

• 药剂与工艺 •

基于质量源于生产的广藿香质量标志物的确立

荆文光¹, 郭晓晗¹, 李 楚^{1,2}, 程显隆¹, 马双成^{1*}, 魏 锋^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: **目的** 建立基于质量源于生产 (quality by production, QbP) 的广藿香质量标志物 (Q-Marker), 为规范广藿香饮片生产, 合理提升广藿香饮片质量提供依据。 **方法** 对广藿香饮片生产过程中的质量风险点和饮片质量进行分析, 发现饮片加工过程中存在广藿香叶加入不足的不规范生产现象, 致使广藿香饮片质量下降。采用 GC 法同时测定广藿香饮片中挥发性成分百秋李醇和广藿香酮的含量, 利用指纹图谱结合化学计量学对不同比例广藿香叶的样品中差异性成分进行筛选。 **结果** 百秋李醇含量与饮片中广藿香叶比例呈显著正相关, 可作为控制饮片中广藿香叶比例的关键标志物之一。正交偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA) 结果显示, 黄酮类成分对不同广藿香叶比例的饮片样品划分具有显著影响。通过同时测定雷杜辛黄酮醇和藿香黄酮醇 2 种主要黄酮类成分的含量并结合方差分析, 结果显示雷杜辛黄酮醇和藿香黄酮醇含量在不同广藿香叶比例样品中具有显著性差异 ($P < 0.05$), 并与广藿香叶比例呈显著性正相关, 亦可作为广藿香生产规范性的 Q-Marker。考虑饮片加工过程中广藿香叶的损失, 以 15% 广藿香叶比例为标准, 建议百秋李醇不低于 0.24%, 雷杜辛黄酮醇和藿香黄酮醇总量不低于 0.045%。 **结论** 基于 QbP 理念, 确立百秋李醇、藿香黄酮醇和雷杜辛黄酮醇为广藿香生产规范化 Q-Marker, 为广藿香质量标准提升和保障饮片质量提供实验依据。

关键词: 广藿香; 质量源于生产; 生产规范性; 质量标志物; 质量风险点; GC; 指纹图谱; 化学计量学; 百秋李醇; 藿香黄酮醇; 雷杜辛黄酮醇; 正交偏最小二乘-判别分析; 黄酮

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)15-4496-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.007

Establishment of quality markers for *Pogostemonis Herba* based on quality by productionJING Wen-guang¹, GUO Xiao-han¹, LI Chu^{1,2}, CHENG Xian-long¹, MA Shuang-cheng¹, WEI Feng¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

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

Abstract: Objective To establish quality markers (Q-Marker) for *Pogostemonis Herba* (PH) based on quality by production (QbP) and provide a basis for standardizing the production so as to reasonably improve the quality of PH pieces. **Methods** Based on the analysis of the production process and the quality of PH pieces, an irregular production phenomenon of insufficient *Pogostemon cablin* leaves (PCL) proportion during the processing was obviously discovered, which led to the deterioration of the quality of PH pieces. The GC method was performed to simultaneously determine the content of the patchouli alcohol and pogostone, meanwhile, the non-volatile components in PH were also screened by fingerprints combining with chemometrics. **Results** The content of patchouli alcohol was significantly positively correlated with the PCL ratio. As a consequence, patchouli alcohol can be used as one of the key indicators to control the PCL ratio. The results showed that flavonoids had a significant impact on the classification of samples with different PCL ratios. Orthogonal partial least squares-discriminant

收稿日期: 2021-04-03

基金项目: 国家重点研发计划“中药材净切制关键技术与智能设备研究及应用”(2019YFC1711500)

作者简介: 荆文光, 博士, 从事中药质量标准和质量评价研究。Tel: (010)53852101 E-mail: jingwenguang@nifdc.org.cn

*通信作者: 马双成, 研究员, 研究方向为中药药效物质基础与质量控制。Tel: (010)53852076 E-mail: masc@nifdc.org.cn

魏 锋, 研究员, 研究方向为中药质量标准研究。Tel: (010)53852020 E-mail: weifeng@nifdc.org.cn

analysis (OPLS-DA) results showed that flavonoids have a significant effect on the division of decoction pieces with different PCL ratios. Simultaneous determination of the content of two main flavonoids, retusin and pachypodol, were performed and their contents had exhibited a significant difference in different PCL ratios and a positive correlation with PCL ratio, indicating the two flavones could be Q-Marker for the standardized production of PH. Considering the loss of leaves during the pieces processing, with 15% PCL ratio as the standard, it is recommended that the content of patchouli alcohol should not be less than 0.24%, and the total amount of retusin and pachypodol should not be less than 0.045%. **Conclusion** Based on QbP, patchouli alcohol, retusin and pachypodol are developed as the Q-Marker for standardized production of PH, which provide experimental basis for PH standard improvement and guarantee for quality of decoction pieces.

Key words: *Pogostemonis Herba*; quality by production; standard production; Q-Marker; quality risk point; gas chromatography; fingerprint; chemometrics; patchouli alcohol; retusin; pachypodol; OPLS-DA; flavonoid

广藿香为唇形科植物广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 的干燥地上部分, 原产于东南亚一带, 后在我国岭南地区引种成功, 现主产于我国广东、海南、广西等省区, 具有芳香化浊、和中止呕、发表解暑的功效, 是藿香正气水、抗病毒口服液、霍胆丸等中成药重要的原料之一^[1]。

在众多本草典籍中, 广藿香药用部位为叶, 李时珍《本草纲目》为藿香释名曰: “豆叶曰藿, 其叶似之, 故名”, 并详述藿香性状及药用部位的应用变迁“方茎有节中虚, 叶微似茄叶。洁古、东垣惟用其叶, 不用枝梗。今人并枝梗用之, 因叶多伪故耳”。由此可见, 广藿香叶的使用对于临床药效的发挥至关重要, 广藿香质量评价也多以叶多、杂质少, 香气浓者为佳。《中国药典》2020年版一部广藿香标准中检查项规定叶不得少于 20%, 饮片炮制要求“除去残根和杂质, 先抖下叶, 筛净另放; 茎洗净, 润透, 切段, 晒干, 再与叶混匀。”但饮片标准中, 并未延续药材标准控制叶比例, 也没有百秋李醇的含量测定项, 标准检验项目缺失较多, 无法合理控制饮片质量。

由于广藿香挥发油多集在叶中, 且为重要的香水和藿香正气类中成药生产用原料, 因此, 广藿香叶多单独采集用于提取挥发油, 导致加入饮片生产中的广藿香叶明显不足, 存在不规范生产的现象, 严重影响广藿香饮片的质量。对于广藿香的质量控制, 李小琪等^[2]采用一测多评法同时测定广藿香中 4 种挥发性成分; 毕丹等^[3]采用超高效液相色谱法同时测定广藿香中 6 个成分的含量; Li 等^[4]采用 HPLC-DAD 测定了广藿香中 9 种成分, 结果均显示不同批次广藿香药材中所测定的挥发性和非挥发性成分的含量存在较大差异; 张洪坤等^[5]从广藿香标准汤剂 HPLC 指纹图谱的聚类分析和判别分析研究入手, 对广藿香不同产地进行了判别分析, 这些为

广藿香的质量评价奠定了基础, 但以上研究均未说明哪些成分是广藿香叶区别于其茎梗的差异性标志成分, 因此也无法从生产规范性角度解决现有广藿香饮片中广藿香叶比例偏低的问题。

中药质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 最早由刘昌孝院士提出^[6-7], 其在现有质量评价与控制方法基础上, 从质量要素的传递与溯源、化学成分与药性药效 2 方面的关系、基于植物亲缘学及生源途径的成分特异性分析等角度, 提出以中药 Q-Marker 研究为核心的中药质量评价模式^[8-9]。通过对复方丹参制剂中丹参、三七药材^[10-12]、延胡索^[13]、元胡止痛滴丸^[14]、益母草和赶黄草^[15]的 Q-Marker 进行了深入的研究, 详细阐述了 Q-Marker 的研究路径。郝敏等^[16]认为应针对不同的中药产品针对性地制定质量标准更为科学合理, 提出了基于中药 Q-Marker 的饮片质量控制研究思路。刘晓娜等^[17]从中药质量的整体性和功效的特异性属性角度出发, 提出了一种着重体现元素 Q-Marker 的研究思路。

Q-Marker 的出现为中药质量评价提供多种思路和方法, 但中药质量特别是作为原料的中药材质量的形成过程是一个复杂的体系, 有别于一般产品, 其质量属性禀赋于人工和天然 2 部分因素: 从人工的角度, 和所有产品一样, 中药材的质量源于生产 (quality by production, QbP), 过程控制和生产 (种植/养殖) 规范性是质量的保证; 从天然的角度, 中药材的质量受产地环境的影响极大, 因而有“道地药材”之称, 基于此, 本课题组提出了道地性和生产规范性是中药材质量形成的关键^[18]。而对于部分中药饮片在原料道地性未知的情况下, 保证生产规范性尤为重要, 理清饮片质量属性形成过程中的关键因素, 充分挖掘能够体现生产规范性的关键 Q-Marker, 亦是保证饮片质量的关键内容。本实验基于 QbP 的理念, 利用指纹图谱结合化学计量学、

多成分含量测定等方法, 筛选出能够体现广藿香饮片生产规范性的关键 Q-Marker, 为保证广藿香饮片质量、提升饮片标准奠定基础。

1 仪器与材料

Acquity H-Class 型超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Waters e2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司, Empower 3 工作站; Agilent 7890B 气相色谱仪, Agilent 公司; AE240 型十万分之一电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; LX220ASCS 型万分之一电子天平, 普利赛斯国际贸易(上海)有限公司; 101-1AB 型电热鼓风干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; KQ-500E 超声波

清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

对照品百秋李醇(批号 110772-201909)、广藿香酮(批号 111822-201904)、毛蕊花糖苷(批号 111530-201713)购自中国食品药品检定研究院; 对照品新西兰牡荆苷(批号 P01F9F54173)、异毛蕊花糖苷(批号 W17J10C90785)、藿香黄酮醇(批号 P18A11S111514)、雷杜辛黄酮醇(批号 P30A10S87217)购自上海源叶生物科技有限公司; 对照品鼠李素(批号 20012029)购自上海同田科技股份有限公司; 各对照品质量分数均>98.0%。

广藿香饮片样品来源于药材市场、饮片企业和医院, 共计 59 批, 详细信息见表 1。无水乙醇、二

表 1 59 批广藿香饮片的来源信息、叶占比及百秋李醇、广藿香酮、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇含量测定结果 (n = 2)
Table 1 Source informations, PCL ratio of 59 batches of PH pieces and contents of patchouli alcohol, pogoston, pachypodol and retusin (n = 2)

编号	生产批号	生产厂家	叶占比/%	百秋李醇/%	广藿香酮/%	藿香黄酮醇/%	雷杜辛黄酮醇/%	2 种黄酮总量/%
S1	181201065	河北济鑫堂药业有限公司	4.00	0.135 1	0.208 0	0.015 8	0.010 0	0.025 7
S2	190801	重庆健峰药业有限公司	13.41	0.236 2	0.168 6	0.027 0	0.017 4	0.044 5
S3	180426	亳州市永刚饮片厂有限公司	19.80	0.257 5	0.100 3	0.025 4	0.015 9	0.041 3
S4	190801	安徽徽草堂药业饮片股份有限公司	36.45	0.235 9	0.181 7	0.042 8	0.034 8	0.077 6
S5	420191201	河北悦康志德药业有限公司	22.46	0.345 0	0.143 9	0.035 4	0.028 0	0.063 4
S6	1711118	宁夏明德中药饮片有限公司	10.42	0.075 2	0.118 2	0.014 9	0.009 7	0.024 6
S7	170201	亳州市詹政中药饮片有限公司	10.39	0.113 6	0.209 4	0.017 4	0.012 8	0.030 2
S8	190501	亳州市张仲景中药饮片有限责任公司	8.12	0.168 1	0.087 8	0.023 9	0.018 1	0.042 0
S9	8180915801	河北百合中药饮片有限公司	6.17	0.168 2	0.156 4	0.014 5	0.011 3	0.025 9
S10	190801	重庆市渝和堂药业有限公司	24.70	0.267 6	0.107 2	0.032 9	0.024 0	0.056 9
S11	911039	新疆本草堂药业有限公司	9.69	0.224 9	0.171 9	0.016 5	0.008 8	0.025 3
S12	2004001	安国市聚药堂药业有限公司	19.41	0.254 6	0.093 4	0.028 7	0.017 4	0.046 1
S13	190601	山东嘉泰中药饮片有限公司	14.57	0.284 3	0.168 7	0.030 7	0.026 4	0.057 1
S14	201902236	樟树市庆仁中药饮片有限公司	15.38	0.158 6	0.123 1	0.027 8	0.016 6	0.044 4
S15	180301	安徽济善堂中药科技有限公司	5.88	0.252 0	0.186 4	0.018 4	0.011 2	0.029 6
S16	190601	安徽济善堂中药科技有限公司	5.04	0.092 0	0.126 0	0.013 2	0.009 8	0.023 0
S17	190801	江西百仁中药饮片有限公司	8.37	0.145 1	0.164 0	0.019 0	0.015 0	0.034 0
S18	200202	成都吉安康药业有限公司	23.51	0.330 6	0.126 2	0.034 6	0.018 8	0.053 4
S19	2002001	河北全泰药业有限公司	14.24	0.247 4	0.216 1	0.022 7	0.021 7	0.044 4
S20	1910001	内蒙古瑞泰药业有限责任公司	12.86	0.198 3	0.156 4	0.019 9	0.010 3	0.030 2
S21	200201	江西百仁中药饮片有限公司	21.41	0.136 2	0.150 7	0.030 1	0.020 3	0.050 3
S22	200222	杭州华东中药饮片有限公司	12.57	0.179 6	0.135 9	0.020 6	0.011 4	0.032 0
S23	1912004	宁夏永寿堂中药饮片有限公司	17.57	0.204 7	0.147 4	0.024 3	0.024 4	0.048 7
S24	200301	重庆康嘉药业有限公司	5.24	0.107 2	0.167 6	0.028 9	0.022 9	0.051 9
S25	200201	广东天泰药业有限公司中药饮片厂	12.77	0.244 8	0.173 2	0.024 8	0.020 0	0.044 8
S26	1908008	宁夏乌玛天启中药饮片有限公司	16.86	0.292 0	0.183 1	0.020 7	0.015 0	0.035 7

续表 1

编号	生产批号	生产厂家	叶占 比/%	百秋李 醇/%	广藿香 酮/%	藿香黄 酮醇/%	雷杜辛黄 酮醇/%	2种黄酮 总量/%
S27	20190701	安徽华鼎堂中药饮片科技有限公司	10.71	0.155 0	0.214 8	0.012 6	0.011 2	0.023 8
S28	200101	安国市安兴中药饮片有限公司	21.02	0.295 6	0.180 4	0.029 2	0.019 6	0.048 8
S29	190101	湖北聚瑞中药饮片有限公司	12.38	0.181 4	0.200 4	0.0185	0.011 2	0.029 8
S30	181201	黑龙江福久堂中药饮片有限责任公司	11.93	0.171 8	0.154 4	0.013 3	0.013 2	0.026 5
S31	420191201	河北悦康志德药业有限公司	27.50	0.343 4	0.137 7	0.039 6	0.030 7	0.070 3
S32	190901	成都吉安康药业有限公司	19.36	0.223 2	0.088 0	0.027 2	0.012 4	0.039 7
S33	190821002	亳州市贡药饮片厂	19.14	0.236 4	0.165 7	0.026 9	0.026 9	0.053 7
S34	190802	河北弘汉药业有限公司	25.05	0.176 3	0.179 4	0.038 0	0.031 4	0.069 4
S35	19090402	盛实百草药业有限公司	19.58	0.301 3	0.1002	0.028 1	0.013 8	0.041 9
S36	01-20020101	安徽省金芙蓉中药饮片有限公司	19.96	0.269 4	0.149 5	0.026 5	0.022 6	0.049 1
S37	200303	河北弘汉药业有限公司	22.64	0.286 9	0.153 9	0.028 8	0.017 2	0.046 1
S38	1908201	海南寿南山参业有限公司	22.87	0.322 4	0.165 9	0.027 4	0.020 2	0.047 6
S39	20200201	河北凯达药业有限公司	19.90	0.345 8	0.143 5	0.039 4	0.022 1	0.061 4
S40	191001.01	重庆市渝和堂药业有限公司	14.03	0.218 3	0.129 6	0.026 9	0.016 7	0.043 5
S41	2001283	盐城市中药饮片有限公司	14.17	0.203 5	0.160 9	0.022 9	0.012 6	0.035 5
S42	161201	北京亚威中药饮片有限公司	19.19	0.225 5	0.167 1	0.031 8	0.021 5	0.053 3
S43	191126	安徽嘉佑中药饮片有限公司	13.29	0.209 6	0.194 1	0.021 5	0.019 2	0.040 7
S44	1910101	海南寿南山参业有限公司	23.37	0.380 4	0.153 2	0.036 0	0.025 0	0.061 1
S45	180601	安徽药知源中药饮片有限公司	21.34	0.218 9	0.103 7	0.038 4	0.033 1	0.071 5
S46	18102501	内蒙古慕听药业有限公司	32.07	0.512 2	0.147 1	0.046 8	0.029 6	0.076 4
S47	200201	重庆众妙药业有限公司	19.89	0.288 6	0.177 5	0.031 8	0.017 8	0.049 6
S48	GP200401Y	河北庆源堂中药科技有限公司	24.25	0.368 4	0.168 5	0.027 8	0.021 0	0.048 8
S49	190402	四川固康药业有限公司	40.15	0.422 4	0.125 9	0.037 2	0.020 8	0.058 0
S50	2002001	河北全泰药业有限公司	30.62	0.317 9	0.158 0	0.029 9	0.028 7	0.058 6
S51	190826	江苏苏轩堂药业有限公司	38.65	0.337 3	0.159 8	0.042 0	0.035 9	0.077 9
S52	191201	重庆万力药业有限公司	27.33	0.174 0	0.241 9	0.030 7	0.029 1	0.059 8
S53	LK200114	珠海市立康中药饮片有限公司	20.07	0.292 1	0.114 1	0.028 0	0.014 7	0.042 7
S54	200301	重庆华奥药业股份有限公司	39.00	0.445 7	0.158 2	0.034 2	0.037 1	0.071 3
S55	200222	重庆众景中药饮片有限责任公司	23.73	0.372 4	0.138 7	0.038 0	0.037 2	0.075 2
S56	200401	河北药兴药业有限公司	23.18	0.371 4	0.051 5	0.031 8	0.014 7	0.046 6
S57	190802	安国市深豪药业有限公司	33.26	0.257 5	0.186 9	0.047 7	0.039 1	0.086 7
S58	200201	重庆上药慧远药业有限公司	21.92	0.320 4	0.138 6	0.030 4	0.016 9	0.047 3
S59	200103	华逸中药饮片有限公司中药饮片厂	24.15	0.382 1	0.142 2	0.026 7	0.012 8	0.039 5

氯甲烷、醋酸乙酯、石油醚、正己烷均为国药集团化学试剂有限公司，分析纯；水为屈臣氏纯净水；乙腈、甲醇为色谱纯来自 Fisher 公司。

2 方法与结果

2.1 饮片中叶比例测定

取广藿香饮片样品约 100 g，手工挑取广藿香叶，称定质量，记录叶的比例，59 批次饮片中广藿

香叶的占比见表 1。经统计，广藿香叶比例低于 15% 的样品占比 37.2%，低于 20% 的样品占比 57.6%，高于 20% 的样品占比 42.4%。

广藿香药材标准规定叶不低于 20%，即使考虑饮片加工过程中的损失（按 15% 比例计），仍有超过三分之一的样品中叶的比例未达标。因此，确立广藿香叶中关键的 Q-Marker，充分体现广藿香饮片

生产规范性,即足量加入广藿香叶,保证饮片质量和临床疗效势在必行。本实验从59批次样品中,挑选10批次(S48、S50~S58)广藿香叶的比例较高的样品,分别配制10%、20%、30%、40%4种叶比例,合计40个样品作为验证用样品。

2.2 饮片样品和验证用样品中百秋李醇和广藿香酮含量测定

《中国药典》2020年版一部中广藿香药材以百秋李醇为含量测定指标性成分,但饮片项下并未延续药材标准,缺少含量测定项。文献研究表明^[19-20],广藿香油的主要有效成分为百秋李醇和广藿香酮,百秋李醇具有抗炎、免疫调节及抗幽门螺旋杆菌的作用;广藿香酮具有抗菌、抗炎、抗氧化、杀虫以及抗肿瘤等多种生物活性^[21-22]。

本实验参考《中国药典》2020年版百秋李醇含量测定方法同时测定广藿香中百秋李醇和广藿香酮的含量。样品前处理方法:取广藿香饮片粉末(过三号筛)约1g,精密称定,置锥形瓶中,加无水乙醇50mL,超声处理2次,每次30min,滤过,合并滤液,回收溶剂至干,残渣加正己烷使溶解,转移至5mL量瓶中,精密加入内标溶液(正十八烷)0.5mL,加正己烷至刻度,摇匀,吸取1 μ L,注入气相色谱仪,测定,即得(图1)。饮片样品测定结果见表1,验证样品测定结果见表2。

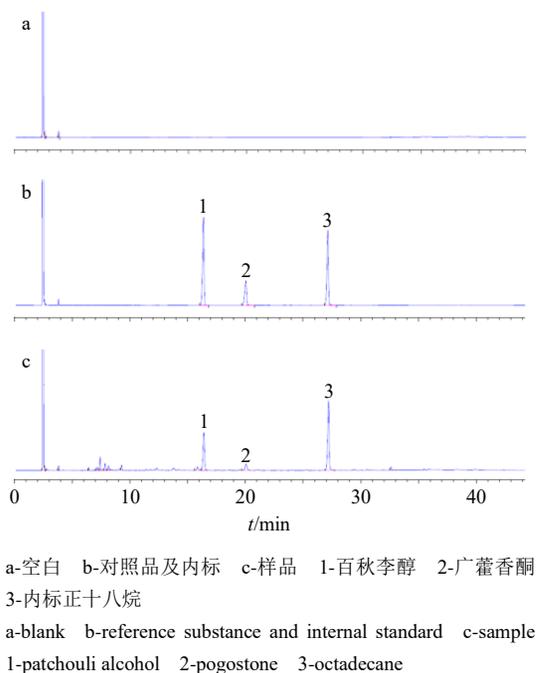


图1 百秋李醇和广藿香酮含量测定GC图

Fig. 1 GC diagram of patchouli alcohol and pogostone determination

2.3 指纹图谱结合化学计量学筛选不同叶比例样品非挥发性差异成分

2.3.1 色谱条件 色谱柱为Waters Acquity UPLC BEH-C₁₈柱(50mm \times 2.1mm, 1.7 μ m);流动相为0.2%磷酸水溶液-乙腈;梯度洗脱:0~10min, 8%~16%乙腈;10~18min, 16%~20%乙腈;18~30min, 20%~42%乙腈;30~35min, 42%乙腈;35~40min, 42%~80%乙腈;40~50min, 80%~95%乙腈;体积流量0.3mL/min;柱温35 $^{\circ}$ C;检测波长335nm;进样量1.0 μ L。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别取新西兰牡荆苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、鼠李素、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇、广藿香酮对照品适量,置于25mL量瓶中,加甲醇超声溶解,放冷,用甲醇定容至刻度作为混合对照品溶液,冷藏,备用。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末(过三号筛)0.5g,精密加入甲醇25mL,称定质量,超声30min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3.4 广藿香指纹图谱的建立 取59批广藿香饮片样品,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件分析,将所得的色谱数据导入国家药典委员会《中国色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012版)》,以S5样品图谱作为参照图谱,采用中位数法,时间窗设为0.1min,经多点校正后,进行色谱峰的匹配,生成指纹图谱共有模式,标定共有峰23个,经对照品比对,指认出7个共有峰,分别为1号峰新西兰牡荆苷、4号峰毛蕊花糖苷、5号峰异毛蕊花糖苷、11号峰鼠李素、17号峰藿香黄酮醇、20号峰雷杜辛黄酮醇、21号峰广藿香酮(图2)。59批次饮片进行指纹图谱测试,以全谱峰匹配,相似度为0.24~0.83,说明各批次样品之间指纹图谱差异显著。

2.3.5 基于正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)的不同广藿香叶比例的饮片差异性化学成分分析 将59批次饮片按广藿香叶的比例数值高低进行分类,叶的比例低于15%的归为I组,介于15%~25%的归为II组,高于25%比例的归为III组。以指纹图谱23个色谱峰的峰面积与样品称样量比值为变量,运用SIMCA 13.0软件对59批样品进行OPLS-DA,结果显示叶片比例分布不同的3组样品基本能够得到区分(图3)。

通过提取OPLS-DA模型中变量重要性投影

表 2 不同比例广藿香叶验证样品中百秋李醇、广藿香酮、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇含量测定结果 (n = 2)

Table 2 Contents of patchouli alcohol, pogoston, pachypodol and retusin in different ratio samples (n = 2)

样品	百秋李醇/%	广藿香酮/%	藿香黄酮醇/%	雷杜辛黄酮醇/%	2种黄酮总量/%	样品	百秋李醇/%	广藿香酮/%	藿香黄酮醇/%	雷杜辛黄酮醇/%	2种黄酮总量/%
S51_10%	0.173 5	0.226 0	0.013 7	0.010 4	0.024 1	S51_30%	0.273 4	0.150 1	0.033 1	0.028 2	0.061 3
S55_10%	0.212 0	0.117 2	0.019 5	0.009 9	0.029 4	S55_30%	0.407 5	0.143 5	0.040 2	0.023 9	0.064 1
S54_10%	0.230 5	0.161 5	0.015 8	0.016 9	0.032 7	S54_30%	0.368 9	0.158 0	0.029 2	0.032 0	0.061 2
S52_10%	0.102 7	0.260 2	0.021 6	0.016 7	0.038 3	S52_30%	0.190 2	0.231 6	0.041 0	0.039 9	0.080 8
S58_10%	0.214 7	0.161 4	0.016 4	0.010 2	0.026 6	S58_30%	0.445 0	0.151 9	0.031 9	0.030 6	0.062 6
S50_10%	0.167 2	0.160 6	0.017 3	0.011 9	0.029 2	S50_30%	0.333 2	0.157 4	0.033 3	0.029 3	0.062 6
S57_10%	0.127 4	0.175 0	0.022 1	0.015 1	0.037 2	S57_30%	0.241 4	0.181 7	0.042 2	0.033 8	0.076 0
S53_10%	0.180 8	0.121 1	0.017 7	0.011 9	0.029 6	S53_30%	0.390 3	0.104 0	0.037 0	0.025 4	0.062 4
S56_10%	0.277 0	0.054 7	0.017 0	0.008 2	0.025 2	S56_30%	0.494 3	0.063 1	0.035 3	0.016 9	0.052 3
S48_10%	0.223 5	0.183 3	0.016 4	0.008 3	0.024 7	S48_30%	0.437 2	0.158 2	0.040 1	0.022 5	0.062 6
S51_20%	0.210 0	0.168 5	0.023 3	0.019 4	0.042 7	S51_40%	0.356 3	0.133 7	0.040 8	0.036 4	0.077 2
S55_20%	0.327 4	0.151 4	0.030 9	0.016 6	0.047 5	S55_40%	0.494 1	0.126 3	0.049 8	0.029 7	0.079 5
S54_20%	0.318 9	0.165 6	0.021 2	0.024 5	0.045 7	S54_40%	0.430 0	0.157 6	0.032 2	0.037 3	0.069 4
S52_20%	0.147 0	0.236 5	0.020 3	0.026 1	0.046 5	S52_40%	0.254 6	0.242 8	0.051 9	0.053 1	0.105 0
S58_20%	0.330 9	0.133 8	0.023 2	0.022 0	0.045 2	S58_40%	0.543 4	0.162 5	0.040 2	0.039 1	0.079 4
S50_20%	0.267 2	0.167 2	0.025 4	0.020 8	0.046 2	S50_40%	0.433 8	0.125 2	0.042 2	0.037 8	0.080 0
S57_20%	0.188 4	0.175 1	0.032 7	0.024 4	0.057 1	S57_40%	0.294 7	0.193 1	0.052 5	0.044 7	0.097 2
S53_20%	0.299 3	0.098 7	0.026 4	0.017 8	0.044 1	S53_40%	0.511 2	0.095 4	0.045 9	0.031 2	0.077 1
S56_20%	0.362 3	0.092 3	0.028 4	0.014 2	0.042 6	S56_40%	0.620 5	0.041 6	0.044 1	0.021 8	0.065 9
S48_20%	0.316 4	0.173 6	0.029 3	0.015 6	0.044 8	S48_40%	0.503 2	0.145 9	0.051 6	0.029 9	0.081 5

(variable importance for the projection, VIP)值图(图4),对23个共有峰面积按照VIP值大小进行排列,以VIP值>1.0为标准筛选差异性标志物,结果共得到10个VIP值大于1的共有峰,分别为16~20、22、23、10、11、14号色谱峰,其中11号色谱峰为鼠李素、17号色谱峰为藿香黄酮醇、20号色谱峰为雷杜辛黄酮醇、21号色谱峰为广藿香酮,说明这些共有峰对不同叶比例的饮片样品分类具有显著影响。16~20号色谱峰从紫外吸收上判断均为黄酮类化合物,说明广藿香中黄酮类成分可作为控制叶片比例的关键指标。从相对峰面积上比较,17号色谱峰藿香黄酮醇和20号色谱峰雷杜辛黄酮醇的相对峰面积较其他成分高,可作为黄酮类主要的指标性成分,故同时测定以上2种黄酮类化合物的含量,并通过与叶片比例的相关性来确定能否作为控制饮片中叶比例的关键指标。

2.4 藿香黄酮醇和雷杜辛黄酮醇含量测定

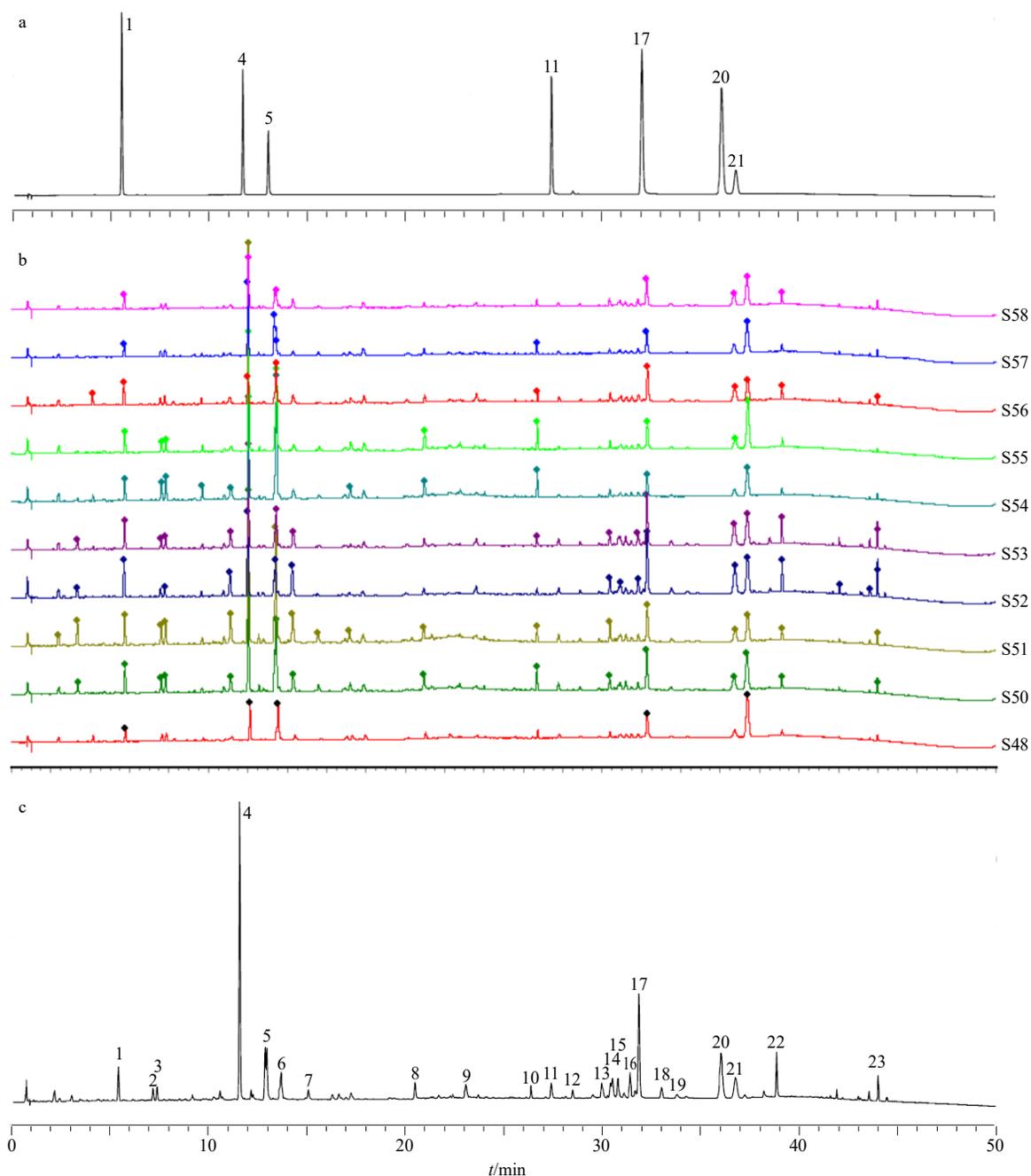
2.4.1 色谱条件 色谱柱为Waters SunFire C₁₈液相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为0.1%

磷酸水溶液-乙腈;洗脱程序:0~10 min, 30%~33%乙腈;10~15 min, 33%乙腈;15~20 min, 33%~41%乙腈;20~40 min, 41%乙腈;40~45 min, 41%~56%乙腈;45~61 min, 56%乙腈;体积流量1.0 mL/min;柱温35℃;检测波长355 nm,进样量10 μL。色谱图见图5。

2.4.2 对照品溶液的制备 分别取藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇对照品适量,精密称定,用甲醇配制成质量浓度分别为11.2、12.0 μg/mL的混合对照品溶液,冷藏,备用。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末(过三号筛)0.5 g,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取“2.4.2”项下混合对照品溶液各0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列不同浓度的混合对照品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定峰面积。以进样量为横坐标(X),



1-新西兰牡荆苷 4-毛蕊花糖苷 5-异毛蕊花糖苷 11-鼠李素 17-藜香黄酮醇 20-雷杜辛黄酮醇 21-广藜香酮
 1-vitexin 4-verbasoside 5-isoverbasoside 11-rhamnetin 17-retusin 20-pachypodol 21-pogostone

图2 混合对照品 (a)、广藜香饮片指纹图谱 (b) 和共有指纹图谱 (c)

Fig. 2 Mixed reference substances (a), fingerprints of PH pieces (b), and common fingerprint (c)

色谱峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程结果分别为藜香黄酮醇 $Y = 3.27 \times 10^6 X - 4108.56$ ，线性范围为 11.2~168.0 ng, $R^2 = 0.9999$ ；雷杜辛黄酮醇 $Y = 3.19 \times 10^6 X - 2588.88$ ，线性范围为 12.0~180.0 ng, $R^2 = 0.9999$ ；结果显示线性关系良好。

2.4.5 精密度试验 分别精密吸取同一对照品溶液 10 μ L，连续进样 6 次，结果 6 次进样所测得藜香黄

酮醇峰面积 RSD 为 0.20%，雷杜辛黄酮醇峰面积 RSD 为 0.12%，表明精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 分别精密吸取同一供试品溶液 (S47) 1 μ L，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，结果 6 次进样所测得藜香黄酮醇峰面积的 RSD 为 0.90%，雷杜辛黄酮醇峰面积的 RSD 为 0.59%，表明 24 h 内供试品溶液稳定性较好。

2.4.7 重复性试验 分别精密称取同一批样品 (S47)

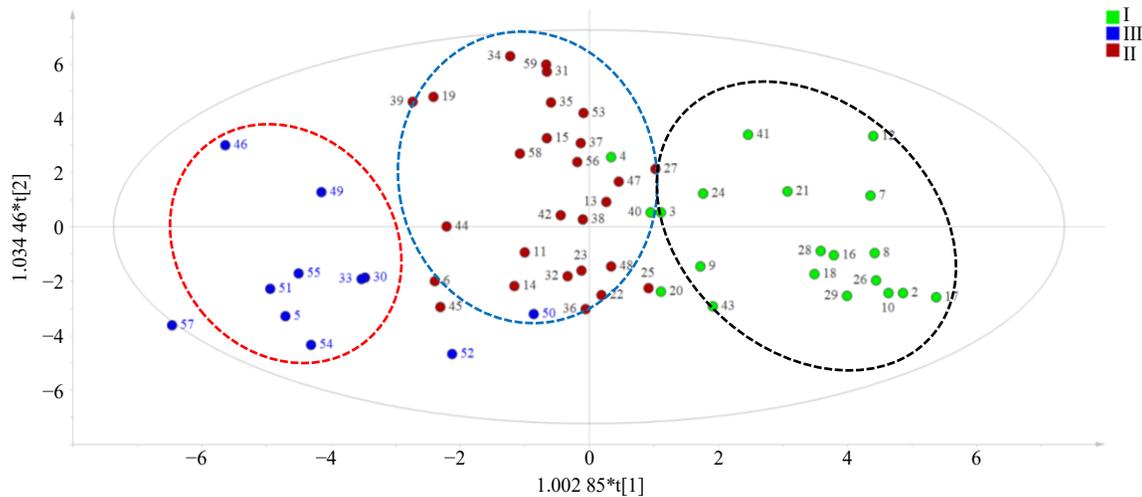


图3 59批样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA scores plot of 59 patch samples

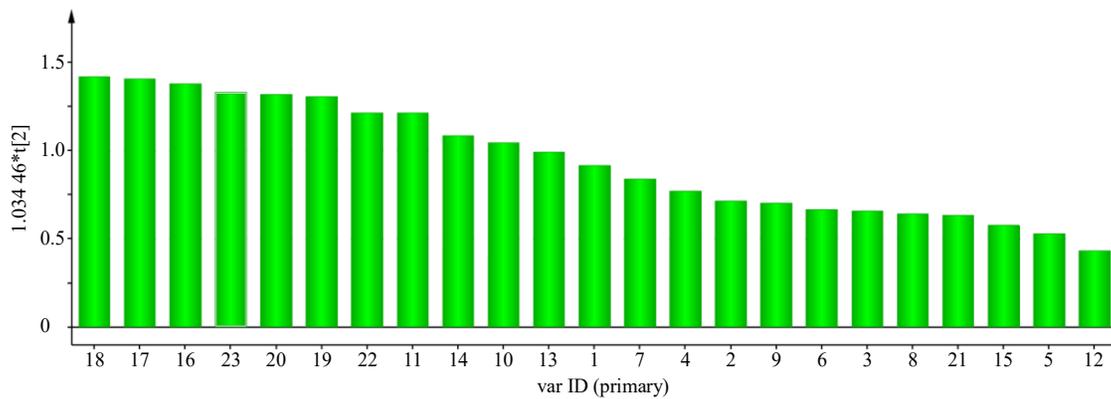


图4 23个共有峰的 OPLS-DA VIP 值图

Fig. 4 OPLS-DA VIP value of 23 shared peaks

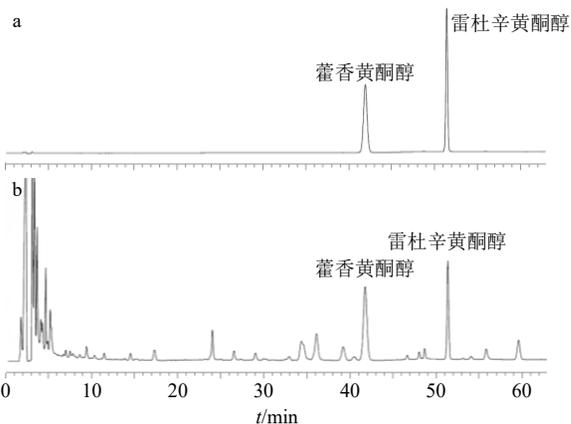


图5 混合对照品溶液 (a) 和广藿香样品 (b) 的 HPLC 图
Fig. 5 HPLC of mixed reference substances (a) and PH sample (b)

6 份, 按供试品溶液制备方法制备并进样分析, 结果 6 次试验含量结果显示藿香黄酮醇质量分数的 RSD 为 1.19%, 雷杜辛黄酮醇质量分数的 RSD 为 1.18%, 表明重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 取重复性试验已测知含量粉末 0.25 g, 精密称定, 精密加入等量待测成分, 按照“2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果藿香黄酮醇平均加样回收率为 102.74%, RSD 为 1.45%; 雷杜辛黄酮醇平均加样回收率为 103.96%, RSD 为 1.41%。

2.5 广藿香规范化生产的 Q-Marker 确立

利用 SPSS 22.0 对自制 40 个不同比例验证性样品中百秋李醇、广藿香酮、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇含量以及 2 种黄酮总含量进行单因素方差分析 (表 3), 并采用 Student-Newman-Keuls (SNK) 法进行组间两两比较, 结果显示, 百秋李醇含量在各比例组间均呈显著差异 ($P < 0.05$), 广藿香酮含量在各比例组间均无显著性差异 ($P > 0.05$), 藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇以及 2 种黄酮总量的两两之间均呈显著差异 ($P < 0.05$)。

表3 广藿香叶不同比例验证样品组百秋李醇、广藿香酮、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇含量统计分析 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Variance analysis of patchouli alcohol, pogoston, pachypodol, and retusin in different ratio groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	质量分数/%				
	百秋李醇	广藿香酮	藿香黄酮醇	雷杜辛黄酮醇	2种黄酮总量
10%比例	0.191±0.05*	0.162±0.06	0.018±0.00**	0.012±0.00**	0.030±0.01**
20%比例	0.277±0.07*	0.156±0.04	0.026±0.00**	0.020±0.00**	0.046±0.00**
30%比例	0.358±0.10*	0.150±0.04	0.036±0.00**	0.028±0.01**	0.065±0.01**
40%比例	0.444±0.11*	0.142±0.05	0.045±0.01**	0.036±0.01**	0.081±0.01**

*表示显著性水平 $\alpha=0.05$, **表示显著性水平 $\alpha=0.01$, 下表同

* indicate significance $\alpha = 0.05$, ** indicate significance $\alpha = 0.01$, same as below table

同时将40个样品以百秋李醇含量、藿香黄酮醇含量、雷杜辛黄酮醇含量以及2种黄酮总量为变量进行OPLS-DA分析,结果显示,4个不同叶比例组别可以得到明显区分(图6),说明百秋李醇含量、藿香黄酮醇含量、雷杜辛黄酮醇含量以及2种黄酮总量可作为控制叶比例的关键指标。

将所有饮片样品中百秋李醇含量和2种黄酮总含量与叶片比例进行相关分析(表4),结果显示饮片叶比例与百秋李醇、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇含量以及2种黄酮总含量均呈现显著的正相关($P < 0.05$),说明百秋李醇、藿香黄酮醇和雷杜辛黄酮醇可作为控制叶比例的关键Q-Marker。因此,为规范

广藿香饮片生产加工,保证饮片中广藿香叶的真实加入,可通过以上3种Q-Marker的含量测定进行饮片中叶比例控制。将所有饮片按比例进行统计分析,考虑到饮片加工过程中叶片损失,以15%比例为参考,以3种Q-Marker含量均值80%为限度,百秋李醇含量应不低于0.24%,雷杜辛黄酮醇和藿香黄酮醇总量应不低于0.045%,建议以此补充完善《中国药典》“广藿香”饮片标准,充分保证饮片质量。

3 讨论

广藿香明代以前本草中多以“藿香”之名出现,原产于南洋,自宋朝引入我国,现主要种植于广东、广西、海南等地,尤以广东产量最高,是“十大南

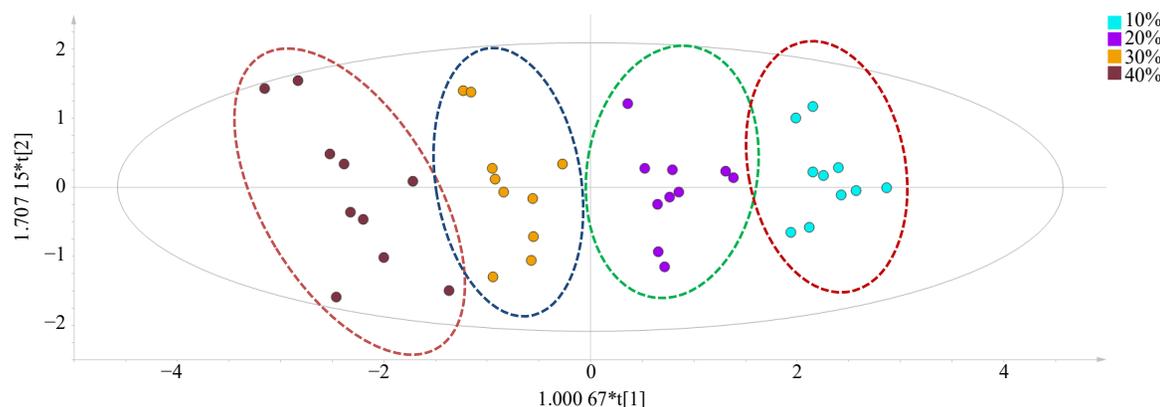


图6 不同广藿香叶的比例验证样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA scores plot of verification samples with different PCL ratio

表4 广藿香叶的比例与饮片各测定成分含量相关性分析

Table 4 Correlation analysis of PCL ratio and the content of each determined component

相关系数	叶比例	百秋李醇	广藿香酮	藿香黄酮醇	雷杜辛黄酮醇	2种黄酮总量
叶比例	1.000					
百秋李醇	0.712**	1.000				
广藿香酮	-0.112	-0.212	1.000			
藿香黄酮醇	0.818**	0.639**	-0.179	1.000		
雷杜辛黄酮醇	0.725**	0.441**	0.098	0.822**	1.000	
2种黄酮总量	0.809**	0.568**	-0.046	0.957**	0.952**	1.000

药”之一,地道的“广药”。广藿香全草含有挥发油,而尤以叶中挥发油的含量最高,是广藿香芳香化湿的主要药效部位。

《中国药典》2020年版一部广藿香药材检查项规定叶不低于20%,但饮片项下只有性状和鉴别项,缺少检查项、含量测定项等,不能全面反映饮片质量。且广藿香饮片炮制要求先抖下叶另放,在与切段干燥的茎混合,正因如此,广藿香叶多被用来提取广藿香油,实际加入到饮片中的叶较少,叶比例偏低,这既不符合炮制要求,又极大的影响了饮片质量。因此,生产不规范是导致广藿香饮片质量问题的主要原因,合理控制饮片中广藿香叶的比例,保障饮片使用的临床疗效,确立能代表广藿香生产加工规范性的Q-Marker则显得尤为重要。

传统广藿香入药部位为叶,叶中挥发油较多,现代中成药藿香正气类也均以广藿香油为原料,但霍胆丸(片)则以广藿香叶乙醇提取物为原料,且古方中广藿香也多入汤剂,说明广藿香中一些非挥发性物质仍然可能是有效成分,故本实验建立了非挥发油类成分的指纹图谱,分别采用甲醇、乙醇、75%甲醇、75%乙醇为溶剂,考察建立指纹图谱,结果显示甲醇提取的色谱峰较多,故选择甲醇为提取溶剂;通过全波长扫描,并提取各波长下指纹图谱,结果显示在335 nm 色谱峰数目较多,分离度较好,响应较高,故选择335 nm 作为指纹图谱的检测波长。

本实验利用化学计量学筛选出黄酮类成分可作为控制叶片比例的关键指标,结合Q-Marker的可定量性,选择藿香黄酮醇和雷杜辛黄酮醇2种黄酮成分作为潜在的Q-Marker,后期实验可尝试采用总黄酮部位的测定,探索其与叶比例的关联性,同时其余黄酮类成分的鉴定尚需进一步研究。

2种黄酮类成分含量测定曾考察甲醇、95%乙醇、75%乙醇、75%甲醇等不同提取溶剂,同时对超声、冷浸、回流等提取方法进行考察,最后确定甲醇超声提取30 min为2种黄酮类成分含量测定前处理方法。从40个验证性样品含量测定结果可知,10%比例的饮片样品百秋李醇的含量均值达0.19%,已高于药材标准0.1%的限度,而药材叶比例检查不低于20%,饮片20%的叶比例限度样品百秋李醇的含量均值达0.28%,远高于药材标准,因此需结合广藿香不同品种的百秋李醇含量分布,适当修订或提高药材中百秋李醇的含量限度。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 46-47.
- [2] 李小琪, 范燕豪, 陈阳, 等. 一测多评法同时测定广藿香中4种成分 [J]. 中成药, 2019, 41(8): 1884-1888.
- [3] 毕丹, 张水英, 任晋, 等. 超高效液相色谱法同时测定广藿香中6个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(8): 1331-1336.
- [4] Li P, Yin Z Q, Li S L, *et al.* Simultaneous determination of eight flavonoids and pogostone in *Pogostemon cablin* by high performance liquid chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2014, 37(12): 1771-1784.
- [5] 张洪坤, 黄玉瑶, 吴桂芳, 等. 不同产地广藿香标准汤剂 HPLC 指纹图谱的聚类分析和判别分析 [J]. 中药材, 2017, 40(10): 2286-2292.
- [6] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [7] 张铁军, 王杰, 陈常青, 等. 基于中药属性和作用特点的中药质量标志物研究与质量评价路径 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1051-1060.
- [8] Bai G, Zhang T J, Hou Y Y, *et al.* From quality markers to data mining and intelligence assessment: A smart quality-evaluation strategy for traditional Chinese medicine based on quality markers [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 109-116.
- [9] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, *et al.* A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 3-13.
- [10] Cheng H T, Li X L, Li X R, *et al.* Simultaneous quantification of selected compounds from *Salvia* herbs by HPLC method and their application [J]. *Food Chem*, 2012, 130(4): 1031-1035.
- [11] Liu A H, Li L, Xu M, *et al.* Simultaneous quantification of six major phenolic acids in the roots of *Salvia miltiorrhiza* and four related traditional Chinese medicinal preparations by HPLC-DAD method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(1): 48-56.
- [12] Zhang J L, Cui M, He Y, *et al.* Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 36(5): 1029-1035.
- [13] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物(Q-marker)研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.

- [14] 张铁军, 许浚, 申秀萍, 等. 基于中药质量标志物(Q-Marker)的元胡止痛滴丸的“性-效-物”三元关系和作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2199-2211.
- [15] 熊亮, 彭成. 基于中药质量标志物(Q-Marker)的基本条件研究益母草和赶黄草的 Q-Marker [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2212-2220.
- [16] 郝敏, 陆兔林, 毛春琴, 等. 基于中药质量标志物的饮片质量控制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1699-1708.
- [17] 刘晓娜, 车晓青, 李德芳, 等. 基于多源信息融合的中药质量标志物与质量评价研究模式 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4576-4581.
- [18] 程显隆, 郭晓晗, 李明华, 等. 道地性和生产规范性是中药材质量属性形成的关键 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(7): 991-995.
- [19] 黎玉翠. 广藿香酮及广藿香醇的抗炎、抗真菌活性及药物代谢研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [20] F. Diánez, M. Santos, C. Parra, *et al.* Screening of antifungal activity of twelve essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2018, 67(4): 400-410.
- [21] 何景进. 广藿香油和广藿香酮的抗炎抗过敏和免疫调节作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [22] 罗孟兰, 朱德伟, 彭成, 等. 广藿香酮的研究进展 [J]. 成都中医药大学学报, 2019, 42(3): 60-66.

[责任编辑 郑礼胜]