

UPLC/Q-TOF-MS特征图谱结合化学计量学评价秋海棠属5种药材质量

郑丽慧¹, 夏俊锋², 黄蕾³, 胡敏¹, 肖凌¹, 汪波¹, 徐玲^{1*} (1. 湖北省药品监督检验研究院, 国家药品监督管理局中药质量控制重点实验室, 湖北省药品质量检测与控制工程技术研究中心, 武汉 430075; 2. 仙桃市公共检验检测中心, 仙桃 433000; 3. 武汉市第一医院, 武汉 430022)

摘要 目的: 采用UPLC/Q-TOF-MS技术结合化学计量学方法综合评价秋海棠、中华秋海棠、掌裂叶秋海棠、长柄秋海棠和柔毛秋海棠的质量。方法: 采用ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%甲酸为流动相进行梯度洗脱, 柱温30 °C, 流速0.2 mL · min⁻¹, 检测波长254 nm; 采用电喷雾离子源 (ESI) 正负离子同时扫描, 以MSE方式进行采集, 建立秋海棠属5种药材UPLC/Q-TOF-MS特征图谱, 并对它们各自共有峰进行确认和归属, 运用主成分分析法 (PCA) 和偏最小二乘判别分析法 (PLS-DA) 对数据进行统计分析。结果: 筛选出秋海棠、中华秋海棠、掌裂叶秋海棠、长柄秋海棠和柔毛秋海棠药材各自的共有特征峰分别为15、13、12、12、15个, 且共鉴定出29个化合物; 秋海棠属5种药材质量存在较大差异, 其中, 柔毛秋海棠与其他4种药材的化学成分差异显著, 秋海棠与中华秋海棠药材之间化学成分差异较小, 掌裂叶秋海棠与长柄秋海棠药材之间化学成分差异较小; 还筛选出对该5种药材区分贡献显著的8个化学标志物, 原花青素B2、表儿茶素、葫芦素D或其同分异构体、葫芦素D葡萄糖苷和葫芦素B为潜在鉴别特征性化学标志物, 原花青素B1、儿茶素和芦丁为潜在含量差异性化学标志物。结论: 该方法直观、准确地反映了此5种药材的整体质量及化学成分差异情况, 并对于建立科学、合理的秋海棠属药材质量评价方法和安全用药具有重要的指导意义, 也为其整体质量评价和控制及标准修订提供参考。

关键词: 秋海棠属药材; UPLC/Q-TOF-MS特征图谱; 共有特征峰; 主成分分析; 偏最小二乘判别分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)04-0439-013

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.04.009

Quality Evaluation of Five Species of *Begonia* Medicinal Materials Based on Combinative Methods of UPLC/Q-TOF-MS Specific Chromatogram and Chemometrics

Zheng Lihui¹, Xia Junfeng², Huang Lei³, Hu Min¹, Xiao Ling¹, Wang Bo¹, Xu Ling^{1*} (1. Hubei Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Control of Chinese Medicine Hubei Engineering Research Center for Drug Quality Control, Wuhan 430075, China; 2. Public Inspection and Testing Center of Xiantao, Xiantao 433000, China; 3. Wuhan Integrated TCM & Western Medicine Hospital, Wuhan 430022, China)

Abstract Objective: To evaluate comprehensively the quality of *Begonia evasiana*, *Begonia sinensis*, *Begonia pedatifida*, *Begonia smithiana* and *Begonia henryi* by using UPLC-Q-TOF-MS technology combined with

chemometric. **Methods:** Chromatographic separations were conducted on a ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) with acetonitrile-0.1% aqueous formic acid as mobile phase by gradient elution. The column temperature was 30 °C, the flow rate was 0.2 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 254 nm. The positive and negative ions were scanned simultaneously by the electric spray ion source (ESI), and collected in MSE mode. The UPLC/Q-TOF-MS characteristic maps of five kinds of *Begonia* medicinal materials were established, their common peaks were confirmed and assigned, principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used to analyze the data statistically. **Results:** The common characteristic peaks were 15, 13, 12, 12 and 15 for *Begonia evasiana*, *Begonia sinensis*, *Begonia pedatifida*, *Begonia smithiana* and *Begonia henryi*, respectively, and a total of 29 compounds were identified. There were significant differences in the quality of the five medicinal herbs of the genus *Begonia*, among which the chemical composition differences between the *Begonia henryi* and the other four medicinal herbs were significant. The chemical composition differences between the *Begonia evasiana* and *Begonia sinensis* were relatively small, and the chemical composition differences between the *Begonia pedatifida* and *Begonia smithiana* were relatively small. 8 chemical markers that contributed significantly to the differentiation of the five medicinal materials were also screened, including proanthocyanidin B2, epicatechin, cucurbitacin D or its isomers, cucurbitacin D glucoside, and cucurbitacin B as potential identification characteristic chemical markers, while proanthocyanidin B1, catechins, and rutin were potential content differential chemical markers. **Conclusion:** The method directly and accurately reflects the overall quality and chemical composition differences of these five medicinal materials, and has important guiding significance for establishing scientific and reasonable quality evaluation methods and safe drug use of the genus *Begonia* medicinal materials, and also provides references for the overall quality evaluation and control and standard revision of *Begonia*.

Keywords: *Begonia* medicinal materials; UPLC/Q-TOF-MS specific chromatogram; common chromatographic peaks; principle component analysis; partial least squares discriminant analysis (PLS-DA)

秋海棠属 (*Begonia*) 药材秋海棠 (*Begonia evasiana* Andr.)、中华秋海棠 (*Begonia sinensis* A.DC.)、掌裂叶秋海棠 (*Begonia pedatifida* Levl.)、长柄秋海棠 (*Begonia smithiana* Yii ex Irmsch.) 和柔毛秋海棠 (*Begonia henryi* Hemsl.) 等隶属秋海棠科 (*Begoniaceae*), 为多年生草本植物。该属植物具有较高的药用价值和观赏价值^[1-2]。其药用价值始载于公元1765年的《本草纲目拾遗》^[3], 历史悠久, 疗效确切。该属药材多以根茎入药, 少数以全草入药, 具有活血散瘀、调经止痛、清热消肿、凉血止血等功能。在民间10多个少数民族中被广泛用来治疗跌打损伤、月经不调、咽喉肿痛、痈疔肿毒、吐血、痢疾、胃溃疡和蛇毒咬伤等病症^[4-13]。

秋海棠属药材由于品种繁多、外形相似, 存在同物异名、同名异物现象, 导致该属药用植物常被混用、误用。而仅依赖形态鉴别难以对秋海

棠属药材的品种资源及其品质进行有效的评价和控制。目前, 关于秋海棠属药材的研究主要集中在化合物提取分离、纯化、鉴定及提取物的药理作用、生药学鉴别、DNA条形码鉴定和含量测定等方面^[14-26], 有关秋海棠属药材的特征图谱研究甚少, 仅有盾叶秋海棠指纹图谱的报道^[27], 且缺乏对秋海棠属药材整体化学成分的研究和报道。本研究建立秋海棠属5种药材秋海棠、中华秋海棠、掌裂叶秋海棠、长柄秋海棠和柔毛秋海棠的UPLC特征图谱, 全面反映该5种药材整体质量和化学成分差异情况, 发现各自潜在的化学标志物, 明确各自的质量控制点, 以期为秋海棠、中华秋海棠、掌裂叶秋海棠、长柄秋海棠和柔毛秋海棠药材的鉴别和质量控制提供参考依据。基于本研究奠定的基础和后面的持续研究, 中华秋海棠和掌裂叶秋海棠药材的质量标准均已被《湖北省中药材质量标准》2018年版所收载^[28]。

1 材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY UPLC Xevo G2Q-Tof 液质联用色谱仪 (Waters公司); Thermo Scientific Orbitrap Elite轨道离子阱质谱仪 (Thermo公司); CLF-40型密封型手提式粉碎机 (浙江温岭市创力药材器械厂); XS204电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司, 万分之一); XP205电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司, 十万分之一); DIF-6020型真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); LC-350 A型超声波仪 (济宁中区鲁超仪器公司); Synergy UV 超纯水机 (Millipore

公司)。

1.2 药材与试剂

对照品原儿茶酸(批号110809-200503)、原儿茶醛 (批号110801-200506)、儿茶素 (批号877-200001)、表儿茶素 (批号878-200102)、芦丁 (批号100080-200306) 均购自中国食品药品检定研究院, 原花青素B1 (批号21031017)、原花青素B2 (批号20131224) 和葫芦素B (批号B10498) 购自上海土蜂生物有限公司。

秋海棠、中华秋海棠、掌裂叶秋海棠、长柄秋海棠和柔毛秋海棠的根茎, 原植物均经中南民族大学万定荣教授鉴定, 各批次样品信息见表1。

表 1 样品信息表

物种名	拉丁名	批号	产地	采集时间
秋海棠	<i>Begonia.grandis</i> .Andr	1	湖北宜昌长阳	2012-10-04
		2	湖北宜昌长阳	2013-10-03
		3	湖北宜昌长阳	2014-10-19
		4	湖北恩施星斗山	2015-07-25
		5	江西九江庐山	2015-08-31
中华秋海棠	<i>Begonia.sinensis</i> A.DC.	6	湖北钟祥客店镇	2012-11-21
		7	湖北钟祥客店镇	2013-11-21
		8	湖北钟祥客店镇	2014-10-27
		9	湖北咸宁丁泗桥	2014-11-02
		10	江西九江庐山	2015-08-31
掌裂叶秋海棠	<i>Begonia.pedatifida</i> Levl.	11	湖北神农架木鱼	2012-10-28
		12	湖北神农架木鱼	2013-08-10
		13	恩施利川付宝山	2014-06-23
		14	湖北宜昌长阳	2015-08-02
长柄秋海棠	<i>Begonia.smithiana</i> Yii ex Irmsh.	15	湖北恩施毛坝	2014-10-18
		16	湖北恩施毛坝	2015-07-24
		17	湖北恩施毛坝	2015-07-25
柔毛秋海棠	<i>Begonia.henryi</i> Hemsl.	18	湖北宜昌三斗坪	2015-08-01
		19	湖北宜昌雾渡河	2015-08-20
		20	湖北宜昌南津关	2015-09-27

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

采用ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈(A)-0.1% 甲酸(B), 梯度洗脱 (0~15 min, 5%A→10%A; 15~35 min, 10%A→14%A; 35~40 min, 14%A→16%A; 40~44 min, 16%A→19%A; 44~58 min, 19%A→30%A; 58~68 min, 30%A→52%A; 68~74 min, 52%A→72%A; 74~84 min, 72%A→80%A; 84~86 min, 80%A→90%A; 86~90 min, 90%A→95%A); 流速: 0.2 mL · min⁻¹, 检测波长: 254 nm, 柱温: 30 °C, 进样量: 2 μL。

2.1.2 质谱条件

Q-TOF-MS: ESI (+/-) 正负离子模式, 锥孔电压40 V, 毛细管电压2600 V, 离子源温度100 °C, 脱溶剂气温度350 °C, 脱溶剂气流速600 L · h⁻¹; 采集: 采集方式MSE, 采集时间 103 min; 质量扫描范围50~1200; 碰撞能量: 低能量4 V, 梯度高能20~30 V; 碰撞气体: 高纯氦气。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液

精密称取原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、芦丁、原花青素B1、原花青素B2、葫芦素B对照品依次为12.33、7.66、7.63、6.32、1.41、1.28、1.70 mg, 分别置于10 mL量瓶中, 加甲醇超声溶解, 定容, 置于4 °C冰箱中保存, 即得各化合物的对照品储备溶液。

精密量取上述对照品储备溶液各3 mL置于同一25 mL量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液

精密称取已干燥的秋海棠、中华秋海棠、掌裂叶秋海棠、长柄秋海棠和柔毛秋海棠5种药材的根茎粉末(过4号筛)各5.0 g, 分别置于具塞锥形瓶中, 精密加入90%甲醇150 mL, 密塞, 称量, 回流提取30 min, 放冷, 再称量, 用90%甲醇补足缺失的量, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液25 mL, 水浴蒸干, 残渣加90%甲醇溶解, 定容至5 mL, 置于

4 °C冰箱中保存, 使用前摇匀, 并用0.22 μm微孔滤膜过滤, 即得各药材的供试品溶液。

2.3 方法学考察

用秋海棠根茎粉末(S1)进行特征图谱方法学考察, 将 $t_r=36.2$ min的芦丁峰作为参照峰S, 将其保留时间记为1, 计算UPLC色谱图中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

2.3.1 精密度试验

取样品1份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 连续测定6次, 记录峰面积, 计算RSD, 结果各共有色谱峰的保留时间的RSD均小于0.5%, 峰面积的RSD均小于3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验

取“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别在0、3、6、9、12、24 h进样测定, 结果各共有峰的相对保留时间的RSD均小于0.8%, 相对峰面积的RSD均小于1.5%, 符合色谱特征图谱研究的技术要求。

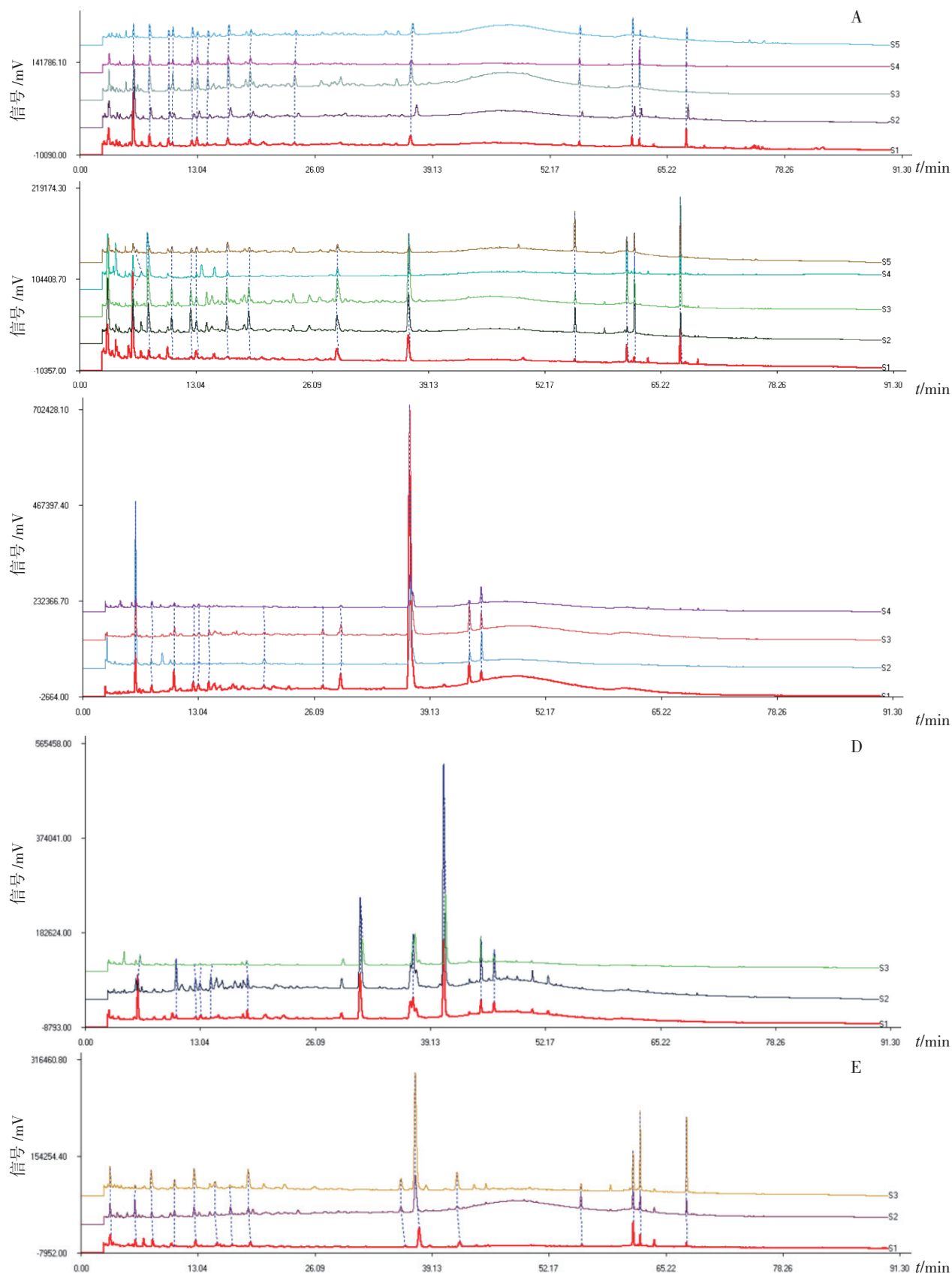
2.3.3 重复性试验

取同一批次样品6份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 结果各共有峰的相对保留时间的RSD均小于0.3%, 相对峰面积的RSD均小于2.3%, 符合色谱特征图谱研究的技术要求。

2.4 特征图谱的建立及共有峰的鉴定

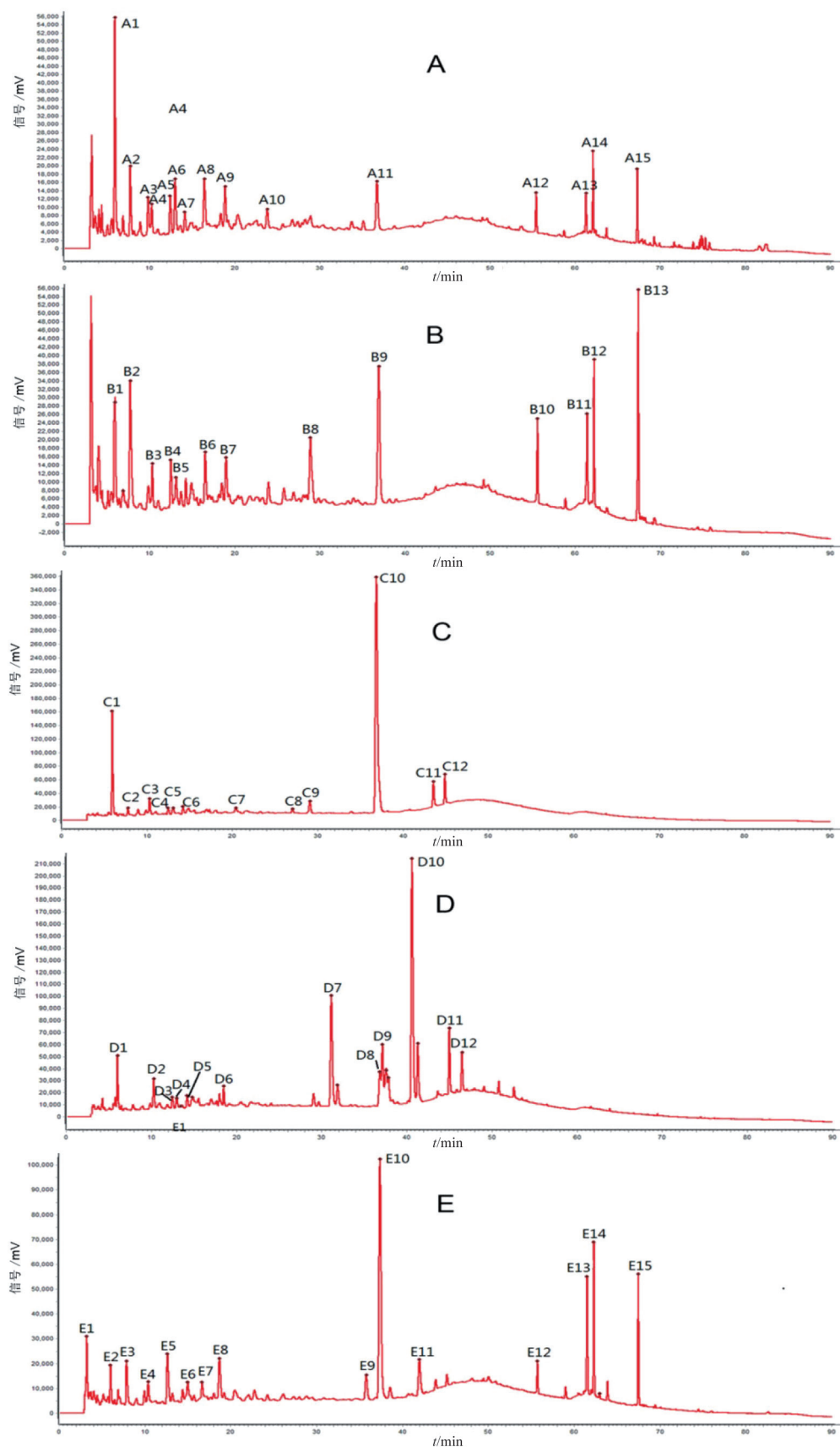
将20批次秋海棠属5种药材样品按照“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 得到该5种药材各自的UPLC特征图谱叠加图(图1), 并得到该5种药材各自的对照特征图谱(图2)。筛选出共有特征峰: 秋海棠15个、中华秋海棠13个、掌裂叶秋海棠12个、长柄秋海棠12个、柔毛秋海棠15个, 其峰面积占总峰面积的90%以上, 具有一定的代表性。

并对该5种药材各自共有特征峰进行鉴定, 共鉴定出化合物29个, 详见表2。包括有机酸类3个、黄酮及黄酮苷类21个和三萜及三萜皂苷类5个。其中原儿茶酸、原花青素B1、儿茶素、原花青素B2、表儿茶素、芦丁和葫芦素B是通过与对照品保留时间、正负离子一级二级碎片裂解信息比对后进行鉴定, 其他共有特征峰的化合物均是依据参考文献和分析它们的裂解规律推导出来^[18-21]。



A. 秋海棠; B. 中华秋海棠; C. 掌裂叶秋海棠; D. 长柄秋海棠; E. 柔毛秋海棠。

图1 秋海棠属5种药材UPLC特征图谱



A. 秋海棠; B. 中华秋海棠; C. 掌裂叶秋海棠; D. 长柄秋海棠; E. 柔毛秋海棠。

图 2 秋海棠属 5 种药材 UPLC 对照特征图谱

表2 秋海棠属5种药材共有特征峰质谱信息

序号	保留时间 / min	分子离子峰 (m/z)	二级碎片离子 (m/z)	化合物归属	峰号
1	3.22	210.0760[M+H] ⁺	MS2: 192.0656, 164.0706, 146.0601, 127.0390	N- 苄氧羰基甘氨酸	E1
		208.0614[M-H] ⁻	MS2: 179.0560, 161.0456		
2*	5.95	155.0339[M+H] ⁺	MS2: 137.0234, 111.0441	原儿茶酸	A1、B1、C1、 D1、E2
		153.0182[M-H] ⁻	MS2: 109.0289		
3	7.87	205.0988[M+H] ⁺	MS2: 188.0721, 170.0619, 159.0931, 146.0613, 118.0661	β - 吡啶- α - 氨基丙酸	A2、B2、C2、 E3
		203.0828[M-H] ⁻	MS2: 159.0933, 116.0511		
4	9.82	881.1972[M+H] ⁺	MS2: 741.2009, 579.1440, 451.1199, 175.1216	未知	A3
		879.1782[M-H] ⁻	MS2: 739.1832, 718.1437, 688.2096, 577.1357, 289.0712, 161.0239, 125.0248		
5*	10.30	579.1541[M+H] ⁺	MS2:409.0955, 287.0575, 271.0630, 247.0627, 163.0404, 139.0402, 127.0401	原花青素 B1	A4、B3、C3、 D2、E4
		577.1346[M-H] ⁻	MS2: 451.1044, 425.0883, 407.0780, 289.0722, 125.0248		
6*	12.51	291.0883[M+H] ⁺	MS2: 207.0674, 147.0454, 139.0403, 123.0452	儿茶素	A5、B4、C4、 D3、E5
		289.0717[M-H] ⁻	MS2: 245.0824, 205.0512, 179.0355, 125.0247, 109.0297		
7	13.10	1155.2746[M+H] ⁺	MS2: 867.2132, 577.1339, 355.1043, 289.0705, 123.0440	花色素多聚体	A6、B5、C5、 D4
		1153.2587[M-H] ⁻	MS2: 865.1959, 575.1190, 287.0561, 245.0456, 125.0426		
8	14.32	867.2199[M+H] ⁺	MS2: 527.1026, 393.0641, 271.0624, 247.0624, 163.0404, 127.0401	表儿茶素三聚体	A7、C6、D5、 E6
		865.1984[M-H] ⁻	MS2: 739.1669, 713.1514, 695.1409, 577.1351, 413.0879, 287.0563, 125.0247		
9*	16.58	579.1541[M+H] ⁺	MS2: 409.0958, 287.0577, 275.0576, 163.0405, 139.0402, 127.0401	原花青素 B2	A8、B6、E7
		577.1348[M-H] ⁻	MS2: 451.1044, 425.0883, 407.0780, 289.0722, 125.0248		
10	18.5	787.2020[M+H] ⁺	MS2: 655.1544, 479.1202, 317.0700, 257.0446, 153.0184	异鼠李素-3-O- 葡萄糖	D6
		785.1770[M-H] ⁻	MS2: 623.1248, 477.1038, 315.0522, 271.0196, 151.0093	糖- 鼠李糖- 鼠李糖苷	
11*	18.95	291.0886[M+H] ⁺	MS2: 207.0670, 165.0563, 147.0454, 139.0402, 123.0451	表儿茶素	A9、B7、E8
		289.0695[M-H] ⁻	MS2: 245.0824, 205.0512, 179.0355, 125.0247, 109.0297		

续表 2

序号	保留时间/ min	分子离子峰 (m/z)	二级碎片离子 (m/z)	化合物归属	峰号
12	20.40	1154.7742[M+H] ⁺	MS2: 865.2008, 727.2110, 575.1209, 441.1196, 345.1193, 301.1195, 219.1137	花色素多聚体	C7
		1152.5621[M-H] ⁻	MS2: 864.1910, 710.1467, 665.1624, 609.1445, 591.1151, 439.0940, 343.1039		
13	23.92	867.2197[M+H] ⁺	MS2: 402.1692, 250.1209, 191.0721, 112.0879	表儿茶素三聚体同分异构体	A10
		865.1981[M-H] ⁻	MS2: 739.1678, 713.1523, 695.1417, 577.1359, 413.0884, 287.0568, 125.0249		
14	27.06	773.2162[M+H] ⁺	MS2: 611.1625, 465.1047, 303.0511, 181.0206, 153.0129	槲皮素-3-O-葡萄糖-	C8
		771.2003[M-H] ⁻	MS2: 609.1474, 463.0898, 301.0330, 179.0035, 151.0085	鼠李糖-葡萄糖苷	
15	29.01	757.2020[M+H] ⁺	MS2: 611.1625, 465.1047, 303.0511, 181.0206, 153.0129	槲皮素-3-O-葡萄糖-	B8
		755.2019[M-H] ⁻	MS2: 609.1474, 463.0898, 301.0330, 179.0035, 151.0085	鼠李糖-鼠李糖苷	
16	29.3	743.3050[M+H] ⁺	MS2: 690.2320, 611.1630, 465.1047, 303.0508, 197.1179	芦丁-阿拉伯糖苷	C9
		741.1889[M-H] ⁻	MS2: 688.2131, 592.0138, 547.0173, 447.0295,		
17	31.24	611.1272[M+H] ⁺	MS2: 479.0847, 303.0515	未知	D7
		609.1080[M-H] ⁻	MS2: 301.0354		
18	35.65	611.1608[M+H] ⁺	MS2: 465.1030, 433.1132, 386.1714, 303.0500, 139.9824	芦丁同分异构体	E9
		609.1446[M-H] ⁻	MS2: 301.0356		
19*	36.8	611.1656[M+H] ⁺	MS2: 465.1024, 303.0525, 182.9869, 141.9599, 113.9647	芦丁	A11、B9、 C10、D8、 E10
		609.1459[M-H] ⁻	MS2: 301.0351		
20	37.31	757.2221[M+H] ⁺	MS2: 625.1757, 425.0925, 383.0820, 317.0674, 257.0446, 153.0184	异鼠李素-3-O-葡萄糖	D9
		755.2020[M-H] ⁻	MS2: 609.1419, 477.0632, 463.0880, 315.0522, 271.0196, 151.0093	-阿拉伯糖-鼠李糖苷	
21	40.79	625.1391[M+H] ⁺	MS2: 611.1068, 493.0974, 317.0654, 257.0446, 153.0184	异鼠李素-3-O-葡萄糖	D10
		623.1240[M-H] ⁻	MS2: 491.0723, 315.0522, 271.0196, 151.0093	醛酸-阿拉伯糖苷	
22	42.34	435.0917[M+H] ⁺	MS2: 303.0500, 181.0206, 153.0129	槲皮素-3-O-阿拉伯糖	E11
		433.0767[M-H] ⁻	MS2: 301.0330, 179.0035, 151.0085	苷	

续表 2

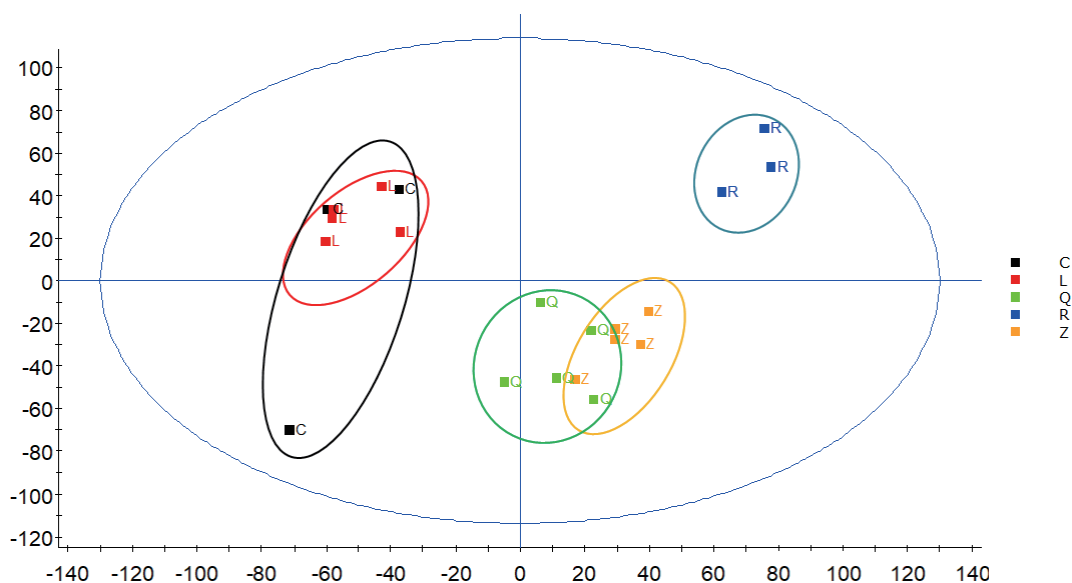
序号	保留时间 / min	分子离子峰 (m/z)	二级碎片离子 (m/z)	化合物归属	峰号
23	43.78	595.1680[M+H] ⁺ 593.1520[M-H] ⁻	MS2: 449.1075, 287.0584 MS2: 447.1261, 285.0418, 229.0505, 151.0092	山奈酚-3-O-葡萄糖-鼠李糖苷	C11
24	44.98	625.1763[M+H] ⁺ 623.1601[M-H] ⁻	MS2: 479.1190, 433.1136, 317.0658, 257.0446, 153.0184 MS2: 477.1083, 431.0979, 315.0522, 271.0196, 151.0093	异鼠李素-3-O-葡萄糖-鼠李糖苷或其同分异构体	D11
25	46.45	493.0969[M-H] ⁻ 491.0822[M-H] ⁻	MS2: 317.0654, 257.0446, 153.0184 MS2: 315.0522, 255.0279, 151.0028	异鼠李素-3-O-葡萄糖醛酸	D12
26	47.0	625.1787[M+H] ⁺ 623.1627[M-H] ⁻	MS2: 479.1210, 317.0669, 257.0446, 153.0184 MS2: 477.1173, 315.0522, 271.0196, 151.0093	异鼠李素-3-O-葡萄糖-鼠李糖苷或其同分异构体	C12
27	55.73	679.3692[M+H] ⁺ 723.3590[M+HCOO] ⁻	MS2: 517.3167, 499.3099, 481.2993, 463.2889 MS2: 677.3513, 515.2996, 497.2916, 479.2806, 461.2732	葫芦素 D 葡萄糖苷	A12、B10、E12
28	61.56	517.3170[M+H] ⁺ 561.3065[M+HCOO] ⁻	MS2: 499.30101, 481.2996, 463.2891 MS2: 391.1873, 273.1702, 206.1713, 140.4514	葫芦素 D 或其同分异构体	A13、B11、E13
29	62.1	517.3171[M+H] ⁺ 561.3065[M+HCOO] ⁻	MS2: 499.3063, 481.2960, 463.2856 MS2: 391.1873, 273.1702, 206.1713, 140.4514	葫芦素 D 或其同分异构体	A14、B12
30	62.31	738.4057[M+NH4] ⁺ 765.3678[M+HCOO] ⁻	MS2: 559.3254, 499.3047, 481.2945, 463.2843 MS2: 719.3655, 659.3449, 497.2890, 329.2323	葫芦素 B 葡萄糖苷	E14
31*	67.49	581.3058[M+Na] ⁺ 603.3167[M+HCOO] ⁻	MS2: 499.3095, 481.2991, 463.2887 MS2: 497.2917, 479.2804, 461.2735	葫芦素 B	A15、B13、E15

注: * 与对照品比对鉴定。

2.5 主成分分析

将该5种药材UPLC/Q-TOF-MS分析检测得到的负离子质谱数据导入MassLynx V4.1软件,对其进行主成分分析(Principal Component Analysis, PCA),得到20批次该5种药材的得分图(图3)。在得分图中每个点代表1个样品,点与点之间的距离代表各样品之间存在的差异程度。其中,“Q”代表秋海棠,“Z”代表中华秋海棠,“L”代表掌裂叶秋海棠,“C”代表长柄秋海棠,“R”代表柔毛秋海棠。如图3所示,所有20批次样品被分为3组:第1组,所有批次的柔毛秋海棠样品均聚

为一组;第2组,秋海棠和中华秋海棠样品归为一组,它们的样品距离较近未完全分开,1批次中华秋海棠样品位于秋海棠样品圆圈内;第3组,掌裂叶秋海棠和长柄秋海棠样品为一组,它们的样品距离非常近未完全分开,其中1批长柄秋海棠较离散,位于第三象限,表明这批次长柄秋海棠化学成分差异较大。由得分图可知,柔毛秋海棠与秋海棠属其他4种药材的化学成分差异显著,秋海棠与中华秋海棠药材之间的化学成分差异较小,掌裂叶秋海棠与长柄秋海棠药材之间的化学成分差异较小。



C. 长柄秋海棠; L. 掌裂叶秋海棠; Q. 秋海棠; R. 柔毛秋海棠; Z. 中华秋海棠。

图3 5种秋海棠属药材主成分分析得分图

2.6 偏最小二乘法判别分析

继续采用MassLynx V4.1软件对秋海棠、中华秋海棠、掌裂叶秋海棠、长柄秋海棠和柔毛秋海棠药材在负离子模式下采集的质谱数据进行偏最小二乘法判别分析(PLS-DA),得到载荷图(图4)。在载荷图中距离原点越远的化学成分对该5种药材的区分贡献能力越大。具有主要贡献的差异化合物(色谱峰),即化学标志物。由图4结合该5种药材的特征峰,筛选出了对该5种药材区分具有显著贡献的8个化学标志物,它们可以分为两类。

第一类为原花青素B2(峰A8、B6、E7, 16.58 min, m/z 577.1342)、表儿茶素(峰A9、B7、E8, 18.95 min, m/z 289.0708)、葫芦素D或

其同分异构体(峰A13、B11、E13, 61.56 min, m/z 517.3151)、葫芦素D葡萄糖苷(峰A12、B10、E12, 55.73 min, m/z 723.3601)和葫芦素B(A15、B13、E15, 67.49 min, m/z 603.3178)。此5个化学标志物在秋海棠、中华秋海棠和柔毛秋海棠中均存在,而在掌裂叶秋海棠和长柄秋海棠中均没有。由此推测,表儿茶素、原花青素B2、葫芦素D或其同分异构体、葫芦素D葡萄糖苷和葫芦素B是秋海棠、中华秋海棠和柔毛秋海棠的潜在鉴别特征性化学成分。在主成分分析得分图中,掌裂叶秋海棠、长柄秋海棠能完全与秋海棠、中华秋海棠和柔毛秋海棠区分开。因此,在这5种药材照中,原花青素B2、表儿茶素、葫芦素D或其同分异

构体、葫芦素D葡萄糖苷和葫芦素B是秋海棠、中华秋海棠和柔毛秋海棠药材的潜在鉴别特征性化学标志物。

第二类为原花青素B1（峰A4、B3、C3、D2、E4，10.30 min， m/z 577.1343）、儿茶素（峰A5、B4、C4、D3、E5，12.51 min， m/z 289.0706）、芦丁（峰A11、B9、C10、D8、E10，36.80 min， m/z 609.1457）。它们在秋海棠、中华秋海棠、掌裂叶

秋海棠、长柄秋海棠和柔毛秋海棠中均存在，结合该5种药材的特征图谱分析发现，此3个化学标志物在该5种药材中的峰面积有较大差异，可以推测此3个化学标志物因在该5种药材中的含量有显著性差异，成为对该5种药材区分具有显著贡献的化学标志物。因此，原花青素B1、儿茶素和芦丁是该5种药材的潜在含量差异性化学标志物。

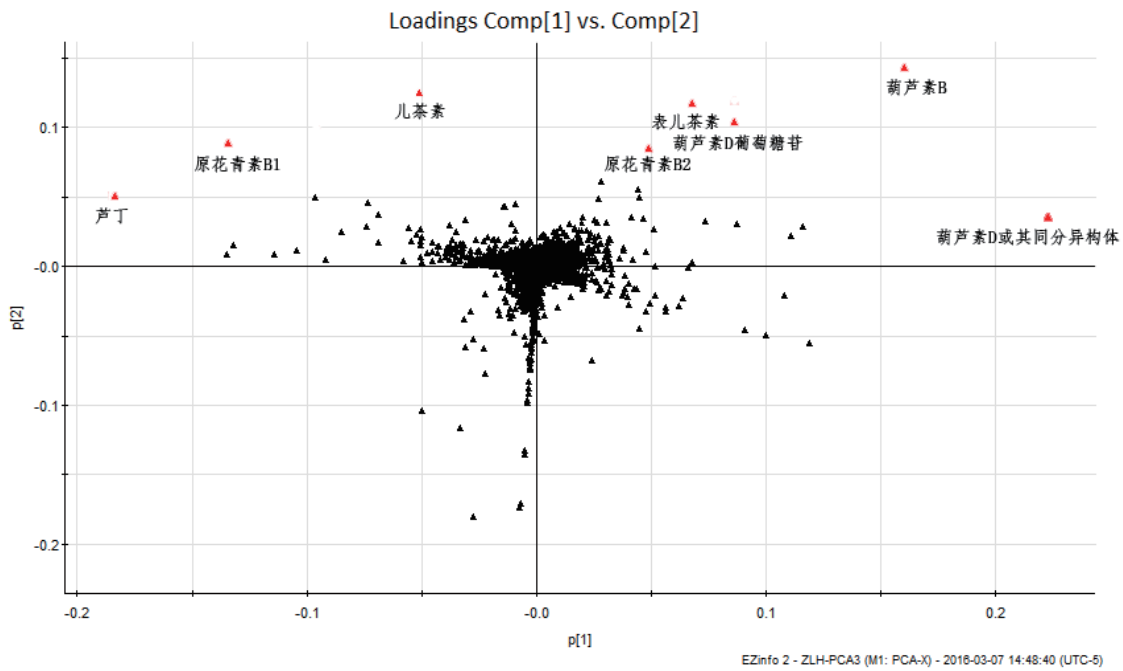


图4 5种秋海棠属药材主成分分析载荷图

由5种药材的特征图谱和它们各自共有峰的归属较全面地反映了该5种药材化学成分分布的整体信息，同时也明确了该5种药材所含化学成分种类与含量的差异。其中，掌裂叶秋海棠和长柄秋海棠所含的化学成分种类相似，主要是酚酸、黄酮及黄酮苷类；秋海棠、中华秋海棠和柔毛秋海棠所含的主要化学成分种类相似，均含有酚酸、黄酮及黄酮苷还有三萜及其皂苷类。结合化学计量学分析，发现柔毛秋海棠与秋海棠属其他4种药材的化学成分差异显著，秋海棠与中华秋海棠药材之间的化学成分差异较小，掌裂叶秋海棠与长柄秋海棠药材之间的化学成分差异较小。

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

药材提取最常用的溶剂有甲醇和乙醇。查阅文献，发现以甲醇作为药材的提取溶剂更为普遍，

故选取甲醇作为提取溶剂。同时，对甲醇的浓度进行考察，选取70%、90%、100% 3个浓度。结果，90%甲醇提取物的色谱峰数目较多，各色谱峰强度明显较高，能够较好地反映出秋海棠属药材各种化学成分的“整体性”，故最终选取90%甲醇作为提取溶剂。

3.2 提取方式的选择

常见的药材提取方法有回流提取法和超声提取法，精密称取批号为1的样品5 g，分别采用回流法提取30 min、超声法提取30 min。结果回流提取的色谱图中峰的数目和响应值明显高于超声提取的，表明回流提取法的提取效率较高，故样品提取方法最终选择回流提取法。

3.3 流动相的选择

本研究考察了不同比例的甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸和乙腈-0.1%甲酸体系，结果

发现乙腈的洗脱效果优于甲醇,且加入0.1%甲酸可以有效改善酚酸成分色谱峰的拖尾现象,各色谱峰分离情况更好,出峰时间更理想,因此选择乙腈-0.1%甲酸为流动相。

3.4 检测波长的选择

由于秋海棠属药材主要含有黄酮、酚酸、三萜等多类成分,所以需要选择一个最佳检测波长,使黄酮、酚酸、三萜等成分均有较高的吸收值,基线稳定,分离度良好。因此,对230、254、280 nm和300 nm 4个波长进行考察。结果254 nm下色谱峰较多,且基线也较稳定,因此最终选取254 nm作为检测波长。

3.5 质谱条件的优化

对质谱参数进行了优化,发现:离子源温度为100 ℃,脱溶剂气温度为350 ℃,脱溶剂气体流速为600 L·h⁻¹,毛细管电压为2600 V,碎裂电压80 V,锥孔电压为40 V,碰撞能量:低能量4 V,高能量:20~30 V时,质谱的离子流信息更丰富且响应更高,故选择该质谱条件。同时还比较了正、负离子两种扫描模式,结果发现有些峰只能在正离子模式下才能响应,而负离子模式下的色谱峰更多且响应更高,故选择正、负离子两种模式同时扫描,也提高了鉴定结果的准确性。

3.6 展望

后期将继续收集秋海棠属紫背天葵、周裂秋海棠、美丽秋海棠和南川秋海棠等品种药材,扩大样本量,争取更多批次、更多产地、不同采收期的样品,探讨活性物质基础研究,以质量标志物开展定量分析,为该属药材的开发和应用提供科学依据。

4 结论

建立UPLC/Q-TOF-MS特征图谱结合化学计量学评价秋海棠属5种药材质量的方法直观、准确地反映了秋海棠、中华秋海棠、掌裂叶秋海棠、长柄秋海棠和柔毛秋海棠药材的整体质量及化学成分差异情况,对于建立科学、合理的秋海棠属药材质量评价方法和安全用药具有重要的指导意义,也为其整体质量评控和标准修订提供参考。

参考文献:

[1] 杨亮,何顺志.中国秋海棠属的研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(12):2979-2981.

- [2] 范文娟,高昂,巩江,等.全球秋海棠药学研究概况[J].辽宁中医药大学学报,2011(2):59-61.
- [3] 赵学敏.清.本草纲目拾遗[M].第二版.北京:人民卫生出版社,1957:261-267.
- [4] 陕西省革命委员会卫生局.陕西中草药[M].上海:科学出版社,1971:723-724.
- [5] 杨济秋,杨济中.贵州民间方药集[M].贵阳:贵州人民出版社,1978:113.
- [6] 李世全.秦岭巴山天然药物志[M].西安:陕西科学技术出版社,1987:224.
- [7] 方志先,赵晖,赵敬华.土家族药物志.上册[M].北京:中国医药科技出版社,2007:418-419.
- [8] 湖北省革命委员会卫生局.湖北中草药志[M].武汉:湖北人民出版社,1978:435-436.
- [9] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草.第14卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:500.
- [10] 王国强主编.全国中草药汇编.卷二[M].北京:人民卫生出版社,2014:490.
- [11] 南京中医药大学.中药大辞典[M].第二版.上海:上海科学技术出版社,2006:1411.
- [12] 李经纬,邓铁涛,蔡景峰,等主编.中医大辞典[M].北京:人民卫生出版社,1995:677.
- [13] 贾敏如,李星炜.中国民族药志要[M].北京:中国医药科技出版社,2005:86-88.
- [14] 焦丽娟,税玉民.中国秋海棠属(秋海棠科)植物的DNA条形码评价[J].植物分类与资源学报,2013,35(6):715-724.
- [15] 郑丽慧,徐江,李西文,等.基于ITS2序列鉴定红白二丸药材及其近缘易混品[J].世界科学技术,2016,18(2):179-185.
- [16] Wang Ruilan, Lin Xianjiang, Lu Yanbin. Effect Counter Current Chromatographic Method for One Step Preparative Isolation and Purification of Unthruglycoside from *Begonia fimbristipula*. Using Elutionextrusion Separation Mode[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2013, 36: 363-371.
- [17] 黄蕾.秋海棠生药学及抗炎活性研究[D].武汉:湖北中医药大学,2014.
- [18] 蔡红,王明奎.三种秋海棠属植物的化学成分的研究[J].合成化学,1997,(增刊):340.
- [19] 张嘉岷,陈耀祖,李伯刚,等.秋海棠化学成分的研究[J].中国中药杂志,1997,22(5):295-296.

- [20] 蔡红, 王明奎. 天葵秋海棠根部的化学成分[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(1): 103-105.
- [21] 蔡红, 王明奎. 蕞叶秋海棠化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1998, 10(1): 48.
- [22] 文雯, 肖凌, 郑丽慧, 等. 秋海棠属中药材水八角及红白二丸质量评价研究[J]. 中国药师, 2018, 21(8): 1331-1334, 1351.
- [23] 黄蕾, 郑丽慧, 何开勇, 等. 秋海棠抗炎作用及其机制研究[J]. 中国药师, 2016, 19(2): 4-7.
- [24] 李丹平, 涂志超, 聂晶, 等. 中华秋海棠对大鼠慢性盆腔炎的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 50-53.
- [25] 涂志超, 李丹平, 聂晶, 等. UPLC法测定秋海棠和中华秋海棠中5种成分的含量[J]. 中药材, 2015, 38(9): 1890-1893.
- [26] 范文娟, 高昂, 巩江, 等. 全球秋海棠药学研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011(2): 59-61.
- [27] 徐文芬, 蒋佳雯, 等. 盾叶秋海棠药用植物的HPLC指纹图谱研究[J]. 湖北民族医药杂志, 2012, 7: 41-44.
- [28] 湖北省药品监督管理局. 湖北省中药材质量标准[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 46-47, 99-100.

(收稿日期 2023年10月13日 编辑 郑丽娥)