

[9] Shen Y P, Yin H W, Chen B, *et al.* Validated reversed phase-high performance liquid chromatography-diode array detector method for the quantitation of Rutin, a natural immunostimulant for improving survival in aquaculture practice, in *Toonea sinensis* Folium[J]. *Pharmacogn Mag*, 2012, 8(29): 49-53.

[10] Wang K J, Yang C R, Zhang Y J. Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*) [J]. *Food Chem*, 2007, 101(1): 365-371.

[11] Yang H, Gu Q Y, Gao T T, *et al.* Flavonols and derivatives of gallic acid from young leaves of *Toona sinensis* (A. Juss.) Roemer and evaluation of their anti-oxidant capacity by chemical methods[J]. *Pharmacogn Mag*, 2014, 10(38): 382-387.

[12] Cheng K W, Yang R Y, Tsou S C, *et al.* Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon[J]. *J Funct Foods*, 2009, 1(3): 253-259.

[13] 顾芹英, 李慧华, 秦 冬, 等. RP-HPLC 法测定香椿叶中槲皮素-3-*O*- α -*L*-鼠李糖苷[J]. 中成药, 2014, 36(3): 577-579.

[14] 姜祖祥, 任深圳, 王旭波, 等. HPLC 法测定香椿叶中山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(47): 4467-4469.

[15] 夏国华, 童馨苇, 丁 妍, 等. 反相高效液相色谱法测定香椿叶中芸香苷的含量[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(6): 41-42.

[16] 孙小祥, 杨娅娅, 盛玉青, 等. 香椿叶中多酚类成分的研究[J]. 中成药, 2016, 38(9): 1974-1977.

HPLC 法同时测定艾叶中 7 种成分

吴佳丽^{1,2}, 王永丽^{1,2*}, 刘 伟^{1,3}, 尉小慧¹, 俞桂新^{1,2*}

(1. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 3. 上海中医药大学附属曙光医院, 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 肝病研究所, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定艾 *Artemisia argyi* Levl. et Vant. 叶中新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的含有量。**方法** 艾叶 50% 甲醇提取液的分析采用 Prevail C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 325 nm; 柱温 30 ℃。**结果** 7 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999\ 5$), 平均加样回收率 98.28% ~ 101.11%, RSD 1.04% ~ 2.59%。**结论** 该方法简便准确, 重复性好, 可用于艾叶的质量控制。

关键词: 艾; 叶; 化学成分; HPLC

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)09-1876-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.024

Simultaneous determination of seven constituents in *Artemisia argyi* leaves by HPLC

WU Jia-li^{1,2}, WANG Yong-li^{1,2*}, LIU Wei^{1,3}, WEI Xiao-hui¹, CHOU Gui-xin^{1,2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai R&D Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isoch-

收稿日期: 2016-11-19
基金项目: 上海市教委预算内项目 (2016YSN11); 中医药行业科研专项 (201307002)
作者简介: 吴佳丽 (1993—), 女, 硕士生, 从事中药活性成分与质量标准研究。Tel: (021) 50271706, E-mail: 185858199@qq.com
* 通信作者: 王永丽 (1987—), 女, 硕士, 助理实验师, 从事中药活性成分与质量标准研究。Tel: (021) 50271706, E-mail: ylwang521@126.com

俞桂新 (1956—), 男, 博士, 研究员, 从事中药活性成分与质量标准研究。Tel: (021) 50271706, E-mail: chouguxinzyb@126.com

lorogenic acid C in the leaves of *Artemisia argyi* Levl. et Vant. . **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of *A. argyi* leaves was performed on a 30 ℃ Prevail C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 325 nm. **RESULTS** Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999\ 5$), whose average recoveries were 98.28% – 101.11% with the RSDs of 1.04% – 2.59%. **CONCLUSION**

This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of *A. argyi* leaves.
KEY WORDS: *Artemisia argyi* Levl. et Vant. ; leaves; chemical constituents; HPLC

艾叶为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl. et Vant. 的干燥叶,在我国各地均有生产,炮制品主要有艾叶炭、醋艾叶、醋艾叶炭等,始载于《离骚》,在战国时期已经成为较常用的药物,为历版《中国药典》所收载的品种。其味辛、苦、温,有小毒,为妇科常用药,具有散寒止痛、温经止血的功效^[1-2],用于经寒不调、少腹冷痛、宫冷不孕、衄血、吐血、经多崩漏、妊娠下血,外治皮肤瘙痒,其化学成分主要有挥发油、黄酮、酚酸、三萜、微量元素、鞣质等成分,具有镇咳平喘祛痰、抗菌抗病毒、镇痛、抗癌、止血、抗凝血、镇静、抗过敏、利胆、免疫抑制、补体激活等作用^[3-5]。其中,酚酸广泛分布于药用植物中,如金银花、托盘根、蒲公英、灯盏花、鼠尾草、方榄、当归、川芎等,主要包括原儿茶酸、香草酸、丁香酸、没食子酸、鞣花酸、对羟基苯甲酸、间羟基苯甲酸、水杨酸、阿魏酸、丹酚酸、1-*O*-甲基-3,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸甲酯、5-*O*-咖啡酰基奎宁酸乙酯、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、咖啡酸、莱菔素等,具有心血管保护、抗氧化、抗癌、抗病毒、抗菌、降糖降脂、免疫调节、保肝利胆等药理作用^[6-10]。

本课题组前期发现,艾叶中酚酸类成分的含有量达 3.28% ~ 4.81%, 是其主要潜在药效活性物质之一^[11-12], 但 2015 年版《中国药典》仅采用 GC 法对其挥发性成分桉油精含有量进行了测定。为了更好地控制艾叶质量,本实验建立 HPLC 法同时测定艾叶中新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的含有量,可为该类成分及艾叶的质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪,配置四元泵(美国 Agilent 公司); BT25S 型电子分析天平(北京赛多利斯公司); KQ-250DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ZP15DI 型超纯水仪(上海泽权仪器设备有限公司)。

1.2 试药 新绿原酸(批号 15012903)、隐绿原酸(批号 15020603)、异绿原酸 A(批号 15062009)、异绿原酸 B(批号 15042210)、异绿原酸 C(批号 15062011)对照品(成都普瑞法科技开发有限公司,含有量 > 98%); 绿原酸(批号 25-1004)、咖啡酸(批号 30-2001)对照品(上海中药标准化中心,含有量 > 98%)。艾叶由上海中药标准化研究中心吴立宏研究员鉴定为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl. et Vant. 的干燥叶(具体信息见表 1)。甲酸、乙腈均为色谱纯(美国 Thermo Fisher 公司); 其他试剂均为分析纯。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	产地	批号
1	安徽	20151001
2	安徽	151228
3	安徽	11207001
4	安徽	20151101
5	安徽	151201
6	安徽	150723
7	山东	150812
8	山东	160229
9	河北	151101
10	河北	151102
11	浙江	1511197
12	浙江	160219
13	湖南	20151201
14	河南	160319
15	江西	1512011
16	湖北	160101

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Prevail C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-水(B, 含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱(1 ~ 16 min, 12% A; 16 ~ 18 min, 12% ~ 20% A; 18 ~ 34 min, 20% ~ 23% A; 34 ~ 35 min, 23% ~ 30% A; 35 ~ 45 min, 30% A; 45 ~ 50 min, 30% ~ 60% A, 50 ~ 55 min, 60% A); 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 325 nm; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

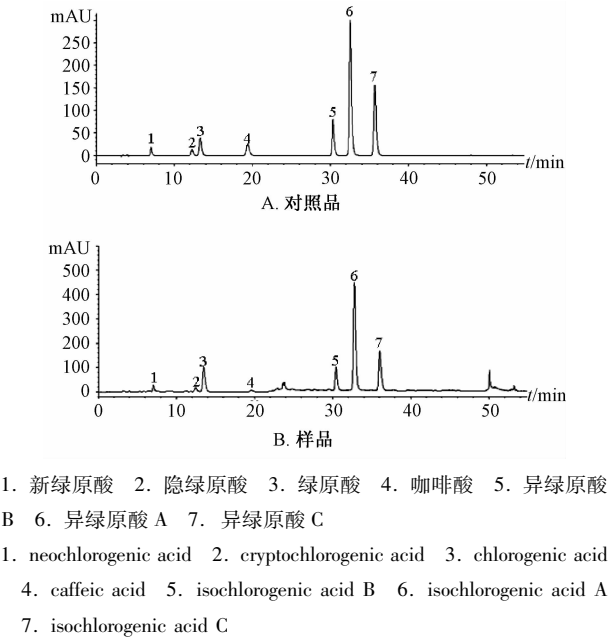


图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.2 供试品溶液制备 精密称取样品粉末约0.5 g，置于50 mL具塞三角瓶中，精密加入50%甲醇25 mL，超声提取30 min，放冷，50%甲醇补足减失的质量，摇匀，0.45 μm微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.3 对照品溶液制备 精密称取新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C 10.03、10.18、10.12、12.41、10.15、12.60、14.58 mg，置于10 mL量瓶中，甲醇溶解定容至刻度，再精密量取适量，置于同一50 mL量瓶中，甲醇稀释定容至刻度，即得分别含新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C 40.12、40.72、202.40、9.93、203.00、504.00、174.96的对照品溶液。

2.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL，置于10 mL量瓶中，50%甲醇定容至刻度，摇匀，在“2.1”项色谱条件下进样。以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）进行回归，结果见表2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液10 μL，连续进样6次，测得新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C峰面积RSD分别为0.39%、0.31%、0.49%、0.75%、0.21%、1.07%、0.96%，表明仪器精密

表2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents			
成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
新绿原酸	$Y = 26.925X - 66.965$	0.999 8	4.012 ~ 40.12
隐绿原酸	$Y = 22.774X - 14.434$	0.999 8	4.072 ~ 40.72
绿原酸	$Y = 26.333X - 67.138$	0.999 8	20.24 ~ 202.4
咖啡酸	$Y = 45.341X - 31.099$	0.999 6	0.993 ~ 9.93
异绿原酸 B	$Y = 28.919X - 108.59$	0.999 9	20.30 ~ 203.00
异绿原酸 A	$Y = 35.515X - 872.71$	0.999 8	50.40 ~ 504.00
异绿原酸 C	$Y = 34.974X - 806.13$	0.999 5	17.496 ~ 174.96

度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液，于0、2、4、8、12、24 h测定峰面积，测得新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C峰面积RSD分别为1.61%、2.36%、0.44%、1.73%、1.89%、2.10%、2.59%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批艾叶6份，每份约0.5 g，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，过滤，精密吸取10 μL测定，测得新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C含有量RSD分别为0.73%、1.31%、1.02%、2.63%、1.55%、1.31%、1.16%，表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取0.25 g含有量已知的样品，加入已知含有量约70%、100%、130%水平的对照品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，计算回收率。结果，新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C平均加样回收率分别为98.28%、99.49%、98.91%、101.11%、100.02%、103.98%、98.96%，RSD分别为2.02%、2.59%、2.33%、1.52%、1.42%、1.04%、2.15%。

2.9 样品含有量测定 取不同产地样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，过滤，精密吸取10 μL，在“2.1”项色谱条件下测定，计算含有量，结果见表3。

3 讨论与结论

本实验比较了30%、50%、70%甲醇、纯甲醇、纯乙醇，发现50%甲醇提取效果最好；比较了超声提取和回流提取，发现前者提取率高于后者；考察了超声提取30、60、90 min，发现三者无显著差异，故选择提取时间为30 min；考察了提取溶剂用量30、50、100、150倍，发现在50倍以上

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/g)
Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/g)

编号	新绿原酸	隐绿原酸	绿原酸	咖啡酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
1	0.26	0.30	1.19	0.09	1.73	6.92	3.03
2	0.66	0.58	3.24	0.09	2.29	11.80	4.29
3	1.08	0.91	4.34	0.13	4.26	13.44	6.79
4	0.48	0.34	2.96	0.06	0.48	16.75	4.75
5	0.38	0.53	1.14	0.14	1.95	5.12	3.67
6	0.37	0.44	1.42	0.16	1.92	6.82	3.12
7	0.28	0.29	1.31	0.03	1.82	6.96	2.62
8	0.31	0.33	1.50	0.04	2.09	7.80	3.12
9	0.95	0.79	3.73	0.13	3.97	12.50	6.14
10	0.74	0.66	3.56	0.17	3.22	13.37	5.53
11	0.49	0.50	1.92	0.10	2.74	8.55	4.65
12	0.40	0.37	2.58	0.12	1.66	8.68	3.50
13	0.73	0.74	2.37	0.15	2.80	8.90	4.98
14	0.24	0.16	1.03	—	1.22	4.00	1.65
15	0.91	0.68	5.13	0.16	4.79	20.91	7.73
16	0.64	0.73	2.61	0.20	2.66	8.15	5.52

注:—表示未检测出该成分

时无显著差异,故提取溶剂用量选择 50 倍;考察了超声提取 1、2、3 次,发现三者无显著差异,故选择提取 1 次。综上所述,最佳提取条件确定为 50 倍量 50% 甲醇超声 30 min。

新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的最大吸收波长均在 325 nm 左右,在此波长下色谱峰响应较高,与其他杂质峰的分离度符合要求,故确定其作为检测波长。

仅选用 1、2 种成分作为评价药物质量优劣的指标时,已经越来越难以满足相关研究的需要,而对多成分分别进行检测又耗时耗力,效率低下,故同时测定多种成分含有量是实现中药质量有效控制的重要方法之一。本实验建立了 HPLC 法同时测定艾叶中 7 种成分的含有量,避免测定单成分的繁琐步骤,大大提高了工作效率,可为艾叶质量标准的提高及其药理作用的研究提供参考。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 89

[2] 孙 蓉, 黄 伟, 王 会. 与功效, 毒性相关的艾叶化学成分研究进展[J]. 中国药物警戒, 2009, 6(11): 676-679.

[3] 王惠君, 王文泉, 卢 诚, 等. 艾叶研究进展概述[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 15-19.

[4] 陈小露, 梅全喜. 艾叶化学成分研究进展[J]. 今日药学, 2013, 23(12): 848-851.

[5] 梁坤伦, 孙金豪, 张瑞芳. 艾叶的生物化学成分及药理作用研究[J]. 科技创新与应用, 2015(30): 80-81.

[6] 高慧媛, 吴立军, 尹 凯, 等. 中药黄独的化学成分研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(6): 414-416.

[7] Wolbis M, Królikowska M, Bednarek P. Polyphenolic compounds in *Taraxacum officinale* [J]. *Acta Polon Pharmaceut Drug Res*, 1993, 50(23): 153-158.

[8] Li L N. Water soluble active components of *Salvia miltiorrhiza* and related plants[J]. *J Chin Pharm Sci*, 1997, 6(2): 57-64

[9] 张卫东, Tam H T B, 陈万生, 等. 灯盏花中新的酚酸类化合物的结构及活性研究[J]. 药学学报, 2001, 36(5): 360-363.

[10] 赵国玲, 刘佳佳, 林 丹, 等. 金银花化学成分及药理研究进展[J]. 中成药, 2002, 24(12): 973.

[11] 王永丽, 尉小慧, 赵森森, 等. HPLC 测定醋艾炭间羟基安息香酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 78-81

[12] 王永丽, 尉小慧, 刘 伟, 等. 不同产地艾叶炮制前后总酚酸的含量比较研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 88-90.