

· 研究报告 ·

RP-HPLC 法同时测定防暑清热饮中 5 种活性成分的含量

李 杰, 杨育儒, 王庆芬, 陈锦珊 (中国人民解放军联勤保障部队第九〇九医院 / 厦门大学附属东南医院药剂科, 福建漳州, 363000)

[摘要] 目的 建立 RP-HPLC 法同时测定防暑清热饮中绿原酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷和广藜香酮含量的方法。方法 采用 ZORBAX-SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 以 0.2% 磷酸溶液 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱, 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 327 nm, 柱温为 30 $^{\circ}$ C。结果 绿原酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷和广藜香酮线性关系良好 ($r \geq 0.999 6$), 平均加样回收率 (RSD) 分别为 102.03% (1.63%)、102.38% (1.51%)、102.39% (1.23%)、103.14% (1.87%) 和 104.01% (2.33%)。结论 本实验建立的测定方法简单、准确、重复性好, 能够有效控制该制剂的质量。

[关键词] 防暑清热饮; 绿原酸; 木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷; 3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸; 蒙花苷; 广藜香酮; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)05-0462-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202002059

Simultaneous determination of five active components in Fangshu Qingre mixture by RP-HPLC

LI Jie, YANG Yuru, WANG Qingfen, CHEN Jinshan (Department of Pharmacy, No. 909 Hospital of Joint Logistic Support Force/Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University, Zhangzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for simultaneous determination of chlorogenic acid, luteolin-7-*O*- β -*D*-glucoside, 3,5-dicaffeoylquinic acid, linarin and pogostone in Fangshu Qingre mixture by RP-HPLC. **Methods** ZORBAX-SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) was used as the chromatographic column. The mobile phase was 0.2% formic acid water solution (A) and acetonitrile solution (B) with a gradient elution mode. The flow rate was 1.0 ml/min. The detectable wavelength was 327 nm. The column temperature was 30 $^{\circ}$ C. **Results** There were good linear relationships in the determination of chlorogenic acid, luteolin-7-*O*- β -*D*-glucoside, 3,5-dicaffeoylquinic acid, linarin and pogostone ($r \geq 0.999 6$), with the average recovery rate of 102.03% (1.63%), 102.38% (1.51%), 102.39% (1.23%), 103.14% (1.87%) and 104.01% (2.33%). **Conclusion** The method was simple and stable with a good reproducibility, which could be used as a quality control method for active components in Fangshu Qingre mixture.

[Key words] Fangshu Qingre mixture; chlorogenic acid; luteolin-7-*O*- β -*D*-glucoside; 3,5-dicaffeoylquinic acid; linarin; pogostone; HPLC

防暑清热饮是由广藜香、白茅根、菊花、薄荷、枸杞等药材配伍而成的中药复方制剂。方中广藜香为君药, 白茅根、菊花为臣药, 薄荷为佐药, 枸杞为使药, 诸药合用, 具有芳香化湿、清热解毒、解渴生津之功效^[1]。课题组前期已采用紫外分光光度法对防暑清热饮中总多糖和总黄酮进行质量控制^[2]。

[基金项目] 医院青年苗圃基金 (17Y019)

[作者简介] 李 杰, 主管药师, 硕士研究生, 研究方向: 制剂工艺及质量标准研究, Tel: 17705963635, Email: lichenjie1004@163.com

[通讯作者] 陈锦珊, 副主任药师, 研究方向: 医院药学, Email: cjs18659341758@163.com

为了更为全面地控制防暑清热饮的质量, 本实验参考现有文献^[3-6], 采取 RP-HPLC 法同时测定方中多个活性成分含量, 现报道如下。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (AngiLent 1200 型, DAD 检测器, 美国安捷伦科技有限公司), 分析天平 (AUX220, 日本岛津公司)。防暑清热饮 (批号: 20200120, 202002101, 202002102, 规格: 100 ml/瓶, 第九〇九医院药剂科), 绿原酸对照品 (批号: 110753-200413)、3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (批号: 111782-201807)、蒙花苷 (批号: 111528-201710) 和

广藿香酮(批号: 111822-201904)均购自中国食品药品检定研究院, 木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号: GZDD-0115, 贵州迪大生物科技有限责任公司), 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为纯化水。

2 含量测定

2.1 色谱条件及系统适用性

色谱柱 ZORBAX-SB-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.2% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱 0~30 min, 88%~82%A; 30~45 min, 82%~78%A; 45~65 min, 78%~35%A; 65~75 min, 35%A; 75~78 min, 35%~30%A; 78~80 min, 30%~88%A; 80~82 min, 88%A; 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 327 nm, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ l, 理论塔板数按 3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸计算应不低于 8 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

分别精密称定绿原酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸对照品适量, 置于同一 10 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并定量稀释成每 1 ml 中含绿原酸 2.15 mg、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 1.05 mg、3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 3.00 mg。分别精密称定蒙花苷和广藿香酮对照品适量置于同一 25 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并定量稀释成每 1 ml 中含蒙花苷 0.21 mg 和广藿香酮 0.05 mg, 作为对照品储备液。精密量取各对照品储备液 5 ml, 置同一 25 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得混合对照品母液。

2.2.2 供试品溶液

精密量取防暑清热饮 5 ml, 置 10 ml 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液

按处方量制备不含广藿香、白茅根、菊花和薄荷的阴性样品, 按“2.2.2”项下供试品方法制备阴性对照溶液。

2.3 专属性考察

分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶

液, 按“2.1”项下色谱条件下进样, 记录色谱图。结果阴性溶液无干扰, 方法专属性良好, 见图 1。

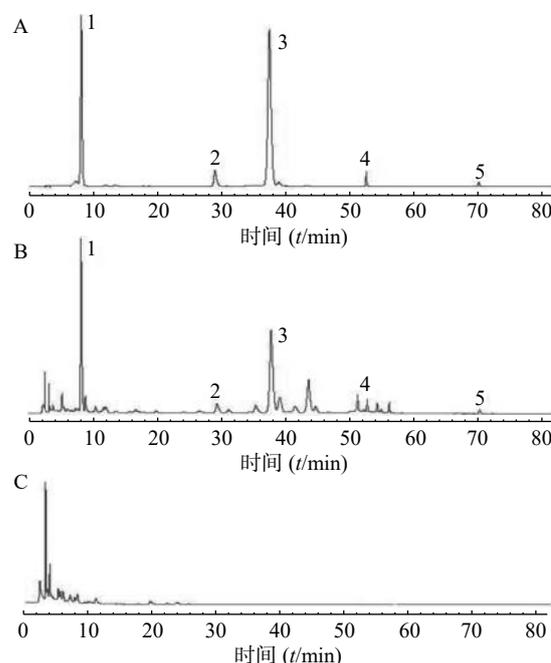


图 1 防暑清热饮 HPLC 图

A.混合对照品溶液; B.供试品溶液; C.阴性对照溶液 1.绿原酸;
2.木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷; 3. 3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸;
4.蒙花苷; 5.广藿香酮

2.4 线性关系考察

分别精密吸取对照品母液按比例稀释, 在上述色谱条件下, 分别进样 20 μ l, 以质量浓度 X (μ g/ml) 为横坐标、峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程, 见表 1。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱峰面积, 绿原酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷、广藿香酮峰面积的 RSD 分别为 0.29%、0.30%、0.32%、0.45%、0.45%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份(批号: 20200120), 并按“2.1”项下色谱条件进行含量

表 1 回归方程及线性范围

化合物名称	回归方程	r	线性范围(μ g/ml)
绿原酸	$Y=13.496X-63.194$	0.999 9	43.00~430.00
木犀草素-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	$Y=19.707X-169.310$	0.999 7	21.00~210.00
3, 5- <i>O</i> -二咖啡酰奎宁酸	$Y=4.659X-0.895$	0.999 7	60.00~600.00
蒙花苷	$Y=6.5862X+6.154$	0.999 6	4.20~42.00
广藿香酮	$Y=11.788X+2.109$	0.999 6	1.02~10.20

测定。结果显示, 防暑清热饮中绿原酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷、广藜香酮峰面积的 RSD 分别为 0.56%、0.68%、0.70%、0.94%、1.75%, 表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

将供试品溶液在室温下放置, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 20 μ l, 记录色谱峰面积, 结果显示, 防暑清热饮中绿原酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷、广藜香酮峰面积的 RSD 分别为 0.64%、1.16%、0.71%、0.59%、1.36%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取已知含量的防暑清热饮 2.5 ml, 共

6 份, 置 10 ml 容量瓶中, 再分别精密加入对照品适量, 加水稀释至刻度, 按“2.1”项下色谱条件操作, 进样 20 μ l, 记录峰面积, 测定其含量, 计算平均加样回收率, 结果见表 2。

2.9 样品测定

取 3 个批号的防暑清热饮样品(批号: 20200120, 202002101, 202002102), 各 3 份, 按“2.2.2”项下方法制备防暑清热饮供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件操作, 进样 20 μ l, 记录峰面积, 计算含量, 结果见表 3。

3 讨论

现代药理学研究表明广藜香酮具有抗菌、抗

表 2 防暑清热饮加样回收率试验结果 ($n=6$)

成分	样品含量($m/\mu\text{g}$)	加入量($m/\mu\text{g}$)	测得量($m/\mu\text{g}$)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
绿原酸	369.44	376.00	745.10	99.91	102.03	1.63
	369.44	376.00	748.25	100.75		
	369.44	376.00	756.12	102.84		
	369.44	376.00	749.80	101.16		
	369.44	376.00	764.27	105.01		
	369.44	376.00	754.89	102.51		
木犀草素-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	209.79	210.00	425.37	102.65	102.38	1.51
	209.79	210.00	428.48	104.14		
	209.79	210.00	425.15	102.55		
	209.79	210.00	419.79	100.00		
	209.79	210.00	428.48	104.14		
	209.79	210.00	421.50	100.81		
3, 5- <i>O</i> -二咖啡酰奎宁酸	452.68	484.00	939.25	100.53	102.39	1.23
	452.68	484.00	947.23	102.18		
	452.68	484.00	956.31	104.06		
	452.68	484.00	942.56	101.22		
	452.68	484.00	949.64	102.68		
	452.68	484.00	954.57	103.70		
蒙花苷	42.88	42.00	85.58	101.67	103.14	1.87
	42.88	42.00	85.42	101.30		
	42.88	42.00	87.42	106.05		
	42.88	42.00	87.13	105.37		
	42.88	42.00	85.42	101.30		
	42.88	42.00	86.21	103.16		
广藜香酮	7.91	8.20	16.10	99.86	104.01	2.33
	7.91	8.20	16.40	103.52		
	7.91	8.20	16.56	105.47		
	7.91	8.20	16.43	103.89		
	7.91	8.20	16.76	107.91		
	7.91	8.20	16.39	103.40		

表3 3批防暑清热饮含量测定结果 (n=3, μg/ml)

批号	绿原酸	木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷	3,5-O-二咖啡酰奎宁酸	蒙花苷	广藜香酮
20200120	147.97±0.73	83.61±0.53	181.99±0.15	17.26±0.48	3.16±0.30
202002101	142.35±0.15	75.19±1.07	162.42±0.16	14.16±0.86	1.74±0.54
202002102	163.00±0.06	80.24±0.88	215.19±0.04	17.63±0.78	2.09±2.38

炎、抗氧化、杀虫以及抑制肿瘤细胞的生长等多种生物活性;绿原酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸属于苯丙素类化合物,具有解热镇痛、抗氧化作用;木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷属于黄酮类化合物,具有免疫调节、抗氧化、抗炎、抑菌抗病毒等作用。对单味药材进行分析,广藜香中含有广藜香酮;菊花、广藜香、白茅根和薄荷均含有绿原酸;菊花中含有3,5-O-二咖啡酰奎宁酸;菊花和薄荷中含有蒙花苷。中药复方制剂成分复杂,在保证达到检测要求的条件下,综合考虑选择绿原酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷、广藜香酮作为液相色谱法检测的指标性成分^[17-21]。

本实验分别考察了甲醇-0.1%磷酸、甲醇-0.2%磷酸、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.2%磷酸4个洗脱溶剂系统作为流动相,结果发现乙腈-0.2%磷酸作为流动相色谱峰时,峰形和分离效果较好,梯度洗脱比等度洗脱分离更好。由于本品为水溶性溶液,被测活性成分极性相对较大,故使流动相起始和结束比例保持一致,即乙腈-0.2%磷酸(12:88),以确保所测成分在正确的保留时间出峰。

在190~400 nm范围内进行全波长扫描,广藜香酮、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷、绿原酸和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷最大吸收波长分别为308、327、330、325和348 nm,综合考虑选择327 nm作为检测波长。

本实验供试品溶液制备简便,由于本品为液体制剂,用水稀释后直接进样,在该色谱条件下无干扰,故考虑稀释后直接进样。

本实验建立的含量测定方法简便、准确、灵敏,可作为防暑清热饮的质控方法,因不同批次有效成分含量相差较大,考虑可能是药材受产地或采收季节的影响,也可能是该制剂提取工艺稳定性的问题,还需进一步考察,后续需要经过多批次测定以确定质控标准。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版)四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
[2] 李杰, 杨育儒, 王庆芬, 等. 紫外-可见分光光度法测定防暑清

热饮中总黄酮和总多糖含量[J]. 药实践杂志, 2020, 38(1): 63-66.
[3] 李其固, 李振化, 赵振宇, 等. HPLC法测定抗病毒栓中的鸟苷, (R, S)告依春, 百秋里醇和广藜香酮[J]. 中成药, 2014, 36(6): 1208-1212.
[4] 侯爱荣, 陈彤. HPLC-DAD同时测定野菊不同部位8种活性成分的含量[J]. 食品与药品, 2018, 20(3): 213-218.
[5] 李青, 罗定强, 尚飞, 等. 菊花七味胶囊质量标准研究[J]. 中国药业, 2019, 28(3): 34-38.
[6] 许一鸣, 吴敬南, 乐巍, 等. 不同产地薄荷药材有机酸与黄酮类成分分析[J]. 中药材, 2018, 41(2): 299-302.
[7] 徐晶晶, 徐超, 刘斌. 不同采收期薄荷中4个黄酮苷的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2077-2081.
[8] 胡少伟, 钟昆芮, 杨佳颖, 等. 薄荷茎、叶中黄酮类成分在不同采收期的含量差异性研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 544-550.
[9] 徐凌玉, 李振麟, 钱士辉. HPLC法测定薄荷中黄酮类成分的含量[J]. 化学工程与装备, 2016(11): 180-182.
[10] 田伟, 甄亚钦, 王鑫国, 等. HPLC法同时测定薄荷配方颗粒中3种成分[J]. 中成药, 2016, 38(12): 2602-2605.
[11] 李杰, 曹毅祥, 曾棋平, 等. 蒲地灌肠液定性定量方法的研究[J]. 中南药学, 2017, 15(2): 228-232.
[12] 广西壮族自治区梧州食品药品检验所. 一种同时测定野菊花中七种成分含量的方法: 201710262290.0 [P]. 2017-04-20.
[13] 谢文彬, 吴磊, 李雨珂, 等. HPLC-DAD法同时测定利咽喷雾剂中7种成分[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(13): 1635-1641.
[14] 倪晓霞, 王庆芬, 刘晓玲, 等. 复方黄连灌肠液的总黄酮测定方法研究[J]. 药实践杂志, 2019, 37(4): 352-356, 374.
[15] 郭晓民, 瞿晶田, 柴士伟. HPLC-DAD法测定野菊花栓中绿原酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(3): 382-385.
[16] 刘晓薇. 怀菊花商品规格等级及其质量特征研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2018.
[17] 罗孟兰, 朱德伟, 彭成, 等. 广藜香酮的研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2019, 42(3): 60-66.
[18] 魏金凤, 王士苗, 沈丹, 等. 藜香与广藜香抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 117-120.
[19] 周衡朴, 任敏霞, 管家齐, 等. 菊花化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4785-4795.
[20] 刘荣华, 付丽娜, 陈兰英, 等. 白茅根化学成分与药理研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2010, 22(4): 80-83.
[21] 刘群群. 薄荷属植物的化学成分及药理学作用研究[J]. 现代食品, 2016(7): 44-45.

【收稿日期】 2020-02-20 【修回日期】 2020-04-03

【本文编辑】 李睿星