

基于 HPLC 指纹图谱和含量测定的半边莲饮片与标准汤剂量值传递规律研究

李振雨*, 刘晓霞, 冯涌微,
位翠杰, 何民友, 夏天睿, 陈向东*, 孙冬梅

广东一方制药有限公司 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244

摘要: 研究半边莲标准汤剂量值传递规律, 为半边莲配方颗粒及其相关制剂质量标准的制定提供参考。将 21 批半边莲饮片制成标准汤剂, 测定标准汤剂的出膏率和浸出物, 建立半边莲饮片和标准汤剂指纹图谱, 通过相似度评价和化学计量学分析, 研究共有峰从饮片到标准汤剂的变化规律; 测定半边莲饮片和标准汤剂中地奥司明和蒙花苷的含量, 并计算转移率。结果显示, 21 批半边莲标准汤剂出膏率在 29.91% ~ 47.94%, 浸出物在 22.19% ~ 36.36%; 饮片和标准汤剂指纹图谱均标定出 11 个相同的共有峰, 说明共有峰均能从饮片传递到标准汤剂中, 饮片指纹图谱的整体相似度较高, 而标准汤剂的相似度变化较大, 主成分分析 (PCA) 显示, 21 批饮片和标准汤剂各自归为一类, 正交偏最小二乘法-判别式分析 (OPLS-DA) 共找到 5 个相对峰面积变化较为显著的色谱峰。21 批标准汤剂地奥司明的含量在 0.15 ~ 0.54 mg/g, 转移率在 1.53% ~ 4.99%; 蒙花苷的含量在 0.06 ~ 0.15 mg/g, 转移率在 4.27% ~ 8.98%。该研究能够为半边莲配方颗粒及其相关制剂质量标准的制定提供一定的参考。

关键词: 半边莲; 饮片; 标准汤剂; 量值传递

中图分类号: R282.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)11-1864-13

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.11.004

Study on the transmission law of quantity value of Lobeliae Chinensis Herba decoction pieces and standard decoction based on HPLC fingerprint and content determination

LI Zhen-yu*, LIU Xiao-xia, FEGN Yong-wei,
WEI Cui-jie, HE Min-you, XIA Tian-rui, CHEN Xiang-dong*, SUN Dong-mei

Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula,
Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China

Abstract: To provide reference for the formulation of quality standards of Lobeliae Chinensis Herba formula granules and related preparations, the transmission law of quantity value of Lobeliae Chinensis Herba standard decoction was studied. Twenty-one batches of Lobeliae Chinensis Herba decoction pieces were made into standard decoction. Paste yield and extracts were measured. The fingerprints of Lobeliae Chinensis Herba decoction pieces and standard decoction were established. Through similarity evaluation and chemometric analysis, the change rules of common peaks from decoction pieces to standard decoction were studied. The contents of diosmin and linarin were measured and the transfer rates were calculated. The results showed that paste yield of 21 batches of Lobeliae Chinensis Herba ranged from 29.91% to 47.94% and the extracts ranged from 22.19% - 36.36%. Eleven identical common peaks were identified in the fingerprints of Lobeliae Chinensis Herba decoction pieces and standard decoction, indicating that the common peaks can be transferred from the decoction pieces to the standard decoction. The overall similarity of the fingerprint of the decoction pieces was relatively high, while the similarity of the stand-

ard decoction varied greatly. Principal component analysis (PCA) showed that 21 batches of decoction pieces and standard decoction were classified into one group respectively. Five chromatographic peaks with significant changes in relative peak area were found by orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The content range of diosmin in 21 batches of standard decoction was 0.15-0.54 mg/g and the transfer rate range was 1.53%-4.99%. The content range of linarin was 0.06-0.15 mg/g and the transfer rate range was 4.27%-8.98%. This study can provide a certain reference for the formulation of quality standards of *Lobeliae Chinensis Herba* formula granules and related preparations.

Key words: *Lobeliae Chinensis Herba*; decoction pieces; standard decoction; quantity value transfer

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,利尿消肿的功效^[1]。研究显示,半边莲主要含黄酮、生物碱和香豆素类成分^[2],具有抑菌、抗病毒、抗肿瘤、抗炎、镇痛等药理作用^[3-7]。半边莲为药典常用中药,但药典项下半边莲药材质量标准只收录性状、鉴别、检查和浸出物项,质量标准尚不完善。目前关于半边莲质量控制研究及成分分析的报道仍比较少^[8]。

传统中药以汤剂为主要用药形式,汤剂为中药发挥药效的物质基础,经过千年的临床实践,因此,建立中药标准汤剂的质量标准,能够为中药配方颗粒等现代中药制剂质量标准的建立提供重要参考^[9,10]。目前,关于半边莲标准汤剂的研究报道尚未见到。本文作者在研究半边莲配方颗粒国家标准时,按照《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》^[11](以下简称《技术要求》),对标准汤剂的关键质量指标:出膏率、浸出物、指标性成分含量及转移率、指纹图谱进行研究,考察半边莲饮片到标准汤剂的量值传递规律,为半边莲配方颗粒及其相关制剂质量标准的制定提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(e2695,沃特世公司); Thermo Acclaim C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱

柱; Agilent ZORBAX SB C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 百万分之一天平(XP26, 梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂

分析级甲醇、磷酸二氢钾(西陇科学股份有限公司); 分析级二甲基亚砜(阿拉丁试剂有限公司); 液相用乙腈(纯度 ≥ 99.9%, 默克股份有限公司)。

1.3 试药

地奥司明(批号:101348-201802, 含量:97.3%)、蒙花苷(批号:111528-201911, 含量:98.5%)对照品购自中国食品药品检定研究院; 木犀草素 7-二葡萄糖苷酸对照品(批号:STD210928082, 纯度大于 95.0%, 成都德思特生物技术有限公司); 海常黄苷对照品(批号:B20210512, 纯度大于 98.0%, 四川维克奇生物技术有限公司); 半边莲对照药材(批号:121142-201605, 中国食品药品检定研究院)。

21 批半边莲药材经广东一方制药有限公司质量中心鉴定为桔梗科植物半边莲 *Lobelia chinensis* Lour. 的干燥全草。取 21 批半边莲药材,参照 2020 年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)半边莲饮片项下规定制成 21 批半边莲饮片,并按照《技术要求》和《医疗机构中药煎药室管理规范》^[12]制备 21 批半边莲标准汤剂样品。半边莲饮片和标准汤剂的产地信息见表 1 所示。

表 1 半边莲饮片和标准汤剂产地信息表

Table 1 Origin information of *Lobeliae Chinensis Herba* decoction pieces and standard decoction

饮片编号 Decoction piece number	标准汤剂编号 Standard decoction number	产地 Origin
YP1	BT1	湖北省黄冈市
YP2	BT2	湖北省黄冈市
YP3	BT3	湖北省黄冈市
YP4	BT4	贵州省安顺市
YP5	BT5	贵州省安顺市
YP6	BT6	贵州省安顺市
YP7	BT7	贵州省铜仁市

续表 1 (Continued Tab. 1)

饮片编号 Decoction piece number	标准汤剂编号 Standard decoction number	产地 Origin
YP8	BT8	贵州省铜仁市
YP9	BT9	贵州省铜仁市
YP10	BT10	安徽省宣城市
YP11	BT11	安徽省宣城市
YP12	BT12	安徽省宣城市
YP13	BT13	湖南省邵阳市
YP14	BT14	湖南省邵阳市
YP15	BT15	湖南省邵阳市
YP16	BT16	江西省宜春市
YP17	BT17	江西省宜春市
YP18	BT18	江西省宜春市
YP19	BT19	河南省驻马店市
YP20	BT20	河南省驻马店市
YP21	BT21	河南省驻马店市

2 方法与结果

2.1 半边莲饮片的炮制和标准汤剂的制备

2.1.1 半边莲饮片的炮制

参照 2020 年版《中国药典》一部半边莲饮片项下炮制规定,细化炮制参数,确定半边莲饮片的炮制方法为:取药材,除去杂质,洗净(1 min 内),切段(5~10 mm),置 60 °C 电热恒温鼓风干燥箱中干燥 5~6 h,即得半边莲饮片,经检验均符合 2020 年版《中国药典》的规定。

2.1.2 半边莲饮片标准汤剂的制备

取半边莲饮片 100 g,加水煎煮两次,一煎加水 12 倍量,浸泡 30 min,武火(500 W)加热煮沸后文火(200 W)保持微沸 30 min,趁热过滤,滤液迅速用冷水冷却;二煎加水 10 倍量,武火(500 W)加热煮沸后文火(200 W)保持微沸 25 min,趁热过滤,滤液迅速用冷水冷却;合并两次滤液,减压浓缩,冷冻干燥,得标准汤剂冻干粉。

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo Acclaim C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(B);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。

2.2.2 对照品溶液的制备

取木犀草素 7-二葡萄糖苷酸、海常黄苷、地奥

司明和蒙花苷对照品适量,溶解于二甲基亚砜中,制成适量的混合对照品溶液。精密移取上述混合对照品溶液适量,加甲醇制成每 1 mL 含木犀草素 7-二葡萄糖苷酸 4.21 μg、海常黄苷 2.23 μg、地奥司明 1.75 μg 和蒙花苷 1.62 μg 的混合溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备

2.2.3.1 半边莲饮片供试品溶液的制备

取本品粉末(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。

2.2.3.2 半边莲标准汤剂供试品溶液的制备

取半边莲标准汤剂适量,研细,取约 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,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 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。

2.2.3.3 半边莲对照药材供试溶液的制备

取本品约 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,取续滤液,即得。

2.2.4 指纹图谱方法学验证

2.2.4.1 精密度考察

取半边莲标准汤剂(编号:BT3)适量,研细,取约 0.5 g,精密称定,按“2.2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件重复进样 6 次,

以地奥司明色谱峰为参照峰 S, 计算其余各共有指纹峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.07% ~ 0.27%, 相对峰面积 RSD 值在 1.12% ~ 2.64%, 均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4.2 重复性试验

取同一批半边莲标准汤剂(编号:BT3)适量, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 平行 6 份, 按“2.2.3.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 以地奥司明色谱峰为参照峰 S, 计算其余各共有指纹峰与 S 峰的相对峰面积 RSD 值在 0.14% ~ 0.36%, 相对峰面积 RSD 值在 0.60% ~ 2.73%, 均小于 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.2.4.3 稳定性试验

取重复性试验项下供试品溶液, 按“2.2.1”项

下色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定, 以地奥司明色谱峰为参照峰 S, 计算其余各共有指纹峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.10% ~ 0.27%, 相对峰面积 RSD 值在 0.50% ~ 2.81%, 均小于 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.2.5 指纹图谱的建立及共有峰的指认

采用“2.2.1”和“2.2.3”项下方法测定 21 批半边莲饮片和标准汤剂样品指纹图谱, 导出指纹图谱 CDF 格式, 导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)》, 分别以 YP1 和 BT1 样品指纹图谱为参照图谱, 时间窗为 0.2 min, 进行多点校正和峰匹配, 并生成饮片和标准汤剂对照指纹图谱, 21 批半边莲饮片和标准汤剂指纹图谱叠加见图 1 和图 3, 对照指纹图谱见图 2 和图 4。结果显

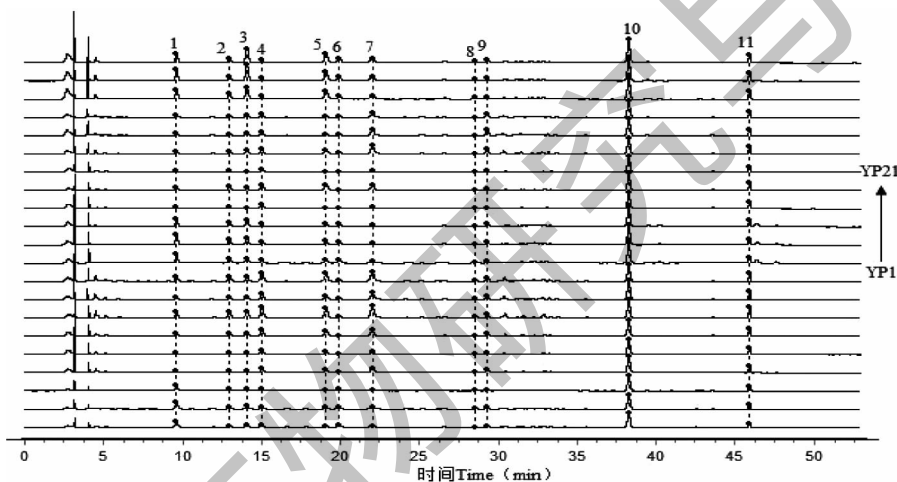


图 1 21 批半边莲饮片指纹图谱叠加图

Fig. 1 Superimposed fingerprint of 21 batches of Lobeliae Chinensis Herba decoction pieces

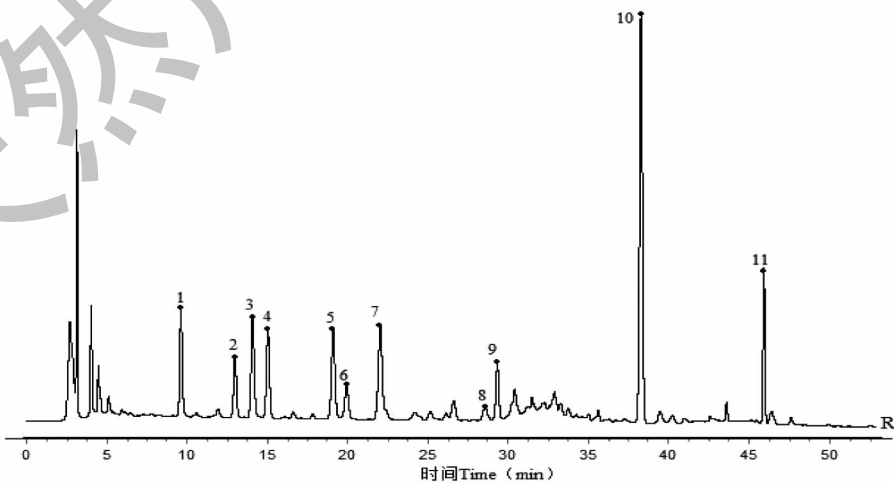


图 2 半边莲饮片对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of Lobeliae Chinensis Herba decoction pieces

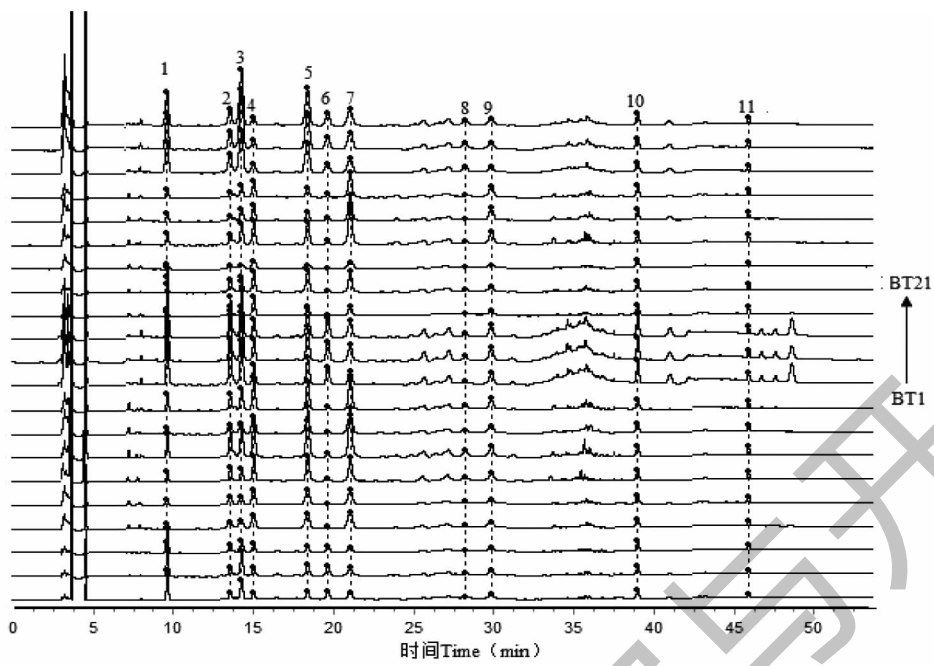


图3 21批半边莲标准汤剂指纹图谱叠加图

Fig. 3 Superimposed fingerprint of 21 batches of *Lobeliae Chinensis Herba* standard decoction

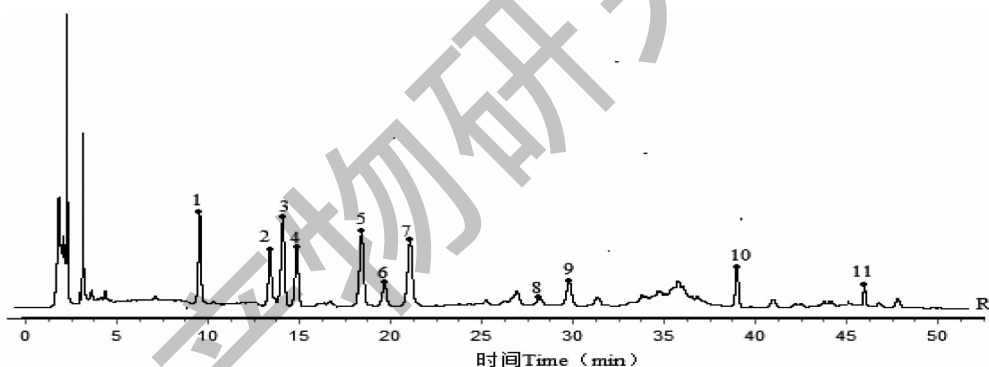


图4 半边莲标准汤剂对照指纹图谱

Fig. 4 Reference fingerprint of *Lobeliae Chinensis Herba* standard decoction

示,21批半边莲饮片和标准汤剂指纹图谱均标识出11个保留时间一致的共有峰,并与半边莲对照药材指纹图谱的11个色谱峰相对应,说明从半边莲饮片到标准汤剂,各共有峰均能传递到标准汤剂中,对照药材指纹图谱见图5所示。取“2.2.2”项下混合对照品溶液和半边莲标准汤剂(编号:BT3)供试品溶液,采用“2.2.1”项下色谱条件进行分析,与对照品保留时间和紫外吸收光谱比对,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,对照品指认结果见图6所示。

2.2.6 相似度评价

计算21批半边莲饮片和标准汤剂样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度,结果见表2,21批半边莲饮片指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在0.912~0.976,饮片指纹图谱的整体相似度较高,指纹图谱可以作为共性特征用于半边莲饮片的质量控制;而21批半边莲标准汤剂指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在0.840~0.943,从饮片到标准汤剂,指纹图谱的相似度变化较大,考虑半边莲指纹图谱共有峰所代表的化学成分在水中的溶解度不同,从饮片到标准汤剂各成分的转移率波动较大,导致共有峰的比例发生较大变化有关。

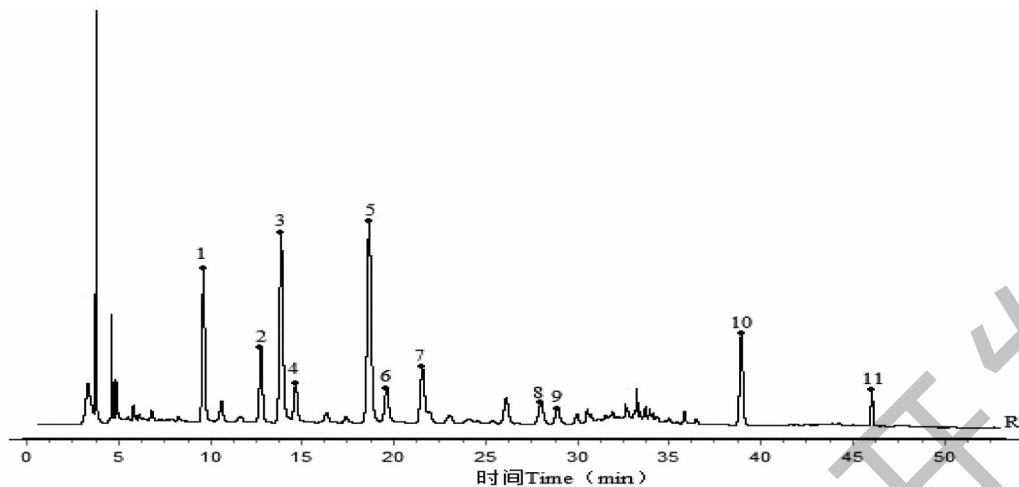


图5 半边莲对照药材指纹图谱

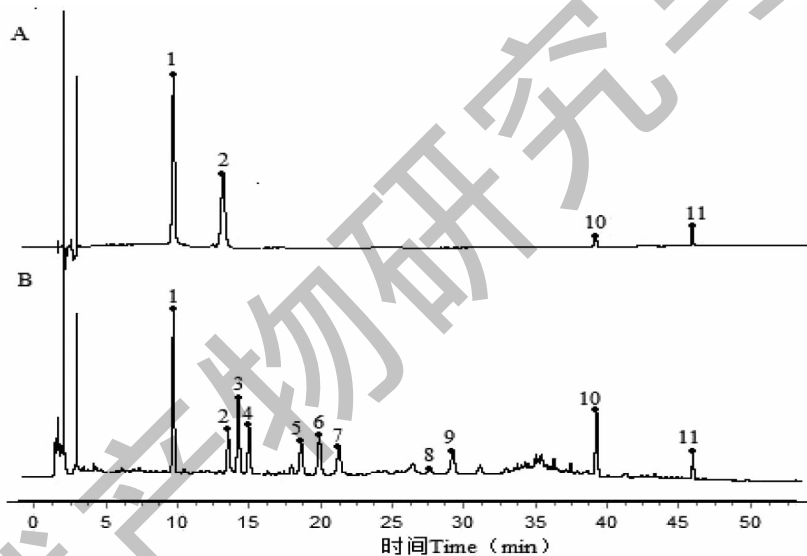
Fig. 5 Reference fingerprint of *Lobeliae Chinensis Herba*

图6 半边莲标准汤剂指纹图谱共有峰指认

Fig. 6 Identification of common peaks in the fingerprint of *Lobeliae Chinensis Herba* standard decoction

注:A;混合对照品溶液,B;供试品溶液。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 solution;B;Sample solution. 1;Luteolin-7-diglucosidic acid;2;Clerodendrin;10;Diosmin;11;Linarin.

表2 相似度计算结果

Table 2 Similarity calculation results

饮片编号 Decoction piece number	相似度 Similarity	标准汤剂编号 Standard decoction number	相似度 Similarity
YP1	0.952	BT1	0.890
YP2	0.960	BT2	0.908
YP3	0.946	BT3	0.867
YP4	0.973	BT4	0.916
YP5	0.973	BT5	0.921
YP6	0.972	BT6	0.924

续表 2 (Continued Tab. 2)

饮片编号 Decoction piece number	相似度 Similarity	标准汤剂编号 Standard decoction number	相似度 Similarity
YP7	0.912	BT7	0.938
YP8	0.976	BT8	0.911
YP9	0.941	BT9	0.934
YP10	0.966	BT10	0.903
YP11	0.962	BT11	0.912
YP12	0.971	BT12	0.928
YP13	0.937	BT13	0.840
YP14	0.974	BT14	0.923
YP15	0.933	BT15	0.859
YP16	0.957	BT16	0.900
YP17	0.963	BT17	0.850
YP18	0.967	BT18	0.875
YP19	0.963	BT19	0.943
YP20	0.932	BT20	0.924
YP21	0.944	BT21	0.927

2.2.7 化学计量学分析

2.2.7.1 主成分分析(PCA)

以峰 10 地奥司明色谱峰为参照峰 S, 计算其余各共有峰的相对峰面积, 以共有峰的相对峰面积为变量导入 SIMCA14.1 软件进行 PCA 分析, 结果见图 7 所示, PCA 模型共提取出 5 个主成分, $R^2 X$ 为

0.978, Q^2 为 0.865, 证明模型有效, 结果显示, 21 批半边莲饮片聚为一类, 在模型中的聚集程度较高, 而对应的标准汤剂聚集程度较为分散, 归为另一类, 与相似度计算结果相一致, 说明从饮片到标准汤剂各共有峰的比例发生较大变化, 而标准汤剂不同批次之间也存在较大的差异, 需要进一步研究。

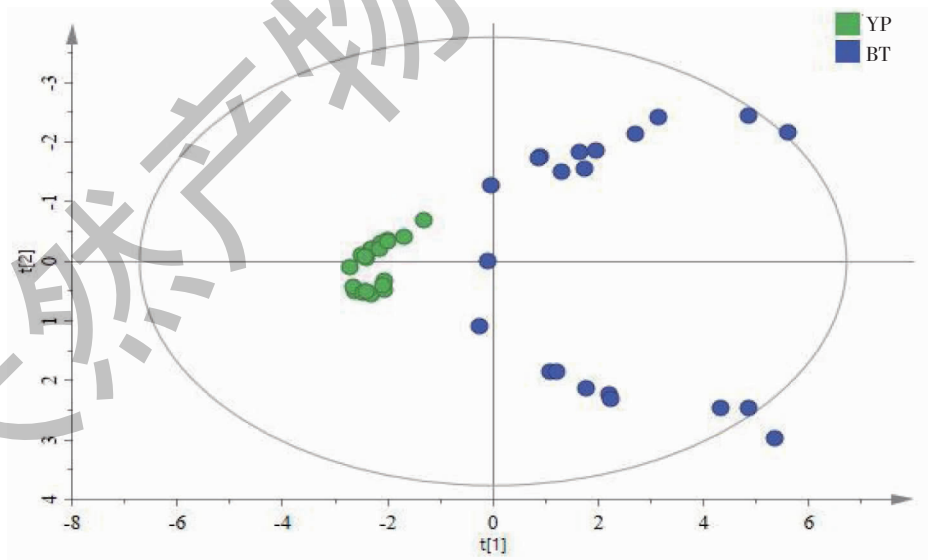


图 7 PCA 得分图

Fig. 7 PCA scores plot

2.2.7.2 正交偏最小二乘法-判别式分析(OPLS-DA)

以共有峰的相对峰面积为变量进行 OPLS-DA

分析, 研究从饮片到标准汤剂各共有峰的相对峰面积变化, 模型采用 200 次置换检验, R^2 和 Q^2 值右边均大于左边, 说明模型无过度拟合现象, 结果见图

8. R^2X 值为 0.938, R^2Y 为 0.894, Q^2 为 0.855, 均大于 0.5, 证实模型有效, 21 批饮片和标准汤剂 OPLS-

DA 得分图见图 9 所示, 两类样品区分较为明显, 以 $VIP > 1.0$ 寻找差异显著性变量, 结果见图 10, 共找

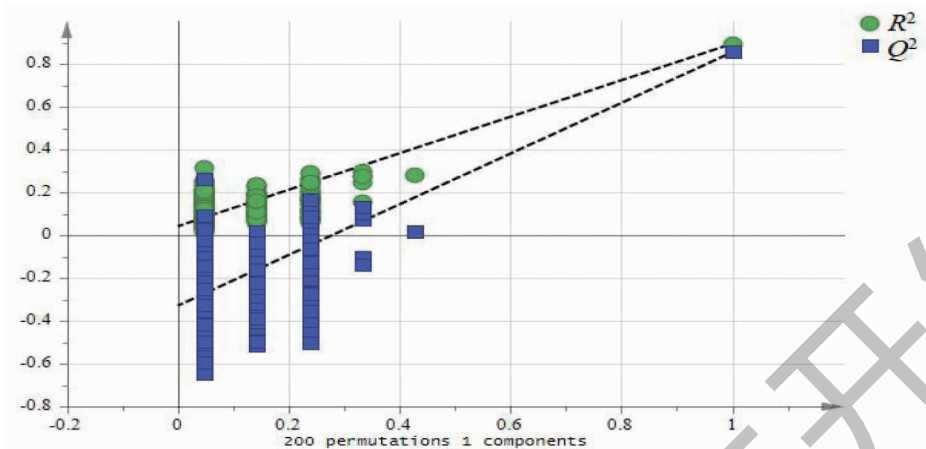


图 8 OPLS-DA 模型置换检验
Fig. 8 OPLS-DA model replacement test

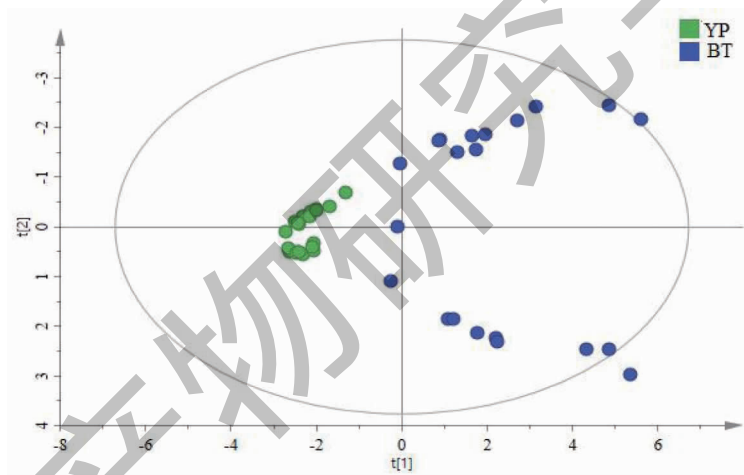


图 9 OPLS-DA 得分图
Fig. 9 OPLS-DA score plot

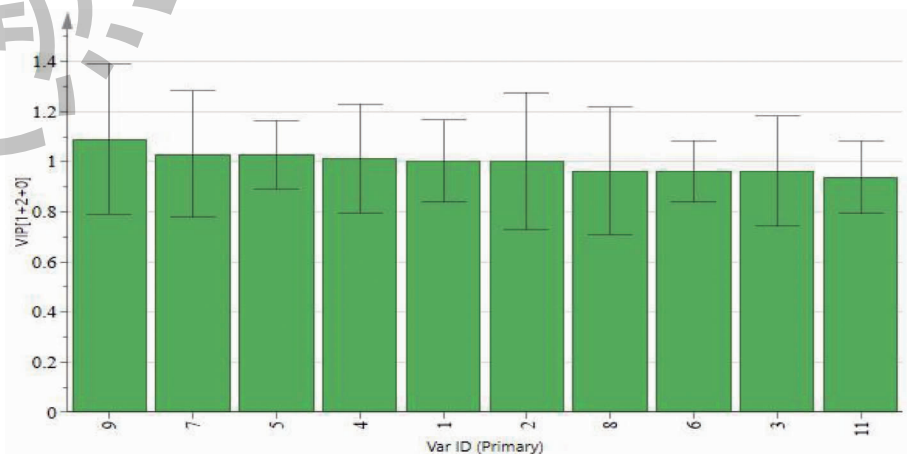


图 10 VIP 图
Fig. 10 VIP plot

到5个差异性变量,按VIP值大小进行排序,分别为峰9 > 峰7 > 峰5 > 峰4 > 峰1,表明上述5个峰的相对峰面积从饮片到标准汤剂相对峰面积变化整体较为显著。

2.3 出膏率测定

出膏率以冻干粉量计,出膏率 = 标准汤剂冻干粉重量/饮片重量 × 100%,结果见表3。21批半边莲标准汤剂出膏率范围在29.91% ~ 47.94%,出膏率均值为40.93%,标准偏差(SD)为5.45%,出膏率均值的70% ~ 130%范围为28.65% ~ 53.20%,出膏率数值均在均值 ± 30%范围内,符合《技术要

求》的规定。

2.4 浸出物测定

取半边莲标准汤剂适量,研细,取约2g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇100 mL,按《中国药典》2020年版通则2201醇溶性浸出物测定法项下的热浸法测定,结果见表3。21批半边莲标准汤剂浸出物范围在22.19% ~ 36.36%,浸出物均值为29.55%,SD为4.24%,均值的70% ~ 130%范围为20.68% ~ 38.41%,浸出物数据均在均值 ± 30%范围内,符合《技术要求》的规定。

表3 出膏率和浸出物含量测定结果

Table 3 Determination results of paste yield and extract content

标准汤剂编号 Standard decoction number	出膏率 Paste yield(%)	浸出物含量 Extracts content(%)
BT1	45.95	28.36
BT2	45.80	30.86
BT3	44.65	22.19
BT4	40.56	33.52
BT5	47.88	35.98
BT6	43.37	33.56
BT7	44.75	31.37
BT8	42.37	25.71
BT9	47.94	34.18
BT10	32.27	35.98
BT11	29.91	31.75
BT12	33.93	36.36
BT13	45.30	25.87
BT14	47.73	25.69
BT15	35.73	26.94
BT16	38.92	25.21
BT17	39.74	28.81
BT18	43.36	24.65
BT19	36.65	30.31
BT20	35.62	26.02
BT21	37.01	27.21
均值 Mean	40.93	29.55
SD	5.45	4.24
均值70% ~ 130% 70%-130% of the mean	28.65 ~ 53.20	20.68 ~ 38.41
均值 ± 3倍SD Mean ± 3SD	24.58 ~ 57.28	16.83 ~ 42.27

2.5 含量测定

2.5.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液(B); 梯度洗脱(0~31 min, 15% → 35% A); 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 检测波长为 340 nm; 进样量为 10 μL。

2.5.2 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, 加二甲基亚砷制成每 1 mL 含地奥司明 90.917 μg、蒙花苷 79.864 μg 的混合溶液, 精密移取上述混合溶液 0.5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含地奥司明 1.818 μg、蒙花苷 1.597 μg 的混合溶液, 即得。

2.5.3 供试品溶液的制备

2.5.3.1 半边莲饮片供试品溶液的制备

取本品粉末(过二号筛)约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入二甲基亚砷 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, 用二甲基亚砷补足减失的重量, 离心(转速为 4 000 r/min) 5 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。

2.5.3.2 半边莲标准汤剂供试品溶液的制备

取半边莲标准汤剂适量, 研细, 取约 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, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 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。

2.5.4 方法学验证

2.5.4.1 精密度试验

精密吸取半边莲标准汤剂溶液, 按照“2.5.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 计算地奥司明和蒙花苷峰面积 RSD 值分别为 0.58% 和 0.55%, 均小于 3.0%, 表明仪器精密密度良好。

2.5.4.2 重复性试验

取同一批半边莲标准汤剂(编号: BT14) 适量, 研细, 约 0.5 g, 精密称定, 平行 6 份, 按“2.5.3.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.5.1”项下色谱条件测定地奥司明和蒙花苷的含量分别为 0.207 mg/g 和 0.084 mg/g, RSD 值为 0.83% 和 0.99%, 均小于 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.5.4.3 线性考察

取地奥司明和蒙花苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含地奥司明 94.323 μg、蒙花苷 48.817 μg 的混合对照品母液。精密量取上述混合对照品母液 1.0 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 47.162、18.865、9.432、3.773、1.886、0.943 μg, 蒙花苷 24.408、9.763、4.882、1.953、0.976、0.488 μg 的混合对照品应用液, 分别精密吸取上述混合对照品母液和应用液, 按照“2.5.1”项下色谱条件依次进样 10 μL, 记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标(Y), 对照品浓度为横坐标(X), 绘制线性回归方程, 地奥司明的线性回归方程为 $Y = 21\,468X + 4\,797.3$, 蒙花苷的线性回归方程为 $Y = 22\,207X + 2\,443.5$, 相关系数 r 均大于 0.999 5, 表明各成分在规定的对照品浓度范围内, 峰面积与对照品浓度线性关系良好。

2.5.4.4 准确度试验

精密称取地奥司明对照品 9.694 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加二甲基亚砷制成每 1 mL 含地奥司明 471.613 μg 的对照品储备液①; 精密称取蒙花苷对照品 2.478 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加二甲基亚砷制成每 1 mL 含蒙花苷 244.083 μg 的对照品储备液②。精密移取上述对照品储备液① 2.8 mL、对照品储备液② 2.2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇制成每 1 mL 含地奥司明 52.821 μg、蒙花苷 21.479 μg 的混合对照品加样母液。取半边莲标准汤剂(编号: BT14) 适量, 研细, 约 0.25 g, 精密称定, 置 9 个 25 mL 量瓶中, 平行 3 组, 每组 3 份, 采用加样回收法, 按对照品加入量与供试品待测成分的含量之比控制在 0.5:1、1:1、1.5:1 的比例分别加入上述对照品加样母液 0.5、1.0、1.5 mL, 再加 70% 甲醇定容至刻度, 按“2.5.3.2”项下方法制备供试品溶液 9 份。按“2.5.1”项下色谱条件测定, 计算地奥司明的平均加样回收率为 98.57%、蒙花苷的平均加样回收率为 96.58%, RSD 值分别为 1.22% 和 1.46%, 均小于 3.0%, 表明该方法准确性良好, 结果见表 4。

2.5.4.5 稳定性试验

精密吸取半边莲标准汤剂(编号: BT14) 供试品溶液, 按照“2.5.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、8、12 和 24 h 进样测定, 计算地奥司明和蒙花苷的色谱峰面积 RSD 值分别为 0.38% 和 0.27%, 均小于 3.0%, 表明供试品溶液稳定性良好。

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 quantity (g)	测得量 Measured quantity (mg)	加入量 Added quantity (mg)	已知量 Known quantity (mg)	回收率 Recovery rate (%)	均值 Average (%)	RSD (%)
地奥司明 Diosmin	1	0.250 4	0.077 9	0.026 4	0.051 8	98.86	98.57	1.22
	2	0.251 0	0.077 7	0.026 4	0.052 0	97.35		
	3	0.253 9	0.078 7	0.026 4	0.052 6	98.86		
	4	0.252 2	0.104 3	0.052 8	0.052 2	98.67		
	5	0.254 6	0.104 7	0.052 8	0.052 7	98.48		
	6	0.255 2	0.104 3	0.052 8	0.052 8	97.54		
	7	0.254 1	0.132 8	0.079 2	0.052 6	101.26		
	8	0.255 9	0.131 2	0.079 2	0.053 0	98.74		
	9	0.254 3	0.129 7	0.079 2	0.052 6	97.35		
蒙花苷 Linarin	1	0.250 4	0.031 4	0.010 7	0.021 0	97.20	96.58	1.46
	2	0.251 0	0.031 4	0.010 7	0.021 1	96.26		
	3	0.253 9	0.031 8	0.010 7	0.021 3	98.13		
	4	0.252 2	0.042 0	0.021 5	0.021 2	96.74		
	5	0.254 6	0.041 9	0.021 5	0.021 4	95.35		
	6	0.255 2	0.042 0	0.021 5	0.021 4	95.81		
	7	0.254 1	0.053 2	0.032 2	0.021 3	99.07		
	8	0.255 9	0.052 5	0.032 2	0.021 5	96.27		
	9	0.254 3	0.051 8	0.032 2	0.021 4	94.41		

2.5.5 样品测定和转移率计算结果

采用“2.5”项下含量测定方法对21批半边莲饮片和标准汤剂地奥司明和蒙花苷的含量进行测定,含量以干燥品计,并计算转移率,转移率=标准汤剂中有效成分的总量/饮片有效成分总量×100%,结果见表5。结果显示,21批半边莲饮片地奥司明的含量范围在1.97~6.55 mg/g,蒙花苷的

含量范围在0.28~0.96 mg/g,21批半边莲标准汤剂地奥司明的含量范围在0.15~0.54 mg/g,均值为0.27 mg/g;地奥司明的转移率范围在1.53%~4.99%,均值为2.77%;蒙花苷的含量范围在0.06~0.15 mg/g,均值为0.10 mg/g;转移率范围在4.27%~8.98%,均值为6.66%。

表5 地奥司明和蒙花苷的含量和转移率测定结果

Table 5 Determination results of contents and transfer rates of diosmin and linarin

序号 No.	地奥司明含量 Diosmin content (mg/g)		地奥司明 转移率 Diosmin transfer rate (%)	蒙花苷含量 Linarin content (mg/g)		蒙花苷 转移率 Linarin transfer rate (%)
	饮片 Decoction pieces	标准汤剂 Standard decoction		饮片 Decoction pieces	标准汤剂 Standard decoction	
1	2.64	0.17	2.96	0.35	0.07	8.84
2	3.56	0.15	2.00	0.43	0.07	7.10
3	3.05	0.23	3.32	0.35	0.06	7.60
4	2.64	0.20	3.04	0.49	0.09	7.28
5	2.26	0.19	4.04	0.50	0.09	8.54
6	2.76	0.18	2.83	0.67	0.14	8.98

续表 5 (Continued Tab. 5)

序号 No.	地奥司明含量 Diosmincontent (mg/g)		地奥司明 转移率 Diosmin transfer rate (%)	蒙花苷含量 Linarincontent (mg/g)		蒙花苷 转移率 Linarin transfer rate (%)
	饮片 Decoction pieces	标准汤剂 Standard decoction		饮片 Decoction pieces	标准汤剂 Standard decoction	
7	4.30	0.24	2.49	0.96	0.14	6.38
8	3.85	0.23	2.43	0.77	0.15	8.03
9	4.69	0.21	2.14	0.88	0.10	5.15
10	5.96	0.54	2.85	0.72	0.12	5.31
11	6.52	0.51	2.28	0.80	0.12	4.27
12	6.25	0.49	2.61	0.78	0.12	4.99
13	2.06	0.22	4.99	0.49	0.09	8.44
14	3.12	0.22	3.50	0.57	0.09	7.77
15	1.97	0.21	4.00	0.28	0.06	8.32
16	4.61	0.24	2.01	0.84	0.11	5.33
17	3.48	0.24	2.82	0.53	0.09	6.62
18	4.01	0.24	2.73	0.63	0.09	6.52
19	5.99	0.30	1.72	0.93	0.12	4.38
20	6.55	0.30	1.53	0.81	0.12	4.97
21	5.88	0.30	1.84	0.86	0.12	5.03
平均值 Mean	4.10	0.27	2.77	0.65	0.10	6.66
SD	1.55	0.11	0.85	0.21	0.03	1.57
均值的 70% ~ 130% 70% -130% of the mean	-	0.19 ~ 0.35	1.94 ~ 3.60	-	0.07 ~ 0.13	4.66 ~ 8.66
均值 ± 3 倍 SD Mean ± 3SD	-	-0.06 ~ 0.60	0.22 ~ 5.32	-	0.01 ~ 0.19	1.95 ~ 11.37

3 讨论与结论

半边莲质地较轻,在饮片煎煮过程中,大量成分溢出,增加了指纹图谱的建立难度,在指纹图谱的建立过程中,综合考虑图谱信息量、色谱峰响应和分离效果,考察了甲醇-0.1%磷酸溶液,乙腈-0.1%磷酸溶液和乙腈-0.1mol/L磷酸二氢钾溶液3种流动相系统,最终选择乙腈-0.1mol/L磷酸二氢钾溶液。采用全波长扫描模式,确定了指纹图谱最佳吸收波长,以“指纹图谱共有峰的总峰面积/称样量”为指标,优选出最佳的供试品溶液制备方法,所建立指纹图谱方法经系统方法学验证,均符合要求。2020年版《中国药典》一部“半边莲”项下无含量测定指标,参考《香港中药材标准》、Zeng等^[13]研究结果,建立有效成分地奥司明和蒙花苷的含量测定方法,从而指导标准汤剂的量值传递研究。产地调研显示,半边莲主产于贵州、安徽、江西、湖南、湖北、河南等地,以野生资源为主,为保证样品的代表性,我司

工作人员深入到半边莲主产地进行样品的搜集,以满足标准汤剂研究的需要。从标准汤剂的出膏率、浸出物和含量测定结果来看,21批半边莲标准汤剂出膏率、浸出物、地奥司明和蒙花苷的含量均存在一定的差异,出膏率和浸出物最大值是最小值的1.6倍左右,地奥司明和蒙花苷含量最大值是最小值的2~4倍。这种差异可能与药材的产地、采收时间和产地加工方式的不同有关。

2020年版《中国药典》半边莲药材项下并无含量测定指标,黄酮类化合物是半边莲中非常重要的一类化合物,是抗癌的主要活性成分,其中地奥司明为黄酮苷化合物,具有改善静脉通透性,改善微循环的作用^[14],蒙花苷与地奥司明结构非常相似,且在半边莲中含量较高,因此,药材和饮片采用地奥司明和蒙花苷为含量测定指标,具有一定的专属性和实际意义。但从转移率计算结果来看,地奥司明和蒙花苷从饮片到标准汤剂的转移率均小于10%,说明

其水溶性并不理想,从指纹图谱各共有峰的比例就能明显看出,地奥司明和蒙花苷色谱峰从饮片到标准汤剂,其在指纹图谱总峰面积中的占比明显下降。考虑到目前从半边莲指纹图谱指认出的其他成分缺乏已知含量的法定对照品,对水溶性较大成分的转移情况分析有待于进一步研究。根据 PCA 结果可知,从半边莲饮片到标准汤剂,共有峰的相对峰面积产生明显变化,OPLS-DA 共找到 5 个相对峰面积变化较为显著的色谱峰,分别为峰 9、峰 7、峰 5、峰 4 和峰 1,考虑与各共有峰所代表的化学成分的转移率差异有关。

本次研究,以标准汤剂的出膏率、浸出物、指纹图谱、有效成分的含量及转移率为考察指标,分析半边莲饮片到标准汤剂的量值传递过程,为半边莲配方颗粒及其相关制剂的质量标准的制定提供参考。

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: 122.
- 2 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.
- 3 Jiang XF, Wen YJ, Yuan ZH. Study on the extraction process and antibacterial activity of total flavonoids from *Lobelia chinensis* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27: 865-869.
- 4 Zhao PF, Ma YX, Zhang N, et al. Study on potence of *Lobelia* in treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking [J]. J North Chin Univ Sci Technol: Nat Sci (华北理工大学学报:自科版), 2023, 45: 109-118.
- 5 Wang XM, Wu FW, Li YR. Exploration of role and material basis of *Lobelia chinensis* Lour. in the treatment of cancer based on professor WANG San-Hu's "interweaved dryness and dampness caused carcinogenesis" theory [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med (广州中医药大学学报), 2022, 39: 171-176.
- 6 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.
- 7 Li QY, Zheng S, Gao QQ. Observation of Lobelia add vinegar to prevent phlebitis caused by mannitol effect [J]. J North Pharm (北方药学), 2015, 12: 99-100.
- 8 Zhang Q, Huo HX, Yao HN, et al. Quality standard of *Lobeliae Chinensis Herba* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 127-133.
- 9 Deng Z, Jing WG, Wang SH, et al. Discussion and research progress in standard decoction of medicinal slices [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 242-248.
- 10 Chen SL, Liu CX, Zhang TJ, et al. Ideas and suggestions on CMM decoction inheritance based on CMM quality markers and traditional usage [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 4519-4528.
- 11 Zhou WX, Liu T, Xu YL, et al. Discussion on part of the content of "technical requirements for quality control and standard formulation of traditional Chinese medicine formula granules" (Draft for Soliciting Opinions) [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2017, 28: 2491-2493.
- 12 Ministry of Health, State Administration of Traditional Chinese Medicine. Notice of the Ministry of Health and the National Administration of traditional Chinese medicine on printing and distributing the management standards of Chinese medicine decoction rooms in medical institutions [EB/OL]. (2009-03-27) [2022-06-18]. <http://www.satcm.gov.cn/yizhengsi/gongzuodongtai/2018-03-25/6577.html>.
- 13 Zeng HF, Jia L, Mai X, et al. Application of characteristic fingerprints combined with pattern recognition method in quality control of *Lobelia chinensis* Lour [J]. Phys Test Chem Anal Chem Anal (理化检验-化学分册), 2021, 57: 97-102.
- 14 Li YS. Research progress of pharmacological action and clinical application of diosmin [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2015, 27: 81-85.