

水芹总酚酸胶囊质量控制方法的研究

田 丹^①, 陈劲春^①, 杨新波^②, 黄正明^③

[摘要] 目的 初步建立水芹总酚酸胶囊的质量控制标准。方法 采用薄层色谱法对水芹总酚酸进行定性鉴别; 采用 Folin酚法测定水芹总酚酸含量; 采用高效液相色谱法测定总酚酸中绿原酸含量。色谱条件: Diamonsil C₁₈柱, 流动相: A: 乙腈-甲醇 (10:1); B: 0.4% 磷酸, 梯度洗脱; 检测波长: 325 nm; 流速: 1 ml/min; 柱温: 25℃。结果 按现有生产工艺, 水芹总酚酸胶囊总酚酸含量最高为 32.42%, 绿原酸最高为 9.3%。结论 Folin酚法和高效液相色谱法能精确测定水芹总酚酸胶囊中总酚酸和绿原酸含量, 可作为水芹总酚酸胶囊的质量控制方法。

[关键词] 水芹总酚酸胶囊; 绿原酸; Folin酚法; 高效液相色谱法; 薄层色谱法

[中图分类号] R927.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9926(2010)04-0328-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2010.04.014

A Study of Methods of Quality Control for Capsule of Total Phenolic Acid from *Oenanthe Javanica*

TIAN Dan^①, CHEN Jing-chun^①, YANG Xin-bo^②, HUANG Zheng-ming^③

^① College of Life Science and Technology Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

^② Institute of Geriatrics, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

^③ Department of Pharmacy Hospital 302 of PLA, Beijing 100039, China

[Abstract] **Objective** To establish a quality standard for the capsule of total phenolic acid extracted from *Oenanthe Javanica*. **Methods** *Oenanthe Javanica* was identified by thin layer chromatography. Folin-Phenol method was applied to the determination of total phenolic acid while high performance liquid chromatography-DAD was established to determine the concentration of chlorogenic acid in total phenolic acid. Chromatographic conditions: Diamonsil C₁₈ column was used as the stationary phase; gradient elution was adopted with A: acetonitrile-methanol (10:1) B: 0.4% phosphoric acid. The detection wavelength was at 325 nm. **Results** Under the existing technology, the highest concentration of total phenolic acid was 32.42%; the chlorogenic acid was 9.3%. **Conclusion** The result showed that this method is reliable, accurate and suitable for quality control of the capsule of total phenolic acid from *Oenanthe Javanica*.

[Key words] capsule of total phenolic acid from *Oenanthe Javanica*; chlorogenic acid; folin-phenol method; high performance liquid chromatography; thin layer chromatography

水芹 (*Oenanthe Javanica*, OJ) 为伞形科水芹属植物, 又名水英、蜀芹, 为 1 年生宿根草本, 具有清肝解毒、利水功能, 主治黄疸 (即肝炎)、脉溢 (即心血管病)、驱风 (抗过敏)、消渴 (抗糖尿病) 等症^[1,2]。植物化学研究表明, 水芹全草含有多种脂肪酸、氨基

酸、香豆素、挥发油、酚类及黄酮类化合物, 全草醇水提取物中酚酸类物质为其主要成分^[3], 药效试验证实水芹总酚酸具有很强的抗肝炎病毒活性和明显的退黄降酶效果^[4,6]。本课题拟开发抗肝炎、保肝水芹总酚酸胶囊新药, 初步选定用薄层色谱 (thin layer chromatography, TLC) 法对水芹总酚酸进行定性鉴别, 用 Folin 酚法, 以原儿茶酸为对照品^[7]和高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法作为水芹总酚酸胶囊中总酚酸和其代表成分绿原酸的质量控制方法。

1 仪器与试剂

基金项目: 国家科技部新药基金, No. 96-901-05-016

作者简介: 田 丹, 硕士。研究方向: 中药药理及新药研发。

E-mail: dan0532@yahoo.com.cn

作者单位: ① 100029 北京, 北京化工大学生命科学与技术学院;

② 100853 北京, 解放军 301 医院老年医学研究所药理研究室;

③ 100039 北京, 解放军 302 医院药理学部临床药理研究室

通讯作者: 黄正明, Tel: (010) 66933233 E-mail: huang_zhengming@

sohu.com

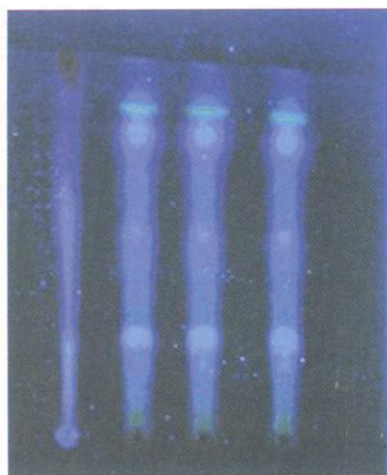
UV-8453 紫外可见分光光度计 (Agilent 公司),

AB265-S电子分析天平(十万分之一)(METTLER TOLEDO公司), KP3200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 高效液相色谱仪: Waters 600泵; Waters DAD996二极管阵列检测器; Waters Millennium 32工作站(Waters公司)。绿原酸、原儿茶酸对照品(均为中国药品生物制品鉴定所), 乙腈、甲醇为色谱纯, 磷酸为优级纯, 钨酸钠、磷钼酸、磷酸、 Na_2CO_3 、醋酸乙酯、异丙醇、甲酸、甲醇、无水乙醇均为分析纯。水芹总酚酸胶囊(规格: 280 mg/粒, 自制, 批号: 20090220, 20090301, 20090303); 聚酰胺薄膜(规格: 8 cm × 8 cm, 50片/盒, 浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂), 试验用水为去离子水。

2 定性鉴别

2.1 性状 本品为胶囊剂(规格: 280 mg/粒, 内容为棕色粉末; 味微苦、略甜)。

2.2 薄层鉴别 分别取 3批水芹总酚酸粉末 0.02 g于 25 ml量瓶中, 加甲醇至刻度, 超声 1 h, 滤过, 滤液浓缩至 2 ml作为供试品溶液; 另取水芹对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。照文献[8]薄层色谱法试验, 吸取上述两种溶液各 5 μ l 分别点于同一聚酰胺薄膜上, 以醋酸乙酯-异丙醇-甲酸-水(6:1:0.2:0.2)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的斑点。薄层色谱结果如图 1。



1 水芹生药材; 2, 3, 4 水芹总酚酸胶囊

图 1 水芹薄层色谱图

3 含量测定

3.1 Folin酚法测定总酚酸含量

3.1.1 溶液的制备 (1)对照品溶液 精密称取

干燥至恒重的原儿茶酸对照品 11.40 mg置 50 ml量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得原儿茶酸标准贮备液(含原儿茶酸 228 μ g/ml)。(2)供试品溶液 精密称取按最佳提取分离工艺放大生产的水芹总酚酸胶囊粉末(批号: 20090220) 0.0106 g于 100 ml量瓶中, 用甲醇定容, 超声使溶解, 离心取上清即得。(3)福林试剂的配制 称取钨酸钠 40 g, 磷钼酸 8 g和 85%磷酸 20 ml溶于 300 ml水中, 煮沸加热回流 2 h, 冷却, 稀释至 400 ml置于棕色瓶中保存。(4) Na_2CO_3 溶液的配制 称取 15 g Na_2CO_3 , 溶于 200 ml水中, 即为 75 g/L Na_2CO_3 溶液。

3.1.2 测定方法 精密吸取样品溶液 1 ml于 10 ml带塞试管中, 加入 2.5 ml福林试剂, 放置 5 min, 再加入 Na_2CO_3 溶液 2 ml, 50℃水浴保持 5 min, 再取出室温放置 2 h, 于 760 nm^[7]测定吸光度。

3.1.3 标准曲线的绘制 从原儿茶酸标准贮备液中分别吸取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 ml于 25 ml量瓶中, 甲醇稀释定容, 摇匀, 浓度分别为 4.56, 9.12, 13.68, 18.24, 22.80, 27.36, 31.92, 36.48, 41.04, 45.60 μ g/ml, 分别从中精密吸取 1 ml按 3.1.2项下测定法反应, 测定吸光度。以最终浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)值为纵坐标, 得回归方程:

$$A = 0.0226C + 0.0035, r = 0.9998, n = 10$$

结果表明 原儿茶酸在 4.56~45.60 μ g/ml范围内呈良好的线性关系。

3.1.4 稳定性试验 取水芹总酚酸胶囊(批号: 20090301), 按 3.1.1项供试品溶液制备方法制备样品溶液, 并按照 3.1.2项测定方法反应后, 每隔 5 min测定 1次, 观察吸光度值变化, 结果表明: 样品显色后在 15~45 min之内吸光度值稳定, RSD为 1.45%。

3.1.5 精密度试验 精密吸取对照品按上述反应后连续测定 5次, 吸光度值 RSD为 1.20%, 结果表明仪器精密度良好。

3.1.6 重复性试验 取同一批样品(批号: 20090220)平行 5份, 精密称定, 按 3.1.1项供试品溶液制备方法制备样品溶液, 并按照 3.1.2项测定方法反应。样品平均含量为 21.42%, RSD为 2.72%, 结果表明该方法重复性良好。

3.1.7 回收率试验 精密称取同一批号(批号: 20090220)的水芹总酚酸胶囊样品 8份, 分别加入一定量的原儿茶酸对照品, 按 3.1.1项下方法制得供

试液后,按 3.1.2项下显色和测定,计算总酚酸的回收率,结果见表 1。

表 1 总酚酸测定回收率 (n = 8)

取样量 (μg)	样品量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	\bar{x} (%)	RSD (%)
4000	856.77	228.00	1068.92	98.53		
4000	856.77	228.00	1057.43	97.47		
4300	921.03	456.00	1386.74	100.71		
4100	878.19	456.00	1325.49	99.34		
4200	899.61	684.00	1597.67	100.89	99.90	1.38
4600	985.28	684.00	1698.93	101.77		
4600	985.28	912.00	1904.85	100.39		
4600	985.28	912.00	1898.43	100.06		

3.1.8 含量测定 分别精密称取 3批水芹总酚酸胶囊粉末适量,按 3.1.1方法制备供试品溶液,按 3.1.2项下显色和测定,记录吸光度,根据标准曲线计算含量,(样品含量较高时,应稀释适当倍数,使吸光度(A)值在线性范围内)结果见表 2。

表 2 水芹总酚酸胶囊中总酚酸含量测定结果 (n = 5)

批号	含量 (%)
20090220	21.42
20090301	32.42
20090303	31.33

3.2 HPLC法测定总酚酸中绿原酸含量

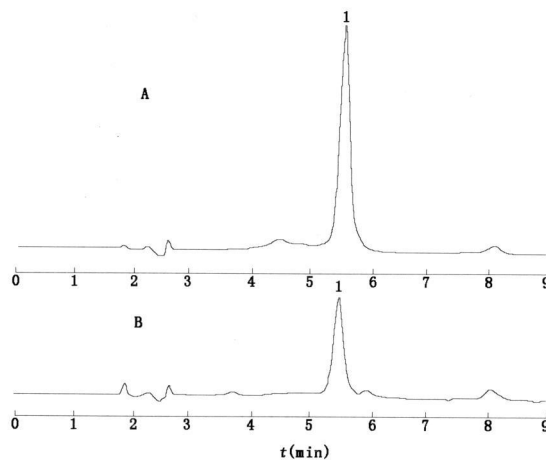
3.2.1 溶液的制备 (1)对照品溶液 精密称取干燥至恒重的绿原酸对照品 4.85 mg置 25 ml棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得绿原酸标准品贮备液(含绿原酸 0.194 mg/ml),精密移取贮备液 5.0 ml置 25 ml棕色量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀即得 38.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 绿原酸标准品溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。(2)供试品溶液 精密称取按最佳提取分离工艺放大生产的水芹总酚酸胶囊粉末约(批号:20090303)0.01 g于 50 ml量瓶中,甲醇定容,超声使溶解,0.45 μm 有机系滤膜滤过,即得。

3.2.2 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A: 乙腈-甲醇(10:1) B: 0.4%磷酸; 检测波长: 325 nm,柱温: 室温; 梯度洗脱; 洗脱程序见表 3。

表 3 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相 A (%)
0~ 32	16
32~ 35	16~ 27
35~ 52	27
52~ 53	27~ 16
53~ 60	16

在以上色谱条件下,样品中绿原酸与其他组分的色谱峰分离良好,见图 2。



A: 对照品; B 样品; 1 绿原酸

图 2 HPLC 色谱图

3.2.3 检测波长的选择 采用 DAD检测器对绿原酸标准品进行扫描,考虑吸收峰强度及溶剂干扰情况,选择 325 nm最大吸收处作为检测波长。

3.2.4 线性关系的考察和标准曲线 精密吸取对照品溶液 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 μl 依次注入 HPLC仪,测定绿原酸峰面积,以绿原酸含量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,结果表明绿原酸进样量在 97~ 485 ng范围内呈良好的线性关系,其回归方程为:

$$Y = 2860.5X + 25.339, r = 0.9999, n = 5$$

3.2.5 精密度试验 精密吸取绿原酸对照品溶液 10 μl 在上述色谱条件下,重复进样 6次,以绿原酸峰面积计算 RSD为 1.43%,表明本方法精密度良好。

3.2.6 稳定性试验 精密吸取供试品(批号:20090301)溶液 10 μl 分别在 0, 1, 3, 5, 7, 10 h进样,按上述色谱条件测定峰面积,得 RSD为 1.02%,说明供试品在 10 h内稳定,能满足含量测定的需要。

3 2 7 重复性试验 取同一批样品(批号: 20090303) 6份, 按 3 2 1(2)项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 按 3 2 2色谱条件进行测定, 计算绿原酸的平均含量为 9.3%, RSD为 1.0%, 结果表明本方法具有较好的重复性。

3 2 8 加样回收率试验 精密称取已知含量的水芹总酚酸胶囊粉末(批号: 20090303) 21.54 mg置 100 ml量瓶中, 按 3 2 1(2)项下供试品溶液配制方法制备样品贮备液, 精密移取 15.0 ml该贮备液 6份置 25 ml量瓶中, 精密加入按 3 2 1(1)项下制备的绿原酸对照品溶液 7.0 ml按 3 2 1(2)项下制备供试品溶液, 按 3 2 2色谱条件进行测定, 计算回收率。

表 4 回收率测定结果 (n = 6)

取样量 (ml)	样品量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	\bar{x} (%)	RSD (%)
15.0	300.59	271.6	591.55	103.38		
15.0	300.59	271.6	588.02	102.76		
15.0	300.59	271.6	578.97	101.18	101.99	1.20
15.0	300.59	271.6	587.62	102.69		
15.0	300.59	271.6	582.67	101.83		
15.0	300.59	271.6	572.54	100.06		

3 2 9 样品测定 分别精密称取 3批水芹总酚酸胶囊样品, 按 3 2 1(2)方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定绿原酸含量, 结果见表 5。

表 5 水芹总酚酸胶囊样品测定结果 (n = 6)

批号	含量(%)
20090220	6.7
20090301	7.0
20090303	9.3

4 讨论

4 1 本实验室中生产的水芹总酚酸泛指所有能被醇水系统提取的含酚羟基的成分, 植物总多酚的测定方法有很多, 曾尝试过铁氰化钾-三氯化铝法^[9]、

重氮化比色法^[10]等, 都因显色不稳定或步骤繁琐而未被采用。Folin酚法常见于花粉和蜂蜜中总酚类的含量测定, 本实验将其引入植物总酚酸的测定。实验证实, 该方法重复性更好、反应体系稳定性更高、实验步骤更简单、对实验人员专一性要求低, 因此更易于生产工艺质量控制定量分析要求。

4 2 检测波长的确定 用二极管阵列检测器分析比较了绿原酸对照品色谱峰和样品所测成分相应色谱峰的紫外光谱, 结果对照品和样品中绿原酸均在 324.4 nm 有最大吸收, 故选择 325 nm 为测定波长。

4 3 洗脱程序的确定 曾经选用乙腈-甲醇、乙腈-甲醇-0.4%磷酸等体系进行等度和梯度洗脱, 结果表明采用等度洗脱, 分离度达不到要求, 样品中物质也不能完全出峰, 影响后续分离。因此, 选用乙腈-甲醇-0.4%磷酸梯度洗脱, 按照洗脱程序, 每次运行梯度后, 柱平衡 7 min 得到的色谱峰分离度较好。

[参考文献]

- [1] 毕丽君, 李慧. 水芹中总黄酮类化合物最佳提取工艺的研究 [J]. 食品科学, 1999, 12: 647-650
- [2] 黄正明, 杨新波, 曹文斌, 等. 中药水芹的现代研究与应用 [J]. 解放军药学报, 2001, 17(5): 266-268
- [3] 黄正明, 杨新波. 抗肝炎中药现代研究与应用 [M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2006: 35-36
- [4] Han YQ, Huang ZM, Yang XB, et al. In vivo and vitro anti-hepatitis B virus activity of total phenolics from *Oenanthe javanica* [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 118: 148-153
- [5] 年国侠, 黄正明, 杨新波, 等. 水芹总酚酸退黄作用的实验研究 [J]. 解放军药学报, 2009, 25(2): 124-125
- [6] 王选举, 黄正明, 杨新波, 等. 水芹总酚酸对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 与 HBeAg 的抑制作用 [J]. 解放军药学报, 2009, 25(2): 148-150
- [7] 张赛群, 梁妍, 杨杰, 等. 紫外分光光度法测定紫云英蜜中总酚的含量 [J]. 数理医药学杂志, 2008, 21(5): 593-596
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005 附录 31
- [9] 于敏, 弥宏, 焦连庆. 蜂胶总黄酮中阿魏酸与总酚酸的含量测定 [J]. 中药材, 2005, 28(12): 1117-1118
- [10] 李楠, 秦学孔, 彭辉. 茶多酚含量重氮化偶合分光光度法测定 [J]. 大连理工大学学报, 2000, 40(4): 425-427

(收稿日期: 2009-08-17; 修回日期: 2009-11-30)

(本文编辑 魏萍)