

双波长 RP-HPLC法同时测定茵陈蒿中绿原酸、咖啡酸和对羟基苯乙酮的含量

王志伟^{1,2}, 高钧², 谭晓杰¹, 马婷婷¹, 陈晓辉¹, 毕开顺^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016 2. 天津天士力集团有限公司, 天津, 300402)

摘要 目的: 建立同时测定茵陈蒿中绿原酸、咖啡酸和对羟基苯乙酮含量的方法。方法: 采用紫外-双波长同时检测的 RP-HPLC法: C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.04% 磷酸水溶液 (9:91), 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长: 325 nm (绿原酸、咖啡酸); 275 nm (对羟基苯乙酮)。结果: 绿原酸、咖啡酸和对羟基苯乙酮进样浓度分别在 52.10~1.303 $\times 10^3$ μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r=0.9999$)、1.756~43.91 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r=0.9999$)、0.6574~16.43 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r=0.9995$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($n=5$); 方法回收率 ($n=9$) 分别为 98.1%, 98.6%, 100.8%。结论: 方法简便、快速、准确, 重现性好, 为茵陈蒿药材的质量控制提供依据。

关键词: 多波长; 茵陈蒿; 绿原酸; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-0919-04

RP-HPLC simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and 4-hydroxyacetophenone in herb of *Artemisia capillaris* Thunb. under different UV-vis wavelengths

WANG Zhi-wei^{1,2}, GAO Jun², TAN Xiao-jie¹, MA Ting-ting¹, CHEN Xiao-hui¹, BIKai-shun^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China 2. Tianjin Tasly Group Co., Ltd, Tianjin 300402 China)

Abstract Objective To establish a method for the determination of chlorogenic acid, caffeic acid and 4-hydroxyacetophenone in herb of *Artemisia capillaris* Thunb. simultaneously under different UV wavelengths. **Methods** An RP-HPLC method detected by different UV wavelengths—325 nm for chlorogenic acid and caffeic acid, 275 nm for 4-hydroxyacetophenone respectively had been developed. The system consisting of a C_{18} column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) and a mixture of acetonitrile and 0.04% phosphate acid as the mobile phase was adopted. The flow rate was 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹. **Results** The linear response range was 52.10~1.303 $\times 10^3$ μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r=0.9999$), 1.756~43.91 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r=0.9999$) and 0.6574~16.43 μ g $\cdot$ mL⁻¹ ($r=0.9995$), respectively ($n=5$). The average recoveries ($n=9$) of chlorogenic acid, caffeic acid and 4-hydroxyacetophenone were 98.1%, 98.6% and 100.8%, respectively. **Conclusion** The assay demonstrates that the method has adequate accuracy and selectivity to measure the four chemical constituents in herb of *Artemisia capillaris*.

Key words different UV wavelengths; *Artemisia capillaris* Thunb.; chlorogenic acid; RP-HPLC

茵陈 (Herba *Artemisiae Scopariae*) 为菊科植物滨蒿 *Artemisia scoparia* Walldst et Kit 或茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb. 的干燥地上部分, 味苦辛, 性微寒, 具有清湿热、退黄疸之功效, 用于黄疸尿少、湿疮搔痒、传染性黄疸型肝炎, 作为常用中药收载于中国药典 2005年版中^[1]。大量文献报道, 绿原酸、咖啡酸和对羟基苯乙酮均为茵陈药材利胆作用的有效

成分。酚酸类成分咖啡酸结构中有 2 个酚羟基, 是良好的抗氧化剂, 能较好地纠正脂质过氧化和自由基负荷, 有较持久的利胆作用^[2]。绿原酸是有咖啡酸和奎宁酸组成的缩酚酸, 有较强的生物活性保肝利胆、抗肿瘤、抗菌抗病毒等, 其水解能产生咖啡酸, 从而发挥更持久的利胆作用^[3,4]。据报道, 对羟基苯乙酮 25~50 mg $\cdot$ kg⁻¹ 十二指肠给药, 对大鼠有

* 通讯作者 Tel: (024) 23986296 E-mail: bikaishun@yahoo.com

明显利胆作用。50 mg·kg⁻¹时还能增加胆汁中固体物、胆红素和胆酸的含量^[2,5]。因此,对药材中的绿原酸、咖啡酸和对羟基苯乙酮 3 个成分进行定量,明确它们的含量范围,是控制药材质量的关键步骤。对绿原酸及咖啡酸的同时测定^[6]及对羟基苯乙酮的测定^[7]均有报道。本研究根据绿原酸、咖啡酸、对羟基苯乙酮不同的紫外吸收特征,采用高效液相色谱-二极管阵列检测器连用仪器,在不同紫外检测波长下,同时测定茵陈蒿中绿原酸、咖啡酸、对羟基苯乙酮的含量,该方法简便、快速、准确,重现性好,为茵陈蒿药材的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪 (G1315A 二极管阵列检测器); Chem Station 色谱工作站。

对照品绿原酸 (批号: 110752-200212)、咖啡酸 (批号: 20050220), 购自中国药品生物制品检定所, 对羟基苯乙酮 (纯度大于 99.5%), 由沈阳药科大学药物化学实验室提供。乙腈和磷酸为色谱纯, 水为二次蒸馏水。从不同产地收集 11 批茵陈蒿, 均经沈阳药科大学孙启时教授鉴定确认为茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液 精密称定对照品咖啡酸 5.5 mg 对羟基苯乙酮 2.1 mg 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀即得两者的对照品储备液。取绿原酸 6.5 mg 精密称定, 置于 5 mL 量瓶中, 分别精密加入咖啡酸、对羟基苯乙酮的对照品储备液各 1 mL, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得绿原酸浓度为 $1.300 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、咖啡酸浓度为 $44.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、对羟基苯乙酮浓度为 $16.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液 取茵陈蒿药材 0.5 g 精密称定, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 50% 甲醇水溶液 100 mL, 加热回流提取 1 h 放冷, 过滤, 旋转蒸发至干, 残渣用甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶中并稀释至刻度, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 色谱条件 色谱柱: Luna C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.04% 磷酸水 (9:91); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 30 °C; 紫外检测波长: 325 nm (绿原酸、咖啡酸)、275 nm (对羟基苯乙酮); 进样量: 5 μL 。对照品及样品色谱图见图 1。

2.4 线性关系的考察 分别精密移取混合对照品溶液 0.2 0.5 1.0 2.5 5.0 mL 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀。分别取上述溶液各 5 μL 进

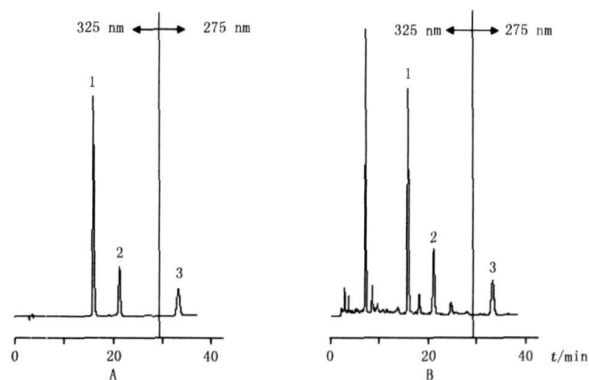


图 1 对照品 (A) 和辽宁样品 (B) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample of Lianying (B)

1. 绿原酸 (chlorogenic acid) 2. 咖啡酸 (caffeic acid) 3. 对羟基苯乙酮 (4-hydroxyacetophenone)

样,在上述色谱条件下进行分析。以各对照品浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归计算, 得绿原酸、咖啡酸、对羟基苯乙酮标准曲线回归方程分别为:

$$Y = 14.6X + 82.0 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 24.6X + 1.13 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 30.9X - 3.87 \quad r = 0.9995$$

绿原酸、咖啡酸、对羟基苯乙酮进样浓度分别在 $52.1 \sim 1.30 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.76 \sim 43.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.657 \sim 16.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取混合对照品溶液, 在上述色谱条件下, 重复进样 6 次, 计算峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.5%, 1.9%。

2.6 溶液稳定性考察 取供试品溶液, 于室温下放置, 分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 进样测定。结果表明, 供试品溶液中绿原酸、咖啡酸、对羟基苯乙酮在 24 h 内稳定, RSD 分别为 0.2%, 1.3%, 1.9%。

2.7 重复性试验 精密量取同一样品 6 份, 依“2.2”项下的方法操作, 在上述色谱条件下分析测定。绿原酸平均含量 0.796%, RSD 为 1.8%; 咖啡酸平均含量 0.015%, RSD 为 1.9%; 对羟基苯乙酮平均含量 0.019%, RSD 为 0.8%。

2.8 回收率试验 精密称取“2.7”项已测知含量的茵陈蒿药材约 0.25 g 9 份, 3 份为一组, 各组分别精密加入一定量的对照品, 中浓度组中加入的量相当于 0.25 g 药材中所含有的 3 种化学成分的量, 低浓度组减半, 高浓度组增 1 倍, 按“2.2”项下的方法操作, 制成高、中、低 3 个浓度的溶液, 在上述色谱

条件下进行分析测定, 结果见表 1。

表 1 绿原酸、咖啡酸和对羟基苯乙酮的回收率测定结果 ($n = 3$)

Tab 1 The results of the recoveries of chlorogenic acid, caffeic acid and 4-hydroxyacetophenone

成分 (component)	药材含量 (sample content) /mg	加入量 (Added) /mg	测得量 (found) /mg	回收率 (recovery) %	RSD %	平均回收率 (mean recovery) %
绿原酸 (chlorogenic acid)	1.99	1.11	3.10	99.8	2.4	98.1
	1.99	2.21	4.15	97.9	1.2	
	1.99	3.32	5.19	96.3	0.1	
咖啡酸 (caffeic acid)	0.04	0.02	0.06	97.8	0.9	98.6
	0.04	0.04	0.07	96.9	0.5	
	0.04	0.06	0.10	100.8	1.4	
对羟基苯乙酮 (4-hydroxyacetophenone)	0.05	0.03	0.07	99.4	1.0	100.8
	0.05	0.05	0.10	100.9	0.3	
	0.05	0.10	0.15	101.8	0.5	

2.9 样品测定 按“2.2”项下的方法制备供试品溶液, 进样测定, 以外标法计算 11 批茵陈蒿中绿原酸、咖啡酸和对羟基苯乙酮含量, 结果见表 2。

表 2 绿原酸、咖啡酸和对羟基苯乙酮测定结果 (% , $n = 3$)

Tab 2 The results of determination of chlorogenic acid, caffeic acid and 4-hydroxyacetophenone

收集地 (collecting locality)	绿原酸 (chlorogenic acid)	咖啡酸 (caffeic acid)	对羟基苯乙酮 (4-hydroxyace- tophenone)
辽宁 1 (Liaoning 1)	0.802	0.014	0.021
辽宁 2 (Liaoning 2)	0.851	0.021	0.027
江西 (Jiangxi)	0.471	0.016	0.002
河北 (Hebei)	0.415	0.027	0.028
青岛 (Qingdao)	0.260	0.058	0.006
河南 (Henan)	2.14	0.017	0.024
浙江 (Zhejiang)	0.329	0.031	0.021
福建 (Fujian)	0.136	0.023	0.005
江苏 (Jiangsu)	0.674	0.037	0.027
陕西 (Shaanxi)	0.856	0.030	0.024
天津 (Tianjin)	0.609	0.013	0.026

3 讨论

3.1 本实验采用了超声提取法考察了水、乙醇、甲醇的提取效率, 结果表明甲醇提取效率最高; 又采用了超声提取法考察了 20% 甲醇水溶液、50% 甲醇水溶液、80% 甲醇水溶液、95% 甲醇水溶液的提取效率, 结果表明 50% 甲醇水溶液提取效率最高; 又以 50% 甲醇水溶液作为提取溶剂比较了回流提取与超声提取 2 种提取方法, 发现回流提取效率大大高于超声提取。在此基础上, 考察了回流提取的次数对实验结果的影响, 结果表明回流提取 1 次即可将药材中绿原酸、咖啡酸和对羟基苯乙酮提取完全。

3.2 中药茵陈蒿中化学成分比较复杂, 从其紫外扫

描图上可以看出, 绿原酸、咖啡酸的最大吸收波长为 325 nm, 对羟基苯乙酮为 275 nm, 为提高对 3 个成分检测的灵敏度和准确度, 故分别选择各自的最大吸收波长作为检测波长, 进行多波长同时检测, 从而实现对 3 个成分的同时测定, 以全面评价药材的质量状态。

3.3 本实验考察了多种流动相系统, 包括甲醇-醋酸水溶液系统、乙腈-醋酸水溶液系统和乙腈-磷酸水溶液系统, 结果表明使用乙腈-磷酸水溶液系统可使样品中待测成分得到满意的分离, 且分析时间最短。

3.4 茵陈蒿应用范围广泛, 中国药典 2005 年版中仅记载性状描述, 并无含量测定项^[1]。本实验建立了多波长反相高效液相色谱法同时测定茵陈蒿中绿原酸、咖啡酸、对羟基苯乙酮含量, 方法简便、快速、准确, 重复性好, 可以为茵陈蒿的质量控制提供依据。

参考文献

- ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部). 166
- KE Ming-qing(柯铭清). Physicochemical and Pharmacological Nature of Effective Components in Chinese Herbal Medicine(中草药有效成分理化与药理特性). 2nd Ed(第二版). Hunan(湖南): Hunan Science & Technology Press(湖南科学技术出版社), 1982. 223, 261
- WU Wei-hua(吴卫华), KANG Zhen(康桢), OUYANG Dong-sheng(欧阳冬生), et al. Progresses in the pharmacology of chlorogenic acid(绿原酸的药理学研究进展). Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2006(18): 691
- DENG Liang(邓良), YUAN Hua(袁华), YU Zong-yuan(喻宗沅). Research progress of chlorogenic acid(绿原酸的研究进展). Chem Bioeng(化学与生物工程), 2005(7): 4
- HOU Jia-yu(侯家玉). Pharmacology of Traditional Chinese Medi-

- cine(中药药理学). Beijing(北京): China Trditional Chinese Medicine PublishingHouse(中国中医药出版社), 2005 101
- 6 DENG Xiang-yu(邓湘昱), SUN Guo-xiang(孙国祥), LIU Xiao(刘霄). Determination of chlorogenic acid and caffeic acid in *Herba Artemisiae Scopariae* and *Shegan Kangbingdu* injection by RP-HPLC (茵陈及射干抗病毒注射液中绿原酸和咖啡酸的含量测定). *China Pharm*(中国药业), 2005 14(4): 41
- 7 KAI Li-man(开丽曼), LI Li(李俐), Ahamaitijang(阿合买提江), *et al* Abstraction and assay ing of *p*-hydroxyacetophenone from *Rhodiola Pamiro-alaica* A. Bor(帕米尔红景天中对羟基苯乙酮成分的提取分离及其含量测定). *China Pharm*(中国药师), 1999 2(4): 169

(本文于 2008年 1月 28日收到)

关于举办 2009药用辅料及药包材质量控制技术国际论坛的通知

为促进中国药用辅料、药包材行业的发展, 进一步提高技术检测水平, 完善技术审评机制, 为药品监管部门、技术检测部门、药用辅料、药包材、药品等生产企业提供一个互动交流与沟通的平台, 扩大中外医药界的交流与合作, 中国药品生物制品检定所与中国医药国际交流中心拟于 2009年 6月 18日 - 19日在北京举办“2009药用辅料及药包材质量控制技术国际论坛”。大会拟邀请药监部门官员、中国药品生物制品检定所、国际药典会及药品审评中心专家、美国药用辅料协会专家出席会议并做专业演讲。现将会议有关事项通知如下:

一、会议组织单位

主办单位: 中国药品生物制品检定所、中国医药国际交流中心

协办单位: 国际药用辅料协会(中国)有限公司

二、时间与地点

会议时间: 2009年 6月 18日 - 19日

会议地点: 北京广西大厦(北京市朝阳区潘家园华威里 26号)

三、收费标准会议注册费: 2200元/人, 各省药监局及药检所代表: 1000元/人。

会议注册费包括: 会务费、资料费、会间茶歇、两天自助午餐、1天晚餐的费用。

住宿费用自理。广西大厦标准间(含双早)380元/天/间。(酒店预订见附件 2)。

四、参会对象与报名办法

各级政府主管部门、各级药品检验机构、药用辅料生产企业、药用辅料经营企业、药包材生产企业、药包材经营企业、药品生产企业等相关人员均可报名参加。

凡欲参会人员, 请于 6月 12日前登陆 www.ccpie.org 或 www.chinapharmex.com 在线注册报名或填写报名表(见附件 2)并传真至中国医药国际交流中心, 超过此日期或参会代表名额已满将不再接受报名, 请予谅解。报名同时请汇寄会议注册费。

五、联系方式

中国医药国际交流中心: 郑鹏、成建英、乔燕

电话: 010- 82212866/6018/6008/6002

传真: 010- 82212857

电子邮箱: chinapham@ccpie.org

网址: www.ccpie.org www.chinapharmex.com

中国药品生物制品检定所药用辅料及包材室

汤龙、孙会敏

电话: 010- 67095696 010- 67095721

详细内容请浏览: <http://www.nicbpb.org.cn>