

RP-HPLC法同时测定艾叶及其炮制品中棕矢车菊素和异泽兰黄素的含量^Δ

周倩*, 孙立立#, 江波, 戴衍朋(山东省中医药研究院, 济南 250014)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4464-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.16

摘要 目的:建立同时测定艾叶及其炮制品(醋艾叶、艾叶炭、醋艾炭)中棕矢车菊素和异泽兰黄素含量的方法,为控制艾叶及其炮制品质量提供新的评价指标。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(37:63, V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为25℃,检测波长为330 nm。结果:棕矢车菊素和异泽兰黄素的质量浓度分别在0.01~0.20、0.01~0.16 mg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 5、0.999 9);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;平均加样回收率分别为99.72%、101.19%,RSD分别为1.48%、0.90%(n 均为6)。两种成分在艾叶、醋艾叶中含量较高,在艾叶炭和醋艾炭中含量极低或未检测到。结论:该方法简便、易行,测定结果准确、重复性好,可用于评价和控制艾叶和醋艾叶饮片的质量。

关键词 反相高效液相色谱法;艾叶;棕矢车菊素;异泽兰黄素;含量测定;炮制

Simultaneous Determination of Eupatilin and Jaceosidin in *Artemisia argyi* and Its Processed Products by RP-HPLC

ZHOU Qian, SUN Li-li, JIANG Bo, DAI Yan-peng(Shandong Academy of TCM, Jinan 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of eupatilin and jaceosidin in *Artemisia argyi* and its processed products (*A. argyi* acetum, *A. argyi* carbonisata, *A. argyi* carbonisata with vinegar), and to provide new evaluation index for quality control of *A. argyi* and its processed products. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid (37:63, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 25 °C and detection wavelength was set at 330 nm. RESULTS: The linear ranges were 0.01-0.20 mg/ml for eupatilin ($r=0.999\ 5$) and 0.01-0.16 mg/ml for jaceosidin ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were lower than 3%. The average recoveries were 99.72% (RSD=1.48%, $n=6$) and 101.19% (RSD=0.90%, $n=6$). The content of eupatilin and jaceosidin were higher in *A. argyi* and *A. argyi* acetum, while in *A. argyi* carbonisata and *A. argyi* carbonisata with vinegar, the two compound were not detected or very low. CONCLUSIONS: The method is simple, convenient, accurate and reproducible, and can be used for quality control and evaluation of *A. argyi* and *A. argyi* acetum decoction piece.

KEY WORDS RP-HPLC; *Artemisia argyi*; Eupatilin; Jaceosidin; Content determination; Processing

测定其含量,避免校正因子法难以准确推算单一波长下吸收较小成分含量的不足,又可实现以单一对照品计算其他成分的含量。

综上,本方法简便、合理、可靠,可较全面、真实地揭示虎杖药材的内在质量特征。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 194-195.
- [2] 于绍华. 虎杖的功效及药理作用研究进展[J]. 中国健康月

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81173545); 国家中医药管理局中医药行业科研专项项目(No.200807039); 《山东省中药炮制规范》2012版标准研究课题

* 助理研究员, 硕士。研究方向:中药炮制。电话:0531-82949829。E-mail:merveilleqq@163.com

通信作者:研究员。研究方向:中药新药与中药炮制原理。电话:0531-82949829。E-mail:xingerx@163.com

刊, 2011, 30(5):46.

- [3] 李菁雯, 陈祥龙, 孟祥智. 虎杖及其提取物的研究进展[J]. 中医药学报, 2011, 30(5):141.
- [4] 施翠英, 邓放, 任波. 应用HPLC法探究虎杖泻心汤中蒽醌类成分的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(11):1 010.
- [5] 孟宪生, 艾立, 罗国安, 等. 基于腰痛宁指纹图谱多指标成分定量方法研究[J]. 中成药, 2009, 31(5):657.
- [6] 卫仲河, 孟宪生, 包永睿, 等. HPLC三波长融合法对芒硝三棱相畏物质基础研究[J]. 中药材, 2011, 34(6):914.
- [7] 江生. 校正因子法测定盐酸帕洛诺司琼异构体的含量[J]. 中国药业, 2008, 17(17):14.
- [8] 罗祖良, 仇峰, 韦日伟, 等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(7):1 448.
- [9] 侯志飞, 孙国祥. 栀子双波长融合高效液相色谱数字化指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9):2 353.

(收稿日期:2012-12-02 修回日期:2013-01-24)

艾叶来源于菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl.et Vant. 的干燥叶^[1], 具有散寒止痛、温经止血之功效, 是妇科常用药。目前, 2010年版《中国药典》(一部)和全国及各省(市)中药炮制规范中收录的艾叶炮制规格主要包括生艾叶、醋艾叶、艾叶炭和醋艾炭几种。长期以来, 艾叶饮片尤其是其炮制品多凭外观性状和简单的理化鉴别来控制其质量; 2010年版《中国药典》(一部)以桉油精为指标来控制生艾叶的质量。但是有研究发现, 艾叶中桉油精含量较低, 且受产地、采集时间和贮藏时间的影响较大^[2-3], 并且炮制后含量还会显著降低^[4], 因此无法作为炮制品的质量控制指标。

挥发油和黄酮类成分为艾叶的主要有效成分。有文献报道采用气相色谱(GC)法测定艾叶中龙脑和石竹烯的含量^[5], 但对黄酮类成分的研究多针对总黄酮含量展开, 以黄酮单体成分为指标考察艾叶饮片质量的研究报道几乎没有。本课题组前期研究发现, 醋艾叶饮片中黄酮类成分棕矢车菊素和异泽兰黄素的含量均比较高^[6], 且异泽兰黄素是艾叶止血、抗凝血的活性成分^[7]。因此, 本试验针对这两种成分的含量测定方法进行了研究, 建立了一种反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定法, 并采用该方法对生艾叶、醋艾叶、艾叶炭、醋艾炭饮片中的棕矢车菊素和异泽兰黄素进行了含量测定。

1 材料

1.1 仪器

600型HPLC仪, 含996型二极管阵列检测器等(美国Waters公司); R200D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司); B3200S-T型超声机[必能信超声(上海)有限公司]; HH-4型数显恒温水浴锅(金坛市晶玻实验仪器厂)。

1.2 试剂

棕矢车菊素、异泽兰黄素对照品由我院中药炮制研究室自制, 经HPLC检测纯度均>98%; 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 甲醇、乙醇、磷酸等试剂均为分析纯; 龙门米醋(北京王致和味滋康食品有限公司, 批号: 090821)。

1.3 中药饮片

艾叶饮片购自安徽沪淮中药饮片厂, 产地为安徽, 经我院林慧彬研究员鉴定为菊科植物艾 *A. argyi* Levl.et Vant. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 艾叶各炮制品的制备^[8-9]

艾叶各炮制品均为我院中药炮制研究室照实验室优选的最佳炮制工艺进行制备, 具体方法见表1。

表1 艾叶不同炮制品的制备方法

Tab 1 Preparation methods for different processed products of *A. argyi*

炮制品	产地	制备方法
醋艾叶	安徽	取净艾叶适量, 淋入15%的米醋(加入前与适量水混匀)至净艾叶中拌匀, 闷润25 min, 220℃炒制28 min, 取出, 晾凉
醋艾炭	安徽	取净艾叶适量, 揉散, 360℃翻炒16 min, 炒制过程中喷洒15%的米醋, 灭尽火星, 取出, 放凉
艾叶炭	安徽	取净艾叶适量, 揉散, 360℃翻炒16 min, 炒制过程中喷洒少许清水, 灭尽火星, 取出, 放凉

2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2%磷酸溶液(37:63, V/V); 检测波长: 330 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 25℃; 进样量: 10 μl。

2.3 混合对照品溶液的制备

分别取对照品棕矢车菊素10 mg、异泽兰黄素8 mg, 精密称定, 置同一25 ml量瓶中, 加适量甲醇溶解并定容, 作为混合对照品贮备液。精密吸取混合对照品贮备液1 ml, 置10 ml量瓶中, 加甲醇稀释并定容, 摇匀, 作为混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

分别取艾叶生品及其各炮制品粉末(过40目筛)0.5 g, 精密称定, 精密加入甲醇20 ml, 称质量, 超声提取30 min, 放凉, 再次称质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 以滤纸滤过, 取续滤液, 过0.45 μm微孔滤膜, 即得。

2.5 系统适用性试验

分别精密吸取混合对照品溶液和醋艾叶的供试品溶液10 μl注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定。结果显示, 棕矢车菊素和异泽兰黄素的色谱峰与其他峰均可达到基线分离, 且保留时间适中; 供试品保留时间和峰形与对照品一致。色谱见图1。

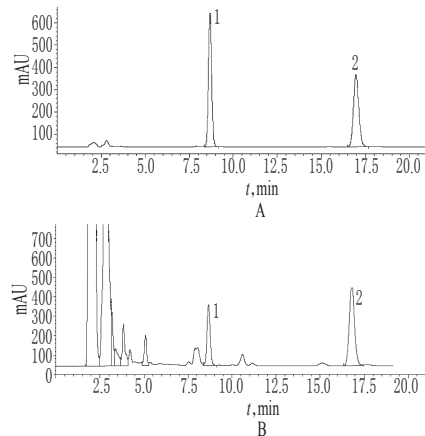


图1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 棕矢车菊素; 2. 异泽兰黄素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test samples; 1. eupatilin; 2. jaceosidin

2.6 线性关系考察

精密吸取混合对照品贮备液0.25、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 ml, 分别置于10 ml量瓶中, 加甲醇稀释并定容, 摇匀。分别吸取10 μl, 依次注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积。以对照品质量浓度(x, mg/ml)为横坐标, 峰面积积分值(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得棕矢车菊素、异泽兰黄素的回归方程分别为 $y=182\ 649.34x+412.18$ ($r=0.999\ 5, n=6$) $y=209\ 533.81x+126.96$ ($r=0.999\ 9, n=6$)。结果表明, 棕矢车菊素和异泽兰黄素的质量浓度分别在0.01~0.20、0.01~0.16 mg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.7 精密度的试验

精密吸取混合对照品溶液10 μl, 按上述色谱条件连续进

样测定5次,记录峰面积。结果显示,棕矢车菊素和异泽兰黄素峰面积的RSD分别为0.41%和0.30%(n 均为5),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

精密吸取醋艾叶的供试品溶液10 μ l,分别于0、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,棕矢车菊素和异泽兰黄素峰面积的RSD分别为1.90%和1.64%(n 均为5),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.9 重复性试验

取醋艾叶样品粉末6份,每份0.5 g,精密称定,分别按“2.4”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样10 μ l,记录峰面积。结果显示,棕矢车菊素的平均质量分数为0.079%,RSD=2.12%($n=6$);异泽兰黄素的平均质量分数为0.153%,RSD=2.33%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的醋艾叶粉末6份,各0.25 g,精密称定,分别精密加入棕矢车菊素和异泽兰黄素对照品适量,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)
Tab 2 Result of recovery tests($n=6$)

成分	样品号	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
棕矢车菊素	1	0.254 3	0.200 9	0.250 0	0.448 5	99.05	99.72	1.48
	2	0.251 7	0.198 8	0.250 0	0.445 2	98.53		
	3	0.257 2	0.203 2	0.250 0	0.453 2	100.02		
	4	0.255 2	0.201 6	0.250 0	0.456 6	101.98		
	5	0.256 8	0.202 9	0.250 0	0.454 7	100.71		
	6	0.253 7	0.200 4	0.250 0	0.445 5	98.03		
异泽兰黄素	1	0.254 3	0.389 1	0.402 0	0.791 6	100.13	101.19	0.90
	2	0.251 7	0.385 1	0.402 0	0.787 7	100.14		
	3	0.257 2	0.393 5	0.402 0	0.801 7	101.53		
	4	0.255 2	0.390 5	0.402 0	0.788 4	98.99		
	5	0.256 8	0.392 9	0.402 0	0.793 1	99.55		
	6	0.253 7	0.388 2	0.402 0	0.793 5	100.83		

2.11 样品含量测定

取艾叶及其炮制品饮片各0.5 g,按“2.4”项下方法制备供试品溶液。吸取供试品溶液和对照品溶液各10 μ l,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(% , $n=3$)

Tab 3 Result of content determination of samples(% , $n=3$)

样品	棕矢车菊素质量分数	异泽兰黄素质量分数
艾叶	0.090	0.174
醋艾叶	0.080	0.152
艾叶炭	0	0.005
醋艾炭	0	0.007

由表3可见,棕矢车菊素和异泽兰黄素在艾叶和醋艾叶饮片中均有比较高的质量分数,提示可作为指标性成分控制这两种饮片的质量。

艾叶经炮制后棕矢车菊素和异泽兰黄素的质量分数均有

一定程度的下降,醋艾叶降低较小,艾叶炭和醋艾炭降低明显,几乎损失殆尽。该变化可为揭示艾叶炮制原理及其科学内涵提供一定的试验依据。

3 讨论

本试验前期对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2%磷酸溶液等流动相系统进行了比较,结果显示,以乙腈-0.2%磷酸溶液(37:63, V/V)作为流动相洗脱,各色谱峰的保留时间适中,分离度较好,且基线稳定。不同柱温的分离效果比较试验表明,柱温对分离效果影响不大,因此选择柱温为室温(25 $^{\circ}$ C)。通过对不同检测波长的比较发现,330 nm波长条件下的色谱峰峰面积较大,色谱图基线噪声较低,因此选择330 nm为检测波长。

在供试品溶液的制备中,本课题组对不同提取溶剂(甲醇、乙醇、70%甲醇、50%甲醇、30%甲醇)、不同提取方法(超声和回流提取)以及提取时间等进行了考察。结果显示,以甲醇作为提取溶剂,所得棕矢车菊素、异泽兰黄素的质量分数最高;超声法提取所得样品质量分数高于回流法;提取60 min与30 min的结果相比未见明显差异,故确定了“2.4”项下的供试品溶液制备方法。

艾叶作为临床常用药之一,长期以来仅凭外观性状(眼看、口尝、鼻闻和手摸等传统经验)和简单的理化鉴别来控制质量,缺少客观的质量评价和控制指标,无法保证临床用药的安全性和有效性。本试验建立了艾叶及其炮制品饮片中棕矢车菊素和异泽兰黄素的含量测定方法,该方法简便、易行,测定结果准确、重复性好,可用于评价和控制艾叶与醋艾叶饮片的质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:83.
- [2] 陈宗良,张慧芳. 艾叶、野艾及细艾叶的比较鉴别[J]. 中药材,1999,22(5):235.
- [3] 靳然,于密密,赵百孝,等. 不同年份蕲艾叶及不同比例艾绒化学成分研究[J]. 中国针灸,2010,30(5):389.
- [4] 张甜甜,孙立立,周倩,等. 艾叶及其炮制品种挥发油成分GC-MS研究[J]. 中成药,2011,33(1):87.
- [5] 王芳,王俊,傅秀娟. 毛细管GC法同时测定艾叶中石竹烯和龙脑的含量[J]. 中国药房,2012,23(27):2551.
- [6] 周倩,孙立立,于凤蕊,等. 醋艾叶饮片HPLC指纹图谱研究暨异泽兰黄素和棕矢车菊素含量测定[J]. 齐鲁药事,2012,31(4):197.
- [7] 梅全喜. 艾叶的药理作用研究概况[J]. 中草药,1996,27(5):311.
- [8] 于凤蕊,孙立立,戴衍朋,等. 醋艾炭炮制工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):23.
- [9] 张甜甜,周倩,吴晓文,等. 醋艾叶饮片炮制工艺研究[J]. 中成药,2012,34(9):1763.

(收稿日期:2012-12-03 修回日期:2013-03-01)