

基于HPLC指纹图谱及多种指标成分含量的益母草质量评价

李士敏¹ 吕俊强² 吴迪² 徐美利² 程永科¹ 通讯作者

1.河北晨光药业有限公司

2.河北省营养健康食品技术创新中心

DOI:10.32629/bmtr.v8i3.20467

[摘要] 目的：建立益母草的指纹图谱，并对其中盐酸益母草碱、盐酸水苏碱进行含量测定以对不同产地益母草进行质量评价。方法：以乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)为流动相，流速1.0 mL/min，柱温25℃，检测波长280 nm，建立20批益母草的指纹图谱并分析相似度，使用SPSS软件进行聚类分析；采用HPLC法测定益母草中盐酸益母草碱、盐酸水苏碱含量。结果：建立了20批益母草的指纹图谱，共匹配出22个共有峰，样品的相似度为0.855~0.981。20批样品通过聚类分析被分为4类。样品中盐酸益母草碱、盐酸水苏碱含量分别为0.020%~0.240%、0.070%~1.575%。结论：不同产地益母草中盐酸水苏碱、盐酸益母草碱含量差异较大，本研究建立的指纹图谱测定方法准确度高、重复性好，能对不同产地益母草进行全面的全面的质量评价。

[关键词] 益母草；指纹图谱；聚类分析；含量测定；盐酸益母草碱；盐酸水苏碱

中图分类号：R284.1 文献标识码：A

Quality evaluation of Yimucao(Leonuri Herba) based on HPLC fingerprint and multiple indicator component contents

Shimin Li¹, Junqiang Lv², Di Wu², Meili Xu², Yongke Cheng¹ Corresponding Author

1. Hebei Chengguang Pharmaceutical Co., Ltd

2. Hebei Nutrition and Health Food Technology Innovation Center

[Abstract] Objective: Establishing the fingerprint of Yimucao(Leonuri Herba), and determine the contents of leonurine hydrochloride and stachydrine hydrochloride to conduct quality evaluation of Yimucao(Leonuri Herba) from different producing areas. Methods: With acetonitrile (A) - 0.1% formic acid solution (B) as the mobile phase, the flow rate of 1.0 mL/min, the column temperature of 25℃, and the detection wavelength of 280 nm, the fingerprints of 20 batches of Yimucao(Leonuri Herba) were established and their similarity was analyzed; cluster analysis was performed using SPSS software. The contents of leonurine hydrochloride and stachydrine hydrochloride in Yimucao(Leonuri Herba) were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Results: Fingerprints of 20 batches of Yimucao(Leonuri Herba) were established, with a total of 22 common peaks identified through matching. The similarity of the samples ranged from 0.855 to 0.981. Through cluster analysis, the 20 batches of samples were classified into 4 categories. The contents of leonurine hydrochloride and stachydrine hydrochloride in the samples were 0.020% ~ 0.240% and 0.070% ~ 1.575%. Conclusion: There are significant differences in the contents of stachydrine hydrochloride and leonurine hydrochloride in Yimucao(Leonuri Herba) from different producing areas. The fingerprint determination method established in this study has high accuracy and good repeatability, and can conduct comprehensive quality evaluation of Yimucao(Leonuri Herba) from different producing areas.

[Key words] Yimucao(Leonuri Herba); fingerprint; cluster analysis; content determination; leonurine hydrochloride; stachydrine hydrochloride

引言

益母草又称坤草、云母草、九重楼等^[1]，为唇形科植物

益母草 Yimucao(Leonuri Herba) Houtt. 的新鲜或干燥地上部分^[2]。益母草入药始见于《神农本草经》“茺蔚子”条目^[3]，

因其具有活血调经、利尿消肿、清热解毒的功效^[2]，临床常用于治疗月经不调、痛经闭经、恶露不尽、水肿尿少等妇科疾病^[3]，疗效确切，被称“经产良药”^[4]。据统计，我国有超700种中成药以益母草为原料，每年药材需求量在4万吨以上^[5]，品种涉及胶囊剂、片剂、颗粒剂、膏剂等多种剂型，临床应用价值极高。益母草属植物有20余种^[6]，主要分布于欧亚大陆，在我国各地均有种植，喜阴凉、湿润的环境，对土壤要求不高且多为野生^[7,8]。据报道，益母草中主要活性成分有生物碱类、黄酮类、二萜类、苯乙醇苷类等^[9]，不同的生长环境、采收季节都可直接导致益母草质量存在显著差异。药材发挥临床疗效是多种化学成分互相协同或拮抗共同作用的，现行标准只对盐酸水苏碱和盐酸益母草碱两种生物碱类成分进行含量控制，难以整体把控益母草药材的质量^[10]。HPLC指纹图谱技术能全面反映中药材的内在化学特性，具有“整体性”和“模糊性”特点，适用于评价不同产区药材中各化学组分差异^[11]。本文以HPLC对益母草进行指纹图谱研究，并结合聚类分析和定量分析，旨在全面评价不同产地益母草的质量差异，为益母草优势产区及优良品种的选育提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）、LC-2030plus 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；AUW-220D 型分析天平（日本岛津公司）；KQ-300DE 型数控超声波清洗机（昆山市超声仪器有限公司）；多功能粉碎机（德清拜杰厨卫科技有限公司）。

1.2 材料

盐酸益母草碱对照品（中国食品药品检定研究院）、盐酸水苏碱对照品（中国食品药品检定研究院）；色谱纯乙腈（Merck 股份有限公司）、色谱纯甲酸（天津市科密欧化学试剂有限公司）；水（屈臣氏）；分析纯冰醋酸（天津市凯通化学试剂有限公司）、分析纯乙醇（烟台远东精细化工有限公司）、分析纯辛烷磺酸钠（天津市光复科技发展有限公司）、分析纯磷酸（天津渤化化学试剂有限公司）。

益母草药材为各产地收集购买所得，均为统货，共20批，其中河南产区6批，编号YL01~YL06；山东产区4批，编号YL07~YL10；湖北产区3批，编号YL11~YL13；四川产区3批，编号YL14~YL16；辽宁产区2批，编号YL17~YL18；安徽产区2批，编号YL19~YL20）。

2 方法与结果

2.1 外观性状检验

本次采购益母草均为干益母草统货，已在采收时切段晒干，《中国药典》2025年版描述益母草“茎表面灰绿色或黄

绿色；叶片灰绿色，多皱缩、破碎，易脱落”，本次样品有13批表面为灰绿色，7批为黄绿色；有4批叶子占比较多，有3批已基本无叶。

2.2 水分检验

按照《中国药典》2020年版四部通则0832水分测定法的第二法烘干法对20批益母草进行水分检测，水分检测结果见表1。

2.3 浸出物检验

按照《中国药典》2020年版四部通则2201浸出物测定法中水溶性浸出物测定法项下的热浸法对20批益母草进行浸出物检测，浸出物检测结果见表1。

表1 20批益母草水分、浸出物测定结果

编号	产地	水分	浸出物
YL01	河南	9.1%	19.8%
YL02	河南	8.7%	16.8%
YL03	河南	8.9%	27.0%
YL04	河南	9.0%	30.2%
YL05	河南	9.3%	19.9%
YL06	河南	6.7%	21.1%
YL07	山东	7.7%	16.7%
YL08	山东	8.6%	13.0%
YL09	山东	8.7%	16.4%
YL10	山东	9.2%	19.2%
YL11	湖北	9.8%	16.0%
YL12	湖北	7.6%	10.5%
YL13	湖北	8.5%	15.3%
YL14	四川	10.0%	23.5%
YL15	四川	8.1%	22.3%
YL16	四川	8.3%	14.1%
YL17	辽宁	8.2%	18.3%
YL18	辽宁	7.7%	17.4%
YL19	安徽	8.3%	11.6%
YL20	安徽	8.8%	14.6%

2.4 含量检验

按照《中国药典》2020年版一部益母草项下含量测定方法进行对照品溶液制备及供试品溶液制备，并按照色谱条件对20批益母草进行盐酸水苏碱和盐酸益母草碱含量测定，含量测定结果见表2。

表2 20批益母草含量测定结果

编号	产地	盐酸益母草碱	盐酸水苏碱
YL01	河南	0.169%	0.904%
YL02	河南	0.124%	0.311%
YL03	河南	0.240%	1.010%
YL04	河南	0.189%	0.810%
YL05	河南	0.199%	0.840%
YL06	河南	0.152%	1.260%
YL07	山东	0.116%	0.493%
YL08	山东	0.057%	0.090%
YL09	山东	0.185%	0.710%

YL10	山东	0.095%	0.446%
YL11	湖北	0.134%	1.234%
YL12	湖北	0.044%	0.070%
YL13	湖北	0.057%	0.615%
YL14	四川	0.193%	1.575%
YL15	四川	0.053%	0.947%
YL16	四川	0.020%	0.288%
YL17	辽宁	0.105%	0.320%
YL18	辽宁	0.079%	0.351%
YL19	安徽	0.124%	0.773%
YL20	安徽	0.151%	0.927%

2.5 指纹图谱检验

2.5.1 色谱条件

使用 Kromasi 100-5-C18 (4.6×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) -0.1%甲酸溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0~5 min, 5% A~10% A; 5~20 min, 10% A~15% A; 20~35 min, 15% A~20% A; 35~65 min, 20% A; 65~65.1 min 20% A~5% A; 65.1~75 min, 5%A), 控制柱温 25℃, 流速 1.0 mL/min, 进样 10 μL, 检测波长 280 nm。

2.5.2 对照品溶液的制备

取盐酸益母草碱对照品适量, 精密称定, 加 50%甲醇制成每 1 ml 含 30 μg 的溶液, 即得。

2.5.3 供试品溶液的制备

取益母草粉末 (过三号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30 min (功率 250 w, 频率 40 kHz), 取出, 放冷, 用 50%甲醇补足重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.5.4 指纹图谱方法学验证

2.5.4.1 系统适用性试验

按 2.5.3 项下方法制备益母草样品溶液, 按 2.5.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 以盐酸益母草碱色谱峰为参照, 计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。检测数据表明各特征峰的相对保留时间 RSD 为 0.05%~0.52%, 相对峰面积 RSD 为 0.99%~1.48%, 即系统适用性良好。

2.5.4.2 重复性试验

取同一批益母草药材, 按 2.5.3 项下方法平行制备六份益母草样品溶液, 按 2.5.1 项下色谱条件进样测定, 计算各特征峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。检测数据表明各特征峰的相对保留时间 RSD 为 0.11%~1.03%, 相对峰面积 RSD 为 0.78%~2.06%, 即该方法重复性良好。

2.5.4.3 稳定性试验

取同一益母草样品溶液, 按 2.5.1 项下色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8、12、24、36、48 h 连续进样测定, 计算各特征峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。检测数据表明各特征峰的相对保留时间 RSD 为 0.10%~1.06%,

相对峰面积 RSD 为 0.74%~1.99%, 即供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.5.4.4 中间精密度

由两位实验人员在不同时间分别按 2.5.3 项下方法制备益母草样品溶液, 按 2.5.1 项下色谱条件, 使用不同型号液相色谱仪进样测定, 计算各特征峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。检测数据表明各特征峰的相对保留时间 RSD 为 0.90%~1.83%, 相对峰面积 RSD 为 1.21%~1.78%, 即该方法中间精密度良好。

2.5.5 共有特征峰标定

取 20 批益母草供试品溶液, 按 2.5.1 项下色谱条件进样测定, 导出色谱图数据, 并将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”, 使用中位数法生成指纹图谱及对照图谱, 共标记 22 个共有峰, 见图 1、图 2。

2.5.6 相似度分析

使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”将 20 批益母草样品的色谱峰与对照图谱进行自动匹配, 计算各样品对照图谱的相似度, 结果表明 20 批益母草指纹图谱相似度为 0.855~0.981, 不同来源样品间存在明显差异, 见表 3。

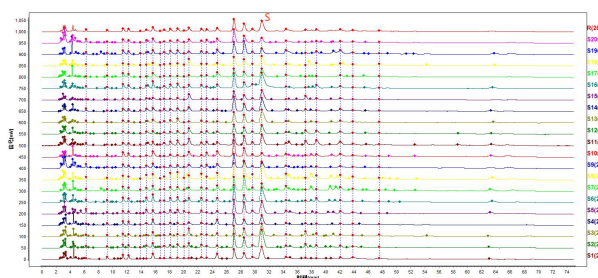


图 1 20 批益母草药材的 HPLC 指纹图谱 (S1-S20)

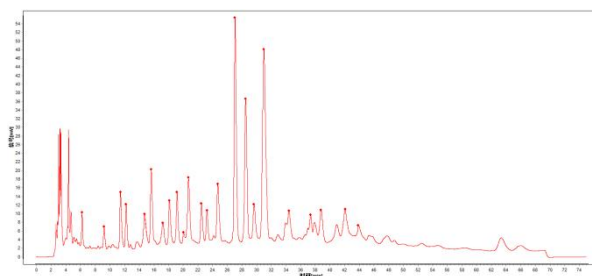


图 2 20 批益母草药材的 HPLC 对照图谱

表 3 20 批益母草指纹图谱相似度评价结果

样品编号	对应色谱编号	相似度	样品编号	对应色谱编号	相似度
YL01	S1	0.968	YL11	S6	0.972
YL02	S2	0.973	YL12	S7	0.897
YL03	S16	0.936	YL13	S15	0.960
YL04	S17	0.975	YL14	S8	0.978
YL05	S18	0.960	YL15	S9	0.936
YL06	S20	0.929	YL16	S10	0.855
YL07	S3	0.976	YL17	S11	0.968

YL08	S4	0.977	YL18	S12	0.977
YL09	S5	0.981	YL19	S13	0.959
YL10	S19	0.877	YL20	S14	0.982

2.5.7 聚类分析

在岛津色谱工作站中将指纹图谱中所有色谱峰进行积分,以20批益母草药材的峰面积作为变量,将数据导入IBM SPSS Statistics软件,运用组间对比法对20批益母草药材进行聚类分析,以平方欧式距离计算各样品的相似程度。20批益母草药材的聚类分析树状图见图3,样品可被分为4类:第1类为S2、S7、S10、S13、S17、S18,第2类为S8、S12、S16,第3类为S1、S3-S5、S9、S15、S19、S20,第4类为S6、S11、S14,聚类分析结果见表4。

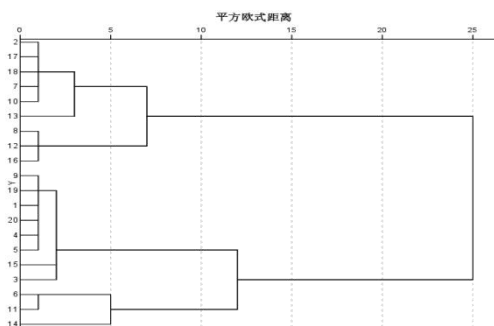


图3 20批益母草药材聚类分析柱状图

表4 20批益母草聚类分析结果

类别	样品编号	药材性状
第1类	YL02、YL12、YL16、YL19、YL04、YL05	色泽偏黄,质地硬脆易折,叶占比约10%,有少量花序
第2类	YL14、YL18、YL03	色泽干黄,质地硬脆易折,花序占比大
第3类	YL01、YL07、YL08、YL09、YL15、YL13、YL10、YL06	色泽黄绿,质地较有韧性,叶占比15%-20%,基本无花序
第4类	YL11、YL17、YL20	色泽嫩绿、质地富有韧性,叶占比约35%,基本无花序

3 讨论

3.1 外观检验结果分析

不同采收期、不同生长环境的益母草长势悬殊,表皮颜色差异大^[12],且随着采收季节不同及产地初加工方式问题,部分益母草的叶子已基本落光,造成不同产地益母草外观差异明显。叶片为益母草的主要营养器官,童年期和营养期的益母草因叶子茂盛,活性成分含量高。《中国药典》规定益母草在花前期或茎叶茂盛的花初开期进行采割,此时生物碱含量最高,之后随着益母草生长,生物碱含量逐渐下降^[13,14]。本研究对不同产地的20批益母草进行了茎、叶占比检测,茎、叶内两种生物碱成分的含量检测,结果表明叶内生物碱

含量可比茎内高2倍以上,叶子重量占比更高的益母草总生物碱含量更高,颜色偏绿比偏黄的茎内含量更高,20批益母草的外观比对与含量检验、聚类分析的结果趋势基本一致,可为筛选综合质量更高的益母草药材提供参考。

3.2 水分、浸出物检验结果

《中国药典》规定益母草在采割后需晒干,本研究20批益母草药材水分均符合不得过13%的标准,且无显著差异。浸出物是药材质量控制的基础指标,可用低成本快速、简单地反映出药材中可溶性成分的总体水平,有效进行药材的真伪鉴别及质量稳定性评价。《中国药典》规定益母草浸出物不得少于15%,本研究有5批样品浸出物不合格,进一步分析5批样品中也存在生物碱含量不合格或偏低的情况。益母草发挥药理作用的成分中包含多种水溶性成分如生物碱、黄酮,水溶性浸出物的检测结果可初步评估益母草药材质量水平,如要更全面地评价及保障药材质量还需与指标成分定量、指纹图谱等方法联合使用。

3.3 含量检验结果分析

盐酸益母草碱为益母草中的特有成分,具有抗血小板凝聚、抑制血管平滑肌对缩血管物质的收缩反应等药理作用,是益母草发挥活血调经功效的重要成分^[15]。盐酸水苏碱是多种益母草制剂、益母草配方颗粒中的质控指标成分,研究表明其具有调节血管张力、抑制血小板聚集和抗氧化等作用,有助于益母草发挥保护心血管健康的功效^[16]。历版《中国药典》均将盐酸水苏碱和盐酸益母草碱的含量作为评价益母草质量的重要指标,其标准规定盐酸水苏碱含量不低于0.5%,盐酸益母草碱含量不低于0.05%。本研究分析发现,不同产地或相同产地不同批次益母草间含量参差不齐,高低之间差异可高达二十倍,同时20批样品中盐酸益母草碱含量合格率90%,盐酸水苏碱含量合格率仅60%。药材质量是保证药品临床有效性的基础,造成药材质量良莠不齐的原因一方面来源于地域气候、光照、水分、土质、采割季节、种植方式的不同^[17],一方面也来源于生产管理不规范、种子型号差异,同时市场价格竞争激烈也可能导致药材未生长到最佳的年份,使得越来越多不符合质量标准的中药材流入市场。

3.4 指纹图谱检验结果分析

相较于传统的鉴别定性、色谱定量等检测方法,指纹图谱技术由于其整体性在中药材及中药制剂的真实性、优良性、稳定性评价方面应用愈加广泛^[18]。盐酸益母草碱为益母草中的特有性生物碱成分,性质稳定,在指纹图谱中色谱峰保留时间居中、分离度好且响应值较大,故本研究选择盐酸益母草碱作为参照峰^[19]。研究建立了20批益母草的指纹图谱,其中17批药材相似度>0.9,表明大部分益母草的化学成分组成基本相同,整体质量具有较好的一致性。其中S10、S13、

S16 三批样品指纹图谱相似度 <0.90 , 但 >0.85 , 表明三批药材与其他药材整体化学成分有较明显差异, 这一结果与含量检验和聚类分析、外观分析间可相互联系, 原因可能与其采收期、产地环境或生长年限有关。

3.5 聚类分析

聚类分析侧重于找出样品之间的共性, 可基于样本所表现的变量特征, 将性质相近的事物归在同一类, 而将性质差别比较大的事物归在不同类, 该方法在中药材的质量研究中有着重要作用^[20,21]。本研究将 20 批益母草样本分为 4 类, 2 种生物碱类成分含量第 4 类 $>$ 第 3 类 $>$ 第 1 类 $>$ 第 2 类。益母草的采收时间、药用部位等因素都会影响其中活性成分的含量。结合 4 类样本各自的外观表征, 可外观色泽偏绿、质地韧性强、叶占比较多的益母草整体质量较高。

综合以上内容, 益母草作为临床常用中药材, 其含有的化学成分多样, 体内作用靶点复杂, 仅依靠现有法定标准难以对市场流通药材的真伪优劣进行全面、有效的评价。本研究建立了益母草的 HPLC 指纹图谱检测方法, 所建方法准确度高、稳定性好, 可用于益母草药材的整体质量评价。采用建立的方法进行分析确定了 6 个产地的 20 批益母草有 22 个共有峰, 但相似度存在差异。通过性状分析、含量分析、指纹图谱相似度分析、聚类分析, 表明不同产地的益母草质量存在显著差异, 也反映了目前中药材市场中存在益母草质量良莠不齐的情况。对不同产地的益母草质量进行评价, 发现不同产地药材质量具有相似性, 但外观、浸出物、主要成分含量等存在差异, 为益母草药材的产地选择及临床使用提供了思路和参考。

[参考文献]

- [1] 蔡晓东, 司徒杰. 产地及采收期对益母草中有效成分含量的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(1): 129-131.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2025 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2025: 311.
- [3] 李艳, 苗明三. 益母草药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(5): 102-106.
- [4] 罗毅, 刘红燕, 周本宏, 等. 益母草毒性研究[J]. 吉林中医药, 2018, 38(9): 1082-1086.
- [5] 周瑜城, 宋文明, 陈科宇, 等. 益母草生物碱的研究进展[J]. 浙江农业科学, 2023, 64(5): 1230-1235.
- [6] 卜兰, 刘菲, 熊亮, 等. 益母草属萜类化学成分及其药理作用研究进展[J]. 世界中医药, 2020, 15(9): 1237-1246.

[7] 崔洪文. 保健野菜——益母草的科学栽培[J]. 农家科技, 2011(10): 46.

[8] 李品汉. 益母草栽培技术[J]. 农技服务, 2003(12): 19-20.

[9] 李天爱, 王一硕, 王颖, 等. 益母草化学成分、药理作用研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(4): 230-247+273.

[10] 孙晨, 谢浙裕, 吴永江. 益母草 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法研究[J]. 药科学报, 2019, 54(11): 2059-2063.

[11] 柳阳, 杨艳芳, 黄超, 洪宗超, 段雪云, 陈树和. 基于 HPLC 指纹图谱和数学判别模式的丹参道地性研究[J]. 中国药师, 2019, 22(6): 1006-1010.

[12] 刘燎原, 程钰洁, 张正, 等. 基于指纹图谱和盐酸水苏碱、盐酸益母草碱含量测定的鲜益母草质量评价[J]. 药物评价研究, 2024, 47(12): 2830-2843.

[13] 朱启亮, 黄玉梅, 高明, 等. 不同产地、部位和采收期益母草中药效成分研究[J]. 中药材, 2017, 40(12): 2828-2831.

[14] 郭巧技, 谢耀轩, 罗婧, 等. 不同采收阶段益母草的质量评价[J]. 天津药学, 2016, 28(4): 4-6.

[15] 乔晶晶, 吴啟南, 薛敏, 等. 益母草化学成分与药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(23): 5691-5704.

[16] 覃黄辉, 李兰玉. 益母草成分水苏碱在疾病中的应用研究进展[J]. 中医临床研究, 2025, 17(11): 134-142.

[17] 邵璐彬, 徐建中, 罗页思, 等. 不同产地益母草种质 HPLC 指纹图谱分析[J]. 浙江中西医结合杂志, 2019, 29(8): 691-694.

[18] 李宝辉, 李冬晖, 薛党党, 等. 中药益母草的化学指纹图谱及多组分定量分析方法的建立及应用研究[J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(3): 336-340.

[19] 朱子聪, 边雨, 高陆, 宋德库, 佟志军. 益母草颗粒 HPLC 指纹图谱及 4 个指标成分含量研究[J]. 中国药房, 2022, 33(5): 86-91.

[20] 李新蕊. 主成分分析、因子分析、聚类分析的比较与应用[J]. 山东教育学院学报, 2007(6): 23-26.

[21] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.

作者简介:

李士敏 (1993-), 女, 汉族, 河北省沧州市, 硕士研究生, 河北晨光药业有限公司, 工程师, 研究方向为药品开发。

基金项目:

邯郸市科技专项计划项目 (23111053104)。