

HPLC 波长切换法同时测定广藿香配方颗粒中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和广藿香酮的含量

甄亚钦^{1,2}, 田伟^{1,2}, 王迎春^{1,2}, 姜国志^{2,3}, 牛丽颖^{1,2}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050091; 2. 河北省中药配方颗粒工程技术研究中心, 河北省高校中药配方颗粒应用技术研发中心, 石家庄 050091;
3. 神威药业集团有限公司, 石家庄 051430)

[摘要] 目的:建立广藿香配方颗粒中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和广藿香酮的含量测定方法,为其质量标准的研究提供依据。方法:采用高效液相色谱法。Wondasil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长分别为325 nm(0~18 min,咖啡酸),330 nm(18~30 min,毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷),311 nm(30~55 min,广藿香酮),柱温30℃。结果:广藿香配方颗粒中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和广藿香酮进样量分别在0.021 8~0.218 μg($r=0.999\ 8$),0.032 6~0.326 μg($r=0.999\ 8$),0.099 4~0.994 μg($r=0.999\ 7$),0.174 2~1.742 μg($r=0.999\ 9$)与峰面积呈良好的线性关系,供试品溶液中4种被测指标成分在24 h内稳定性良好,平均加样回收率分别为98.85%,99.53%,99.37%,100.58%,RSD分别为1.9%,1.1%,1.4%,2.0%。结论:该方法同时测定了广藿香配方颗粒中非挥发性成分咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和挥发性成分广藿香酮的含量,方法可行,重复性好,准确度高,可以为广藿香配方颗粒的质量控制提供方法参考。

[关键词] 广藿香配方颗粒; 波长切换; 咖啡酸; 毛蕊花糖苷; 异毛蕊花糖苷; 广藿香酮

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0079-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110079

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170309.1013.032.html>

[网络出版时间] 2017-03-09 10:13

Simultaneous Determination of Caffeic Acid, Acteoside, Isoacteoside and Pogostone in Pogostemonis Herba Formula Granules by HPLC with Changing Wavelength

ZHEN Ya-qin^{1,2}, TIAN Wei^{1,2}, WANG Ying-chun^{1,2}, JIANG Guo-zhi^{2,3}, NIU Li-ying^{1,2}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China;

2. Hebei Traditional Chinese Medicine (TCM) Formula Granule Engineering & Technology Research Center, TCM Formula Granule Research Center of Hebei Province University, Shijiazhuang 050091, China;

3. Shineway Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang 051430, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method to simultaneously determine the content of caffeic acid, acteoside, isoacteoside and pogostone in Pogostemonis Herba formula granules, in order to provide basis for studying its quality standards. **Method:** An HPLC method was developed. Wondasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used and eluted with mobile gradient of 0.1% phosphoric acid-acetonitrile at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The wavelength were set at 325 nm (0-18 min, caffeic acid), 330 nm (18-30 min, acteoside and isoacteoside), and 311 nm (30-55 min, pogostone). The column temperature was 30℃. **Result:** The good linear

[收稿日期] 20160818(023)

[基金项目] 河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2015001)

[第一作者] 甄亚钦, 硕士, 助理实验师, 从事中药质量控制研究, Tel:0311-89926571, E-mail:zhenyaqin@126.com

[通讯作者] *牛丽颖, 硕士, 教授, 从事中药质量与药效物质基础研究, Tel:0311-89926548, E-mail:niuliyinggy@163.com

relationships between the concentration and peak area were between 0.021 8-0.218 μg ($r=0.999\ 8$) for caffeic acid, 0.032 6-0.326 μg ($r=0.999\ 8$) for acteoside, 0.099 4-0.994 μg ($r=0.999\ 7$) for isoacteoside acid and 0.174 2-1.742 μg for pogostone ($r=0.999\ 9$), respectively. The four tested indicators of sample solutions were steady within 24 h. The average recoveries were 98.85%, 99.53%, 99.37%, 100.58%, with RSD of 1.9%, 1.1%, 1.4%, 2.0%, respectively. **Conclusion:** Caffeic acid, acteoside, isoacteoside and pogostone were determined by this method simultaneously. The method is feasible and accurate with a good reproducibility, and can provide a reference for quality control.

[**Key words**] Pogostemonis Herba formula granule; changing wavelength; caffeic acid; acteoside; isoacteoside; pogostone

广藿香为唇形科植物广藿香 *Pogostemon cablin* 的干燥地上部分,具有芳香化浊、和中止呕、发表解暑的功效,用于湿浊中阻、脘痞呕吐、暑湿表证、湿温初起、发热倦怠、胸闷不舒、寒湿闭暑、腹痛吐泻、鼻渊头痛^[1]。广藿香主产于广东、海南、广西、台湾、云南等地^[2]。广藿香配方颗粒是以符合炮制规范的广藿香饮片为原料,经现代化的提取、浓缩、干燥、制粒等制剂工艺加工而成。配方颗粒突破了传统中药饮片煎煮的应用形式,具有免煎易服、作用迅速、成分完全、安全卫生、携带方便等优点,可以替代中药饮片在临床上使用,并且越来越受到广大患者的欢迎^[3-5]。

挥发油被普遍认为是广藿香的主要有效成分,因此广藿香有效成分及质量控制方法的研究,多集中于挥发油部分^[6-8],对于非挥发性成分的研究较少^[9-10]。研究表明,广藿香水溶性成分能够通过抑制胃肠运动机能达到解痉作用,消除消化系统症状,并有镇痛和止泻作用,更能发挥广藿香“芳香化湿、和胃止呕、发表解暑”的功效^[11-14]。广藿香的传统用药方式为水煎剂,因此广藿香的有效成分应包括挥发性成分和水溶性成分。广藿香酮是广藿香挥发油中主要的活性成分,现代药理研究表明,广藿香酮具有抗真菌(尤其是抗白色念珠菌),杀虫等作用^[15]。课题组前期对广藿香水提物化学成分进行研究,分离得到多种化合物,其中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷含量较高。现代研究表明,咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷具有抗炎、抗菌、抗病毒、免疫调节等多种药理作用^[16-17]。

本实验采用 HPLC 波长切换法建立了同时测定广藿香配方颗粒中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和广藿香酮含量的方法,可全面控制颗粒中水溶性和挥发性指标成分的含量,为广藿香配方颗粒质量全面、有效地控制提供方法参考和科学依据。

1 材料

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(低压三元梯度泵,自动进样器,DAD 检测器,变色龙色谱工作站,美国赛默飞公司),Wondasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm ,日本岛津公司),TB-215D 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯公司)。

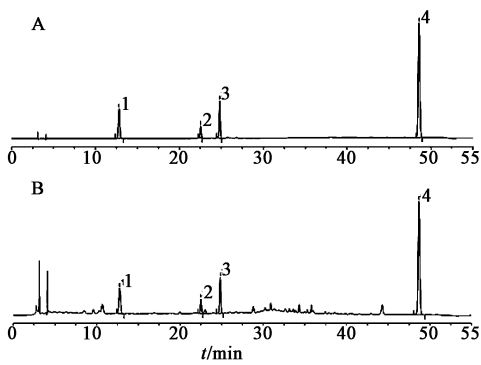
对照品咖啡酸(批号 110885-200102,纯度 98.0%) 和毛蕊花糖苷(批号 111530-201411,纯度 94.4%) 购自中国食品药品检定研究院。对照品异毛蕊花糖苷(批号 15111802,纯度 98.0%) 和广藿香酮(批号 151014,纯度 98.0%) 购自成都普菲德生物技术有限公司。广藿香配方颗粒(批号 15061011, 15051611, 15042111) 由神威药业集团有限公司提供。甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性 Wondasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)梯度洗脱(0~10 min,14% A;10~25 min,14%~26% A;25~35 min,26%~55% A;35~48 min,55%~60% A),检测波长 325 nm(0~18 min,咖啡酸),330 nm(18~30 min,毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷),311 nm(30~55 min,广藿香酮),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 5 μL 。理论板数按广藿香酮峰计算不低于 1 万。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液制备 精密称取咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广藿香酮对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为 0.043 6, 0.065 2, 0.198 8, 0.348 4 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取广藿香配方颗粒适量,研细,取约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加甲醇-0.1% 磷酸(75:25)溶液 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 20 min,放冷,加甲醇-0.1% 磷酸(75:25)溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。



1. 咖啡酸;2. 毛蕊花糖苷;3. 异毛蕊花糖苷;4. 广藿香酮
图 1 混合对照品(A)和广藿香配方颗粒供试品(B)的 HPLC
Fig.1 HPLC chromatograms of mixed standards (A) and sample of Pogostemonis Herba formula granules (B)

2.4 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取稀释后的上述溶液和混合对照品溶液各 5 μL , 按 2.1 项下色谱条件测定。以咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广藿香酮的峰面积为纵坐标, 以进样量为横坐标分别绘制标准曲线。结果表明, 咖啡酸进样量在 0.021 8 ~ 0.218 μg 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 47.917X - 0.08$ ($r = 0.9998$); 毛蕊花糖苷进样量在 0.032 6 ~ 0.326 μg 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 9.17X - 0.0169$ ($r = 0.9998$); 异毛蕊花糖苷进样量在 0.099 4 ~ 0.994 μg 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 9.361X - 0.0547$ ($r = 0.9997$); 广藿香酮进样量在 0.174 2 ~ 1.742 μg 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 26.85X - 1.035$ ($r = 0.9999$)。

2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 5 μL , 连续进样 6 次, 测得咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广藿香酮峰面积 RSD 分别为 1.1%、1.1%、0.8%、1.1%, 均 < 2%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 5 μL , 按 2.1 项下色谱条件, 分别于 0、2、4、6、8、24 h 测定, 结果咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广藿香酮的峰面积 RSD 分别为 1.6%、1.1%、1.8%、1.7%, 均 < 2%。结果表明, 供试品溶液中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广藿香酮在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批广藿香配方颗粒(批号 15061011), 按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件分别进样 5 μL 测定, 结果算得该批样品中咖啡酸质量分数为 1.07 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.2%; 毛蕊花糖苷质量分数为

1.80 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.6%; 异毛蕊花糖苷质量分数为 4.55 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.4%; 广藿香酮质量分数为 8.35 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 0.8%。表明方法的重复性良好。

2.8 准确度试验 采用加样回收法, 取广藿香配方颗粒样品(批号 15061011)9 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 按每 3 份为一组, 每组精密加入对照品咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广藿香酮的量相当于广藿香配方颗粒所含各对照品含量的 80%、100%、120%, 置具塞锥形瓶中, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样 5 μL 测定, 咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广藿香酮的平均加样回收率分别为 98.85%、99.53%、99.37%、100.58%, RSD 分别为 1.9%、1.1%、1.4%、2.0%, 结果表明该方法的准确度良好。见表 1。

2.9 样品含量测定 取 3 批广藿香配方颗粒样品, 按 2.3 项下方法分别制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样 5 μL 测定, 对 3 批样品中所含的咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广藿香酮进行测定。见表 2。

3 讨论

中药配方颗粒是用符合炮制规范的中药饮片为原料, 经现代工艺提取、浓缩、干燥、制粒而成的纯中药产品, 在制备过程中已将有效物质提取出来, 因此制备供试品溶液时采用超声溶解即可, 操作简便, 提取效率高。实验中考察了提取溶剂的种类和提取时间, 分别比较了以甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇为溶剂时的提取效果, 发现以 75% 甲醇为提取溶剂提取效果最好, 而超声时间对提取效果影响不大, 因此确定供试品溶液的制备方法采用 75% 甲醇超声 10 min。但在稳定性试验中发现以 75% 甲醇作为提取溶剂制备的供试品溶液稳定性较差, 咖啡酸的色谱峰峰面积随放置时间的延长降低明显, 以 0.1% 磷酸代替提取溶剂中的水后发现供试品溶液在 24 h 内稳定, 而对提取效果无明显影响, 因此最终确定以甲醇-0.1% 磷酸(75:25)溶液作为提取溶剂。

为了真实、准确地反映广藿香配方颗粒中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和广藿香酮的含量, 本实验结合不同时间切换波长, 分别选定 325 nm 下测定咖啡酸, 330 nm 下测定毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷, 311 nm 下测定广藿香酮的含量, 以保证在各成分最大吸收波长处检测。采用 HPLC 波长切换法各被测化合物色谱峰峰型对称, 检测灵敏度高, 获得了满意的分离和测定结果^[18]。

表 1 广藿香配方颗粒中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广藿香酮的加样回收率测定

Table 1 Recoveries of caffeic acid, acteoside, isoacteoside and pogostone of Pogostemonis Herba formula granules

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
咖啡酸	0.251 5	0.269 1	0.212 6	0.479 5	98.97	98.85	1.9
	0.252 3	0.270 0	0.212 6	0.478 6	98.12		
	0.251 2	0.268 8	0.212 6	0.477 9	98.35		
	0.250 9	0.268 5	0.267 1	0.525 5	96.22		
	0.251 5	0.269 1	0.267 1	0.529 7	97.57		
	0.250 6	0.268 1	0.267 1	0.531 1	98.46		
	0.251 1	0.268 7	0.321 6	0.586 3	98.76		
	0.250 5	0.268 0	0.321 6	0.591 5	100.59		
	0.251 9	0.269 5	0.321 6	0.599 6	102.64		
毛蕊花糖苷	0.251 5	0.452 7	0.362 1	0.806 6	97.74	99.53	1.1
	0.252 3	0.454 1	0.362 1	0.808 2	97.79		
	0.251 2	0.452 2	0.362 1	0.813 2	99.70		
	0.250 9	0.451 6	0.448 8	0.901 1	100.16		
	0.251 5	0.452 7	0.448 8	0.897 9	99.20		
	0.250 6	0.451 1	0.448 8	0.902 6	100.60		
	0.251 1	0.452 0	0.540 6	0.989 5	99.43		
	0.250 5	0.450 9	0.540 6	0.995 1	100.67		
	0.251 9	0.453 4	0.540 6	0.996 6	100.48		
异毛蕊花糖苷	0.251 5	1.144 3	0.912 3	2.060 1	100.38	99.37	1.4
	0.252 3	1.148 0	0.912 3	2.059 3	99.89		
	0.251 2	1.143 0	0.912 3	2.073 2	101.96		
	0.250 9	1.141 6	1.137 8	2.272 7	99.41		
	0.251 5	1.144 3	1.137 8	2.251 2	97.28		
	0.250 6	1.140 2	1.137 8	2.266 7	99.01		
	0.251 1	1.142 5	1.363 3	2.500 3	99.60		
	0.250 5	1.139 8	1.363 3	2.490 5	99.08		
	0.251 9	1.146 1	1.363 3	2.478 8	97.76		
广藿香酮	0.251 5	2.100 0	1.672 7	3.768 8	99.77	100.58	2.0
	0.252 3	2.106 7	1.672 7	3.760 2	98.85		
	0.251 2	2.097 5	1.672 7	3.735 7	97.94		
	0.250 9	2.095 0	2.086 8	4.188 1	100.30		
	0.251 5	2.100 0	2.086 8	4.159 8	98.71		
	0.250 6	2.092 5	2.086 8	4.198 0	100.90		
	0.251 1	2.096 7	2.506 3	4.669 9	102.67		
	0.250 5	2.091 7	2.506 3	4.677 3	103.16		
	0.251 9	2.103 4	2.506 3	4.683 5	102.94		

广藿香配方颗粒的制备过程为首先提取挥发油,然后以水为溶剂分次煎煮提取广藿香中的水溶性成分,然后减压浓缩、干燥、制粒,最后加入挥发油混匀。因此广藿香配方颗粒的研究应包括挥发性成

分和非挥发性成分。目前广藿香的研究主要集中在挥发油部分,而关于广藿香中非挥发性成分的研究较少。本研究建立的 HPLC 波长切换法可同时测定广藿香配方颗粒中非挥发性成分咖啡酸、毛蕊花糖

表 2 样品中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、广藿香酮的质量分数测定

Table 2 Contents of caffeic acid, acteoside, isoacteoside and pogostone in samples $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品批号	咖啡酸	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	广藿香酮
15061011	1.07	1.80	4.55	8.35
15051611	0.97	1.67	4.37	8.13
15042111	1.04	1.72	4.29	8.61

苷、异毛蕊花糖苷和挥发性成分广藿香酮的含量,能够对广藿香配方颗粒的质量进行全面、有效的控制。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 45.

[2] 任守忠, 靳德军, 张俊清, 等. 广藿香药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2006, 8(8): 27-29.

[3] 李睿, 翟华强, 田伟兰, 等. 中药煮散的历史源流及其与现代配方颗粒的对比性分析[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 965-969.

[4] 吴蓓丽, 谢晓梅, 况作品, 等. 宣木瓜药材-饮片-提取物-配方颗粒的质量相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 9-12.

[5] 戴永娜, 王作顺. 冠心病合剂配方颗粒与传统汤剂的临床疗效比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 182-187.

[6] 刘乡乡, 黄晓玲, 宋力飞, 等. GC法测定广藿香提取物中百秋李醇和广藿香酮的含量[J]. 中药材, 2005, 28(1): 30-31.

[7] 张颖梅, 陈海明, 吴晓丽, 等. HPLC同时测定广藿香中雷杜辛黄酮醇及广藿香酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 160-163.

[8] 连宗衍, 杨丰庆, 李绍平. 顶空固相微萃取-气相色谱质谱法定性定量分析广藿香中的挥发性成分[J]. 分析化学, 2009, 37(2): 283-287.

[9] 王大海, 殷志琦, 张庆文, 等. 广藿香非挥发性化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2704-2707.

[10] 叶超, 刘芳, 陈宝龙, 等. 高效液相色谱法测定广藿香中毛蕊花糖苷的含量[J]. 中南药学, 2014, 12(12): 1248-1250.

[11] 黄木土. 广藿香水提物 HPLC 指纹图谱的再研究[D]. 广州: 广东药学院, 2008.

[12] 何冰, 陈小夏, 罗集鹏. 广藿香去油部分的 5 种不同极性提取物对胃肠道的影响[J]. 中药材, 2001, 24(6): 422-423.

[13] 陈小夏, 何冰, 李显奇, 等. 广藿香三种提取物对肠道功能作用的比较[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(2): 32-34.

[14] 赵书策, 贾强, 廖富林. 广藿香提取物的抗炎、镇痛药理研究[J]. 中成药, 2007, 29(2): 285-287.

[15] LI Y C, LIANG H C, CHEN H M, et al. Anti-candida albicans activity and pharmacokinetics of pogostone isolated from Pogostemonis Herba[J]. Phytomedicine, 2012, 20(1): 77-83.

[16] 胡军华, 刘莉莉, 张艳军. HPLC法同时测定不同产地紫苏叶和荆芥中咖啡酸和迷迭香酸[J]. 中草药, 2015, 46(14): 2155-2159.

[17] 宋小敏, 廖理曦, 董馨, 等. 毛蕊花糖苷抑制脂多糖诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症反应及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2506-2510.

[18] 王琿, 张振秋. HPLC 波长切换法同时测定迷迭香中咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 116-118.

[责任编辑 顾雪竹]