

基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及定量测定的夏枯草质量控制研究

邱俊娜¹, 张 榆¹, 张 双², 刘 斌¹, 姜艳艳^{1*}, 程发峰^{2*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

摘 要: 目的 建立夏枯草药材 HPLC 指纹图谱, 结合化学模式识别技术筛选出不同批次夏枯草质量差异性标志物, 并以其为指标建立夏枯草含量测定方法, 为科学全面地评价夏枯草药材质量提供参考。方法 采用 HPLC 法建立 30 批不同产地夏枯草的指纹图谱, 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 进行相似度评价, 确定共有峰; 运用主成分分析和正交偏最小二乘判别分析, 筛选出不同批次夏枯草质量差异性标志物, 基于筛选出的质量差异性标志物建立含量测定方法, 并对 61 批夏枯草药材进行含量测定。结果 建立了夏枯草 HPLC 指纹图谱, 共标定 28 个共有峰, 其相似度均在 0.970 以上, 表明 30 批夏枯草药材的整体质量相对稳定; 采用主成分分析和正交偏最小二乘判别分析筛选出了不同批次夏枯草质量差异的 5 个标志物, 分别为咖啡酸 (5 号峰)、金丝桃苷 (9 号峰)、异槲皮苷 (10 号峰)、异迷迭香酸苷 (11 号峰) 和迷迭香酸 (12 号峰), 以 5 个标志物为指标, 对其进行含量测定, 色谱峰分离度良好, 且线性关系良好, 平均加样回收率为 95.0%~105.0%, RSD 值均低于 3%。结论 该方法科学、准确、可靠, 指纹图谱结合化学模式识别技术和含量测定构建了一个更加完善、合理、有效的夏枯草质量评价方法。

关键词: 夏枯草; 指纹图谱; 化学模式识别; 质量控制; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析; 咖啡酸; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 异迷迭香酸苷; 迷迭香酸

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)10-2842-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.027

Quality control of *Prunella vulgaris* based on HPLC fingerprints combined with chemical pattern recognition and content determination

QIU Jun-na¹, ZHANG Yu¹, ZHANG Shuang², LIU Bin¹, JIANG Yan-yan¹, CHENG Fa-feng²

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective The quantitative method for the quality makers screened by a chemical pattern recognition method combined with the HPLC fingerprint was established, so as to provide reference for scientific and comprehensive quality evaluation of *Prunella vulgaris*. **Methods** Fingerprints of 30 batches of *P. vulgaris* were established by HPLC. Similarity evaluation was performed by using Similarity Evaluation System for Fingerprint Chromatogram of TCM (2004A) to confirm the common peak. Principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were used to screen out the components that caused the quality differences in the batches. Quantitative method of the screened quality makers was established, and its content in 61 batches of samples was determined. **Results** The HPLC fingerprints of *P. vulgaris* were obtained, and a total of 28 common peaks were marked. The similarity of 30 batches of samples was higher than 0.970, which indicated that the overall quality of *P. vulgaris* was relatively stable. Caffeic acid (F5), hyperoside (F9), isoquercitrin (F10), salviaflavone (F11), and rosmarinic acid (F12) were recognized as the quality makers using principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis. Five markers, which showed good linear relationship, were used as indicators for content determination. The average recovery was 95.0%—105.0%, with the RSD value less than 3%. **Conclusion** The analysis method established was scientific, accurate, and reliable. A more perfect, reasonable, and effective method for quality evaluation of *P. vulgaris* was constructed using a fingerprint combined with chemical pattern recognition technique.

收稿日期: 2019-11-03

基金项目: 北京市教委共建科研基地建设项目 (2016022)

作者简介: 邱俊娜, 在读硕士生, 研究方向为中药药效物质与质量评价。E-mail: 20160931834@bucm.edu.cn

*通信作者 姜艳艳, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与质量控制方法。E-mail: jyyjml129@163.com

程发峰, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为经方的现代应用。E-mail: fafengcheng@gmail.com

Key words: *Prunella vulgaris* L.; fingerprint; chemical pattern recognition; quality control; principal component analysis; orthogonal partial least squares discrimination; caffeic acid; hyperoside; isoquercitrin; salviaflaside; rosmarinic acid

夏枯草为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥穗状花序, 是一味药食同源的常用中药。其味辛、苦, 性寒, 归肝、胆经, 具有清肝泄火、明目、散结消肿等功效, 用于目赤肿痛、目珠夜痛、头痛眩晕、瘰癧、癭瘤、乳痈、乳癖、乳房胀痛^[1]。同时, 夏枯草在中国东南地区也被广泛用作凉茶的原料, 欧洲地区作为蔬菜直接食用^[2]。现代药理研究表明, 夏枯草具有抗氧化、抗肿瘤、降压、降糖、抗菌、抗炎及免疫抑制等多种药理活性^[3-9]。夏枯草含有酚酸类、黄酮类、三萜及其苷类以及多糖等多种化学成分^[10-13]。《中国药典》2015 年版中, 夏枯草含量测定项下以迷迭香酸为指标, 进行质量评价。查阅文献发现, 夏枯草含量测定多以咖啡酸、熊果酸、齐墩果酸、迷迭香酸、异迷迭香酸苷、芦丁、槲皮素和木犀草素中一个或几个成分指标进行质量控制^[14-17], 也有文献采用 HPLC 法测定其指纹图谱来控制其质量^[18-20]。以若干个化学成分作为指标进行含量测定的方法, 无法真正体现中药的质量; 而单纯的指纹图谱方法虽然能从整体上模糊控制其质量, 但无法对中药中化学成分进行精准识别。因此, 本实验建立指纹图谱结合化学模式识别技术的夏枯草质量控制方法, 并以所筛选出的质量标志物为指标, 进行测定, 提升夏枯草质量评价水平。

指纹图谱能够较全面地反映中药所含化学成分的种数与数量, 在现阶段中药的有效成分大多尚未明确的情况下, 指纹图谱的整体性特点能反映中药化学成分的全貌。化学模式识别技术不仅可以对多个指标进行综合、降维和分类分析, 而且还可以表达、识别和处理指纹图谱的信息, 更加准确、全面地、科学地对中药材进行质量评价^[21]。指纹图谱结合化学模式识别技术的中药质量控制方法, 可以更加系统、全面地评价中药材的质量^[22]。因此, 本研究建立夏枯草的 HPLC 指纹图谱, 对其进行相似度评价, 结合主成分分析及正交偏最小二乘判别分析等化学模式识别方法分析, 筛选出不同批次夏枯草差异性质量标志物, 并对其进行含量测定方法研究, 建立含量测定的标准, 以期对夏枯草的质量控制及评价提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ-100DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声

仪器有限公司); Sartorius BS 124S 型万分之一电子分析天平、Sartorius BT 25S 型十万分之一电子分析天平 (北京赛多利斯有限公司); HH-6 数显恒温水浴锅 (常州荣华仪器有限公司); Waters 高效液相色谱系统 (1525 型二元梯度泵, 2998 型 PDA 检测器, 2707 型自动进样器, Breeze 2 色谱工作站, 美国 Waters 公司)。

1.2 试剂

对照品咖啡酸 (批号 Y09J8C28349)、金丝桃苷 (批号 Y01D7X25998)、异槲皮苷 (批号 P25J9F65872)、异迷迭香酸苷 (批号 R02M9F60399)、迷迭香酸 (批号 S03N8H47130) 均购自上海源叶科技生物有限公司, 质量分数均大于 98%; 乙腈 (赛默飞世尔科技有限公司, 色谱纯); 水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 其他试剂均为分析纯。

1.3 材料

61 批夏枯草 (S1~S61) 分别购自药店或药材市场, 样品信息见表 1, 均经北京中医药大学中药资源与鉴定系张媛教授鉴定为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥成熟花穗。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取迷迭香酸、异迷迭香酸苷、异槲皮苷、金丝桃苷、咖啡酸对照品适量, 置 5 mL 量瓶中, 分别加甲醇溶解并稀释至刻度, 制得各对照品母液; 精密吸取 5 种母液适量, 加甲醇稀释, 制成质量浓度为 408.800、122.500、30.360、17.544、29.104 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 夏枯草药材 (过 2 号筛) 约 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 回流提取 60 min, 放至室温, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -1% 醋酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 5%~11% A; 10~18 min, 11% A; 18~23 min, 11%~15% A; 23~33 min, 15% A; 33~46 min, 15%~22% A; 46~60

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	陕西	20190925	S32	贵阳	190101
S2	河北	190601CP257	S33	江苏	19031401
S3	安徽	2019031801	S34	江西	201809179
S4	山西	181001	S35	安国	19031401
S5	山西	D8020201	S36	陕西	180401
S6	安徽	181218	S37	安徽	20181201
S7	河北	20190303	S38	安徽	700002737
S8	江苏	51781201	S39	湖南	190907
S9	安徽	180101	S40	湖南	190601
S10	安徽	160101	S41	广东	20190607
S11	江西	P2019032614	S42	河南	20190506
S12	安徽	190201	S43	安徽	20181001
S13	安徽	190301	S44	江西	P2017031609
S14	安徽	19032202	S45	广西	20180401
S15	安徽	181101	S46	河南	190101
S16	江苏	190301	S47	安徽	20150701
S17	江苏	180401	S48	河南	190614
S18	安徽	1903310452	S49	江西	190101
S19	河南	20190201	S50	河南	190307
S20	湖北	181101	S51	江西	181201
S21	江西	1810009	S52	河南	17021008
S22	河南	160826002	S53	河南	20180801
S23	江苏	1708046	S54	安徽	93570101
S24	江苏	1904047	S55	江苏	17010501
S25	江苏	1708046	S56	河南	16080701
S26	江苏	1804033	S57	江苏	517181201
S27	河南	1802010	S58	安徽	80000063
S28	湖北	H80101	S59	河南	181157
S29	安徽	90000140	S60	江苏	1901052
S30	安国	18041311	S61	河南	1905005
S31	安徽	1903310452			

min, 22%~30% A; 60~85 min, 30%~45% A; 85~108 min, 45%~77% A; 108~120 min, 77%~100% A。体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 290 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μ L。

2.1.4 精密度试验 取夏枯草样品 (S30), 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下的色谱条件进样, 连续进样 6 次, 以 12 号峰 (迷迭香酸) 为参照峰, 测得 28 个共有色谱峰的相对保留时间的 RSD<2%, 相对峰面积的 RSD<3%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取夏枯草样品 (S30), 按照

“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0、4、8、12、18、24 h 进样, 以 12 号峰 (迷迭香酸) 为参照峰, 测得 28 个共有色谱峰的相对保留时间的 RSD<2%, 相对峰面积的 RSD<3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批 (S30) 夏枯草粉末 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下的色谱条件分别进样, 以 12 号峰 (迷迭香酸) 为参照峰, 测得 28 个共有色谱峰的相对保留时间的 RSD<2%, 相对峰面积的 RSD<3%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 指纹图谱的建立及相似度评价 选取 30 批 (S1~S30) 不同产地夏枯草, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下的色谱条件进样, 记录 30 批夏枯草色谱图, 将所有色谱图导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”进行评价, 将 S30 样品的图谱设定为参照图谱, 时间窗口设置为 0.5, 采用平均数法结合多点校正生成对照图谱, 并进行相似度评价, 得 30 批夏枯草 HPLC 指纹图谱, 见图 1, 共标定 28 个共有峰, 12 号峰为迷迭香酸, 该化合物具有较好的峰形, 峰面积最大, 且为夏枯草特征性成分, 故选 12 号峰为参照峰 (S), 计算并得到 30 批

夏枯草指纹图谱中各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2%, 说明所选 28 个共有峰有较高的吻合度, 保留时间稳定, 无明显差异, 但其相对峰面积相差较大, 说明 28 个共有峰所代表的化合物在不同市售夏枯草中的含量存在着较大差异。S1~S30 指纹图谱的相似度分别为 0.996、0.999、0.997、0.990、0.995、0.995、0.993、0.997、0.991、0.996、0.989、0.997、0.997、0.995、0.986、0.997、0.997、0.990、0.995、0.983、0.999、0.999、0.998、0.989、0.984、0.992、0.995、0.987、0.998、0.971, 30 批夏枯草的指纹图谱的相似度均在 0.970 以上, 表明 30 批夏枯草药材的整体质量相对稳定。

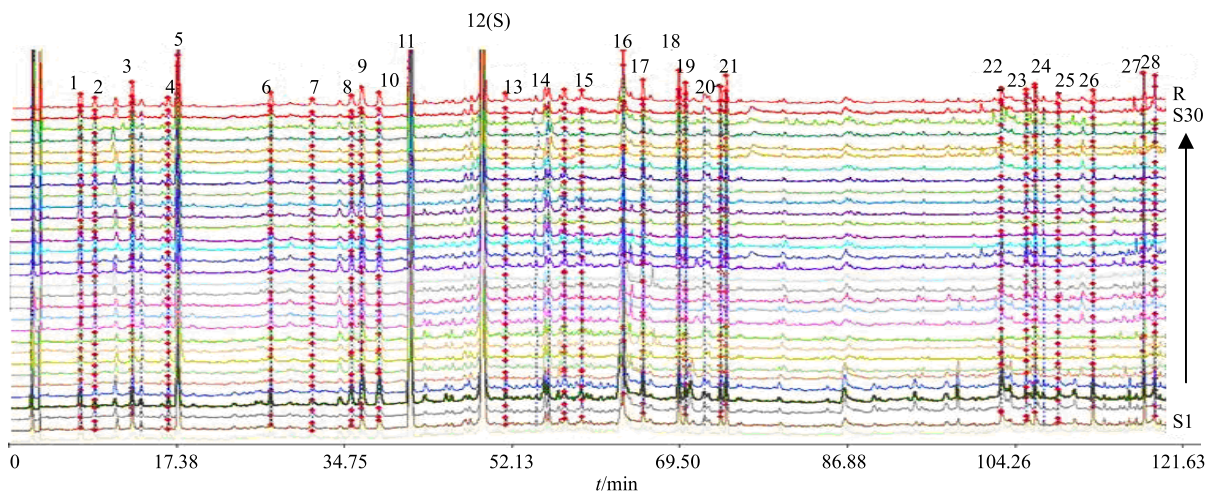


图 1 30 批夏枯草药材 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 Common HPLC specific chromatogram of 30 batches of *P. vulgaris*

2.1.8 主成分分析 (PCA) PCA 能够将原有多个指标数据转化为一组新的相互无关的几个综合变量 (主成分) 全面反映原始多个数据的信息。以 30 批夏枯草药材指纹图谱中的 28 个共有峰为变量, 运用 SPSS 22.0 数据处理软件对 30 批夏枯草指纹图谱进行 PCA, 根据特征值和贡献率选出主成分, 结

果见表 2。以特征值 > 1, 提取出的主成分有 8 个, 其累积贡献率为 85.02%, 包含了原有 30 批夏枯草指纹图谱的主要信息, 它们能够反映夏枯草的基本特征。载荷的绝对值越大, 对主成分的贡献越大, 矩阵结果见表 3, 第 1 主成分信息量最大, 峰 5、8~13、16 在第 1 主成分中有明显的载荷值, 峰 25、

表 2 特征值与方差贡献率

Table 2 Eigenvalue and contribution rate

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	8.481	30.289	30.289	8.481	30.289	30.289
2	3.998	14.280	44.568	3.998	14.280	44.568
3	3.566	12.735	57.303	3.566	12.735	57.303
4	2.381	8.505	65.808	2.381	8.505	65.808
5	1.739	6.211	72.019	1.739	6.211	72.019
6	1.350	4.821	76.840	1.350	4.821	76.840
7	1.225	4.375	81.215	1.225	4.375	81.215
8	1.065	3.805	85.020	1.065	3.805	85.020

表 3 初始因子载荷矩阵
Table 3 Initial factors loading matrix

峰号	主成分载荷							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.490	0.029	0.329	-0.484	0.284	0.277	0.151	0.353
2	0.250	0.133	0.892	0.030	0.043	0.007	-0.033	0.059
3	-0.400	0.092	0.655	0.022	0.191	0.044	-0.180	0.459
4	0.402	0.580	0.302	0.428	0.081	0.003	-0.155	0.178
5	0.740	0.297	0.107	-0.163	0.246	0.104	-0.055	-0.095
6	0.569	0.054	0.229	0.011	0.489	-0.248	0.277	-0.122
7	0.199	0.512	0.267	-0.083	0.123	0.314	-0.503	-0.264
8	0.775	-0.138	-0.486	-0.050	-0.104	-0.059	-0.004	0.206
9	0.867	-0.170	-0.237	-0.174	-0.197	-0.081	0.060	0.098
10	0.670	-0.192	0.241	0.104	-0.053	-0.133	-0.343	-0.098
11	-0.733	0.359	-0.106	0.196	0.183	0.255	0.166	0.136
12	0.774	0.117	-0.066	-0.009	0.477	0.042	-0.151	0.082
13	0.883	-0.111	0.173	-0.072	-0.038	0.153	0.030	0.058
14	0.667	-0.088	-0.121	-0.020	-0.334	0.324	-0.295	-0.064
15	0.373	-0.431	-0.011	0.094	-0.128	0.619	0.302	0.048
16	0.819	-0.063	-0.081	-0.283	0.081	-0.191	0.019	0.037
17	0.401	0.487	-0.399	-0.231	0.013	-0.233	0.269	0.317
18	0.338	0.427	-0.314	0.598	0.166	-0.144	-0.050	-0.150
19	0.104	0.404	0.515	0.332	-0.401	0.215	0.337	0.131
20	0.709	0.391	-0.029	0.421	-0.149	0.008	0.229	-0.107
21	0.748	0.353	-0.113	0.444	-0.150	0.049	0.175	-0.104
22	0.176	-0.535	-0.157	0.504	0.237	-0.186	-0.198	0.371
23	0.102	-0.346	0.575	0.106	-0.550	-0.221	-0.108	0.120
24	0.303	-0.301	0.637	-0.146	0.195	-0.112	0.263	-0.409
25	-0.115	-0.676	0.425	0.303	0.200	-0.154	0.238	-0.086
26	-0.681	0.532	-0.058	0.206	0.217	0.076	0.068	-0.011
27	0.132	-0.597	-0.055	0.648	0.137	0.065	-0.087	0.087
28	0.014	-0.625	-0.324	0.123	0.338	0.453	0.019	-0.080

28 在第 2 主成分中有明显的载荷值；峰 2、24 在第 3 主成分中有明显的载荷值，峰 27 在第 4 主成分中有明显的载荷值，峰 23 在第 5 主成分中有明显的载荷值，表明影响夏枯草药材质量差异性的是多个成分，而不是单一成分。利用 SIMCA 13.0 软件绘制 PCA 得分图，见图 2。由 PCA 得分图可知，30 批夏枯草样品明显分布于 2 个区域，表明 30 批夏枯草样品可以被分为 2 类。

2.1.9 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 为了进一步寻找上述 2 种类型批次之间产生差异性的主要标志物，采用 OPLS-DA 对夏枯草样品进行分析。

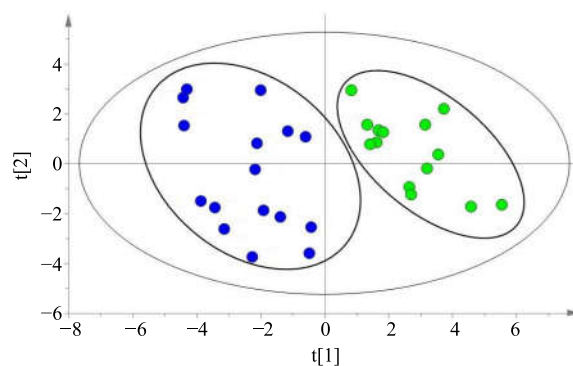
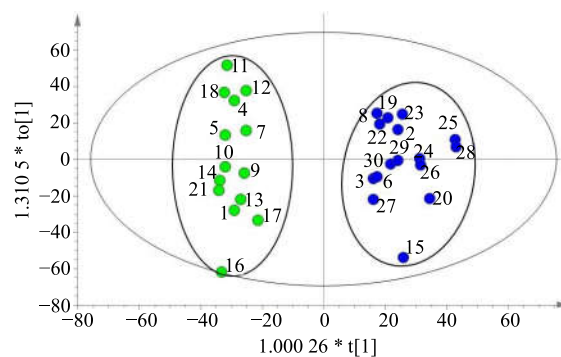


图 2 夏枯草 PCA 图

Fig. 2 PCA plots of 30 batches of *P. vulgaris*

将 30 批夏枯草样品的 28 个共有峰导入 SIMCA 13.0 软件中, 获得相应模型, 结果见图 3 和图 4。该 OPLS-DA 模型中, 累积解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.828 和 0.944, 预测能力参数 (Q^2) 为 0.843, 均大于 0.5, 说明所建立的模型稳定、可靠。由 OPLS-DA 得分图可知, 30 批夏枯草样品被很好地分为 2 类, 根据模型中变量权重重要性排序 (VIP) 预测值来筛选出具有统计学意义的差异标志物, 在 0.95 的置信区间内, 选出 $VIP > 1.0$ 的色谱峰为差异标志物, 峰 12、11、9、10、5 的 VIP 值分别为 3.42、2.83、1.38、1.28、1.12, 均大于 1。因此, 由 OPLS-DA 结果可知, 峰 12、11、9、10、5 可作为鉴别和区分夏枯草质量的标志物。



1~30-代表样品 S1~S30

1—30-means samples S1~S30

图 3 夏枯草的 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA scores plots of 30 batches of *P. vulgaris*

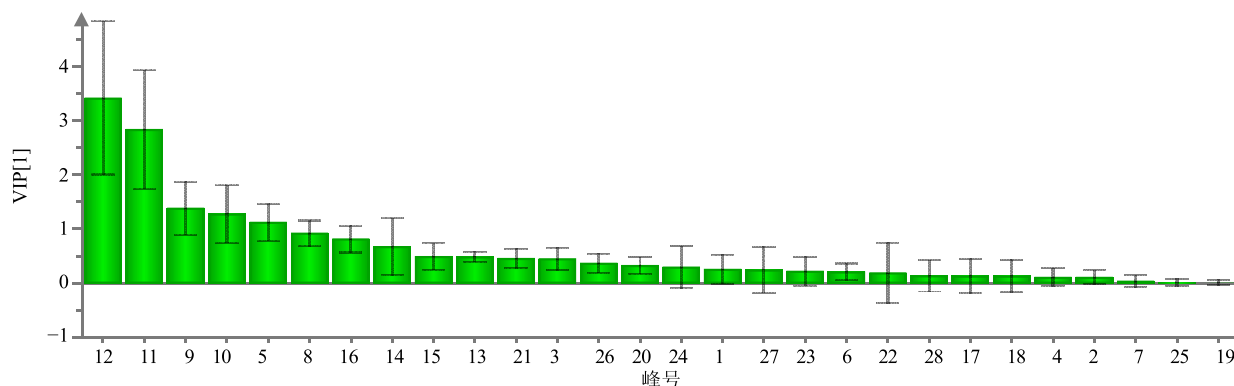


图 4 VIP 值

Fig. 4 VIP plot

2.2 质量标志物含量测定

上述指纹图谱结合化学模式识别技术筛选出了夏枯草的 5 个质量标志物, 分别为咖啡酸 (5 号峰)、金丝桃苷 (9 号峰)、异槲皮苷 (10 号峰)、异迷迭香酸苷 (11 号峰) 和迷迭香酸 (12 号峰), 以该 5 个质量标志物为指标, 建立测定方法。

2.2.1 对照品溶液的制备 同“2.1.1”项下方法。

2.2.2 供试品溶液的制备 取夏枯草药材粉末 (过 2 号筛) 约 0.25 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 滤过, 减压回收溶剂, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈 (A) -1% 醋酸水溶液 (B), 按“2.1.3”项方法梯度洗脱 53 min, 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 330 nm

和 350 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。在上述色谱条件下, 对照品溶液和供试品溶液色谱图见图 5。

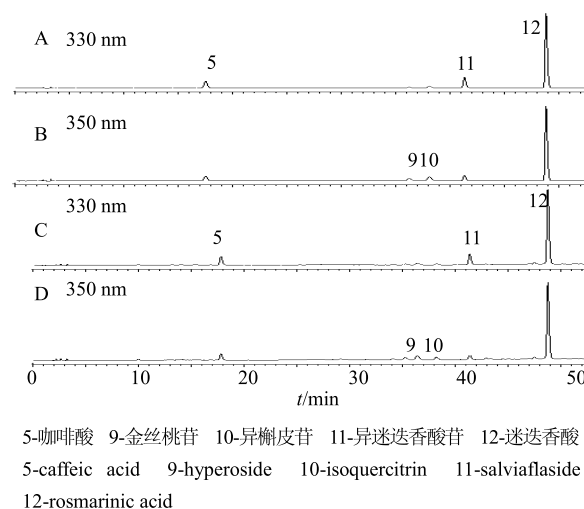


图 5 混合对照品 (A、B) 和夏枯草样品 (C、D) 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of mixed references substance (A, B) and *P. vulgaris* sample (C, D)

2.2.4 线性关系考察 精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得混合对照品溶液 2; 精密吸取 5 mL 混合对照品溶液 2, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度,

得混合对照品溶液 3; 重复以上步骤直至制得混合对照品溶液 5, 按“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 以进样量 (X) 为横坐标, 色谱峰峰面积 (Y) 为纵坐标, 分别绘制标准曲线并进行线性回归, 结果见表 4。

表 4 线性回归方程和相关系数

Table 4 Linear regression equation and correlation coefficient

化合物	线性回归方程	相关系数	线性范围/ μg
咖啡酸	$Y=5\,681\,842\,X+29\,935$	0.999 8	0.036 380~0.582 08
金丝桃苷	$Y=2\,041\,960\,X+2\,672$	0.999 4	0.021 930~0.350 88
异槲皮苷	$Y=2\,117\,140\,X+372$	0.999 9	0.037 950~0.607 20
异迷迭香酸苷	$Y=1\,737\,725\,X+23\,786$	0.999 9	0.153 125~2.450 00
迷迭香酸	$Y=3\,025\,188\,X+156\,286$	0.999 8	0.511 000~8.176 00

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一夏枯草供试品 (S_{30}) 溶液, 连续进样 6 次, 测定咖啡酸、金丝桃苷、异槲皮苷、异迷迭香酸苷和迷迭香酸色谱峰峰面积, 分别计算 RSD。咖啡酸、金丝桃苷、异槲皮苷、异迷迭香酸苷和迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 1.30%、1.61%、1.92%、1.15%、0.59%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一批夏枯草粉末 (S_{30}), 按“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 测定咖啡酸、金丝桃苷、异槲皮苷、异迷迭香酸苷和迷迭香酸色谱峰峰面积, 分别计算平均质量分数和 RSD。咖啡酸、金丝桃苷、异槲皮苷、异迷迭香酸苷和迷迭香酸的平均质量分数分别为 0.020 9%、0.015 0%、0.009 8%、0.101 6%、0.262 7%, RSD 分别为 1.28%、2.30%、2.37%、0.69%、0.83%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取同一夏枯草供试品溶液 (S_{30}), 按“2.2.3”项下色谱条件分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测定咖啡酸、金丝桃苷、异槲皮苷、异迷迭香酸苷和迷迭香酸色谱峰峰面积, 分别计算 RSD。咖啡酸、金丝桃苷、异槲皮苷、异迷迭香酸苷和迷迭香酸的峰面积 RSD 分别为 1.18%、1.34%、1.91%、0.79%、0.50%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已测定的夏枯草粉末 6 份 (S_{30}), 每份约 0.125 g, 分别精密加入适量的对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 测定各化合物的峰面积, 计算咖啡酸、金丝桃苷、异槲皮苷、异迷迭香酸苷和迷迭香酸的平均加样回收率分别为 101.2%、99.37%、99.62%、101.6%、

99.12%, RSD 分别为 2.22%、2.20%、2.62%、1.91%、1.53%。

2.2.9 样品测定 将 61 批夏枯草按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.3”项下的色谱条件测定, 计算样品中咖啡酸、金丝桃苷、异槲皮苷、异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量, 结果见表 5, 咖啡酸的质量分数为 0.005 2%~0.052 0%, 金丝桃苷的质量分数为 0.006 4%~0.045 6%, 异槲皮苷的质量分数为 0.008 1%~0.036 7%, 异迷迭香酸苷的质量分数为 0.044 4%~0.168 7%, 迷迭香酸的质量分数为 0.202 1%~0.789 9%。PCA 和 OPLS-DA 分析已表明迷迭香酸和异迷迭香酸苷对区分夏枯草样品的贡献较大, 61 批夏枯草样品中异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量较高, 为夏枯草的质量控制提供参考。

3 讨论

3.1 提取方法的考察

指纹图谱研究中考察了不同提取方法 (超声和回流)、料液比 (15、20、25、30 倍) 等的提取效果, 以色谱峰数、分离度和基线平稳程度为主要指标, 确定甲醇为溶剂, 料液比为 1:20, 回流 60 min 为夏枯草指纹图谱最优提取条件; 含量测定中考察了不同提取方法 (超声和回流)、提取溶剂 (甲醇、70%甲醇、50%甲醇和 30%甲醇、) 提取溶剂倍数 (60、80、100、120 倍) 和提取时间 (30、60、90 min) 对指标性含量的影响, 根据含量测定的结果, 最终确定 100 倍 50%甲醇加热回流提取 60 min。

3.2 色谱条件的优化

考察了乙腈-水、乙腈-1%醋酸水溶液、甲醇-水, 甲醇-1%醋酸水溶液不同流动相对色谱峰分离

表 5 5 个成分含量测定结果
Table 5 Contents of five constituents

编号	质量分数/%					编号	质量分数/%				
	咖啡酸	金丝桃苷	异槲皮苷	异迷迭香酸苷	迷迭香酸		咖啡酸	金丝桃苷	异槲皮苷	异迷迭香酸苷	迷迭香酸
S1	0.041 6	0.022 6	0.013 1	0.147 1	0.419 0	S32	0.029 8	0.039 2	0.025 1	0.044 4	0.789 9
S2	0.023 9	0.031 8	0.008 6	0.068 3	0.488 6	S33	0.027 9	0.020 8	0.009 6	0.116 2	0.255 5
S3	0.019 8	0.011 6	0.008 1	0.104 6	0.256 8	S34	0.020 2	0.012 5	0.008 5	0.090 4	0.245 9
S4	0.020 0	0.031 7	0.022 1	0.097 4	0.405 6	S35	0.023 2	0.027 2	0.012 0	0.132 6	0.337 7
S5	0.022 9	0.026 2	0.016 7	0.111 4	0.291 5	S36	0.026 2	0.034 8	0.015 1	0.096 5	0.572 0
S6	0.028 9	0.013 8	0.008 5	0.161 7	0.282 9	S37	0.022 6	0.006 4	0.008 4	0.113 0	0.277 4
S7	0.025 0	0.031 6	0.015 2	0.100 3	0.358 6	S38	0.023 9	0.018 8	0.010 4	0.121 1	0.271 4
S8	0.023 7	0.017 9	0.012 3	0.118 8	0.250 4	S39	0.026 7	0.030 8	0.018 0	0.081 1	0.579 4
S9	0.027 2	0.045 6	0.029 6	0.101 6	0.380 2	S40	0.023 4	0.029 8	0.015 6	0.102 9	0.596 0
S10	0.052 0	0.037 9	0.017 4	0.160 7	0.536 6	S41	0.026 1	0.045 4	0.015 9	0.054 2	0.780 5
S11	0.027 4	0.026 5	0.013 0	0.094 4	0.390 5	S42	0.025 5	0.026 8	0.012 6	0.080 3	0.649 6
S12	0.005 2	0.011 9	0.036 7	0.161 0	0.410 1	S43	0.020 3	0.015 5	0.010 6	0.084 7	0.232 4
S13	0.023 3	0.022 7	0.008 8	0.093 9	0.278 0	S44	0.036 1	0.030 9	0.014 1	0.076 9	0.342 0
S14	0.024 4	0.025 6	0.009 8	0.091 4	0.298 0	S45	0.018 3	0.020 7	0.008 3	0.059 3	0.281 5
S15	0.017 4	0.009 7	0.008 4	0.112 9	0.205 6	S46	0.034 0	0.022 6	0.009 6	0.105 9	0.232 6
S16	0.022 6	0.022 0	0.014 4	0.097 7	0.222 5	S47	0.022 3	0.015 0	0.008 5	0.107 9	0.254 7
S17	0.021 5	0.024 8	0.010 2	0.088 0	0.260 1	S48	0.024 5	0.017 5	0.011 9	0.122 0	0.283 5
S18	0.026 6	0.024 6	0.011 4	0.088 5	0.407 8	S49	0.026 1	0.024 6	0.013 3	0.067 6	0.304 1
S19	0.019 5	0.013 0	0.009 6	0.165 8	0.266 0	S50	0.025 9	0.023 8	0.017 2	0.109 8	0.297 5
S20	0.020 5	0.008 2	0.008 3	0.144 6	0.204 9	S51	0.018 4	0.013 4	0.008 3	0.086 4	0.202 5
S21	0.022 4	0.031 8	0.017 4	0.123 5	0.266 9	S52	0.019 3	0.017 3	0.013 7	0.095 5	0.207 7
S22	0.012 8	0.008 2	0.008 5	0.106 9	0.202 1	S53	0.024 3	0.012 5	0.010 7	0.131 7	0.429 2
S23	0.020 3	0.015 8	0.010 7	0.144 4	0.295 8	S54	0.022 9	0.019 9	0.011 7	0.120 1	0.400 7
S24	0.021 5	0.011 1	0.008 5	0.155 1	0.230 6	S55	0.022 3	0.008 5	0.008 3	0.125 4	0.276 7
S25	0.020 3	0.015 8	0.010 4	0.144 3	0.295 5	S56	0.019 9	0.018 4	0.009 5	0.088 5	0.287 5
S26	0.017 4	0.008 5	0.008 7	0.146 1	0.270 5	S57	0.025 1	0.011 1	0.009 5	0.146 3	0.287 3
S27	0.018 7	0.009 5	0.008 4	0.120 8	0.214 3	S58	0.020 9	0.013 1	0.008 9	0.093 8	0.217 7
S28	0.026 5	0.031 6	0.012 2	0.106 6	0.369 8	S59	0.027 7	0.040 1	0.015 7	0.072 2	0.329 0
S29	0.016 0	0.006 4	0.008 3	0.168 7	0.202 4	S60	0.024 8	0.012 3	0.009 0	0.117 0	0.259 5
S30	0.019 9	0.015 6	0.009 7	0.109 6	0.268 6	S61	0.024 8	0.020 5	0.008 3	0.112 7	0.527 8
S31	0.022 5	0.012 6	0.008 7	0.112 5	0.276 2						

度的影响,通过对考察结果分析,选择乙腈-1%醋酸溶液为流动相,各色谱峰具有较好的分离度且保留时间较为合适。比较了不同检测波长下对指纹图谱的影响,290 nm 下色谱峰数量较多,分离度达到要求,最终选择 290 nm 为夏枯草指纹图谱的检测波长。

3.3 结果与讨论

本实验采用 HPLC 法建立了 30 批不同产地夏

枯草的指纹图谱,以 12 号峰迷迭香酸为参照峰(S),共确定了 28 个共有峰,30 批夏枯草的指纹图谱的相似度均在 0.970 以上,表明 30 批夏枯草药材的整体质量相对稳定,为了更好地辨识药材之间的质量差异,采用 PCA 和 OPLS-DA 分析,将 30 批夏枯草样品分成了 2 类,筛选出了 5 个差异性质量标志物,分别是迷迭香酸(12 号峰)、异迷迭香酸苷(11 号峰)、金丝桃苷(9 号峰)、异槲皮苷(10 号峰)、

咖啡酸(5号峰),可作为鉴别和区分夏枯草饮片质量控制指标,同时建立了HPLC测定夏枯草咖啡酸、金丝桃苷、异槲皮苷、异迷迭香酸苷、迷迭香酸含量的方法。

本研究采用HPLC法建立了不同批次夏枯草指纹图谱,首次采用指纹图谱结合PCA和OPLS-DA可快速筛选出不同批次夏枯草差异性质量标志物,并建立了含量测定方法。该方法能够有效、准确地评价不同批次夏枯草质量以及需关注的质量标志成分及含量,可为夏枯草的质量控制提供科学的方法与依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李超. 药食同源夏枯草多糖的分离纯化、结构鉴定及生物活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
- [3] Feng L, Au-Yeung W, Xu Y H, *et al.* Oleanolic acid from *Prunella vulgaris* L. induces SPC-A-1 cell line apoptosis via regulation of Bax, Bad and Bcl-2 expression [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 12(2): 403-408.
- [4] Fang X, Chang R C, Yuen W H, *et al.* Immune modulatory effects of *Prunella vulgaris* L. on monocytes/macrophages [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16(6): 1109-1116.
- [5] Li C, Huang Q, Fu X, *et al.* Characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Prunella vulgaris* L. [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 75: 298-305.
- [6] 许松日, 金光, 李文, 等. 夏枯草醇提取物对正常大鼠离体胸主动脉环的舒张作用 [J]. *四川中医*, 2010, 28(4): 52-54.
- [7] 黎梅桂, 魏刚, 黄敏怡. 夏枯草对肥胖小鼠糖脂代谢的影响 [J]. *北方药学*, 2016, 13(3): 118-120.
- [8] 范鹏莺. 夏枯草提取物对人乳头瘤病毒阳性宫颈癌细胞的凋亡作用 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(3): 388-393.
- [9] 林慧, 梅全喜, 林斌. 夏枯草抗大鼠细菌性阴道炎模型实验研究 [J]. *山西中医学院学报*, 2011, 12(1): 21-23.
- [10] Liang F, Jia X B, Jiang J, *et al.* Combination of active components enhances the efficacy of *Prunella* in prevention and treatment of lung cancer [J]. *Molecules*, 2010, 15(11): 7893-7906.
- [11] Yu H C, Xue R Z, Qiao S G, *et al.* Effects of UV-B radiation on the content of bioactive components and the antioxidant activity of *prunella vulgaris* L. spica during development [J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 989-999.
- [12] 冯伟红, 李春, 信伟梅, 等. 生物测定法用于中药质量评价的探索研究—以夏枯草抗氧化活性与总酚酸含量相关性的研究为例 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(14): 2660-2668.
- [13] 郝桂堂, 戴军, 陈尚卫, 等. 夏枯草多糖的分离、纯化及结构初步分析 [J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19: 591-594.
- [14] 方罗, 林能明, 吴永江. 高效液相色谱同时测定夏枯草药材中4种活性成分的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(5): 616-619.
- [15] 贾晓斌, 刘光敏, 封亮, 等. HPLC测定夏枯草中的芦丁和槲皮素 [J]. *华西药学杂志*, 2010, 25(1): 70-71.
- [16] 林丽美, 许招懂, 姚江雄, 等. 夏枯草中异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量测定 [J]. *中国药学杂志*, 2012, 47(15): 1204-1207.
- [17] 樊亚, 程贺丽. RP-HPLC法测定不同产地夏枯草中木犀草素的含量 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 52(16): 26-30.
- [18] 唐洁, 柏玉冰, 熊苏慧, 等. 不同产地夏枯草指纹图谱研究 [J]. *中南药学*, 2017, 15(8): 1025-1028.
- [19] 张俊侠, 马玉, 肖禾, 等. 不同产地夏枯草药材HPLC指纹图谱研究 [J]. *成都大学学报: 自然科学版*, 2013, 32(1): 20-23.
- [20] 许招懂, 姚江雄, 刘菊妍, 等. 夏枯草药材HPLC指纹图谱研究 [J]. *中药材*, 2012, 35(8): 1234-1237.
- [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.
- [22] 康建, 周霖, 孙志, 等. 基于UPLC指纹图谱结合化学模式识别的冠心丹参胶囊质量控制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(17): 4051-4057.