:A:负离子模式下 TIC 图;B:正离子模式下 TIC 图;C:UV340 nm 下色谱图。Note:A:TIC diagram in negative ion mode;B:TIC diagram in positive ion mode;C:Chromatogram at UV340 nm.

S9、S16~S18 共 6 批半边莲药材指纹图谱的相似度较接近,其相似度值在 0.912~0.935 之间,其余 12 批半边莲药材指纹图谱相似度在 0.946~0.977 之间,说明安徽、河南两个产区的半边莲药材相似度较

高,而湖北、贵州、江西和湖南产区的半边莲药材相似度较为一致,可能与药材的采收时间和产地加工方式的不同有关。

表 2 相似度评价结果

Table 2 Evaluation results of the similarity

序号 No.	相似度 Similarity	序号 No.	相似度 Similarity	序号 No.	相似度 Similarity
S1	0.967	S7	0.925	S13	0.952
S2	0.975	S8	0.935	S14	0.953
S3	0.977	S9	0.924	S15	0.958
S4	0.955	S10	0.946	S16	0.926
S5	0.964	S11	0.970	S17	0.912
S6	0.961	S12	0.946	S18	0.931

### 2.1.7 共有峰的指认

通过质谱精确分子量、碎片离子对比分析对 11 个共有峰进行指认。色谱条件同“2.1.1”项下,质谱条件为:采用电喷雾离子源(HESI),喷雾电压为 3.24 kV,扫描模式为正、负离子模式;扫描范围为 100~1 500  $m/z$ ;鞘气流速为 35 Arb;辅助气流速为 10 Arb;毛细管温度为 350 °C;辅助器加热温度为 350 °C;一级扫描分辨率为 70 000 FWHM;二级扫描分辨率为 175 00 FWHM;二级碰撞能量为 20 eV;S-lens 电压为 50 V。

分别采集正、负离子模式下总离子流图及 340

nm 下色谱图(见图 3)。采用 Compound Discoverer 2.1 质谱分析软件对目标色谱峰的一级和二级质谱进行解析,确定目标成分的精确分子量及加合物离子信息,通过与 mzCloud 标准数据库下碰撞能量为 20 eV 的二级质谱数据库进行比对,初步指认出峰 1 为木犀草素 7-二葡萄糖苷酸,峰 2 为海常黄苷、峰 3 为 diosmetin-3',7-diglucuronide,峰 4 为 luteolin 7,4'-diglucuronide-3'-glucoside,峰 5 为 apigenin 7-glucosyl-(1→2)-glucuronide-4'-glucuronide,峰 6 为 luteolin 7-glucuronosyl-(1→2)-glucuronide-4'-glucuronide,峰 10 为地奥司明、峰 11 为蒙花苷,化合物信息结果见表 3。

表 3 半边莲药材指纹图谱共有峰的质谱指认结果

Table 3 Identification of common peaks in the fingerprint of *L. chinensis* by mass spectrometry

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	[M-H] <sup>-</sup>	二级碎片 Secondary fragment( $m/z$ )	误差 Error(ppm)
1	5.14	木犀草素 7-二葡萄糖苷酸 Luteolin 7-diglucoside	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>18</sub>	637.105 7	351.057 2, 285.040 8, 193.034 5	1.374 5
2	6.49	海常黄苷 Clerodendrin	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>17</sub>	621.111 1	269.046 0, 193.035 0, 113.023 1	1.380 2
3	7.28	Diosmetin-3',7-diglucuronide	C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> O <sub>18</sub>	651.122 0	299.056 2, 284.032 7, 113.023 1	1.394 1
4	7.58	Luteolin 7,4'-diglucuronide-3'-glucoside	C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> O <sub>23</sub>	799.138 8	179.034 2, 285.074 7, 513.089 2	1.235 6
5	10.48	Apigenin 7-glucosyl-(1→2)- glucuronide-4'-glucuronide	C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> O <sub>22</sub>	783.143 7	179.034 2, 351.056 9, 513.089 4, 269.045 9	1.732 5
6	11.49	Luteolin 7-glucuronosyl-(1→2)- glucuronide-4'-glucuronide	C <sub>33</sub> H <sub>34</sub> O <sub>24</sub>	813.154 1	193.050 0, 285.040 6	1.832 1
10	37.88	地奥司明 Diosmin	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	607.167 5	299.056 2, 284.032 7	1.378 9
11	45.89	蒙花苷 Linarin	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	591.173 0	283.061 5, 309.207 6, 268.037 7	1.377 3

### 2.1.8 共有峰的确证

取半边莲药材(编号:S1)粉末(过二号筛)约 0.2g,精密称定,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,取“2.1.2”项下混合对照品溶液和半边莲药材供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行分析,结果见图 4 所示。经与对照品保留时间及紫外吸收光谱比对,进一步确定峰 1 为木犀草素 7-二葡萄糖苷酸,峰 2 为海常黄苷、峰 10 为地奥司明、峰 11 为蒙花苷。

### 2.1.9 聚类分析(HCA)

采用 IBM SPSS 20.0 软件,以 18 批半边莲药材

11 个共有峰的峰面积为变量,采用 Z 得分法对峰面积进行标准化处理,样本间距以平方 Euclidean 距离表征,采用组间联接法对 18 批半边莲药材进行系统聚类分析,结果见图 5 所示。当组间联接距离在 17~25 时,18 批半边莲药材被分为两类,其中编号 S1~S6、S10~S15 的样品聚为一类,编号 S7~S9、S16~S18 的样品聚为另一类,聚类分析的结果与相似度评价结果相一致,说明不同产地的半边莲药材化学成分存在一定的差异。

### 2.1.10 主成分分析(PCA)

以 11 个共有指纹峰的峰面积为变量,导入

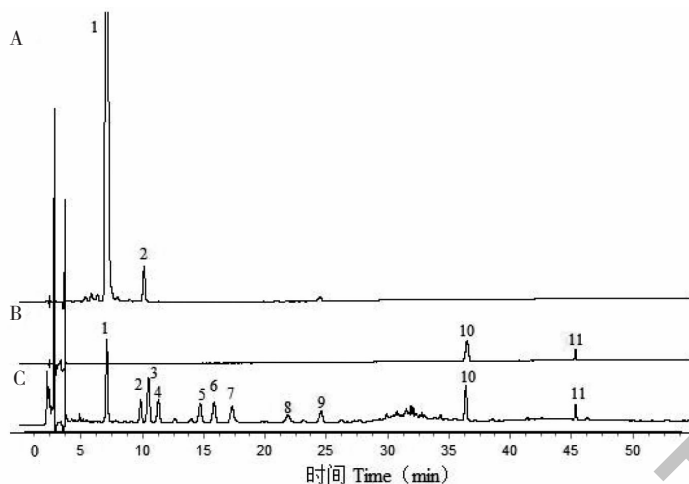


图 4 共有峰的确证

Fig. 4 Confirmation of common peaks

注:A:混合对照品 1;B:混合对照品 2;C:供试品。1:木犀草素 7-二葡萄糖苷酸;2:海常黄苷;10:地奥司明;11:蒙花苷。Note:A: Mixed reference substance 1; B: Mixed reference substance 2; C: Sample. 1: Luteolin 7-diglucosidic acid; 2: Clerodendrin; 10: Diosmin; 11: Linarin.

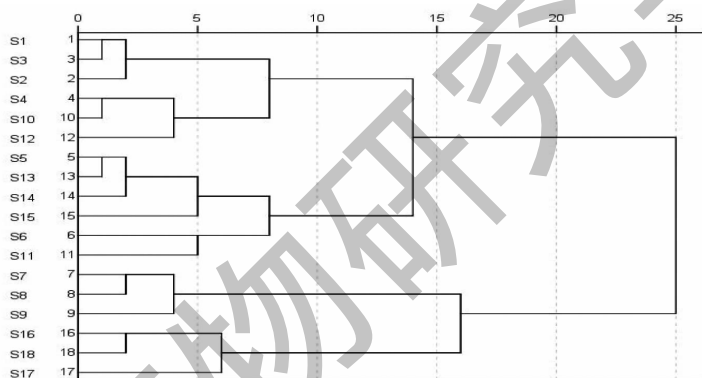


图 5 聚类分析结果

Fig. 5 Cluster analysis results

SIMCA14.1 软件,进行 PCA 分析,共生成 3 个主成分,累计贡献率达到 94.3%,其中前两个主成分累计贡献率达到 87.2%, $Q^2$  为 0.836,证明模型有效。

以特征根大于 1 的主成分 1 和 2 的得分值为 X、Y 轴,生成 18 批半边莲药材 PCA 得分图,见图 6 所示。结果显示,18 批半边莲药材基本可以分为两类,

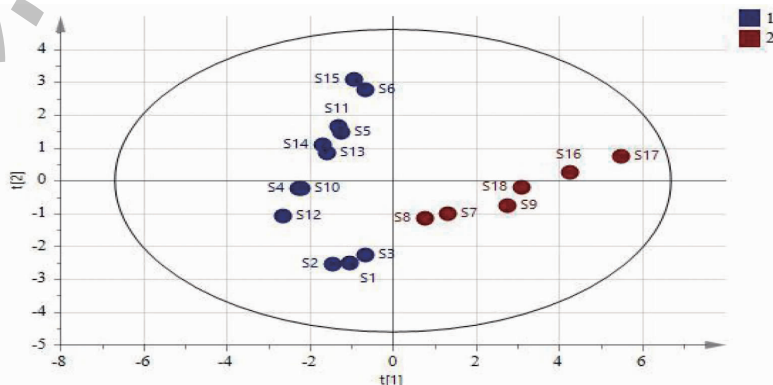


图 6 PCA 得分图

Fig. 6 PCA scores diagram

其中编号为 S1 ~ S6、S10 ~ S15 的样品归为一类,编号 S7 ~ S9、S16 ~ S18 的样品归为第二类,与聚类分析的结果基本一致。

### 2.1.11 正交偏最小二乘法-判别式分析(OPLS-DA)

采用 SIMCA14.1 软件,以 11 个共有峰的峰面积为变量对 18 批半边莲药材指纹图谱进行 OPLS-DA 分析,运用统计推断方法分析该模型,将模型随机排列 200 次做置换检验,结果见图 7。由图 7 可知, $R^2$  和  $Q^2$  截距值分别为 0.451 和 -0.140,所有位于左边的  $R^2$  和  $Q^2$  值均低于其最右边的值,且  $Q^2$  为负值,说明建立的 OPLS-DA 模型没有出现过拟合现象,可以用于不同产地半边莲药材的模式识别研究。所建立的模型中累积解释能力参数  $R^2X(\text{cum})$  为

0.987,累积解释能力参数  $R^2Y(\text{cum})$  为 0.961,预测能力参数  $Q^2(\text{cum})$  为 0.859,这三个参数值均接近于 1,表明该模型的拟合准确性好,具有较强的解释和预测能力。OPLS-DA 得分图显示(见图 8),18 批不同产地的半边莲药材基本上分为两类,其中编号 S1 ~ S6、S10 ~ S15 的样品归为一类,编号 S7 ~ S9、S16 ~ S18 的样品归为另一类。VIP 图显示,变量对分类的影响,峰 2 > 峰 1 > 峰 10 > 峰 11 > 峰 3 > 峰 8 > 峰 5 > 峰 4 > 峰 7 > 峰 9 > 峰 6,以 VIP 大于 1 为显著影响,共找到 7 个差异标志物,对其影响显著性排序,分别为峰 2 > 峰 1(木犀草素 7-二葡萄糖苷酸) > 峰 10(地奥司明) > 峰 11(蒙花苷) > 峰 3 > 峰 8 > 峰 5,结果见图 9 所示。

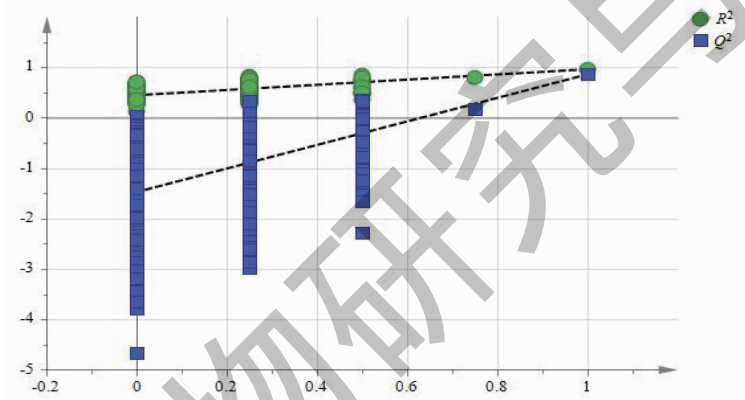


图 7 OPLS-DA 模型置换验证图

Fig. 7 OPLS-DA model permutation test diagram

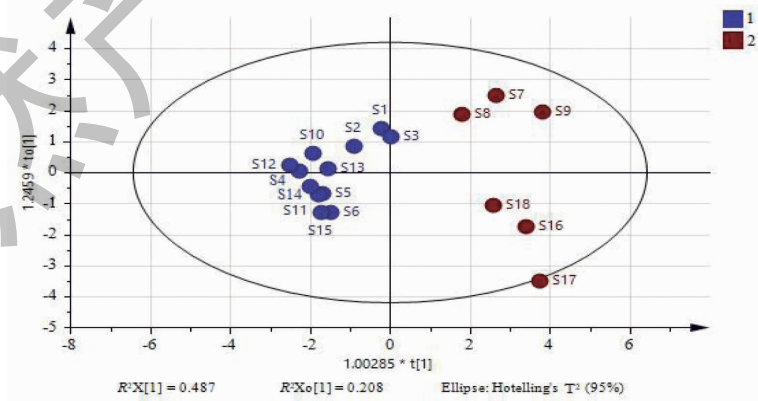


图 8 OPLS-DA 得分图

Fig. 8 OPLS-DA scores diagram

## 2.2 含量测定

### 2.2.1 色谱条件

选择 Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250

mm, 5 μm) 色谱柱;以乙腈为流动相 A,以 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相 B;梯度洗脱(0 ~ 31 min, 15% → 35% A);流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 °C;



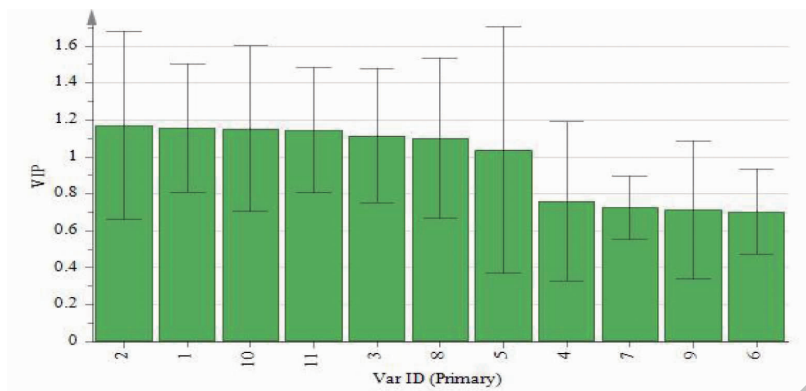


图9 OPLS-DA 模型 VIP 图

Fig. 9 VIP diagram of OPLS-DA

检测波长为 340 nm;进样量为 10  $\mu$ L。

#### 2.2.2 对照品溶液的制备

精密称定地奥司明对照品 2.336 mg、蒙花苷对照品 2.027 mg,置 25 mL 量瓶中,加二甲基亚砜制成每 1 mL 含地奥司明 90.917  $\mu$ g、蒙花苷 79.864  $\mu$ g 的混合对照品储备液,精密移取上述混合对照品储备液 0.5 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含地奥司明 1.818  $\mu$ g、蒙花苷 1.597  $\mu$ g 的混合溶液,即得。

#### 2.2.3 供试品溶液的制备

取半边莲药材粉末(过二号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入二甲基亚砜 25 mL,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 45 min,取出,放冷,再称定重量,用二甲基亚砜补足减失的重量,离心 5 min(4 000 r/min),精密移取上

清液 10 mL 置 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

#### 2.2.4 方法学验证

##### 2.2.4.1 专属性考察

取半边莲药材(编号:S2)粉末(过二号筛)约 0.2 g,精密称定,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,取“2.2.2”项下混合对照品溶液、半边莲药材供试品溶液以及空白溶剂,按“2.2.1”项下色谱条件进行分析,结果见图 10 所示,供试品色谱在与对照品色谱相应的保留时间处有相同的色谱峰,空白溶剂无干扰,且供试品色谱中地奥司明和蒙花苷色谱峰各保留时间点紫外-可见光 3D 光谱峰纯度匹配值分别为 1 000 和 999,匹配率分别为 100.0% 和 99.9% 说明地奥司明和蒙花苷色谱峰纯度较高,该定量分析方法专属性良好。

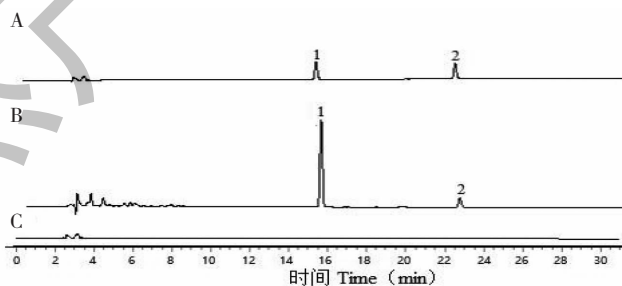


图10 专属性考察色谱图

Fig. 10 Chromatogram of specificity investigation

注:A:混合对照品;B:供试品;C:空白溶剂。1:地奥司明;2:蒙花苷。

Note:A: Mixed reference substance;B: Sample;C: Blank solvent. 1: Diosmin;2: Linarin.

#### 2.2.4.2 线性关系考察

精密称取地奥司明对照品 9.694 mg,置 20 mL 量瓶中,加二甲基亚砜制成每 1 mL 含地奥司明 471.613  $\mu$ g 的对照品储备液。精密称取蒙花苷对

照品 2.478 mg,置 10 mL 量瓶中,加二甲基亚砜制成每 1 mL 含蒙花苷 244.083  $\mu$ g 的对照品储备液。精密移取上述对照品储备液各 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含地奥司明 94.323  $\mu$ g、蒙

花昔 48.817  $\mu\text{g}$  的混合对照品母液。精密量取上述混合对照品母液 1 mL, 分别置 2、5、10、25、50、100 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含地奥司明 47.161、18.865、9.432、3.773、1.886、0.943  $\mu\text{g}$ , 蒙花昔 24.408、9.763、4.882、1.953、0.976、0.488  $\mu\text{g}$  的混合对照品应用液, 分别精密吸取上述混合对照品应用液和混合对照品线性母液, 进样测定, 以进样浓度为横坐标( $x$ ), 以测得的峰面积为纵坐标( $y$ ), 进行线性回归计算, 并绘制标准曲线。结果显示, 地奥司明的线性回归方程为  $y = 21\,468x + 4\,797.3$ ,  $r = 0.999\,8$ ; 表明在浓度为 0.943 ~ 94.323  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围内, 峰面积与地奥司明对照品浓度的线性关系良好。蒙花昔的线性回归方程为  $y = 22\,207x + 2\,443.5$ ,  $r = 0.999\,8$ , 表明蒙花昔在进样浓度 0.488 ~ 48.817  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围内, 峰面积与蒙花昔对照品浓度的线性关系良好。

#### 2.2.4.3 精密度考察

取“2.2.2”项下混合对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算地奥司明和蒙花昔的峰面积 RSD 值分别为 1.27%、0.78%, 表明进样器精密度良好。

#### 2.2.4.4 重复性考察

取半边莲药材(编号:S2)粉末(过二号筛)约 0.2 g, 精密称定, 平行 6 份, 按“2.2.3”项下确定的供试品溶液制备方法, 制备供试品溶液 6 份。按“2.2.1”项下确定的色谱条件进样分析, 记录色谱峰面积, 采用外标法计算地奥司明和蒙花昔的含量分别为 2.758 mg/g 和 0.294 mg/g, 重复性测定 RSD 值分别为 2.94% 和 1.22%, 表明该方法重复性良好。

#### 2.2.4.5 加样回收率考察

精密称取已知含量的半边莲药材(编号:S2)粉末(过二号筛)0.1 g, 共 9 份, 分为 3 组, 每组平行 3 份, 按对照品与样品含量比为 0.5:1、1:1 和 1.5:1 的比例加入地奥司明和蒙花昔对照品, 按“2.2.3”项下方法制备 9 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果见表 4。结果显示, 地奥司明加样回收率均值为 100.13%, 回收率范围为 95.91% ~ 104.45%, RSD 值为 2.94%; 蒙花昔加样回收率均值为 96.06%, 回收率范围为 92.97% ~ 100.30%, RSD 值为 2.69%, 均符合 2020 年版《中国药典》四部通则 9101 的规定, 表明该方法的准确度良好。

表 4 加样回收率测定结果  
Table 4 Results of the sample recovery rate

指标成分 Index component	序号 No.	称样量 Sample weight (g)	测得量 Measured quantity (mg)	加入量 Added amount (mg)	已知量 Known quantity (mg)	回收率 Recovery rate (%)	均值 Average (%)	RSD (%)
地奥司明 Diosmin	1	0.101 2	0.430 8	0.146 2	0.279 1	103.76	100.13	2.94
	2	0.105 0	0.442 3	0.146 2	0.289 6	104.45		
	3	0.103 8	0.429 5	0.146 2	0.286 3	97.95		
	4	0.101 8	0.574 8	0.292 4	0.280 8	100.55		
	5	0.101 4	0.560 1	0.292 4	0.279 7	95.90		
	6	0.103 1	0.574 1	0.292 4	0.284 3	99.11		
	7	0.104 8	0.720 0	0.438 6	0.289 0	98.27		
	8	0.100 6	0.728 3	0.438 6	0.277 5	102.78		
	9	0.106 9	0.726 5	0.438 6	0.294 8	98.43		
蒙花昔 Linarin	1	0.101 2	0.045 7	0.015 9	0.029 8	100.00	96.05	2.62
	2	0.105 0	0.045 8	0.015 9	0.030 9	93.71		
	3	0.103 8	0.045 3	0.015 9	0.030 5	93.08		
	4	0.101 8	0.061 0	0.031 7	0.029 9	98.11		
	5	0.101 4	0.059 6	0.031 7	0.029 8	94.01		
	6	0.103 1	0.060 6	0.031 7	0.030 3	95.58		
	7	0.104 8	0.076 1	0.047 6	0.030 8	95.17		
	8	0.100 6	0.076 9	0.047 6	0.029 6	99.37		
	9	0.106 9	0.076 8	0.047 6	0.031 4	95.38		

### 2.2.5 样品测定

取 18 批半边莲药材,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,并采用“2.2.1”项下色谱条件进行测定,采用外标法计算半边莲药材中地奥司明和蒙花苷的含量,结果见表 5 所示,18 批半边莲药材地奥司明的含量范围为 1.670 ~ 6.832 mg/g,蒙花苷的含量范围为 0.258 ~ 1.257 mg/g。不同产区半边莲

药材地奥司明的含量均值:河南 > 安徽 > 江西 > 湖北 > 湖南 > 贵州。不同产区半边莲药材蒙花苷的含量均值:河南 > 安徽 > 江西 > 湖北 > 湖南 > 贵州。3 批河南产区和安徽产区的半边莲药材地奥司明和蒙花苷的含量明显高于其他产区,说明河南和安徽的半边莲药材质量整体优于其他产区。

表 5 不同产地半边莲药材含量测定结果

Table 5 Content determination of *L. chinensis* from different habitats

序号 No.	地奥司明 Diosmin (mg/g)	蒙花苷 Linarin (mg/g)	地奥司明含量均值 Average content of diosmin(mg/g)	蒙花苷含量均 Average content of linarin(mg/g)
S1	3.265	0.342	3.217	0.360
S2	3.004	0.319		
S3	3.381	0.419		
S4	1.670	0.383	2.120	0.559
S5	2.372	0.566		
S6	2.317	0.729		
S7	5.495	0.652	5.696	0.705
S8	4.760	0.607		
S9	6.832	0.856		
S10	2.525	0.498	2.399	0.410
S11	2.659	0.475		
S12	2.014	0.258		
S13	3.490	0.542	3.483	0.588
S14	3.235	0.467		
S15	3.723	0.755		
S16	6.664	1.187	6.323	1.153
S17	6.652	1.257		
S18	5.654	1.015		

## 3 讨论与结论

### 3.1 指纹图谱的建立

半边莲药材指纹图谱的建立分别考察了甲醇-0.1%磷酸溶液,乙腈-0.1%磷酸溶液以及乙腈-0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液 3 种流动相系统,结果显示,采用乙腈-0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液,色谱峰的信息多,分离效果好。采用二极管阵列检测器,在 190 ~ 400 nm 范围内进行全波长扫描,并提取不同波长下指纹图谱进行对比,结果显示,在 340 nm 下,指纹图谱色谱峰信息量大且整体峰型较高。采用单因素考察对供试品溶液的制备方法进行考察,以“指纹图谱共有峰的总峰面积/样品称样量”为指标,重点考察提取溶剂、提取方式、提取时间及提取溶剂用量

对指纹图谱的影响,并优选出最佳的制样方法,指纹图谱基本反映了半边莲药材的内在质量信息。利用高分辨质谱对共有峰指认,利用 mzCloud 质谱数据库对未知成分进行推测,结合对照品保留时间比对和 3D 光谱分析,对指认出的化合物进行确证,目前已经确证 4 个化合物,尚有 4 个成分因对照品难以获得,有待进一步确证。

### 3.2 相似度评价和化学计量学分析

不同产区的半边莲药材指纹图谱整体相似度较高,相似度值均在 0.9 以上,但相似度值所在的区间又略有差异,HCA 和 PCA 将 18 批样品分成两类,证明不同产区的样品既有相似性,又具有一定的产地特异性,OPLS-DA 对差异成分进行分析,寻找到 7

个差异性标志物,其VIP值排序,分别为峰2 > 峰1 (木犀草素7-二葡萄糖苷酸) > 峰10(地奥司明) > 峰11(蒙花苷) > 峰3 > 峰8 > 峰5。对18批半边莲药材指纹图谱上述7个共有峰的峰面积进行对比,结果显示,河南、安徽两个产区半边莲药材上述7个共有峰的峰面积要高于其他产区,说明,河南和安徽半边莲药材上述7种成分的含量较高。全草类中药,不同的采收时间和产地加工方式对药材的质量影响较大<sup>[9-11]</sup>,因此,应根据全草类药材在不同生长期有效成分的变化规律,选择适宜的采收期,并根据有效成分的性质,进行合理的产地加工,从而保证药材的质量。

### 3.3 含量测定指标的选择

地奥司明又名香叶木苷、布桔苷,具有增加静张力,改善微循环,减轻水肿等药理作用<sup>[12]</sup>,蒙花苷具有抑菌、抗炎、抗氧化活性,可抑制多种肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡,对肝、肾等器官有保护作用<sup>[13]</sup>,以上两种成分均为半边莲的主要有效成分之一,在半边莲药材中含量较高,对照品易得,具有一定的专属性,为不同产区药材的差异性标志物,因此,选择上述成分作为含量测定指标,能够有效评价半边莲药材的质量。参考Zeng等<sup>[7]</sup>研究结果,对地奥司明和蒙花苷进行测定,优化和筛选了色谱条件和供试品溶液制备方法,地奥司明,易溶于二甲基亚砷和强碱性溶液,不溶于水、微溶于甲醇或乙醇<sup>[14]</sup>,因此,在经过提取溶剂的考察后,选择“万能溶剂”二甲基亚砷为提取溶剂,从而保证地奥司明的充分提取,并经方法学验证,证明该方法专属性、重复性和准确性均较好,能够为中国药典半边莲药材项下质量标准的提升提供重要的参考。根据18批药材的测定结果,河南和安徽的半边莲药材地奥司明和蒙花苷的含量整体高于其他产区,证明河南和安徽的药材质量整体要优于其他产区,为半边莲药材资源的选购和进一步开发提供依据。

### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 122.
- 2 Han JY. Study on antitumor activity of *Lobelia* [J]. J Shanxi Coll Tradit Chin Med (山西中医学院学报), 2016, 17: 71-

- 72.
- 3 Zhang YJ, Li MC, Zhang H, et al. Research progress in pharmacological effect and underlying mechanism of Chinese *Lobelia* [J]. China Pharm (中国药师), 2015, 18: 1376-1378.
- 4 Zhou B, Cui XD, Cheng D, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Lobelia chinensis* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2013, 36: 679-681.
- 5 Cao YQ, Chu YJ, Liu KF, et al. Visual analysis on fingerprint studies of Chinese materia medica in China [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol (世界科学技术-中医药现代化), 2020, 22: 3073-3081.
- 6 Yan HY, Zhou CC. Progress and prospect of application of traditional Chinese medicine fingerprint (specific chromatogram) in Chinese Pharmacopoeia (2010-2020) [J]. J South Med Univ (南方医科大学学报), 2022, 42: 150-155.
- 7 Zeng HF, Jia L, Mai Xi, et al. Application of characteristic fingerprints combined with pattern recognition method in quality control of *Lobelia chinensis* Lour. [J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal) (理化检验-化学分册), 2021, 57: 97-102.
- 8 Zhou Y, Wang Y, Wang RF. HPLC fingerprint of *Lobelia chinensis* Lour. [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2007, 29: 1717-1720.
- 9 Chen LM, Gao HM, Zhu JJ, et al. Effects of different harvesting and processing methods on quality of *Andrographis Herba* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 1717-1725.
- 10 Chen DN, Tang XM, Zhang CR, et al. Study on yield and quality of *Desmodii Styracifolii Herba* in different harvest seasons [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2018, 20: 450-452.
- 11 Zhou LL, Wang XH, Gong HY, et al. Quantitative analysis of luteolin in *Chrysanthemum indicum* originating from Henan by near-infrared spectroscopy [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 610-615.
- 12 Li YS. Research progress of pharmacological action and clinical application of diosmin [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2015, 27: 81-85.
- 13 Liu ZF, Li PY, Tan YS, et al. Research progress on the pharmacological effects and pharmacokinetics of linarin [J]. Int J Tradit Chin Med (国际中医中药杂志), 2022, 44: 716-720.
- 14 Jin WH, Fan KH, Yu BT, et al. Preparation and content determination of diosmin cream [J]. J China Pharm (中国药房), 2012, 23: 2735-2736.