

HPLC 法测定金莲花汤中绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸

王腾宇, 李德利, 方明月, 王青青, 刘双月, 赧迪, 白根本*, 王如峰*

北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488

摘要: **目的** 建立金莲花汤中绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的 HPLC 含量测定方法, 并对采用不同来源的药材制备的 3 批金莲花汤中的上述 5 种成分进行含量测定。**方法** 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Synergi Polar-RP 苯基 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 4 μm); 流动相为 1% 乙酸 (A) ~ 乙腈 (B); 洗脱程序 (0~30 min, 5%~14%B; 30~40 min, 14%~14%B; 40~42 min, 14%~19%B; 42~60 min, 19%~25%B; 60~63 min, 25%~5%B; 63~64 min, 5%~5%B); 柱温 35℃; 检测波长 286 nm; 进样量 10 μL。**结果** 测定 3 批金莲花汤中绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸含量分别为: 0.34、0.08、9.73、0.93、0.32 mg/g; 0.13、0.03、8.37、0.33、0.21 mg/g; 0.37、0.07、8.36、0.12、0.26 mg/g。**结论** 该方法精密性、稳定性、重复性良好, 适用于金莲花汤中上述 5 种成分的含量测定; 用不同来源的药材制备的金莲花汤中上述 5 种成分的含量存在差异, 其中葛根素的含量最高。

关键词: 金莲花汤; 含量测定; HPLC; 绿原酸; 咖啡酸; 葛根素; 牡荆素; 迷迭香酸

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)06-1053-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.20

Content assay of five components in Jinlianhua decoction by HPLC

WANG Tengyu, LI Deli, FANG Mingyue, WANG Qingqing, LIU Shuangyue, GENG Di, BAI Genben, WANG Rufeng

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content assay of chlorogenic acid, caffeic acid, puerarin, vitexin and rosmarinic acid in Jinlianhua decoction, and the contents of the above five components were determined in three batches of Jinlianhua decoction prepared from the drugs bought from different places of China. **Methods** The analysis was performed on a Synergi Polar-RP Phenomenex C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 4 μm) using 1% acetic acid solution (A) - acetonitrile (B) as the mobile phases with gradient elution (0-30 min, 5%-14% B; 30-40 min, 14%-14% B; 40-42 min, 14%-19% B; 42-60 min, 19%~25% B; 60-63 min, 25%-5% B; 63-64 min, 5%-5%B). The column temperature was set at 35℃, the UV detection wavelength was 286 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The contents of chlorogenic acid, caffeic acid, puerarin, vitexin and rosmarinic acid in the three batches of Jinlianhua decoction were determined as follows: 0.34, 0.08, 9.73, 0.93, 0.32 mg/g; 0.13, 0.03, 8.37, 0.33, 0.21 mg/g; 0.37, 0.07, 8.36, 0.12, 0.26 mg/g. **Conclusion** The method is precise, stable and reproducible. It is suitable for the determination of chlorogenic acid, caffeic acid, puerarin, vitexin and rosmarinic acid in Jinlianhua decoction. The content of these five components is different in the Jinlianhua decoctions prepared from the drugs purchased from different places of China, and that of puerarin is the highest.

Key words: Jinlianhua decoction; content assay; HPLC; chlorogenic acid; caffeic acid; puerarin; vitexin; rosmarinic acid

金莲花汤是 2003 年国家中医药管理局公布的预防“非典型肺炎”的处方, 由金莲花、蒲公英、大青叶、葛根、苏叶按照一定比例组成。其中, 金

莲花性寒味苦, 能清热解毒, 治疗上呼吸道感染^[1-2]; 蒲公英性寒味微苦, 能清热解毒, 消肿散结^[3-4]; 大青叶性寒味苦, 能清热解毒、凉血消斑^[5]; 葛根性

收稿日期: 2017-09-19

基金项目: 北京中医药大学新奥奖励基金 (金莲花汤的抗流感病毒有效成分群的获取及其药效物质基础研究)

第一作者: 王腾宇 (1991—), 男, 汉族, 河南省平顶山市人, 硕士研究生, 研究方向为生物转化。E-mail: 1642169551@qq.com

*通信作者: 王如峰, 男, 教授, 博导, 研究方向为中药化学成分生物转化。Tel: (010)84738646 E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

白根本, 男, 教授, 研究方向为生物学。Tel: (010)84738646 E-mail: baigb@263.net。

凉味甘辛,能升阳透疹、解热生津^[6-7];苏叶性温味辛,能发表散寒,理气和营^[8]。全方具有清热解毒、散风透邪的功效,可用于风瘟病的治疗。风瘟是由风热病邪引起的急性外感热病,多发于春天温暖多风或冬天应寒反温季节,初起以发热、恶寒、头痛、咳嗽等肺卫证候为主症。除了非典之外,流行性感冒(中医称“时行感冒”)也属于风瘟的范畴,其临床表现为高热、畏寒、头痛、疲弱乏力。就病因病机而言,流感是由风热温邪引起,为机体正气亏虚,外感疫毒之邪(“疠气”)夹时令之气乘虚而入、中伤机体所致^[9]。因此,金莲花汤对于流感的防治和药物开发具有重要的价值。前人对于金莲花汤的研究很少,而对组成该方的单味药研究较多,研究内容主要集中在药理药效和化学成分方面,对于该方单味药的研究有助于更加全面的认识该方的药理药效和化学成分;为了深入研究金莲花汤的药效物质基础,本课题组建立了适用的 HPLC 方法,对其组方单味药的主要成分绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸进行了含量测定。

1 仪器和材料

Waters 高效液相色谱仪(Waters 公司),BP 211D 型 1/10 万电子天平(Sartorius 公司),Synergi Polar-RP 苯基 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 4 μm)。

绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸对照品购自中国食品药品检定研究院,纯度不低于98%;色谱试剂乙腈为色谱纯(Fisher 公司),其他试剂为分析纯;水为市售娃哈哈纯净水;3 批金莲花汤药材(表 1)分别购自北京市两家药店和河北安国药材市场,经北京中医药大学王如峰教授鉴定为各药材正品。

2 方法和结果

2.1 液相条件及系统适用性试验

色谱柱为 Synergi Polar-RP 苯基 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 4 μm);流动相为 1%乙酸(A)~乙腈(B);洗脱程序(0~30 min, 5%~14%B; 30~40 min, 14%~14%B; 40~42 min, 14%~19%B; 42~60 min, 19%~25%B; 60~63 min, 25%~5%B, 63~64 min, 5%B),柱温 35℃;检测波长 286 nm;进样量 10 μL。采用上述方法分别得到混合对照品和金莲花汤样品的色谱图(图 1)。样品中绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的保留时间分别是 16.85、18.77、21.55、37.02、48.89 min,其色谱峰与相邻峰达到基线分离,理论塔板数分别为 6

表 1 实验用药材来源信息

Table 1 Source information of experimental crude medicine

来源	药材	批号	产地
北京同仁堂药店	金莲花	53441101	吉林
	葛根	16090302	河北
	大青叶	53750701	河北
	蒲公英	73040102	河北
	苏叶	63841002	江苏
北京京芝堂药店	金莲花	160401	湖南
	葛根	151201	河南
	大青叶	53750801	河北
	蒲公英	20170108	河北
	苏叶	20151022	江苏
河北安国药材市场	金莲花	20170312	河北
	葛根	20170526	湖南
	大青叶	20170820	河北
	蒲公英	20161128	河北
	苏叶	20161069	河北

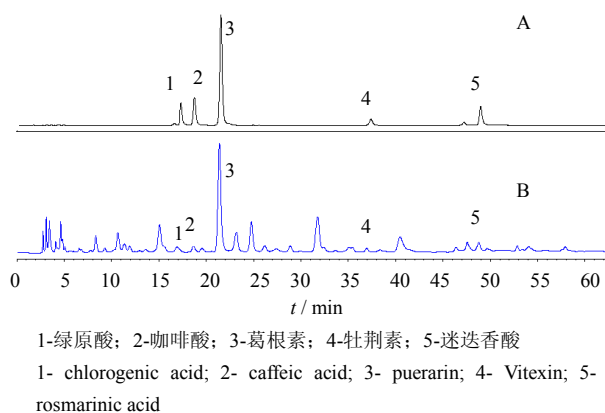


图 1 混合对照品(A)和金莲花汤样品(B)的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC sample of the mixture (A) and the Jinlianhua decoction (B)

668、22 249、32 487、64 669、152 760, 拖尾因子分别为 1.04、0.98、1.01、0.99、0.97。

2.2 对照品的制备

精密称取绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸对照品适量,分别置于 5 mL 量瓶中,甲醇定容,制成浓度分别为 59.00、22.40、437.50、20.60、50.00 μg/mL 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

分别称取金莲花、葛根、大青叶、蒲公英、苏叶 30、50、50、75、30 g,加入 3 L 蒸馏水,将除苏叶外的 4 种药材浸泡 30 min,煎煮 15 min 后加入

苏叶继续煎煮 15 min, 收集滤液, 再加入 2 L 蒸馏水继续煎煮 30 min, 收集并合并两次滤液, 补足至 4 L, 取适量用甲醇稀释 10 倍, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备

分别取绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸对照品储备液 100 μL , 混匀, 制备混合对照品, 用甲醇倍比稀释得到 1、2、4、8、16、32、64 倍稀释的 7 份对照品溶液。分别进样 10 μL , 按照上述色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标进行线性回归, 得到下列回归方程。绿原酸: $Y=2 \times 10^7 X-5\ 900.6$ ($r=0.999\ 7$); 咖啡酸: $Y=5 \times 10^7 X-4\ 450.5$ ($r=0.999\ 6$); 葛根素: $Y=1 \times 10^7 X-5\ 274.2$ ($r=0.999\ 7$); 牡荆素: $Y=1 \times 10^7 X-1\ 464.1$ ($r=0.999\ 9$); 迷迭香酸: $Y=2 \times 10^7 X-5\ 416.3$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明, 绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸分别在 1.84~11.80、0.70~44.80、1.37~87.50、0.06~4.12、0.16~10.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.5 精密度试验

取上述混合对照品溶液, 连续进样 5 次, 每次 10 μL 。测定绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的峰面积, 计算 RSD 分别为 1.50%、2.10%、1.42%、1.64%、1.35%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样。分别根据峰面积考察样品的稳

定性, 计算绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的 RSD 分别为 2.12%、1.61%、0.89%、1.77%、1.02%, 表明供试品至少在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批药材, 制成 5 份供试品溶液, 分别进样。计算绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的 RSD 分别为 1.92%、2.12%、0.84%、2.60%、0.49%, 表明该方法重复性良好。

2.8 检测下限和定量下限测定

取上述对照品溶液, 逐步稀释进样, 直到 $S/N=10$ 和 $S/N=3$, 此时的进样量即分别为定量限 (LQD) 和检测限 (LOD)。测得绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的定量限分别为 3.21、0.97、5.53、2.66、3.01 ng; 检测限分别为 2.99、0.91、5.32、1.66、2.75 ng。

2.9 回收率试验

制备 1 批供试品 5 份, 每份 10 mL, 分别加入上述 5 种对照品适量, 测定相应的化合物的含量, 计算加样回收率, 结果绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的平均加样回收率分别为 99.27%、98.78%、100.24%、98.33%、97.81%, RSD 值分别为 1.66%、1.60%、0.84%、0.94%、1.74%。

2.10 结果

取 3 批市售金莲花汤药材制备金莲花汤供试品溶液, 每批 3 份, 按照上述方法测定绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的绝对含量, 计算平均值和相对含量, 结果见表 2。

表 2 金莲花汤中 5 种成分的含量

Table 2 Five components of the content in Jinlianhua decoction

批次	绿原酸		咖啡酸		葛根素		牡荆素		迷迭香酸	
	绝对/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	相对/%	绝对/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	相对/%	绝对/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	相对/%	绝对/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	相对/%	绝对/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	相对/%
1	0.34	2.96	0.08	0.68	9.73	85.44	0.93	8.12	0.32	2.79
2	0.13	1.45	0.03	0.28	8.37	92.40	0.33	3.61	0.21	2.27
3	0.37	3.98	0.07	0.74	8.36	91.13	0.12	1.31	0.26	2.84

3 讨论

本研究建立了同时测定金莲花汤中 5 种成分的 HPLC 方法, 并通过方法学考察证明该方法精密度、重复性、稳定性良好。采用上述方法, 成功测定了金莲花汤中绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的含量, 对于明确金莲花汤的药效物质基础具有指导意义, 可为金莲花汤的进一步新药开发和

质量标准制定提供依据。

就测定的 3 批金莲花汤中的 5 种成分而言, 葛根素的含量均最高, 咖啡酸的含量均最低, 而牡荆素、迷迭香酸、绿原酸的含量各批次之间存在差异, 说明葛根素是金莲花汤中的主要成分, 而其他成分由于含量相对较低, 受不同来源和批次的药材质量影响较大。葛根素是来自葛根的主要成分, 除了对

心血管系统的作用之外,还可以活化巨噬细胞的异物吞噬功能,使初期感染状态下的异物排除功能增强^[10],临床上也有用葛根素治疗慢性咽炎的报道^[11]。这与中医通过提高机体免疫力,驱除外邪的瘟病治疗原则相符,因此,金莲花汤对于瘟病(如流感)的防治和相关药物开发具有重要的价值;本实验对于金莲花汤中5种成分的含量测定有利于加深对金莲花汤药效物质基础的认识。

金莲花汤化学成分复杂,前人的研究较少,其所含化学成分并不清楚;现阶段主要根据组成该方的药材所含主要化学成分对其所含化学成分进行推测;本研究根据组成该方的单味药所含的5种主要化学成分作为参考,对该方中此5种成分进行含量测定。在初步认识到该方的化学成分的基础上,结合其药理药效可以初步推断金莲花汤的药效物质基础,对于下一步的深入研究具有参考价值。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 下册. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 1398.
- [3] 谢沈阳, 杨晓源, 丁章贵, 等. 蒲公英的化学成份及其药理作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(S1): 141-151.
- [4] 施亚琴, 朱粉霞, 丁淑敏, 等. 超高效液相法同时测定蒲公英中5种活性成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(9): 677-680.
- [5] 武彦文, 高文远, 肖小河. 大青叶的研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 793-796.
- [6] 秦红英, 周光明, 彭贵龙, 等. 高效液相色谱法测定紫苏中5种有机酸和黄酮的含量 [J]. 食品科学, 2015, 35(14): 102-105.
- [7] 赵茜, 邹素兰. HPLC法测定紫苏不同来源不同部位中迷迭香酸的含量 [J]. 广西植物, 2014, 34(6): 865-868.
- [8] 尹丽红, 李艳枫, 孟繁琳. 葛根的化学成分、药理作用和临床应用 [J]. 黑龙江医药, 2010, 23(3): 371-373.
- [9] 葛资宇, 童骄, 王小玉, 等. 流感中医认识探析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(1): 77-79.
- [10] 董丽萍. 葛根对免疫机制的作用 [J]. 中国药理学报, 1998, 19(4): 339-341.
- [11] 吴志学, 郭伟, 陈玉. 葛根素穴位注射加中药治疗慢性咽炎 [J]. 湖北中医杂志, 2003, 25(3): 39-40.