

## 基于 HPLC 指纹图谱和多成分定量测定结合化学模式识别的断血流质量评价

王娜<sup>1</sup>, 韩玲玲<sup>2,3</sup>, 张亚中<sup>2,3</sup>, 刘军玲<sup>2,3\*</sup>

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012
2. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051
3. 国家药监局中药质量研究与评价重点实验室, 安徽 合肥 230051

**摘要:** 目的 建立断血流的 HPLC 指纹图谱与含量测定方法, 结合化学计量学分析断血流的质量。方法 采用 HPLC 法建立 15 批断血流药材的指纹图谱, 通过对照品比对, 指认共有峰, 并测定其中 4 种有效成分(木犀草苷、橙皮苷、槲皮素、醉鱼草皂苷 IVb) 的含量, 使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》、IBM SPSS Statistics 23 和 Simca 软件进行相似度评价、聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)及正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 对不同产地断血流的差异进行分析。结果 建立的 15 批断血流指纹图谱共匹配出 21 个共有峰, 通过与对照品比对, 指认出木犀草苷、橙皮苷、迷迭香酸、蒙花苷、槲皮素、醉鱼草皂苷 IVb 6 个色谱峰, 指纹图谱相似度为 0.660~1.000; 15 批次断血流药材中木犀草苷、橙皮苷、槲皮素、醉鱼草皂苷 IVb 的质量分数分别为 0.202 9~2.772 8、4.719 0~16.957 0、0.252 0~1.045 3、0.022 8~0.170 8mg/g; CA 分析将样品分为 3 类; PCA 提取出 1 个主成分; OPLS-DA 分析确定木犀草苷、槲皮素 2 个差异标志物。结论 建立的断血流 HPLC 指纹图谱与含量测定并结合化学计量学分析方法稳定可靠, 可用于断血流药材的质量评价。

**关键词:** 断血流; 高效液相色谱; 指纹图谱; 木犀草苷; 橙皮苷; 槲皮素; 醉鱼草皂苷 IVb; 含量测定; 化学计量学; 质量评价

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)17-6009-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.027

## Quality control method for *Clinopodii Herba* based on HPLC fingerprint and multi-component quantitative determination combined with chemical pattern recognition

WANG Na<sup>1</sup>, HANG Lingling<sup>2,3</sup>, ZHANG Yazhong<sup>2,3</sup>, LIU Junling<sup>2,3</sup>

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. Anhui Provincial Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China
3. Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicines of the State Food and Drug Administration, Hefei 230051, China

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint and content determination method for Duanxueliu (*Clinopodii Herba*), and to evaluate the quality of *Clinopodii Herba* through chemometric analysis. **Methods** HPLC was used to establish fingerprint spectra of 15 batches of *Clinopodii Herba*, identify common peaks by comparison with reference materials, and determine the content of four effective ingredients (luteolin-7-O-glucoside, hesperidin, quercetin, buddlejasaponins IVb). The similarity evaluation, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were performed using *traditional Chinese medicine fingerprints* (version 2012), IBM SPSS Statistics 23, and Simca software to analyze differences in *Clinopodii Herba* from different regions of origin. **Results** A total of 21 common peaks were matched in 15 batches of established *Clinopodii Herba* fingerprint spectra. Compared with the control sample, six

收稿日期: 2024-01-03

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划: 十大皖药断血流产业化关键技术与标准研制(202104h04020036)

作者简介: 王娜, 女, 硕士研究生, 主要从事中药质量标准规范化研究。E-mail: 1774706528@qq.com

\*通信作者: 刘军玲, 女, 硕士生导师, 安徽省食品药品检验研究院中药室主任, 主要研究方向为中药质量研究与成分分析。

chromatographic peaks were identified, including luteolin-7-*O*-glucoside, hesperidin, rosmarinic acid, buddleioside, quercetin, buddlejasaponins IVb. The similarity range of the fingerprint spectra was 0.660—1.000; The mass fractions of luteolin-7-*O*-glucoside, hesperidin, quercetin and buddlejasaponins IVb in 15 batches of *Clinopodii Herba* were 0.202 9—2.772 8, 4.719 0—16.957 0, 0.252 0—1.045 3, 0.022 8—0.170 8 mg/g, respectively; CA divides the samples into three categories; PCA extracts one principal component; OPLS-DA was used to determine two quality difference biomarkers, luteolin-7-*O*-glucoside and quercetin. **Conclusion** HPLC fingerprint and content determination established in this study, combined with chemometric analysis methods, are stable and reliable, and can be used for quality control research of *Clinopodii Herba*.

**Key words:** *Clinopodii Herba*; HPLC; fingerprint; luteolin-7-*O*-glucoside; hesperidin; quercetin; buddlejasaponins IVb; content determination; chemometrics; quality evaluation

断血流为唇形科植物灯笼草 *Clinopodium polycephalum* (Vaniot) C. Y. Wu et Hsuan 或风轮菜 *C. chinense* (Benth) O. Kuntze 的干燥地上部分。夏季开花前采收, 除去泥沙, 晒干。微苦、涩, 凉。归肝经<sup>[1]</sup>。具有止血<sup>[2]</sup>、抗炎抗菌<sup>[3]</sup>、降血糖<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>等药理作用, 临床可用于治疗崩漏、尿血、鼻衄、牙龈出血, 创伤出血<sup>[6-7]</sup>等病症。断血流的化学成分主要有皂苷类、黄酮类、挥发油和其他成分, 其中主要的活性成分是皂苷类成分和黄酮类成分, 醉鱼草皂苷 IVb (buddlejasaponins IVb) 是断血流中主要的止血成分<sup>[8]</sup>。另外, 断血流药材中黄酮类成分含量较高, 从该药材中分离得到的黄酮类化合物主要有香蜂草苷 (didymin)、柚皮素 (naringenin)、异樱花素 (isosakuranetin)、蒙花苷 (buddleioside)、芹菜素 (apigenin)、金合欢素 (acacetin)、迷迭香酸 (rosmarinic acid)、木犀草苷 (luteolin-7-*O*-glucoside)、橙皮苷 (hesperidin)、槲皮素 (quercetin) 等<sup>[9-12]</sup>。

《中国药典》2020年版一部虽收录了断血流, 但只有性状、鉴别及检查项等, 缺少含量测定指标<sup>[13]</sup>。醉鱼草皂苷IVb 作为断血流的专属有效成分, 研究较多, 但大多针对断血流片、断血流胶囊、断血流制剂、断血流口服液中的醉鱼草皂苷IVb 进行测定, 鲜有涉及断血流药材, 且相较于断血流片、断血流胶囊, 断血流药材中的醉鱼草皂苷IVb 含量较低, 在断血流药材中的占比也较低, 但含量低不代表活性低, 因此, 最大限度地将此专属成分从断血流药材中提取出来无疑具有重大意义。此外, 黄酮类成分在断血流药材中的含量较高, 后续有可能成为其质量控制指标之一。因此, 本研究针对收集到的 15 批不同产地的断血流药材建立其 HPLC<sup>[14-16]</sup>指纹图谱, 并测定醉鱼草皂苷IVb 及 3 种黄酮类成分(木犀草苷、橙皮苷、槲皮素) 的含量, 结合化学计量学分析不同产地断血流的成分差异, 评价不同产地

断血流的质量, 为完善断血流药材的质量标准提供依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪及所配备的二极管阵列检测器 (Dionex 公司); ML 型 204 万分之一电子天平 (Mettler 公司); XP26 型百万分之一电子分析天平 (Mettler 公司); A11 型分析研磨机 (IKA 公司); XMTD205 水浴锅 (常州国宇仪器制造有限公司); Simplicity-185 型超纯水仪 (Millipore 公司)。

### 1.2 药材

15 批断血流药材经安徽省食品药品检验研究院刘军玲主任中药师鉴定为唇形科植物灯笼草 *C. polycephalum* (Vaniot) C. Y. Wu et Hsuan 或风轮菜 *C. chinense* (Benth) O. Kuntze 的干燥地上部分。样品信息见表 1。

表 1 15 批断血流样品信息

Table 1 Information of 15 batches of *Clinopodii Herba*

编号	基原	产地	采集时间
S1	灯笼草	安徽霍山	2021-07-06
S2	灯笼草	安徽金寨	2021-07-22
S3	灯笼草	安徽	2019-10-15
S4	灯笼草	安徽金寨县毛河	未知
S5	灯笼草	安徽岳西县巍岭乡	未知
S6	灯笼草	湖北罗田	2021-07-28
S7	风轮菜	湖北英山县	未知
S8	风轮菜	湖北罗田	未知
S9	风轮菜	贵州省邵阳市新乡县	2023-08-27
S10	风轮菜	贵州铜仁	2023-08-10
S11	风轮菜	贵州黔东南施秉县	2023-08-27
S12	风轮菜	湖南新宁	2023-08-14
S13	风轮菜	湖南	2023-08-01
S14	风轮菜	湖南凤凰	2023-08-25
S15	风轮菜	河南	2021-07-24

### 1.3 试剂

对照品醉鱼草皂苷 IVb (批号 110782-200602)、橙皮苷 (批号 110721-201316, 质量分数  $\geq 95.3\%$ )、槲皮素 (批号 100081-201610, 质量分数  $\geq 99.1\%$ )、芦丁 (批号 100080-200707, 质量分数  $\geq 90.5\%$ )、木犀草苷 (批号 111720-201810, 质量分数  $\geq 93.5\%$ )、迷迭香酸 (批号 11871-201102, 质量分数  $\geq 99.8\%$ )、蒙花苷 (批号 111528-202112, 质量分数  $\geq 98\%$ )、芹菜素 (批号 111901-201102, 质量分数  $\geq 99.6\%$ )，以上对照品均购自中国食品药品检定研究院。

乙腈 (色谱纯)，购于美国 Fisher Scientific 公司；乙醇 (分析纯)，购于国药集团化学试剂有限公司；甲酸 (色谱纯)，购于上海麦克林生化科技有限公司；水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱，以乙腈 (A) -0.1% 甲酸水 (B) 为流动相，梯度洗脱 (0~10 min, 7%~15% A; 10~25 min, 15%~20% A; 25~35 min, 20%~23% A; 35~42 min, 23%~25% A; 42~60 min, 25%~35% A; 60~70 min, 35%~55% A; 70~80 min, 55%~95% A; 80~85 min, 95% A)，检测波长 250 nm，柱温 30 °C，体积流量 1.0 mL/min，进样量 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

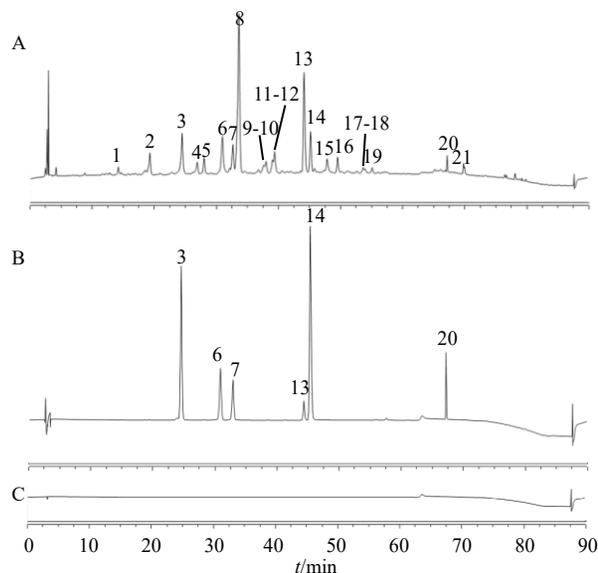
**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取木犀草苷、橙皮苷、迷迭香酸、蒙花苷、槲皮素、醉鱼草皂苷 IVb 的对照品适量，加甲醇溶解，配制质量浓度依次为 34.0、298.0、27.8、29.9、70.7、13.4 μg/mL 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取本品粗粉约 2 g，精密称定，置圆底烧瓶中，精密加入 75% 乙醇 50 mL，称定质量，水浴加热回流 1 h，放冷，用 75% 乙醇补足减少的质量，摇匀，滤过，即得。

**2.2.3 阴性对照溶液的制备** 取 75% 乙醇，作为阴性对照溶液。

### 2.3 指纹图谱方法学考察

**2.3.1 专属性试验** 取混合对照品溶液、供试品溶液 (S2) 和阴性对照溶液 (75% 乙醇溶液) 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果显示，在色谱图中各待测成分峰分离度良好，溶剂对色谱峰无影响，见图 1。



3-木犀草苷; 6-橙皮苷; 7-迷迭香酸; 13-蒙花苷; 14-槲皮素; 20-醉鱼草皂苷 IVb。

3-luteolin-7-O-glucoside; 6-hesperidin; 7-rosmarinic acid; 13-buddleioside; 14-quercetin; 20-buddlejasaponins IVb.

图 1 断血流供试品 (A)、混合对照品 (B) 阴性对照 (C) 溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of *Clinopodii Herba* test substance (A) mixed control substance (B) negative control substance (C) solvent

**2.3.2 精密度试验** 取断血流样品 (S2)，按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液，按“2.1”项色谱条件重复进样 6 次，记录色谱图，以槲皮素 (峰 14) 为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均  $< 1.5\%$ ，表明仪器精密度良好。

**2.3.3 重复性试验** 取断血流样品 (S2)，按照“2.2.2”项方法平行制备 6 份供试品溶液，按照“2.1”项色谱条件进样分析，记录色谱图，以槲皮素 (峰 14) 为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均  $< 1.0\%$ ，表明该方法重复性良好。

**2.3.4 稳定性试验** 取断血流样品 (S2)，按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液，按“2.1”项色谱条件于制备后的 0、4、8、12、24、48 h 进样，记录色谱图，以槲皮素 (峰 14) 为参照峰，计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积 RSD 均  $< 2.0\%$ ，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.4 指纹图谱的建立及分析

将所得的 15 批断血流指纹图谱依次导入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 版)”。以样品 S2 作为参照图谱，时间窗宽度设为 0.1，采用中位数法，利用多点校正法进行峰匹配，生成对照图

谱, 15批断血流色谱图与对照图谱的叠加图谱见图2。15批断血流指纹图谱标定21个共有峰, 通过与对照品比对, 指出3号峰为木犀草苷、6号峰为橙皮苷、7号峰为迷迭香酸、13号峰为蒙花苷、14号峰为槲皮素、20号峰为醉鱼草皂苷 IVb。15批断血流之间的相似度分别为 1.000、0.878、0.881、0.786、0.908、0.886、0.755、0.698、0.947、0.909、

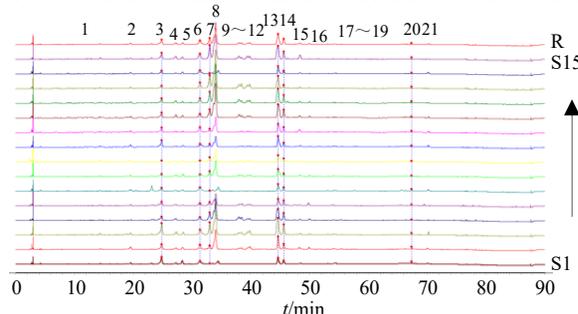


图2 15批断血流 HPLC 叠加图谱 (S1~S15) 及对照图谱(R)

Fig. 2 15 batches of *Clinopodii Herba* HPLC overlay chromatograms (S1—S15) and control chromatogram (R)

0.796、0.747、0.660、0.903、0.766, 平均相似度为 0.835。其中安徽产地的断血流相似度为 0.786~1.000, 平均相似度为 0.891; 湖北产地的断血流相似度为 0.698~0.886, 平均相似度为 0.780; 贵州产地的断血流相似度为 0.796~0.947, 平均相似度为 0.884; 湖南产地的断血流相似度为 0.660~0.903, 平均相似度为 0.770; 河南产地的断血流相似度为 0.766。评价结果显示, 不同产地样品的相似度存在一定差异, 因基原植物不同, 相同产地的样品也存在一定差异。

## 2.5 多指标成分含量测定

**2.5.1 线性关系考察** 精密称定木犀草苷、橙皮苷、槲皮素、醉鱼草皂苷 IVb 的对照品适量, 以甲醇配制成 6 个不同质量浓度的系列混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积。以对照品浓度为横坐标 ( $X$ ), 对照品峰面积为纵坐标 ( $Y$ ) 进行线性回归分析, 结果显示各组分在相应浓度范围内线性关系良好。线性回归方程、线性范围及相关系数见表 2。

表2 断血流中4种成分的线性回归结果

Table 2 Linear regression results of four components in *Clinopodii Herba*

成分	线性回归方程	$R^2$	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
木犀草苷	$Y=1532.1 X-1.882 0$	0.999 4	0.082 3~1.175 9
橙皮苷	$Y=23.056 X-0.034 9$	0.999 0	1.917 7~7.196 2
槲皮素	$Y=410.98 X+0.154 3$	0.999 7	0.099 3~0.439 5
醉鱼草皂苷 IVb	$Y=167.15 X-0.003 4$	0.999 5	0.009 1~0.071 6

**2.5.2 精密度试验** 精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果木犀草苷、橙皮苷、槲皮素、醉鱼草皂苷 IVb 峰面积的 RSD 分别为 0.129 0%、0.129 4%、0.133 1%、0.137 0%, 表明仪器精密度良好。

**2.5.3 重复性试验** 精密称取断血流样品粉末 6 份 (S2), 按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下平行进样分析, 结果木犀草苷、橙皮苷、槲皮素、醉鱼草皂苷 IVb 质量分数 RSD 分别为 0.015 1%、0.028 5%、0.032 4%、0.041 3%。

**2.5.4 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液 (S2), 在“2.1”项色谱条件下, 分别于 0、4、8、12、24、48 h 进样, 计算出含量, 结果木犀草苷、橙皮苷、槲皮素、醉鱼草皂苷 IVb 质量分数的 RSD

分别为 0.053 7%、0.100 3%、0.013 6%、0.229 6%, 样品稳定性良好。

**2.5.5 加样回收率试验** 精密称取已知成分含量的断血流样品 (S2) 1.0 g 置圆底烧瓶中, 平行 6 份, 按 1:1 比例加入各对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样分析, 计算得到木犀草苷、橙皮苷、槲皮素、醉鱼草皂苷 IVb 的平均加样回收率分别为 101.77%、102.12%、94.35%、88.95%, RSD 分别为 0.056 0%、0.059 8%、0.058 7%、0.050 2%, 表明加样回收率良好。

**2.5.6 样品含量测定** 取 15 批断血流药材粉末各约 2.0 g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算木犀草苷、橙皮苷、槲皮素、醉鱼草皂苷 IVb 4 个成分的含量。结果见表 3。

表3 样品含量测定结果  
Table 3 Results of content determination of samples

批号	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )				总和
	木犀草苷	橙皮苷	槲皮素	醉鱼草皂苷 IVb	
S1	1.751 5	7.894 0	0.383 8	0.169 0	10.198 3
S2	1.195 1	9.704 9	0.514 9	0.170 8	11.585 8
S3	2.772 8	16.957 0	1.045 3	0.126 0	20.901 1
S4	1.012 5	8.845 6	0.719 5	0.022 8	10.600 4
S5	1.049 5	4.719 0	0.507 9	0.136 1	6.412 5
S6	0.691 6	11.588 7	0.385 8	0.145 3	12.811 4
S7	0.556 8	6.188 1	0.252 0	0.026 2	7.023 0
S8	0.202 9	4.983 2	0.311 8	0.031 3	5.529 1
S9	1.631 9	11.059 2	0.413 1	0.083 5	13.187 7
S10	1.174 2	10.516 1	0.489 6	0.096 2	12.276 0
S11	1.220 2	8.204 9	0.778 3	0.051 3	10.254 7
S12	0.990 6	10.602 0	0.730 1	0.122 6	12.445 2
S13	0.654 6	13.104 1	0.307 5	0.148 2	14.214 5
S14	0.760 3	10.133 8	0.298 0	0.063 5	11.255 7
S15	1.428 1	14.070 9	0.750 5	0.153 7	16.403 2

2.6 化学模式识别分析

2.6.1 聚类分析 (cluster analysis, CA) 以 15 批断血流中 4 种化学成分的含量为变量, 以平方欧氏距离为测距, 运用 IBM SPSS Statistics 23 软件, 采用系统聚类法, 对 15 批断血流药材进行聚类分析, 结果见图 3。当平方欧氏距离为 10 时可分为 3 类, S1、S2、S4、S6、S9、S10、S11、S12、S14 聚为第 1 类, S5、S7、S8 聚为第 2 类, S3、S13、S15 聚为第 3 类, 根据聚类分析, 可看出 2 种基原的断血流无明显差异, 而不同产地的断血流药材具有一定差异, 相同产地不同批次的断血流药材亦有一定差异。

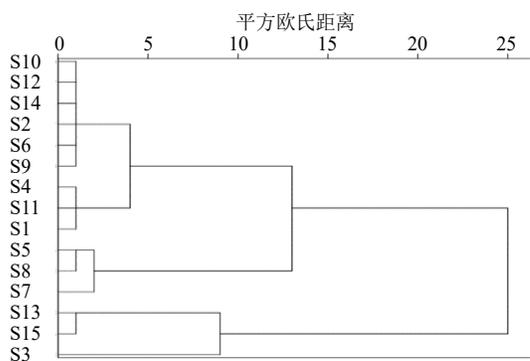


图 3 15 批断血流样品的 CA 图

Fig. 3 Cluster analysis of 15 batches of *Clinopodii Herba* samples

2.6.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 为进一步比较不同产地断血流间的质量差异, 将 15 批断血流 4 个有效成分含量导入 IBM SPSS Statistics 23 和 Simca 软件, 进行 PCA, 共有峰特征值见表 4。第 1 个主成分的初始特征值为 2.400, 累积方差贡献率达到 59.988%, 表明以上 1 个成分能够较好的代表指纹图谱中的大部分信息。PCA 得分图显示 15 批样品聚类效果不明显, 进一步说明断血流药材内部质量差异较大, 见图 4。

2.6.3 正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 将 15 批断血流 4 种有效成分含量数据导入到 Simca 软件进行 OPLS-DA, 以变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 值 > 1.0 为标准进行筛选, 结果见图 5, 表明共有 2 个特征峰的 VIP 值 > 1.0, 分别为峰 1 木犀草苷 (VIP = 1.319 0)、峰 5 槲皮素 (VIP = 1.127 8), 表明这 2 个成分是断血流不同产地批次样品间质量差异贡献较大的标志物, 可以用来区分不同产地、批次间断血流的质量差异。

3 讨论

3.1 色谱条件及处理方法的选择

本实验以断血流为研究对象, 对收集到的 15 批不同产地的断血流药材进行指纹图谱和多成分含量

表4 主成分特征值及方差贡献率

Table 4 Principal component eigenvalues and variance contribution rate

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差百分比/%	累积/%	总计	方差百分比/%	累积/%
1	2.400	59.988	59.988	2.400	59.988	59.988
2	0.911	22.779	82.767			
3	0.431	10.764	93.531			
4	0.259	6.469	100.000			

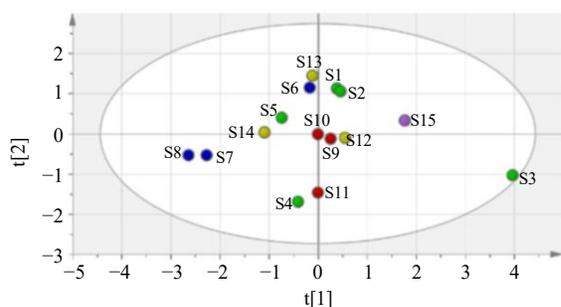


图4 15批断血流PCA得分图

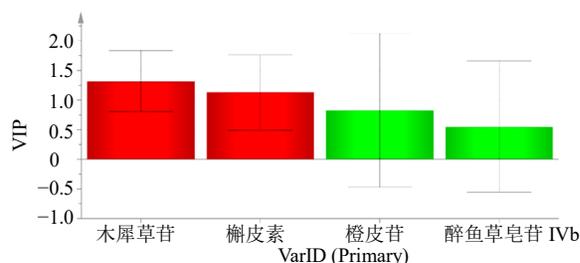
Fig. 4 PCA score chart of 15 batches of *Clinopodii Herba*

图5 15批断血流OPLS-DA模型VIP值图

Fig. 5 VIP value chart of 15 batches of *Clinopodii Herba*

测定,在实验操作过程中所用提取溶剂有25%乙醇、50%乙醇、75%乙醇、95%乙醇、50%甲醇、75%甲醇,提取方法有超声与加热回流,提取时间有30、60、90 min,发现75%乙醇回流60 min后提取的样品溶液色谱峰信息较准确完整、操作简单且高效节约,适用于断血流的定性及定量研究。在波长的选择上,断血流所含成分多,需要依据各类成分化学性质选择特定波长,本实验根据6种待测成分的吸收波长特点,分别考察了在250、282、330 nm波长下的检测效果。结果发现,在250 nm波长下木犀草苷、橙皮苷、槲皮素、醉鱼草皂苷IVb有最大吸收,迷迭香酸、蒙花苷在330 nm波长下有最大吸收,含量测定以醉鱼草皂苷IVb的最大吸收波长为主,故最终选择250 nm为测定波长。另外对流动相亦进

行了考察,有甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸、乙腈-0.05%甲酸等。结果表明,以乙腈-0.1%甲酸进行梯度洗脱获得的图谱峰形良好,基线分布稳定,可分别满足对断血流6种化合物图谱的分离要求。

### 3.2 指纹图谱结果分析

断血流的HPLC指纹图谱共确定21个共有峰,比对照品,指认了其中6个成分(木犀草苷、橙皮苷、迷迭香酸、蒙花苷、槲皮素、醉鱼草皂苷IVb),相似度为0.660~0.947,从指纹图谱平均相似度分析来看,呈现安徽>贵州>湖北>湖南>河南的趋势。通过相似度结果,可将安徽、贵州产地的断血流与湖北、湖南、河南产地的断血流进行区分,但通过指纹图谱相似度结果未能区分安徽与贵州产地的断血流及湖北、湖南与河南产地的断血流。在实际调研中发现断血流生长于山坡草丛和阴湿地,山坡也分为阳面和阴面,根据上述指纹图谱分析,断血流之间的差异可能跟具体生长环境关联度较大,后续可对生长环境与其质量的相关性进行继续研究。

### 3.3 含量测定及化学计量学分析

本研究通过化学模式识别法对15批断血流的质量进行综合评价,CA分析中S1、S2、S4、S6、S9、S10、S11、S12、S14聚为第1类,S5、S7、S8聚为第2类,S3、S13、S15聚为第3类,说明产地来源并不是决定聚类结果的唯一因素,不同产地批次的木犀草苷、橙皮苷、槲皮素、醉鱼草皂苷IVb 4种化学成分的含量范围浮动较大,这可能是导致此聚类结果的因素;PCA分析得到1个主成分,说明以上成分能够较好地代表指纹图谱中的大部分信息;OPLS-DA分析得到VIP值>1.0的色谱峰分别为1号峰木犀草苷,5号峰槲皮素,断血流指纹图谱中这2个色谱峰较易辨别,且研究表明2种成分均具有抗炎、抗肿瘤<sup>[17-18]</sup>等生物活性,说明选择2个成分作为断血流不同批次样品间质量差异贡献较

大的标志物是合理的。

断血流作为一种常用的大宗药材,亦是十大皖药之一,市场需求巨大,但整体质量控制尚显不足。本实验建立指纹图谱的同时进行含量测定,并采用化学计量学分析方法深入研究断血流,结果可为断血流建立多指标成分的质量标准提供可靠的依据。但本研究未能辨析断血流 31 min 洗脱出的显著峰,对断血流化学成分的指认存在不足之处,后期将采用色谱-质谱联用等方法进一步对未知成分进行鉴定,另外断血流含量范围浮动较大,根据目前实验资料,仍不能明确造成断血流样品差异较大的具体原因,需进一步研究,以期全面控制断血流的质量提供更为科学全面的依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 340.
- [2] 彭代银, 刘青云, 戴敏, 等. 荫风轮总苷止血作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 909-912.
- [3] 彭代银, 刘青云, 戴敏, 等. 荫风轮总苷抗炎镇痛作用研究 [J]. 安徽医药, 2005, 9(6): 413-415.
- [4] 王立英, 吴斐华, 马龙, 等. 芹菜素在风轮菜改善高糖所致血管内皮细胞损伤中的作用 [J]. 中草药, 2014, 45(20): 2946-2952.
- [5] 邢娜, 张海晶, 舒尊鹏, 等. 风轮菜总黄酮不同极性部位的抗氧化作用研究 [J]. 世界中医药, 2015, 10(8): 1169-1172.
- [6] 朱海琳, 孟兆青, 丁岗, 等. 断血流的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(9): 2002-2010.
- [7] 咎丽霞, 孙文基. 断血流的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 126-128.
- [8] 王圣男. 安徽特色中药断血流提取物(片)的有效成分研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2013.
- [9] 陈靖宇. 风轮菜属植物荫风轮和风轮菜的有效成分研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 1997.
- [10] 咎丽霞. 超声提取-分光光度法测定断血流总皂苷含量 [J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2007, 37(6): 1016-1018.
- [11] 年四辉, 刘丽敏, 廖启元, 等. 断血流及其制剂中总黄酮的含量测定研究 [J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(4): 37-38.
- [12] 王文通, 卢金清, 江汉美, 等. SD-HS-SPME-GC-MS 联用分析断血流挥发性成分 [J]. 中国药师, 2018, 21(11): 1958-1961.
- [13] 康宁, 高晓艳, 范庆龙, 等. HPLC 法测定断血流药材中断血流皂苷 A 的含量 [J]. 中国处方药, 2015, 13(5): 27-28.
- [14] 杨素德, 王伟, 李家春, 等. 苳蓉总苷胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 3955-3957.
- [15] 邓雯, 王慧玲, 彭丽华, 等. 淫羊藿破壁饮片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 今日药学, 2016, 26(5): 300-303.
- [16] 梁燕玲, 王慧玲, 彭丽华, 等. 灯盏细辛破壁饮片指纹图谱研究 [J]. 今日药学, 2017, 27(8): 532-536.
- [17] 管仁伟, 曲永胜, 顾正位, 等. 木犀草苷的药理作用研究 [J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(1): 1-3.
- [18] 廖永安, 吉燕华, 刘清华, 等. 槲皮素治疗急性肾损伤研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2024, 5: 1-19.

[责任编辑 时圣明]