

HPLC 特征图谱结合化学计量学评价独一味药材及其与独一味胶囊的一致性

张燕琴¹, 潘伟男¹, 姚蓉¹, 阎敏², 陈锋^{2*}

¹湖南食品药品职业学院药系, 长沙 410208; ²中南大学湘雅医院药剂科, 长沙 410008

摘要: 采用 HPLC 方法建立独一味药材及独一味胶囊的特征指纹图谱, 运用相似度评价药材质量; 并结合化学计量学对独一味药材进行分类, 以相对保留时间对独一味药材和独一味胶囊进行成分一致性评价。结果显示, 独一味药材含共有峰 23 个, 独一味胶囊含共有峰 24 个; 10 批独一味药材的相似度均大于 0.85, 可见药材来源较为单一; 同时结合化学计量学中聚类分析和主成分分析对 10 批药材进行分类, 可将其分为 4 类, 且分类结果一致, 可见以该法评价独一味药材可行; 并对以同一 HPLC 特征图谱方法建立的独一味药材及独一味胶囊特征图谱进行比较, 可知独一味胶囊很好的保留了独一味药材的诸多药效成分。

关键词: 独一味药材; 独一味胶囊; 特征图谱; 化学计量学; 一致性

中图分类号: R284

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.2.013

Evaluation of Consistence between *Lamiophlomis rotata* and Its Capsule by HPLC Fingerprint Coupled with Chemometrics

ZHANG Yan-qin¹, PAN Wei-nan¹, YAO Rong¹, YAN Min², CHEN Feng^{2*}

¹Hunan Food and Drug Vocational College, Changsha 410208, China;

²Xiangya Hospital Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: The fingerprint of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo and its capsule was established and its equality was evaluated by similarity. There was 23 common peaks of *L. rotata* and 24 common peaks of its capsule. Similarity of 10 batches of *L. rotata* was more than 0.85. Ten batches of *L. rotata* was classified to 4 kinds by chemometrics and the results were same so that it was workable. By comparing with fingerprint of *L. rotata* and its capsule which was analyzed by the same methods, the results showed most of the medicinal composition of *L. rotata* were reserved in its capsule.

Key words: *Lamiophlomis rotata*; capsule of *Lamiophlomis rotata*; fingerprint; chemometrics; consistency

独一味^[1]是唇形科植物独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 的干燥地上部分, 系藏族习用药; 味甘、苦, 性平; 归肝经; 具有活血止血, 祛风止痛的功效, 用于跌打损伤、外伤出血、风湿痹痛、黄水病。本品同时是蒙古族、纳西族等民族民间用于止血镇痛、活血化瘀、补髓、行气、续筋接骨的常用药^[2]。

经过文献检索, 独一味含有环烯醚萜苷类、黄酮类、苯乙醇苷类等化学成分^[3]。有药效学研究表明, 环烯醚萜苷类成分(尤其以药典含量测定成分山柽苷甲酯和 8-O-乙酰山柽苷甲酯)是独一味止

血、镇痛、抗炎的活性成分^[2-5]; 同时, 有关海南民族药黎药—裸花紫珠的研究文献^[6]显示, 其所含黄酮苷及苯乙醇苷类成分(如木犀草苷、连翘酯苷 B、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷等)均为其抗菌消炎的活性成分; 再者, 根据文献整合发现, 独一味药材中含有咖啡酸等有机酸类成分, 而咖啡酸^[7]具有抗凝血及增强凝血的双向调节作用; 因此, 独一味药材具有的药效与其所含丰富的化学成分种类紧密相关。

目前以独一味入药的中成药单味制剂主要有独一味片、独一味胶囊、止血镇痛胶囊等^[1,8]。由 2015 年版中国《药典》中独一味片、独一味胶囊及国家药品标准中止血镇痛胶囊的制备工艺可知, 三者均是以水提取及浓缩为生产工艺。众所周知, 以水提法对中药进行提取能够最大程度的保留有效成分且接近传统中医用药习惯。因此, 在以 2015 年版中国

《药典》对独一味药材、独一味胶囊中环烯醚萜苷类成分进行含量测定及薄层鉴别的指导下,本实验设计了从独一味药材至独一味胶囊的成分一致性评价。本文以同一特征图谱分析方法,建立了独一味药材及独一味胶囊的特征图谱,分析了尽可能多的共有特征峰(包含胡麻属苷、咖啡酸、山梔苷甲酯、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯、毛蕊花糖苷、木犀草苷、马钱苷、连翘酯苷 B);同时以相对保留时间对独一味药材和独一味胶囊进行一致性评价,可知独一味胶囊很大程度上保留了独一味药材止血、镇痛、抗炎的有效成分。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪,SPD-20A 检测器,SPDM-20A 检测器,Labsolution 色谱工作站(日本岛津公司);色谱柱:Kromasil 100-5C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, ANZO NOBEL 公司);水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司);Milli-Q 纯水系统(美

国 Millipore 公司);AY220 万分之一电子天平(日本岛津公司)。

1.2 试剂与试药

甲醇(AR、色谱纯,国药集团化学试剂有限公司),乙醇(AR,国药集团化学试剂有限公司),乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司),磷酸(AR,国药集团化学试剂有限公司),水为超纯水。胡麻属苷(16061412,成都普菲德生物技术有限公司),咖啡酸(110885-200102,中国生物制品检定研究所);山梔苷甲酯、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯(成都曼斯特生物科技有限公司,纯度均大于 97%);木犀草苷(111720-201408,中国食品药品检定研究院);毛蕊花糖苷(111530-201310,中国食品药品检定研究院);马钱苷(11640-200502,含量测定用,中国药品生物制品鉴定所);连翘酯苷 B(111811-201102)。独一味药材为中药材市场购买,来源具体见表 1。独一味胶囊为购买的市售产品,生产厂家为甘肃独一味生物制药有限责任公司。

表 1 独一味样品来源
Table 1—Origins of *L. rotata*

编号 Sample	药材 Medicinal material	产地 Origin	编号 Sample	药材 Medicinal material	产地 Origin
S1	独一味 <i>L. rotata</i>	四川阿坝县 Aba, Sichuan	S6	独一味 <i>L. rotata</i>	四川理塘县 Litang, Sichuan
S2	独一味 <i>L. rotata</i>	四川阿坝县 Aba, Sichuan	S7	独一味 <i>L. rotata</i>	四川理塘县 Litang, Sichuan
S3	独一味 <i>L. rotata</i>	四川阿坝县 Aba, Sichuan	S8	独一味 <i>L. rotata</i>	四川巴塘县 Batang, Sichuan
S4	独一味 <i>L. rotata</i>	四川雅江县 Yajiang, Sichuan	S9	独一味 <i>L. rotata</i>	四川巴塘县 Batang, Sichuan
S5	独一味 <i>L. rotata</i>	四川雅江县 Yajiang, Sichuan	S10	独一味 <i>L. rotata</i>	甘肃陇南 Longnan, Gansu

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相:乙腈(A)-0.4% 磷酸溶液(B);梯度洗脱,0 ~ 15 min, 97% A; 15 ~ 20 min, 97% ~ 96% A; 20 ~ 30 min, 96% ~ 93% A; 30 ~ 50 min, 93% A; 50 ~ 52 min, 93% ~ 90% A; 52 ~ 66 min, 90% ~ 88% A; 66 ~ 72 min, 88% ~ 85% A; 72 ~ 80 min, 85% ~ 83% A; 80 ~ 90 min, 83% ~ 82% A; 90 ~ 95 min, 82% ~ 79% A。流速 1.0 mL/min, 检测波长 235 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取山梔苷甲酯、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯、胡麻属

苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、连翘酯苷 B、咖啡酸、马钱苷适量置于容量瓶中,精密称定,加甲醇溶解定容至刻度,制成对照品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即可。

2.3 供试品溶液的制备

取独一味药材或独一味胶囊细粉约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 30% 甲醇 25 mL,称定重量,回流 60 min,放冷后补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜即可。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

取按“2.3”项下制备的同一份独一味胶囊供试品溶液,按“2.1”项下连续进样 6 次,测得各共有峰的相对保留时间 RSD 小于 0.42%、相对峰面积 RSD

均小于 2.51%。

取按“2.3”项下制备的同一份独一味药材供试品溶液,按“2.1”项下连续进样 6 次,测得各共有峰的相对保留时间 RSD 小于 0.35%、相对峰面积 RSD 均小于 2.85%。

说明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取同一批独一味胶囊样品,分别按“2.3”项下制备方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下分别进样,测得各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.21%、相对峰面积 RSD 均小于 3.12%;取同一批独一味药材样品,分别按“2.3”项下制备方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下分别进样,测得各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.37%、相对峰面积 RSD 均小于 3.24%。表明独一味药材与独一味胶囊应用该法重复性均较好。

2.4.3 稳定性试验

取按“2.3”项下制备的同一份独一味胶囊供试品溶液,按“2.1”项下分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样测定,测得的各共有峰相对保留时间 RSD 均小于

0.42%、相对峰面积 RSD 均小于 3.11%;取按“2.3”项下制备的同一份独一味药材供试品溶液,按“2.1”项下分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样测定,测得的各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.55%、相对峰面积 RSD 均小于 2.90%。表明独一味胶囊和独一味药材供试品溶液在 24 h 内较为稳定。

2.5 样品测定

2.5.1 独一味胶囊

取 11 批独一味胶囊样品,按“2.3”项下制备供试品溶液,依照“2.1”项下的色谱条件依次进行分析,记录色谱图,共获得 24 个共有峰,指认其中 8 个共有峰,分别为胡麻属苷(11 号峰)、咖啡酸(12 号峰)、山柽苷甲酯(13 号峰)、马钱苷(16 号峰)、8-O-乙酰山柽苷甲酯(19 号峰)、连翘酯苷 B(21 号峰);木犀草苷(22 号峰)、毛蕊花糖苷(23 号峰)。独一味胶囊 HPLC 对照指纹图谱见图 1A,独一味药材对照图谱见图 1B,对照品图谱见图 1C₁、1C₂。

2.5.2 独一味药材

取 10 批独一味药材样品,按“2.3”项下制备供试品溶液,依照“2.1”项下的色谱条件依次进行分

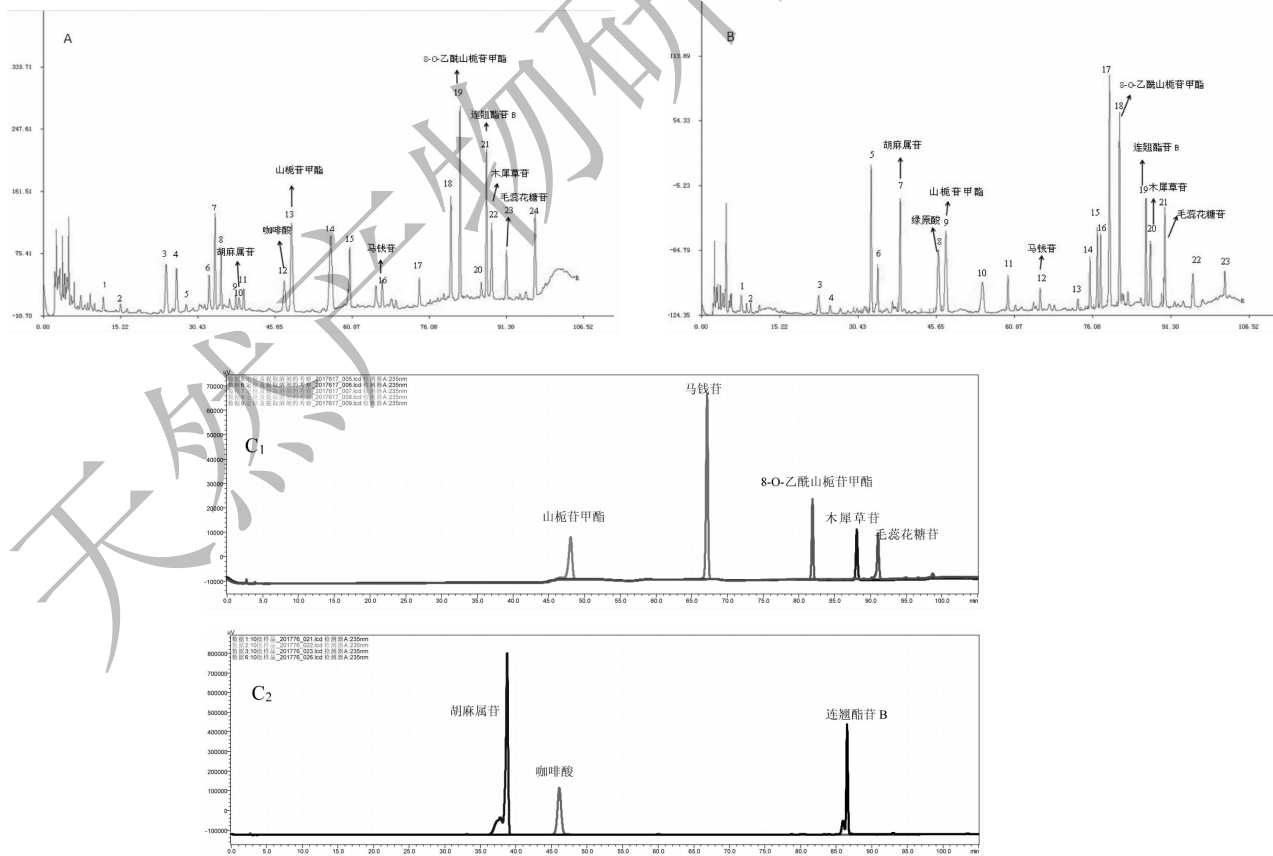


图 1 独一味胶囊 (A)、独一味药材 (B) 及混合对照品 (C₁、C₂) 的 HPLC 特征图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of capsule of *L. rotata* (A), *L. rotata* (B), and mixed standards (C₁, C₂)

析,记录色谱图,共获得 23 个共有峰,指认其中 8 个共有峰,分别为胡麻属苷(7 号峰)、咖啡酸(8 号峰)、山柽苷甲酯(9 号峰)、马钱苷(12 号峰)、8-*O*-乙酰山柽苷甲酯(18 号峰)、连翘酯苷 B(19 号峰);木犀草苷(20 号峰)、毛蕊花糖苷(21 号峰)。

2.6 特征指纹图谱的建立

2.6.1 参比峰的选择

在各批次样品图谱中 8-*O*-乙酰山柽苷甲酯的色谱峰(18 号峰)分离良好,峰面积较大且为所有样品共有,所以确定 8-*O*-乙酰山柽苷甲酯为内参比峰。

2.6.2 11 批独一味胶囊及 10 批药材特征图谱的建立及相似度评价

2.6.2.1 独一味胶囊

采用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,输入 11 批独一味胶囊液相图谱的 CDF 文件,以第 2 批胶囊的特征图谱作为参照图谱,经中位数法进行多点校正,对色谱峰进行自动匹配生成样品的色谱特征图谱共有模式,见图 2;并进行相似度计算,以建立的标准图谱为参考,各相似度结果见表 2。分析结果显示 10 批药材相似度均 >0.90。说明独一味胶囊生产工艺较为稳定可靠。

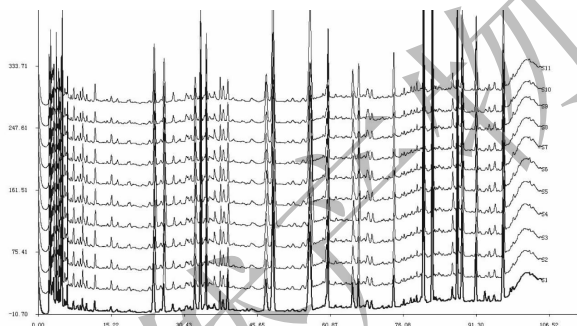


图 2 11 批独一味胶囊特征图谱

Fig. 2 Fingerprint of 11 batches of capsule of *L. rotata*

表 2 11 批独一味胶囊相似度评价

Table 2 Results of similarity evaluation of 11 batches of samples

编号 Sample	相似度 Similarity	编号 Sample	相似度 Similarity
S1	0.915	S7	0.931
S2	0.997	S8	0.946
S3	0.903	S9	0.905
S4	0.952	S10	0.932
S5	0.941	S11	0.913
S6	0.955		

2.6.2.2 独一味药材

采用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,输入 10 批独一味药材液相图谱的 CDF 文件,以第 5 批药材的特征图谱作为参照图谱,经中位数法进行多点校正,对色谱峰进行自动匹配生成样品的色谱特征图谱共有模式,见图 3;并进行相似度计算,以建立的标准图谱为参考,各相似度结果见表 3。分析结果显示 10 批药材相似度均 >0.85。说明独一味药材来源较为稳定、一致。

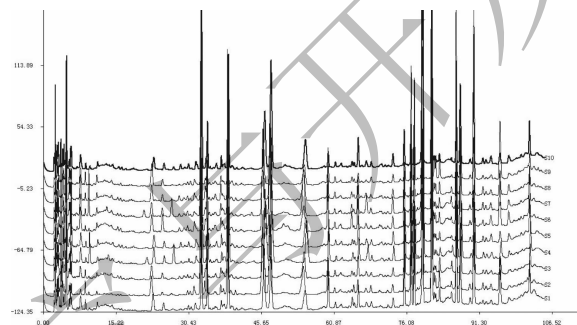


图 3 10 批独一味药材特征图谱

Fig. 3 Fingerprint of 10 batches of *L. rotata*

表 3 10 批独一味药材相似度评价

Table 3 Results of similarity evaluation of 10 batches of *L. rotata* samples

编号 Sample	相似度 Similarity	编号 Sample	相似度 Similarity
S1	0.859	S6	0.946
S2	0.957	S7	0.940
S3	0.891	S8	0.966
S4	0.981	S9	0.908
S5	0.992	S10	0.895

2.6.3 对独一味药材的聚类分析

对 10 批独一味药材进行系统聚类分析,应用 SPSS 20.0 软件,采用组间连接法以平方欧氏距离(Euclidean metric)作为样品的分类依据。聚类分析结果见图 3,由结果可知:10 批样品可分为 4 类,样品 4、5、7、8 为一类,样品 1、2、3、9 为一类,样品 6 为一类,样品 10 为一类。

2.6.4 对独一味药材的主成分分析(PCA)

采用 SPSS 20.0 软件分别以共有峰的峰面积作为数据源对 10 批药材进行主成分分析,KNO 检验值为 0.722,Bartlett's 检验均为 $P < 0.05$,表明独一味药材所得数据适于主成分分析,提取 PC1(未知共

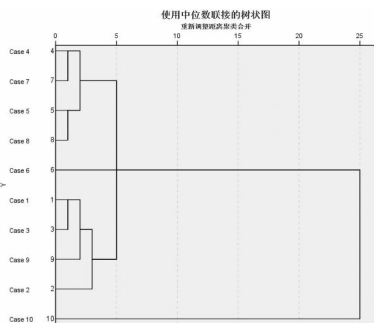


图4 10批样品聚类分析

Fig. 4 Hierarchical clustering analysis of 10 batches of samples

有峰18号峰)、PC2(8-O-乙酰山柃苷甲酯)2个主成分,可知总方差累计贡献率可达89.705%。以PC1、PC2作为坐标系,进行投影得到的所有样本主成分分析平面图见图5。结果显示10批独一味样品可以分为4类,与聚类分析结果一致。

2.7 独一味药材与独一味胶囊成分一致性评价

独一味胶囊是独一味药材的单味药制剂,以

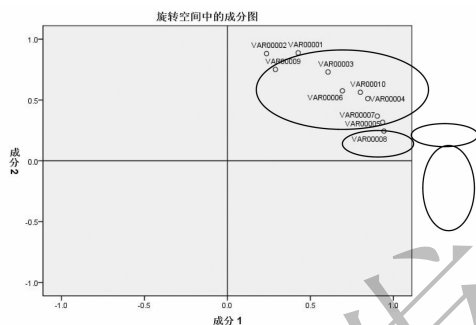


图5 10批样品主成分分析

Fig. 5 Principal component analysis of 10 batches of samples

中国药典控制的主要生产工艺即为水提。本法以30%甲醇的溶剂进行提取,极性与水极为相近。以该法对独一味药材及独一味胶囊建立的标准图谱进行对比,得到二者的特征图谱极为相近,以二者进行相似度匹配,可知二者共有峰有21个,见图6。对二者的21个以相对保留时间进行比较,可知二者SD相差较小(均小于2%),见表4。

表4 独一味药材与独一味胶囊标准图谱中共有峰相对保留时间对比

Table 4 Comparison on RRT of common peaks of fingerprints of *L. rotata* and its capsule

色谱峰号 Sample	SD (%)	药材 Medicinal material	胶囊 Capsule	色谱峰号 Sample	SD (%)	药材 Medicinal material	胶囊 Capsule
1	0.34	0.145	0.146	12	0.29	0.683	0.687
2	0.34	0.291	0.293	13	0.06	0.811	0.812
3	0.16	0.316	0.317	14	0.77	0.914	0.900
4	0.25	0.394	0.396	15	0.51	0.976	0.986
5	0.12	0.410	0.409	16	0	1	1
6	0	0.425	0.425	17	0.10	1.050	1.048
7	1.36	0.436	0.448	18	0.09	1.062	1.060
8	0.11	0.466	0.467	19	0.05	1.074	1.073
9	0.10	0.479	0.480	20	0.14	1.111	1.108
10	0.19	0.514	0.516	21	0.17	1.181	1.177
11	0.08	0.593	0.594				

3 讨论与结论

本实验使用DAD检测器以全波长扫描法对独一味药材及独一味胶囊进行检测,其在235 nm下吸收较佳,检测到最多的色谱峰。参照2015年版中国药典一部中独一味药材及独一味胶囊的提取方法,以30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇分别对其进行提取,经分析得到,30%甲醇提取时能够检测到最多色谱峰,且在同一色谱条件下分离度最佳。同时

考察了超声、回流1 h对提取率的影响,发现以超声法制备的供试品检测到的成分较少,以回流法对其进行制备的供试品检测到较多成分;在此基础上对回流时间进行考察,发现回流30 min时提取率较差;回流90 min时,同一特征性成分较60 min时含量高,但是考虑本实验主要用于定性,故选择回流时间60 min。以乙腈-0.4%磷酸为基础试剂进行梯度调整,得到最佳的梯度程序,以其进行分析得到的色谱图分离度最佳、基线最为平稳。独一味药材及独

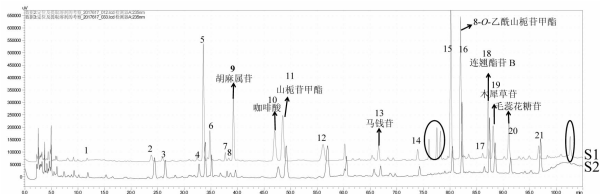


图6 独一味药材(S1)及独一味胶囊(S2)对比图谱

Fig. 6 HPLC chromatograms of *L. rotata* (S1) and capsule of *L. rotata* (S2)

一味胶囊以该法进行精密度、稳定性、重复性考察,三者RSD均小于3%,可见以该法对二者以特征指纹图谱评价质量可行。通过确立的方法建立10批独一味药材特征图谱,得到共有峰23个,其相似度均大于0.85,可知药材来源较为单一,各地药材质量相差不大;建立11批独一味胶囊特征图谱,得到共有峰24个,其相似度均大于0.9,可知独一味胶囊生产工艺稳定均一、可靠。以聚类分析和主成分分析对独一味药材进行分类,二者均将10批独一味药材分为四类,且分类结果一致,可见以二者对其进行分析是可行的。

由对比图谱可知,独一味胶囊较完整的保留了独一味药材的多数成分,二者共有峰共有21个,且完整保留了本文控制的8个指标性成分。在分离度较好的单个色谱峰中,独一味药材有4个色谱峰(对比图谱中圈出来的4个)在制剂成独一味胶囊的过程中发生了变化或转移,未能得到保留,但是尚未能对其成分进行指证;在之后的研究中,重点将对独一味药材及独一味胶囊中20余个色谱峰中剩余的成分指认更多色谱峰,尤其将对4个在提取过程中损失的成分进行定性,为成药前后该4个成分对药效的影响研究提供依据。

(上接第211页)

- 19 Yua CH, Tang WZ, Peng C, *et al.* Diuretic, anti-inflammatory, and analgesic activities of the ethanol extract from *Cynoglossum lanceolatum* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139: 149-154.
- 20 Liu TS(刘陶世), Zhao XH(赵新慧), Duan JA(段金廛), *et al.* Study on anti-inflammatory and analgesic action of total glucosides from Shaoyao Gancào decoction and its compound mechanism [J]. *Tradit Chin Drug Res Pharm* (中药新药与临床药理), 2007, 18: 427-430.

参考文献

- Chinese pharmacopoeia commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015, Vol I, 262.
- Yuan T(袁涛), Wang S(王森), Dun Z(顿珠), *et al.* Research progress of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo from Tibetan medicine. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2014, 36: 1958-1961.
- Fei ZP(费正平), Li MX(李茂星), Zhang RX(张汝学), *et al.* Research on hemostatic fraction of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo. *Pharm J Chin People's Liberation Army* (解放军药理学学报), 2005, 21: 272-274.
- Zheng YN(郑亚男), Du WJ(杜文杰), Yin XF(尹雪霏), *et al.* Comparison of effect on anti-inflammatory and analgesia from different active fraction of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2015, 26: 282-284.
- Zhang QL(张泉龙), Qiu JG(邱建国), Li MX(李茂星), *et al.* Research on external use on analgesia of iridoid glycoside from *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo [J]. *Herald Med* (医药导报), 2011, 30: 877-879.
- Feng SX(冯世秀), Zhang M(张旻), Yi B(易博), *et al.* Progress of pharmacological activity and chemical component of *Callicarpa nudiflora* Hook. Et Am [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48: 1015-1026.
- Zhu XL(祝晓玲), Mou JX(牟金香), Ren HY(任海义), *et al.* Effect of coagulation on rat caused by leukopenia and thrombopenia by caffeic acid [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2014, 30(1): 46-48.
- Capsule for analgesia and hemostasis, National Standards of drugs of State food and drug administration (国家食品药品监督管理局国家药品标准), WS-10006 (ZD-0006)-2004-2012Z.
- Cheng W(程薇), Zhao SY(赵淑英), Niu X(牛欣). Effects of outside using extractive of Kusnezoff Monkshood root on engorgement in rat's Voix Pedis [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2011, 29: 284-286.
- Wang RG(王瑞国), Zheng LP(郑良朴), Lin JM(林久茂), *et al.* Experimental study on inhibitive effect and mechanism of *Phyllanthus emblica* on the formation of cotton ball granuloma in rats [J]. *J Fujian Coll Tradit Chin Med* (福建中医学院学报), 2007, 17(4): 22-24.