

# 马鞭草药材 UPLC 指纹图谱建立及指标性成分的测定

李振雨<sup>1,2\*</sup>, 梁月仪<sup>1,2</sup>, 吕渭升<sup>1,2</sup>,  
黄爽<sup>1,2</sup>, 杨洁<sup>1,2</sup>, 卢晓莹<sup>1,2</sup>, 陈向东<sup>1,2</sup>, 孙冬梅<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:**建立马鞭草药材指纹图谱,并对4种有效成分的含量进行测定,为马鞭草药材质量控制提供参考。采用超高效液相色谱(UPLC)法建立马鞭草药材指纹图谱,并利用高分辨质谱对共有峰进行指认,以15批马鞭草药材指纹图谱共有峰的相对峰面积为变量,进行化学计量学分析,并对15批马鞭草药材有效成分戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量进行测定。结果显示,马鞭草药材指纹图谱有16个共有峰,并指认出其中6个成分,聚类分析(HCA)和主成分分析(PCA)将15批药材分为3类,正交偏最小二乘法-判别式分析(OPLS-DA)共筛选出7个VIP>1.0的差异性成分。含量测定结果显示,不同产区的马鞭草药材戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量存在较大的差异。该方法能有效分析不同产地马鞭草药材的质量差异,为不同产地马鞭草药材质量的评价提供参考。

**关键词:**马鞭草; UPLC 指纹图谱; 化学计量学分析; 含量测定

中图分类号: R282.4; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)4-0551-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.4.001

## Establishment of UPLC fingerprint of *Verbenae Herba* and determination of index components

LI Zhen-yu<sup>1,2\*</sup>, LIANG Yue-yi<sup>1,2</sup>, LYU Wei-sheng<sup>1,2</sup>,  
HUANG Shuang<sup>1,2</sup>, YANG Jie<sup>1,2</sup>, LU Xiao-ying<sup>1,2</sup>, CHEN Xiang-dong<sup>1,2</sup>, SUN Dong-mei<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:** The fingerprint of *Verbenae Herba* was established and the contents of four effective components were determined to provide reference for the quality control of *Verbenae Herba*. The fingerprint of *Verbenae Herba* was established by ultra performance liquid chromatography (UPLC) method, and the common peaks were identified by high resolution mass spectrometry. The relative peak areas of the common peaks in the fingerprints of 15 batches of *Verbenae Herba* were used as variables for chemometric analysis, and the contents of the effective components of hastatoside, verbenoside, acteoside and isoacteoside in 15 batches of *Verbenae Herba* were determined. The results showed that there were 16 common peaks in the fingerprint of *Verbenae Herba*, and six of them were identified. Cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) divided 15 batches of medicinal materials into three categories, and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) screened seven different components with VIP > 1.0. The content determination results showed that the contents of hastatoside, verbenoside, acteoside and isoacteoside in different production areas were significantly different. This method can effectively analyze the quality difference of *Verbenae Herba* from different habitats, and provide a reference for the quality evaluation of *Verbenae Herba* from different habitats.

**Key words:** *Verbenae Herba*; UPLC fingerprint; chemometric analysis; content determination

马鞭草为马鞭草科植物马鞭草 *Verbena officinalis* L. 的干燥地上部分,具有活血散瘀、解毒、利水、退黄、截疟的功效<sup>[1]</sup>。化学成分研究表明,马鞭草含有挥发油、环烯醚萜、苯丙素、黄酮等成分,具有抗炎、抗氧化、镇痛、止咳平喘、抗心肌缺血和脑缺血等多种药理活性<sup>[2-4]</sup>。2020年版《中华人民共和国药典》一部马鞭草药材项以齐墩果酸和熊果酸为含测指标,专属性不强,且中药以传统汤剂入药,采用齐墩果酸和熊果酸等脂溶性成分为含量指标,是否有助于药材的质量控制值得商榷。有文献报道,通过测定马鞭草中含量较高的环烯醚萜苷类成分马鞭草苷和戟叶马鞭草苷,以及苯丙素糖苷类成分毛蕊花糖苷,具有一定的专属性,且对于保证马鞭草的临床疗效具有积极的意义<sup>[5,6]</sup>,并将上述含量指标用于马鞭草标准汤剂和配方颗粒的质量控制研究中<sup>[7,8]</sup>。也有采用指纹图谱用于马鞭草药材的质量控制<sup>[9,10]</sup>,但化学成分的指认均集中在马鞭草苷、戟叶马鞭草苷和毛蕊花糖苷上,对其他水溶性成分的研究尚未见报道。本次研究,通过建立马鞭草药材指纹图谱结合高分辨质谱指认,以及建立马鞭草苷、戟叶马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷4种有效成分的含量测定方法,为马鞭草药材的整体质量控制提供参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 药材

实验所用15批马鞭草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马鞭草科植物马鞭草 *Verbena officinalis* L. 的干燥地上部分,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《中华人民共和国药典》(一部)“马鞭草”药材项下规定,15批马鞭草药材产地信息详见表1。

### 1.2 仪器

Waters 超高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司),Thermo Fisher QE Focus 高分辨液质联用仪(赛默飞世尔科技公司);Waters BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(3 mm × 150 mm, 2.5 μm, 沃特世科技有限公司);YMC Triart C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 日本YMC公司);万分之一分析天平(ME204E, 梅特勒-托利多公司);百万分之一分析天平(XP26, 梅特勒-托利多公司);数控超声波清洗器(KQ500DE, 昆山市超声仪器有限公司)。

表1 马鞭草药材产地信息

Table 1 Origin information of *Verbenae Herba*

编号 No.	产地 Origin
S1	湖南省邵阳市
S2	湖南省邵阳市
S3	湖南省邵阳市
S4	湖南省邵阳市
S5	湖南省湘西土家族苗族自治州
S6	湖南省湘西土家族苗族自治州
S7	河南省南阳市
S8	河南省南阳市
S9	河南省南阳市
S10	河南省南阳市
S11	江苏省淮安市
S12	江苏省淮安市
S13	贵州省遵义市
S14	贵州省遵义市
S15	贵州省遵义市

### 1.3 试剂与试药

试剂:甲醇(西陇科学股份有限公司)为分析纯;磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司)和乙腈(默克股份有限公司)为HPLC色谱级。

试药:马鞭草苷(批号:M04202105007,含量:98.0%,成都瑞芬思生物科技有限公司);戟叶马鞭草苷(批号:WKq22021007,含量:98.0%,维克奇生物科技有限公司);毛蕊花糖苷(批号:111530-201914,含量:95.2%,中国食品药品检定研究院);异毛蕊花糖苷(批号:FF17B039,含量:98.0%,成都瑞芬思德丹生物科技有限公司);木犀草素-7-二葡萄糖苷酸(批号:DST220323-206,含量:98%,乐美天医药德思特生物有限公司);芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷(批号:21032205,含量:98%,成都格利普生物科技有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 指纹图谱的建立

#### 2.1.1 色谱条件

采用Waters BEH C<sub>18</sub> (3 mm × 150 mm, 2.5 μm) 色谱柱;以乙腈为流动相A,以0.02%磷酸溶液为流动相B;梯度洗脱(0~22 min, 5% → 12% A; 22~25 min, 12% A; 25~43 min, 12% → 20% A; 43~45 min, 20% A);流速为0.60 mL/min;柱温为40℃;检测波长为260 nm;进样量为5 μL。

### 2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取戟叶马鞭草苷对照品 1.062 mg, 马鞭草苷对照品 2.033 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含戟叶马鞭草苷 41.631  $\mu\text{g}$ 、马鞭草苷 79.694  $\mu\text{g}$  的混合溶液, 作为对照品溶液 1。精密称取毛蕊花糖苷对照品 2.093 mg, 异毛蕊花糖苷对照品 2.250 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含毛蕊花糖苷 39.851  $\mu\text{g}$ 、异毛蕊花糖苷 44.100  $\mu\text{g}$  的混合溶液, 作为对照品溶液 2。精密称取木犀草素 7-二葡萄糖苷 2.348 mg, 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷 2.562 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷 100.430  $\mu\text{g}$ 、木犀草素 7-二葡萄糖苷 92.042  $\mu\text{g}$  的混合溶液, 作为对照品溶液 3。

### 2.1.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过四号筛)约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz) 30 min, 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

取马鞭草药材(编号: S2) 供试品溶液, 采用“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录样品指纹图谱, 以毛蕊花糖苷色谱峰为参照峰 S, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.42% ~ 0.72%, 相对峰面积 RSD 值在 0.76% ~ 1.15%, 均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

#### 2.1.4.2 重复性考察

取同一批次马鞭草药材粉末(编号: S2, 过四号

筛) 共 6 份, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 6 份, 采用“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 分别记录 6 份样品指纹图谱, 以毛蕊花糖苷色谱峰为参照峰 S, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.57% ~ 1.03%。相对峰面积 RSD 值在 0.78% ~ 1.63%, 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“2.1.4.2 重复性考察”项下供试品溶液, 采用“2.1.1”项下色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析, 以毛蕊花糖苷色谱峰为参照峰 S, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.36% ~ 0.89%, 相对峰面积 RSD 值在 0.59% ~ 1.67%。均小于 3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.1.5 指纹图谱的建立及相似度评价

取 15 批马鞭草药材粉末(过四号筛), 按“2.1.3”项下方法制备 15 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 记录 15 批样品指纹图谱, 导出各批次样品指纹图谱 CDF 格式, 并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版)》中, 以编号 S1 样品指纹图谱为参照, 进行多点校正和匹配, 15 批马鞭草药材指纹图谱共标识出 16 个共有峰, 见图 1, 以平均数法生成马鞭草药材对照指纹图谱, 见图 2。计算各批次样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度, 结果见表 2。15 批不同产地的马鞭草药材指纹图谱相似度均在 0.9 以上, 说明不同产地的马鞭草药材在指纹图谱的计算模式下整体相似度较高, 指纹图谱可作为共性质量特征, 用于马鞭草药材的鉴别和质量控制。

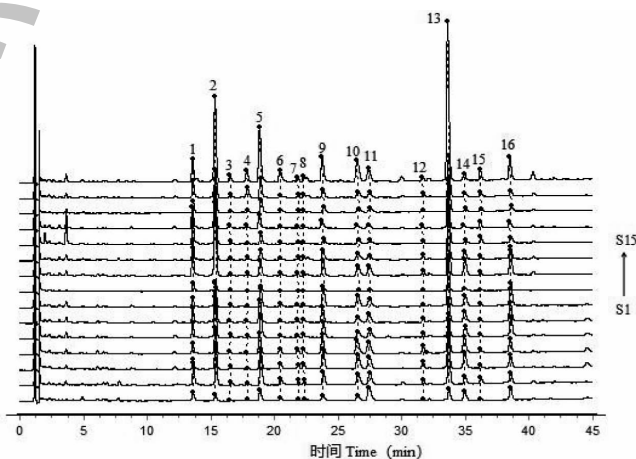


图 1 15 批马鞭草药材指纹图谱叠加图

Fig. 1 Superimposed fingerprints of 15 batches of Verbenae Herba

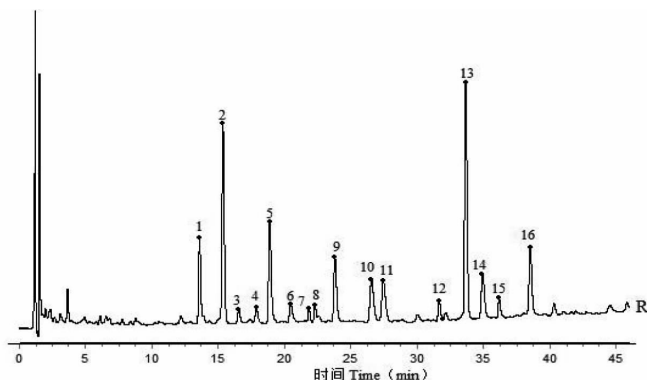


图2 马鞭草药材对照指纹图谱

Fig. 2 Control fingerprint of Verbenae Herba

表2 相似度计算结果

Table 2 Similarity calculation results

编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.958
S2	0.959
S3	0.959
S4	0.946
S5	0.934
S6	0.933
S7	0.961
S8	0.964
S9	0.970
S10	0.954
S11	0.953
S12	0.965
S13	0.991
S14	0.980
S15	0.963

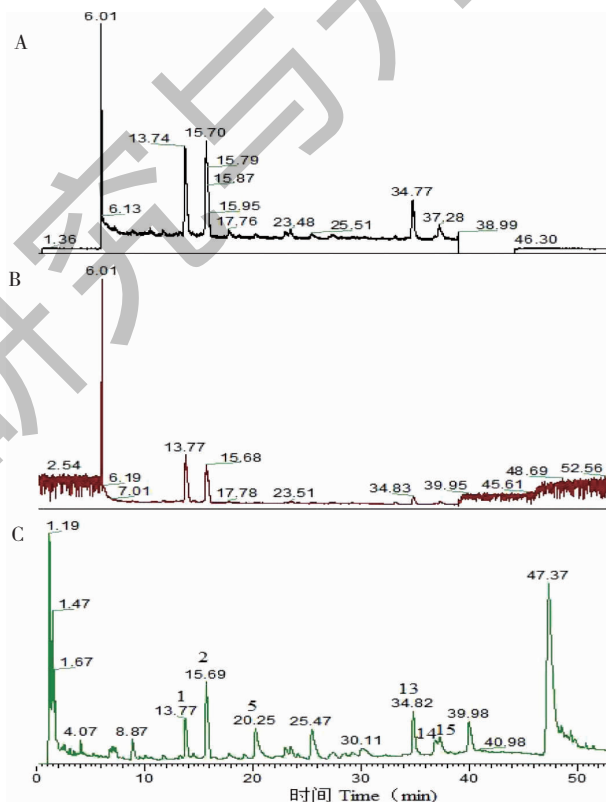


图3 马鞭草药材指纹图谱共有峰的指认

Fig. 3 Identification of common peaks in the fingerprint of Verbenae Herba

注:A:负离子模式下TIC;B:正离子模式下TIC;C:UV 260 nm下色谱图。Note: A: TIC in negative ion mode; B: TIC in positive ion mode; C: Chromatogram at UV 260 nm.

### 2.1.6 共有峰的指认

取马鞭草供试品(编号:S2)溶液,采用液相色谱-高分辨质谱对共有峰进行指认,除流动相B为0.05%甲酸溶液外,其余色谱条件均同“2.1.1”项下;质谱采用HESI离子源,离子源参数为:鞘气流速40 arb;辅助气流速12 arb;喷雾电压3.0 kV;S-lens电压50 V;辅助器加热温度400 ℃;毛细管加热温度400 ℃。质谱扫描参数为:正、负离子扫描模式(dd-MS<sup>2</sup> Discover);扫描范围为100~1 000 *m/z*;一级扫描分辨率为70 000 FWHM;二级扫描分辨率为17 500 FWHM;二级碰撞能量为20 eV。分别采集供试品溶液在正、负离子模式下总离子流图(total ion chromatogram, TIC)及紫外吸收色谱图(见图3)。

通过化合物的精确分子量及二级质谱信息,结合本地质谱数据库资料及相关参考文献,指认出峰1为戟叶马鞭草苷、峰2为马鞭草苷、峰5为木犀草素-7-二葡萄糖苷酸、峰13为毛蕊花糖苷,峰14为芹菜素-7-0-葡萄糖醛酸苷,峰15为异毛蕊花糖苷,化合物信息见表3。

表3 马鞭草药材中化合物质谱指认结果

Table 3 Mass spectrum identification results of compounds in Verbenae Herba

峰号 Peak No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	理论分子量 Theoretical molecular weight	分子离子峰 Molecular ion peak	实测值 Measured value ( <i>m/z</i> )	二级碎片 Secondary fragment ( <i>m/z</i> )
1	13.77	戟叶马鞭草苷 Hastatoside	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	404.131 9	[M+H] <sup>+</sup>	405.138 9	243.086 8、 225.075 7、 207.065 1、 193.049 9
2	15.69	马鞭草苷 Verbenoside	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	388.136 9	[M+H] <sup>+</sup>	389.143 9	227.091 1 195.065 0
5	20.25	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>	638.111 9	[M-H] <sup>-</sup>	637.104 8	351.056 7、 285.040 3、 193.034 5
13	34.82	毛蕊花糖苷 Acteoside	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	624.205 4	[M-H] <sup>-</sup>	623.198 2	461.166 3、 161.023 2
14	36.85	芹菜素-7- <i>O</i> - 葡萄糖醛酸苷 Apigenin-7- <i>O</i> -glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	446.084 9	[M-H] <sup>-</sup>	445.077 6	269.045 5、 175.023 9、 113.023 0
15	37.28	异毛蕊花糖苷 Isoacteoside	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	624.205 4	[M-H] <sup>-</sup>	623.198 2	461.166 7、 161.023 3

### 2.1.7 共有峰的确证

取“2.1.2”项下对照品溶液和“2.1.3”项下供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,采用与对照品保留时间比对以及紫外-可见光 3D 光谱分

析,结果见图 4 所示,进一步确认峰 1 为戟叶马鞭草苷,峰 2 为马鞭草苷,峰 5 为木犀草素 7-二葡萄糖苷酸,峰 13 为毛蕊花糖苷,峰 14 为芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷,峰 15 为异毛蕊花糖苷。

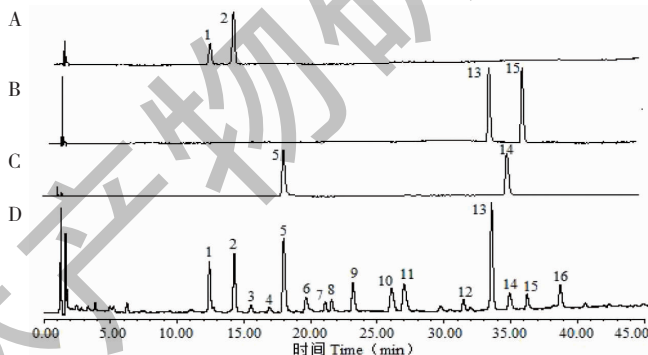


图4 马鞭草指纹图谱共有峰的确证

Fig. 4 Confirmation of common peaks in the fingerprint of Verbenae Herba

注:A:对照品溶液 1;B:对照品溶液 2;C:对照品溶液 3;D:供试品溶液。1:戟叶马鞭草苷;2:马鞭草苷;5:木犀草素 7-二葡萄糖苷酸;13:毛蕊花糖苷;14:芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷;15:异毛蕊花糖苷 Note: A: Reference solution 1;B: Reference solution 2;C: Reference solution 3;D: Test solution. 1: Hastatoside;2: Verbenoside;5: Luteolin 7-diglucoside;13: Acteoside;14: Apigenin-7-*O*-glucuronide;15: Isoacteoside.

### 2.1.8 化学计量学分析

#### 2.1.8.1 聚类分析(HCA)

以峰 13 为 S 峰,分别计算峰 1~12、峰 14~16 与 S 峰的相对峰面积,以各共有峰的相对峰面积为变量,采用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行系统聚类分析,所有变量数据均经 Z 得分法标准化处理,聚类方法为组间联接法,度量标准为平方 Euclidean 距

离,软件自动生成聚类分析树状图(见图 5)。结果显示,当组间距离为 8~13 时,15 批不同产地的马鞭草药材被分为三类,其中编号 S7~S15 的样品聚为一类,S1~S4 样品聚为第二类,S5~S6 样品聚为第三类。表明不同产地的马鞭草药材化学成分的比例存在较大的差异,这种差异可能与药材的采收时间和产地加工方式的不同有关。

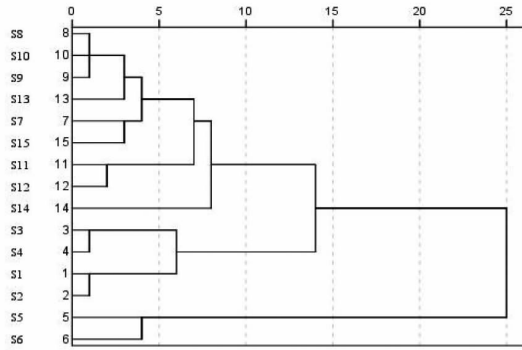


图5 聚类分析树状图

Fig. 5 Cluster analysis tree

### 2.1.8.2 主成分分析(PCA)

以各共有峰的相对峰面积为变量,采用 SIMCA 14.1 软件,进行无监督模式下主成分分析(PCA),结果见图6所示。结果显示,15批马鞭草药材被分

为3类,编号S7~S15为I类,编号S1~S4为II类,编号S5、S6为III类。PCA结果与HCA结果基本一致,表明不同产地马鞭草药材存在一定的差异。

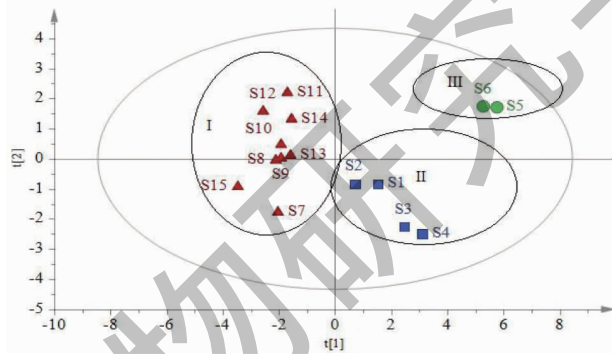


图6 主成分分析

Fig. 6 Principal component analysis

### 2.1.8.3 正交偏最小二乘法-判别式分析(OPLS-DA)

将马鞭草各共有峰的相对峰面积导入 SIMCA14.1 软件中进行正交偏最小二乘法-判别式分析(OPLS-DA),运用统计学方法将模型随机排列 200

次做置换检验,结果见图7。位于左侧的模型解释程度  $R^2$  值和模型预测能力  $Q^2$  值均小于最右边的值,其中  $R^2$  为 0.887,  $Q^2$  为 0.902,均大于 0.5,说明 OPLS-DA 模型未出现过拟合现象,所建立的模型有效,OPLS-DA 将 15 批马鞭草分为 3 类(见图8),为

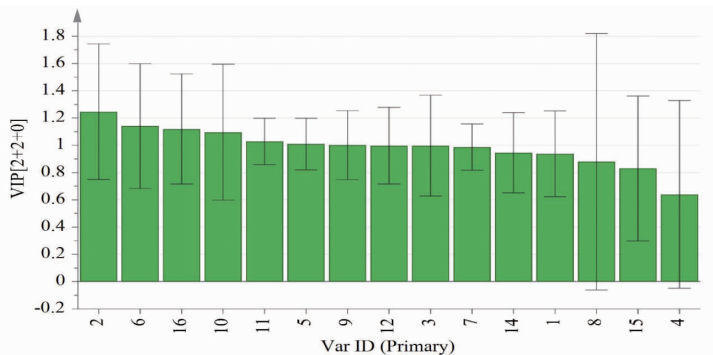


图7 模型置换检验图

Fig. 7 Model permutation test diagram

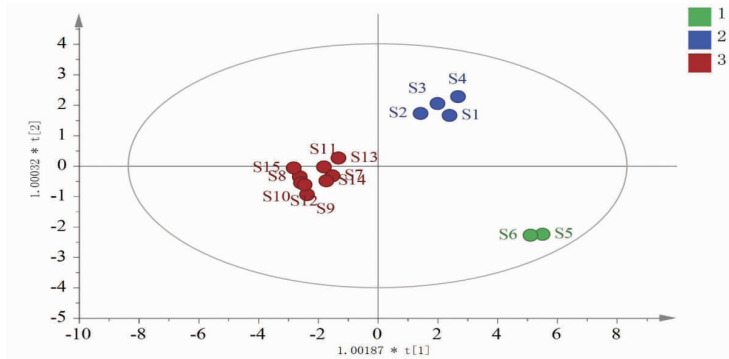


图8 OPLS-DA 图

Fig. 8 OPLS-DA diagram

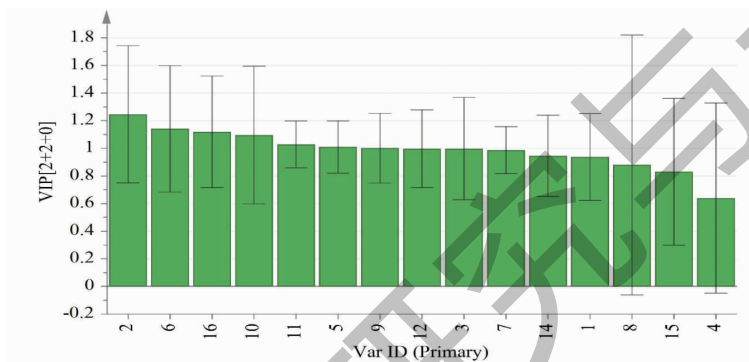


图9 VIP 图

Fig. 9 VIP diagram

寻找 15 批马鞭草药材成分的差异,对变量进行重要性投影(VIP)分析(见图 9),其中色谱峰 2、6、16、10、11、5、9 的 VIP 值大于 1.0,是引起不同批次样品差异的主要因素,目前峰 2 已知为马鞭草苷,其余成分有待于进一步研究。

## 2.2 含量测定

### 2.2.1 色谱条件

采用 YMC Triart C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;以乙腈为流动相 A,以水为流动相 B,梯度洗脱(0 ~ 30 min, 13% → 25% A; 30 ~ 32 min, 25% → 80% A; 32 ~ 35 min, 80% A);流速为 1.0 mL/min;柱温为 40 °C;检测波长为 230 nm;进样量为 10 μL。

### 2.2.2 对照品溶液的制备

取戟叶马鞭草苷对照品、马鞭草苷对照品、毛蕊花糖苷对照品和异毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,加 70% 甲醇制成每 1 mL 含戟叶马鞭草苷 100 μg、马鞭草苷 100 μg、毛蕊花糖苷 200 μg、异毛蕊花糖苷 10 μg 的混合溶液,即得。

### 2.2.3 供试品溶液的制备

同“2.1.3”项下方法。

### 2.2.4 方法学验证

#### 2.2.4.1 精密度考察

精密吸取马鞭草药材(编号:S9)供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 针,记录戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷色谱峰面积,计算峰面积 RSD 值分别为 0.36%、0.98%、1.02% 和 0.68%,均小于 3.0%,表明该方法精密度良好。

#### 2.2.4.2 线性关系考察

取马鞭草苷对照品 9.468 mg,戟叶马鞭草苷对照品 6.942 mg,毛蕊花糖苷对照品 22.448 mg,异毛蕊花糖苷 2.461 mg,精密称定,加 70% 甲醇定容至 10 mL,制成每 1 mL 分别含马鞭草苷 927.864 μg、戟叶马鞭草苷 680.316 μg、毛蕊花糖苷 2137.050 μg、异毛蕊花糖苷 241.178 μg 的混合对照品贮备液。

精密吸取上述混合对照品贮备液 1 mL,置 2、5、10、20、50、100 mL 量瓶中,分别加 70% 甲醇定容至



刻度,制成系列对照品应用液,分别精密吸取上述对照品贮备液和应用液,按“2.2.1”项下色谱条件依次进样分析,记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标

( $Y$ ),对照品浓度( $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标( $X$ ),绘制标准曲线,结果见表4,结果显示,各化学成分在相应的浓度范围内峰面积与对照品浓度线性关系良好。

表4 各成分线性考察结果

Table 4 Linear relationship results of various constituents

成分 Component	回归方程 Regression equation	$r$	线性范围 Linear range( $\mu\text{g/mL}$ )
马鞭草 Verbenoside	$Y=4\ 155.031X-606\ 4.047$	0.999 9	9.279 ~ 927.864
戟叶马鞭草 Hastatoside	$Y=4\ 329.280X-307\ 8.207$	0.999 9	6.803 ~ 680.613
毛蕊花糖苷 Acteoside	$Y=4\ 315.611X-10\ 217.760$	0.999 9	21.370 ~ 2 137.050
异毛蕊花糖苷 Isoacteoside	$Y=3\ 698.882X-1\ 623.330$	1.000 0	2.412 ~ 241.178

### 2.2.4.3 重复性考察

取同一批马鞭草药材粉末(编号:S9,过四号筛),精密称定,平行6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液6份,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,计算6次测定的马鞭草药材粉末中戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量均值分别为6.04、6.69、12.68、0.47 mg/g, RSD值分别为1.25%、0.98%、0.68%、2.10%,均小于3.0%,表明该方法重复性良好。

### 2.2.4.4 加样回收率考察

取已测定含量马鞭草药材(编号:S9,过四号筛)粉末约0.5 g,精密称定,平行3组,每组3份,分

别按含量比例为1:0.5、1:1、1:1.5加入戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷对照品,按“2.2.3”项下方法制备9份供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,计算戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的平均加样回收率及RSD值,结果见表5所示,戟叶马鞭草苷的平均加样回收率为97.98%、RSD值为1.08%;马鞭草苷的平均加样回收率为99.07%、RSD值为2.16%;毛蕊花糖苷的平均加样回收率为98.64%、RSD值为0.83%、异毛蕊花糖苷的平均加样回收率为97.95%、RSD值为1.73%;表明该方法准确性良好。

表5 各成分加样回收率测定结果

Table 5 Determination results of recovery rate of each component

指标成分 Index component	序号 No.	称样量 Sample weight (g)	已知量 Known quantity (mg)	对照品加入量 Reference substance added amount (mg)	测得量 Measured quantity (mg)	回收率 Recovery rate(%)	回收率均值 Average recovery rate(%)	RSD (%)
戟叶马鞭草苷 Hastatoside	1	0.505 2	3.051 4	1.571 3	4.606 3	98.96	97.98	1.08
	2	0.504 8	3.049 0	1.571 3	4.600 3	98.73		
	3	0.501 8	3.030 9	1.571 3	4.601 2	99.94		
	4	0.502 7	3.036 3	3.142 6	6.098 9	97.45		
	5	0.501 5	3.029 1	3.142 6	6.071 7	96.82		
	6	0.503 4	3.040 5	3.142 6	6.083 1	96.82		
	7	0.508 3	3.070 1	4.713 9	7.654 0	97.24		
	8	0.507 4	3.064 7	4.713 9	7.673 6	97.77		
	9	0.506 4	3.058 7	4.713 9	7.684 1	98.12		
马鞭草苷 Verbenoside	1	0.505 2	3.379 8	1.632 1	5.028 9	101.04	99.07	2.16
	2	0.504 8	3.377 1	1.632 1	5.020 9	100.72		
	3	0.501 8	3.357 0	1.632 1	5.039 1	103.06		
	4	0.502 7	3.363 1	3.264 2	6.529 3	97.00		
	5	0.501 5	3.355 0	3.264 2	6.519 5	96.94		



续表 5 (Continued Tab. 5)

指标成分 Index component	序号 No.	称样量 Sample weight (g)	已知量 Known quantity (mg)	对照品加入量 Reference substance added amount (mg)	测得量 Measured quantity (mg)	回收率 Recovery rate(%)	回收率均值 Average recovery rate(%)	RSD (%)
马鞭草苷 Verbenoside	6	0.503 4	3.367 7	3.264 2	6.531 9	96.94		
	7	0.508 3	3.400 5	4.896 3	8.216 8	98.37		
	8	0.507 4	3.394 5	4.896 3	8.220 9	98.57		
	9	0.506 4	3.387 8	4.896 3	8.234 1	98.98		
毛蕊花糖苷 Acteoside	1	0.505 2	6.405 9	3.166 7	9.532 4	98.73	98.64	0.83
	2	0.504 8	6.400 9	3.166 7	9.532 7	98.90		
	3	0.501 8	6.362 8	3.166 7	9.435 4	97.03		
	4	0.502 7	6.374 2	6.333 4	12.589 6	98.14		
	5	0.501 5	6.359 0	6.333 4	12.572 4	98.10		
	6	0.503 4	6.383 1	6.333 4	12.716 2	100.00		
	7	0.508 3	6.445 2	9.500 1	15.846 3	98.96		
	8	0.507 4	6.433 8	9.500 1	15.832 1	98.93		
	9	0.506 4	6.421 2	9.500 1	15.821 2	98.95		
异毛蕊花糖苷 Isoacteoside	1	0.505 2	0.237 4	0.118 7	0.351 4	96.00	97.95	1.73
	2	0.504 8	0.237 3	0.118 7	0.352 1	96.75		
	3	0.501 8	0.235 8	0.118 7	0.354 5	99.96		
	4	0.502 7	0.236 3	0.237 4	0.469 8	98.37		
	5	0.501 5	0.235 7	0.237 4	0.465 8	96.92		
	6	0.503 4	0.236 6	0.237 4	0.463 2	95.45		
	7	0.508 3	0.238 9	0.356 1	0.592 1	99.19		
	8	0.507 4	0.238 5	0.356 1	0.593 4	99.67		
	9	0.506 4	0.238 0	0.356 1	0.591 5	99.27		

#### 2.2.4.5 稳定性考察

取“2.2.4.3 重复性考察”项下供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件,分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样分析,记录戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的色谱峰面积,并计算峰面积 RSD 值分别为 0.69%、1.21%、0.87%、0.69%,均小于 3.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

#### 2.2.5 样品测定

取 15 批马鞭草药材粉末,采用“2.2”项下含量测定方法,对 15 批药材戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量进行测定,并计算戟叶马鞭草苷和马鞭草苷的总量,以及毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的总量,结果见表 6 所示。结果显示,15 批马鞭草药材戟叶马鞭草苷和马鞭草苷的总

含量在 9.10 ~ 25.82 mg/g,毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷总含量在 8.85 ~ 30.34 mg/g。

### 3 讨论与结论

#### 3.1 含量指标的选择

根据文献报道<sup>[11,12]</sup>和我司前期研究显示,毛蕊花糖苷在一定条件下能转化为异毛蕊花糖苷,毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷均具有抗氧化、抗溶血、能抑制血管紧张素酶活性、降血压以及增强免疫功能活性等功效,说明毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷对马鞭草的质量控制与评价均具有重要意义,因此,我司在已有的研究基础上,增加对药材异毛蕊花糖苷的测定,以期含马鞭草的中药制剂的质量控制提供参考。化学成分研究显示,马鞭草苷和戟叶马鞭草苷均属于环烯醚萜苷,戟叶马鞭草苷又称为 5-羟基马鞭草苷,与马鞭草苷相比,5 号碳位上多了一个羟

表6 15批马鞭草药材含量测定结果

Table 6 Content determination results of 15 batches of Verbenae Herba

编号 No.	含量 Content (mg/g)					
	戟叶马鞭草苷 Hastatoside	马鞭草苷 Verbenoside	戟叶马鞭草苷 + 马鞭草苷 Hastatoside + Verbenoside	毛蕊花糖苷 Acteoside	异毛蕊花糖苷 Isoacteoside	毛蕊花糖苷 + 异毛蕊花糖苷 Acteoside + Isoacteoside
S1	4.69	5.00	9.69	18.76	0.81	19.57
S2	9.88	4.73	14.61	16.99	1.29	18.28
S3	4.73	5.28	10.01	17.90	0.68	18.58
S4	4.95	5.99	10.94	8.39	0.69	27.08
S5	7.29	8.27	15.56	8.49	0.36	8.85
S6	8.11	4.77	12.88	9.37	0.56	9.93
S7	4.12	4.99	9.10	19.91	0.51	20.42
S8	11.56	14.26	25.82	17.91	0.37	18.27
S9	6.64	7.35	13.99	13.93	0.52	14.45
S10	9.24	13.20	22.44	20.80	0.64	21.43
S11	12.40	8.47	20.88	14.87	1.35	16.22
S12	11.20	10.22	21.42	28.83	1.51	30.34
S13	5.47	4.26	9.73	10.10	0.50	10.60
S14	8.00	5.66	13.66	15.53	1.22	16.76
S15	9.05	10.10	19.15	15.28	1.29	16.57
均值 mean value	7.82	7.50	15.33	17.00	0.82	17.82

注:  $n = 2$ , 以干燥品计。

Note:  $n = 2$ , calculated by dry sample.

基,两种成分化学结构类似,在紫外-可见光3D光谱的吸收曲线基本一致,因此,建议将两种成分合并检测,并计算两种成分的总量。本次研究,建立了4种有效成分的含量测定方法,供试品溶液制备方法与指纹图谱一致,但色谱条件属于单独建立,与指纹图谱并不一致,主要是考虑指标性成分的分度、纯度和方法的重现性等问题。含量测定结果显示,不同产区的马鞭草药材戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量存在一定的差异,即使同一产区,不同批次的药材,含量也存在一定的差异,这种差异主要与药材的采收时间、产地加工方式、储存方式、储存时间等不同有关。此外,我司在研究中发现,同一株马鞭草药材,不同的药用部位,戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量也有较大差异,其中花和叶子中戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷要明显高于茎。因此,严格控制药材的采收时间,保证药材中花和叶子的比例,对马鞭草药材的质量控制具有重要意义。

### 3.2 指纹图谱的研究

采用UPLC法建立马鞭草药材指纹图谱,对指纹图谱的色谱条件和供试品溶液制备方法进行了系统考察,相似度计算结果显示,15批药材指纹图谱相似度均在0.9以上,整体相似度较高,可以用于马鞭草药材的鉴别和质量控制。通过高分辨质谱对共有峰进行指认,共指认出3类有效成分,分别为环烯醚萜苷、苯丙素苷和黄酮类,首次实现采用指纹图谱对马鞭草中3类有效成分的特征,并首次从马鞭草药材指纹图谱中指认出异毛蕊花糖苷、木犀草素7-二葡萄糖苷酸和芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷,更好地反映了马鞭草药材的整体性和特征性。以共有峰的相对峰面积为变量,聚类分析和主成分分析均将15批药材分为3类,其中河南、江苏和贵州的药材在化学成分的比例上较接近,OPLS-DA共找到7个峰比例差异比较大的色谱峰,分别为峰2、6、16、10、11、5、9,这种差异可能与药材的采收时间和产地加工方式的不同有关。

综上所述,该方法能有效分析不同产地马鞭草

药材的质量差异,为不同产地马鞭草药材质量的评价提供参考。

#### 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: 53.
- 2 He J, Fan YQ, Yang FW, et al. Research advances on chemical components and pharmacological activities of *Verbena officinalis*[J]. Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药), 2020, 37:1205-1212.
- 3 Guo L, Miao MS. Investigation of the chemistry, pharmacology and clinical application of European *Verbena*[J]. Acta Chin Med(中医学报), 2014, 29:1345-1347.
- 4 Liu YL, Miao JX, Tian S, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological action of verbenoside [J]. Henan Tradit Chin Med(河南中医), 2021, 41: 294-299.
- 5 Liu SX, Bai X, Liu Y, et al. Establishment of HPLC fingerprint of *Verbena officinalis* and determination of multi-components[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47: 2069-2073.
- 6 Shu JC, Gui X, Wang ZT. Quality control of *Verbena* Herba [J]. Chin Modern Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28:433-438.
- 7 Sun W. Quality study on standard decoction of *Verbena officinalis* L[D]. Anhui J Tradit Chin Med(安徽医科大学), 2022.
- 8 Xu SB. The study of the quality-standard on *Verbena officinalis* formulation granules[D]. Hefei: Anhui Medical University(安徽医科大学), 2022.
- 9 Zhang ZP, Deng LH, Wang SF, et al. Study on quality evaluation of *Verbena officinalis* L. based on ultra high performance liquid chromatography fingerprint and chemical pattern recognition[J]. Chin Med Herald(中国医药导报), 2022, 19: 21-25.
- 10 Wang MM, Liu Z, Chi ZL, et al. Study on HPLC fingerprint of *Herba Verbena officinalis*[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2013, 31:1800-1803.
- 11 Yu WN, Zhang ZL, Zhang Y, et al. Determination of dynamic changes of isoacteoside in processing process of *Rehmannia Radix*[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23:22-26.
- 12 Xu BB, Huang BT, Zeng JX. Comparison of contents of verbasoside and isoverbasoside in *Plantagin Semen* and *Plantagin Herba*[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22:64-67.