

野生与栽培夏枯草 5 种活性成分的 HPLC 测定

皮胜玲^{1,2,3}, 张凯强^{1,2,3}, 胡玉珍^{1,2,3}, 黄杰^{1,2,3}, 李亚梅^{1,2,3}, 夏伯候^{1,2,3}, 林丽美^{1,2,3*}, 吴萍^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410203

2. 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南长沙 410203

3. 湖湘中药资源保护与利用协同创新中心, 湖南长沙 410203

摘要: 目的 建立同时测定夏枯草 *Prunella vulgaris* 中迷迭香酸、异迷迭香酸苷、咖啡酸、芦丁、木犀草素 5 种活性成分的方法, 并对不同产地野生与栽培夏枯草进行测定研究, 比较夏枯草野生品与栽培品在酚酸和黄酮类成分量上的差异。方法 采用 Agilent 5HC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) -0.1%磷酸水溶液 (B) 为流动相; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm。以独立样本 *t* 检验, 辅以聚类分析和相关性分析方法进行评价。结果 独立样本 *t* 检验表明, 夏枯草野生品与栽培品在迷迭香酸、芦丁、咖啡酸和木犀草素 4 种成分量上差异显著 ($P < 0.01$), 而异迷迭香酸苷量无差异 ($P > 0.05$)。聚类分析结果显示, 大部分产地野生与栽培夏枯草能被正确区分。相关性分析结果表明, 果穗长度与夏枯草主要成分量无明显关系。结论 所建立的测定方法简单、可行, 可以作为夏枯草品质评价方法之一。

关键词: 夏枯草; HPLC; 聚类分析; 相关性分析; 迷迭香酸; 异迷迭香酸苷; 咖啡酸; 芦丁; 木犀草素

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)08-1666-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.028

Determination of five bioactive constituents in wild grown and cultivated *Prunella vulgaris* by HPLC

PI Sheng-ling^{1,2,3}, ZHANG Kai-qiang^{1,2,3}, HU Yu-zhen^{1,2,3}, HUANG Jie^{1,2,3}, LI Ya-mei^{1,2,3}, XIA Bo-hou^{1,2,3}, LIN Li-mei^{1,2,3}, WU Ping^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410203, China

2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Changsha 410203, China

3. Collaborative Innovation Center of Resource for Chinese Materia Medica of Hunan Province, Changsha 410203, China

Abstract: Objective To compare the contents of phenolic acids and flavonoids in wild grown and cultivated *Prunella vulgaris* from various habitats, an HPLC method was established for simultaneous determination of five bioactive compounds (rosmarinic acid, salviaflaside, caffeic acid, rutin, and luteolin). **Methods** The Agilent 5HC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with a gradient eluent system composed of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid aqueous solution at the temperature of 30 °C. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 280 nm. Independent *t*-test (*t*-test), hierarchical clustering analysis (HCA), and correlation analysis were applied to analyzing and evaluating wild grown and cultivated *P. vulgaris*. **Results** The *t*-test results showed that the contents difference of rosmarinic acid, rutin, caffeic acid, and luteolin had statistical significance ($P < 0.01$). However, there was no obvious difference for salviaflaside ($P > 0.05$). According to the result of HCA, most of the cultivated and wild materials could be differentiated. The result of correlation analysis showed that the ear length has no significant influence on the contents of main compounds in *P. vulgaris*. **Conclusion** The determination method is simple and feasible, and it can be used as one of the quality evaluation method of *P. vulgaris*.

Key words: *Prunella vulgaris* L.; HPLC; hierarchical cluster analysis; correlation analysis; rosmarinic acid; salviaflaside; caffeic acid; rutin; luteolin

收稿日期: 2016-10-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503041); 国家科技部公益性行业专项 (201507002); 湖南省自然科学基金资助项目 (13JJ4089); 湖湘青年科技创新创业平台资助项目 (2013); 2016CX09 湖南中医药大学研究生创新课题

作者简介: 皮胜玲, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量评价。

*通信作者 林丽美, 女, 教授, 主要从事中药药效物质基础及其质量标准化研究。Tel: (0731)88458230 E-mail: lizasmile@163.com

吴萍, 女, 副教授, 主要从事药物分析工作。Tel: 13607437848 E-mail: 545371528@qq.com

夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 为唇形科多年生草本植物, 药用部位为果穗, 味苦、辛, 性寒, 具有清火、明目、消肿、散结等功效, 常用于治疗目赤肿痛、目珠夜痛、头痛眩晕、瘰疬、癭瘤、乳痈、乳癖、乳房胀痛等, 在我国有着上千年悠久的药用历史^[1]。除作药用外, 夏枯草也可食用, 是卫生部首批公布的药食两用中药之一。夏枯草被视同蔬菜长期食用, 作为主料煲制靓汤, 也是“夏桑菊”“王老吉”等多种凉茶的原料。夏枯草中主要的活性成分分为三萜及其苷、酚酸、黄酮及多糖类, 生物活性也非常广泛, 有降压、降糖、抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化和抗肿瘤等活性^[2]。研究报道, 夏枯草酚酸及黄酮类成分具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等生物活性^[3-8]。

夏枯草广泛分布于我国各地, 集中分布于淮河流域及长江中下流地区, 江苏、安徽、浙江及河南野生资源蕴藏丰富, 而安徽、河南及江西等省则以家种为主。鉴于夏枯草来源广泛, 且目前市场上夏枯草药材存在来源不明, 野生与栽培品种混用等问题, 凸显夏枯草药材质量评价尤为重要。《中国药典》2015 年版夏枯草测定指标单一(迷迭香酸), 难以体现夏枯草质量。栽培与野生夏枯草质量到底是否一致? 如何来进行评价? 目前关于这方面的研究鲜见报道。因此, 本实验收集了包括夏枯草主产区在内的不同产地的野生与栽培夏枯草药材, 采用 HPLC 法, 以迷迭香酸、异迷迭香酸苷、咖啡酸、芦丁、木犀草素 5 种活性成分为定量评价指标, 结合化学计量学分析结果, 为夏枯草的质量标准提供依据。

1 仪器与试剂

Waters e2695 (包括四元泵、自动进样器、紫外检测器); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BP211D 分析电子天平(美国 Sartorius 公司, 十万分之一); 游标卡尺。

对照品芦丁(批号 0080-9705) 购自中国食品药品检定研究院, 咖啡酸(批号 140107)、木犀草素(批号 141016) 购自四川维克奇公司, 迷迭香酸、异迷迭香酸苷均为课题组自制, 质量分数均大于 98%。甲醇、乙腈均为色谱纯, 德国 Merck 公司, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

本研究共收集了不同来源的夏枯草药材(果穗) 共 28 批, 其中 S1~S13 为野生样品, S14~S28 为栽培样品(表 1)。所有样品经湖南中医药大学刘塔

表 1 28 批夏枯草药材样品信息

Table 1 Sample information of 28 batches of *Prunella vulgaris* medicinal materials

编号	产地	收集时间	品种	平均果穗长度/cm
S1	广东韶关	2015-07	野生	2.60
S2	浙江丽水	2015-07	野生	3.52
S3	湖南张家界	2015-08	野生	4.00
S4	湖北十堰	2015-08	野生	5.11
S5	江西赣州	2015-08	野生	2.88
S6	河南信阳	2015-07	野生	3.36
S7	浙江温州	2015-07	野生	3.29
S8	陕西汉中洋县	2015-07	野生	3.95
S9	陕西安康	2015-06	野生	3.90
S10	广西河池	2015-07	野生	3.30
S11	湖北襄阳神农架	2015-07	野生	3.33
S12	福建古田	2015-07	野生	5.50
S13	广西玉林	2015-08	野生	4.20
S14	湖南宜章	2015-08	栽培	4.05
S15	河南南阳	2015-08	栽培	5.88
S16	湖北随州	2015-06	栽培	5.14
S17	湖北安国	2015-06	栽培	4.49
S18	河南信阳	2015-07	栽培	6.32
S19	广东清远	2015-06	栽培	5.37
S20	江苏南京	2015-06	栽培	7.30
S21	河南桐柏	2015-06	栽培	4.56
S22	安徽亳州	2015-08	栽培	4.43
S23	陕西汉中略阳	2015-08	栽培	2.70
S24	湖南长沙	2015-08	栽培	3.62
S25	山东威海	2015-07	栽培	5.72
S26	贵州遵义	2015-08	栽培	2.18
S27	四川广元	2015-08	栽培	4.07
S28	福建三明	2015-08	栽培	3.21

斯教授鉴定为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 干燥果穗, 每批样品随机选取 20 个果穗, 用游标卡尺测定其长度, 计算其平均穗长(表 1), 药材粉碎过 60 目筛, 放入自封袋中保存。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 精密称取对照品迷迭香酸、异迷迭香酸苷、芦丁、咖啡酸、木犀草素 18.02、5.08、2.79、4.08、1.79 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解, 并稀释至刻度, 即得对照品储备溶液。

2.1.2 供试品溶液 取夏枯草药材粉末 1 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 60% 甲醇 20 mL 超声 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 提取 30 min, 离心 (10 000 r/min) 10 min, 取上清液, 旋干, 用甲醇定容至 5 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent 5HC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 12%~30% A; 10~15 min, 30% A; 15~25 min, 30%~45% A); 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 在上述色谱条件下, 5 种化学成分对照品与样品 HPLC 色谱图见图 1。

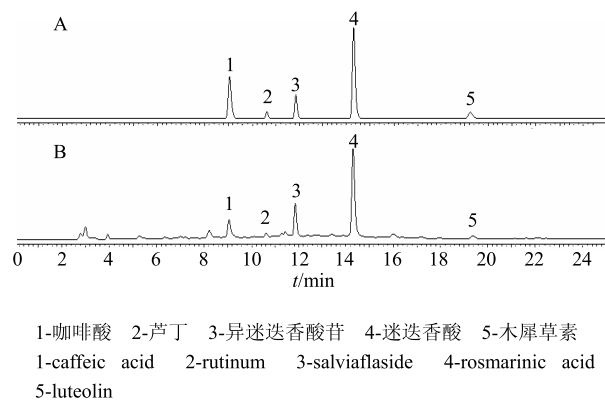


图 1 对照品 (A) 与夏枯草样品 (S27, B) 色谱图

Fig. 1 HPLC of standards (A) and *P. vulgaris* sample (S27, B)

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围 精密移取对照品贮备溶液 0.25、0.5、1、1、2、4 mL 分别稀释定容至 10、10、10、5、5、5 mL 量瓶中, 得到系列浓度的混合对照品溶液, 分别吸取上述系列溶液按“2.2”项下色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果表明 5 个被测化合物在各自标准曲线范围内线性关系良好 (表 2)。

2.3.2 精密度试验 取同一份供试品溶液 (S27), 按“2.2”项下色谱条件重复进样 6 次, 定量测定, 咖啡酸、芦丁、异迷迭香酸苷、迷迭香酸和木犀草素的 RSD 分别为 0.71%、1.56%、1.50%、0.73%、1.46%, 表明方法精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取 S27 样品 6 份, 按“2.1.2”项下制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 咖啡酸、芦丁、异迷迭香酸苷、迷迭香酸和木犀草素的 RSD 分别为 0.59%、1.58%、1.70%、1.40%、1.80%, 表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (S27), 分别在 0、2、4、6、8、12 h 时进样测定, 咖啡酸、芦丁、异迷迭香酸苷、迷迭香酸和木犀草素的 RSD 分别为 0.53%、1.03%、1.14%、1.00%、1.58%, 表明供试品溶液在 12 h 稳定。

2.3.5 加样回收率试验 称取已测定的夏枯草药材 (S27) 粉末 0.5 g, 精密称定 6 份, 取同一混合对照品溶液, 精密移取 0.5 mL 加入样品中, 按“2.1.2”

表 2 回归方程与线性范围

Table 2 Regression equations and linear ranges

成分	线性方程	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	R ²
迷迭香酸	$Y=2.64 \times 10^7 X+218\ 355.03$	0.045 0~1.441 6	0.999 5
异迷迭香酸苷	$Y=2.28 \times 10^7 X-24\ 247.10$	0.012 7~0.406 4	1.000 0
咖啡酸	$Y=5.97 \times 10^7 X+36\ 201.48$	0.010 2~0.326 4	1.000 0
芦丁	$Y=1.20 \times 10^7 X-2\ 807.92$	0.007 0~0.223 2	0.999 9
木犀草素	$Y=3.43 \times 10^7 X+36\ 646.10$	0.004 5~0.143 2	1.000 0

项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 咖啡酸的回收率为 100.11%, RSD 为 0.75%; 芦丁的回收率为 99.25%, RSD 为 1.05%; 异迷迭香酸苷的回收率为 99.78%, RSD 为 1.89%; 迷迭香酸的回收率为 98.83%, RSD 为 1.15%; 木犀草素的回收率为 101.25%, RSD 为 1.87%。

2.4 样品测定

精密称取 28 份夏枯草样品, 按“2.1.2”项下

方法制得供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样, 测定峰面积, 代入回归方程, 计算各成分在样品中的质量分数, 结果见表 3。夏枯草野生品咖啡酸量为 0.210 9~0.609 9 mg/g, 栽培品咖啡酸量为 0.094 9~0.311 3mg/g; 野生品芦丁量为 0.473 9~1.028 8 mg/g, 栽培品芦丁量为 0.089 1~0.494 5 mg/g; 异迷迭香酸苷野生品量为 0.206 0~1.028 8 mg/g, 栽培品异迷迭香酸苷量为 0.125 5~0.769 6 mg/g; 夏枯草野

表 3 样品测定结果

Table 3 Results of five contents determination of samples

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	咖啡酸	芦丁	异迷迭香酸苷	迷迭香酸	木犀草素
S1	0.372 8	0.713 8	1.366 4	2.497 5	0.071 7
S2	0.239 6	0.629 9	0.861 8	2.797 4	0.135 4
S3	0.248 3	0.712 8	0.291 7	2.686 6	0.131 1
S4	0.216 7	0.473 9	0.587 7	2.070 8	0.067 3
S5	0.243 7	0.748 8	0.923 6	3.378 6	0.083 0
S6	0.609 9	0.987 7	0.302 6	6.954 2	0.304 9
S7	0.453 5	0.976 2	0.414 5	4.120 6	0.132 6
S8	0.250 9	0.574 2	0.301 4	1.842 1	0.070 0
S9	0.244 6	0.603 1	0.441 5	2.608 0	0.118 8
S10	0.362 8	1.028 8	0.374 9	3.627 4	0.115 0
S11	0.210 9	0.568 6	0.206 0	1.573 0	0.137 5
S12	0.294 4	0.805 5	0.692 7	3.495 7	0.085 0
S13	0.407 5	0.692 4	0.707 4	1.571 3	0.136 8
S14	0.161 5	0.071 1	0.125 7	1.013 0	0.055 1
S15	0.261 0	0.453 8	0.470 8	1.905 2	0.091 2
S16	0.146 8	0.305 3	0.405 0	0.895 6	0.035 2
S17	0.094 9	0.089 1	0.226 3	0.368 7	0.028 0
S18	0.160 7	0.165 5	0.216 7	0.257 5	0.041 1
S19	0.237 0	0.494 5	0.769 6	1.703 7	0.106 9
S20	0.153 7	0.106 8	0.654 8	0.683 4	0.025 4
S21	0.190 3	0.141 2	0.335 1	0.564 0	0.055 1
S22	0.311 3	0.425 4	0.623 8	1.278 6	0.130 9
S23	0.269 8	0.475 6	0.380 5	1.031 4	0.039 8
S24	0.096 8	0.131 5	0.125 5	0.032 0	0.003 0
S25	0.196 0	0.209 5	0.348 7	0.687 6	0.072 0
S26	0.140 6	0.290 1	0.412 5	1.204 7	0.003 7
S27	0.146 0	0.265 7	0.475 7	1.148 8	0.048 6
S28	0.223 8	0.438 9	0.692 1	1.272 8	0.056 8

生品迷迭香酸的量为 1.571 3~6.954 2 mg/g; 栽培品迷迭香酸的量为 0.032 0~1.905 2 mg/g; 夏枯草野生品木犀草素的量为 0.071 7~0.304 9 mg/g, 栽培品木犀草素的量为 0.003 0~0.130 9mg/g。

2.5 化学计量学分析

2.5.1 两独立样本 t 检验 采用 SPSS19.0 软件, 对 5 种成分量数据进行独立样本 t 检验, 分析野生与栽培夏枯草量差异。芦丁、异迷迭香酸苷和木犀草素具有方差齐性的特点 (P>0.05)。质量分数最高的迷迭香酸野生品与栽培品之间具有显著性差异 (P<0.01), 其次芦丁、咖啡酸也具有显著差异 (P<0.01), 而质量分数较高的异迷迭香酸苷差异不显著 (P>0.05), 对质量分数较低的木犀草素而言, 野生品与栽培品之间也具有显著性差异 (P<0.01)。

2.5.2 相关性分析 传统认为, 色紫褐、穗大者为佳。那么果穗长度、色泽是否与含量相关呢? 目前有研究表明, 果穗短者齐墩果酸、熊果酸量高于果穗长者, 紫红色果穗齐墩果酸、熊果酸量高于棕色

果穗^[7]。采用 SPSS19.0 软件, 对果穗长度数据与各活性成分量数据进行相关性分析。咖啡酸、异迷迭香酸苷、迷迭香酸和木犀草素的 P 值分别为 0.134、0.584、0.089 和 0.364, 均大于 0.05; 而芦丁的 P 值为 0.026, 小于 0.05。故只有芦丁的量与果穗长度呈现相关关系, 因此不能仅凭果穗长度判断夏枯草质量优劣。

2.5.3 聚类分析 以 5 种活性成分量为变量导入 SPSS 19.0 软件, 采用组间联接法和欧式距离的平方对 28 批样品进行聚类分析 (图 2)。聚类分析的结果显示, 所有样品依照 5 种成分的量特征可分为 a、b、c、d 4 类。河南信阳产夏枯草的各活性成分量相对最高, 被单独聚为 a 类, 大部分野生样品与 2 批栽培样品 (广东清远、河南南阳) 各活性成分质量分数在所有样品中较高, 被聚为 b 类和 c 类, d 类都是栽培样品, 各活性成分量在所有样品中均处较低水平。

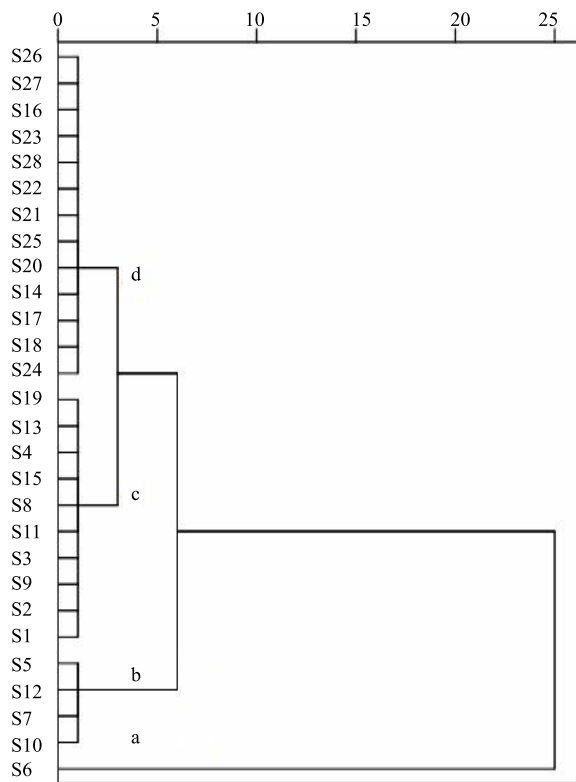


图 2 野生与栽培夏枯草系统聚类分析

Fig. 2 Hierarchical cluster analysis of wild grown and cultivated *P. vulgaris*

3 讨论

3.1 药材前处理方法的选择

本实验考察了溶剂/酸水解萃取法^[9]、固相萃取法^[10]等不同提取方法, 发现对酚酸和黄酮类成分并

无明显富集作用, 最终确定超声提取法; 对不同提取溶剂(甲醇、纯水、乙醇、60%甲醇、70%乙醇)进行比较, 结果发现 60%甲醇的提取效率最高。

3.2 野生与栽培夏枯草测定结果

迷迭香酸是《中国药典》2015 年版夏枯草药材质量评价的主要指标, 野生和栽培夏枯草样品中迷迭香酸的测定结果表明, 28 批药材中有 25 批符合国家入药标准, 野生夏枯草均符合国家入药标准, 而栽培夏枯草有 3 批(S17、S18、S24)量低于国家标准。野生夏枯草迷迭香酸、芦丁、咖啡酸和木犀草素的量普遍高于栽培夏枯草, 而异迷迭香酸苷量没有明显差异; 说明夏枯草野生品的质量可能优于栽培品, 但此结论需进一步通过药理实验验证。

化学计量学结果分析显示, 野生与栽培夏枯草化学成分种类相似, 但质量分数有明显变化; 多指标化学成分定量与化学计量学方法分析相结合的评价模式可为野生和栽培夏枯草质量控制和评价提供科学的依据。

近年来由于野生资源的枯竭和药材需求量的增加, 除传统的栽培品外, 又出现了大量的野生变家种的药材品种。本研究显示夏枯草野生品与栽培品存在一定差异, 既有产地差异, 又有生长栽培方式间的差异。药用植物的生长受遗传因素和环境因素的双重影响, 其活性成分多为植物的次生代谢产物, 在植物体内的积累很大程度上受生长环境各因素的直接或间接影响。夏枯草的生态适应性强, 在我国许多地区均有分布, 而不同产地环境因子如气候、土壤、地形等有较大差异, 这势必会对夏枯草的生长及药材品质造成影响。因此, 不论野生品与栽培品, 生境与药材质量的关系值得研究, 这对于改善栽培药材的品质具有重要的实际意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Bai Y, Xia B, Xie W, *et al.* Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Prunella* [J]. *Food Chem*, 2016, 204(2): 483-496.
- [3] Brindley M A, Widrlechner M P, McCoy J A, *et al.* Inhibition of lentivirus replication by aqueous extracts of *Prunella vulgaris* [J]. *Virology J*, 2009, 6(1): 8-16.
- [4] Zhang G, He L, Hu M. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro [J]. *Innov Food Sci Emer Technol*, 2011, 12(1): 18-25.
- [5] Liang F X B J, Zhao M M, *et al.* Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris* L. in vitro and in tumor-bearing mice [J]. *Molecules*, 2010, 15(12): 9145-9156.
- [6] Liang F, Xiao B J, Feng S, *et al.* Identification of two polysaccharides from *Prunella vulgaris* L. and evaluation on their anti-lung adenocarcinoma activity [J]. *Molecules*, 2010, 15(8): 5093-5103.
- [7] 蔡中齐, 马鸿雁, 张勉. 不同产地及外观形态夏枯草中齐墩果酸和熊果酸的含量比较 [J]. *广东药学院学报*, 2009, 25(3): 256-258.
- [8] 柏玉冰, 李春, 周亚敏, 等. 夏枯草的化学成分及其三萜成分的抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(24): 3623-3629.
- [9] Saliha S, Cevdet D, Hulusi M. Determination of phenolic compounds in *Prunella* L. by liquid chromatography-diode array detection [J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2011, 55(5): 1227-1230.
- [10] Irakli M N, Samanidou V F, Biliaderis C G, *et al.* Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction [J]. *Food Chem*, 2012, 134(3): 1624-1632.