

HPLC-DAD 测定茵陈蒿汤中儿茶素、绿原酸、 西红花苷 I、西红花苷 II 的含量

候金燕¹, 罗琳², 窦志华^{3*}, 冯艳^{3*}, 陆群³, 宣东平³, 陈霞³, 顾薇³

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 南通大学, 江苏南通 226001;

3. 南通大学附属南通第三医院, 江苏南通 226006)

[摘要] 目的: 建立 HPLC-DAD 测定茵陈蒿汤中儿茶素、绿原酸、西红花苷 I、西红花苷 II 含量的方法。方法: 采用 Symmetry C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 儿茶素检测波长 202 nm, 绿原酸检测波长 330 nm, 西红花苷 I, II 检测波长 440 nm。结果: 儿茶素、绿原酸、西红花苷 I, II 分别在 0.18 ~ 0.9 ($r=0.999\ 8$), 0.062 4 ~ 0.312 ($r=0.999\ 9$), 0.441 ~ 2.205 ($r=0.999\ 9$), 0.023 52 ~ 0.117 6 μg ($r=0.999\ 9$) 与峰面积呈良好线性关系; 加样回收率分别为 98.56% (RSD 1.8%), 99.07% (RSD 1.8%), 97.41% (RSD 1.9%) 和 98.46% (RSD 1.9%)。结论: 该法简便、准确、专属性强, 可用于茵陈蒿汤中 4 种成分的含量测定。

[关键词] 茵陈蒿汤; 儿茶素; 绿原酸; 西红花苷 I; 西红花苷 II; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0048-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060048

Determination of Catechin, Chlorogenic Acid, Crocin- I , Crocin- II in Yinchenhao Decoction by HPLC-DAD HOU Jin-yan¹, LUO Lin², DOU Zhi-hua^{3*}, FENG Yan^{3*}, LU Qun³, XUAN Dong-ping³, CHEN Xia³, GU Wei³ (1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Nantong University, Nantong 226001, China; 3. Third Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of catechin, chlorogenic acid, crocin- I , and crocin- II in Yinchenhao decoction by HPLC-DAD. **Method:** The Symmetry C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was kept at 30 °C and the wavelength was set at 202 nm for catechin, 330 nm for chlorogenic acid, and 440 nm for crocin- I and crocin- II , respectively. **Result:** The linear range of catechin, chlorogenic acid, crocin- I , and crocin- II were 0.18-0.90 ($r=0.999\ 8$), 0.020 8-0.374 4 ($r=0.999\ 9$), 0.147-2.646 ($r=0.999\ 9$) and 0.007 84-0.141 12 ($r=0.999\ 9$) μg, respectively. The mean recovery of these 4 components were 98.56% (RSD 1.8%), 99.07% (RSD 1.8%), 97.41% (RSD 1.9%), and 98.46% (RSD 1.9%), respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and specific, and can be used for the determination of 4 constituents in Yinchenhao decoction.

[Key words] Yinchenhao decoction; catechin; chlorogenic acid; crocin- I ; crocin- II ; determination

茵陈蒿汤由茵陈 18 g, 栀子 12 g, 大黄 6 g 组成^[1], 具有清热除湿、利胆退黄的功效, 为中医治疗湿热黄疸的经典名方^[2]。现代研究表明, 该方具有

保肝利胆、抑制肝纤维化等作用^[3]。方中茵陈主要含香豆素类、有机酸类、黄酮类、色原酮类等多种化学成分, 其中绿原酸等有机酚酸类化合物具有明显

[收稿日期] 20140113(002)

[基金项目] 江苏省中医药局科技项目(HZ07071); 江苏省高校自然科学基金项目(08KJB360009)

[第一作者] 候金燕, 在读硕士, 从事中药药效物质基础研究, Tel:18539157680, E-mail:362611813@qq.com

[通讯作者] * 窦志华, 博士, 主任中医师, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及中药研究, Tel:0513-85116027, E-mail:zhihuadou@163.com; * 冯艳, 主管药师, 从事药学研究, Tel:0513-85116102, E-mail:ntsyfy01@163.com

的利胆和抗菌消炎等作用^[4]; 梔子中具有较强药理活性的成分主要是以梔子苷为代表的环烯醚萜类和以西红花苷为代表的西红花酸类两大类成分^[5]; 大黄所含化学成分以蒽醌类为主, 还含有鞣质类、二苯乙烯苷类等, 鞣质分水解型和缩合型两类, 单体分别为没食子酸、儿茶素, 具有多种药理活性^[6]。本课题组前期建立了 HPLC 同时测定茵陈蒿汤中没食子酸, 2 个环烯醚萜类成分, 3 个结合型蒽醌, 5 个游离型蒽醌含量的方法, 并对来自江苏省内 10 家中医院饮片组方茵陈蒿汤中的以上 11 种成分进行了测定。本次研究建立了 HPLC-DAD 同时测定该方中儿茶素、绿原酸、西红花苷 I、西红花苷 II 4 种成分含量的方法, 并对以上饮片组方的茵陈蒿汤中此 4 种成分进行了测定, 为下一步结合指纹图谱研究及药理学试验结果进行谱-效、量-效关系分析阐明该方保肝作用的药效物质奠定基础。

1 材料

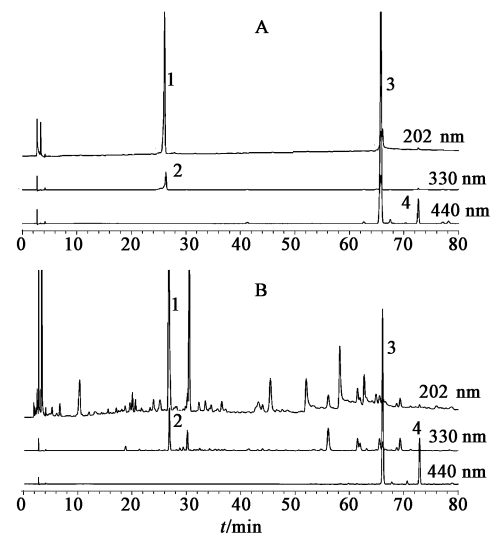
1.1 仪器 Alliance 系列高效液相色谱系统(包括 e2695 分离单元, 2998 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站, 美国 Waters 公司), BT 25 S 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 试药 儿茶素(批号 110877-201203, 纯度 97.2%), 绿原酸(批号 110753-200413, 纯度 ≥ 98%), 西红花苷 I(批号 111588-201202, 纯度 91.1%), 西红花苷 II(批号 111589-201103, 纯度 91.9%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。茵陈、梔子、大黄饮片分别购自江苏省内 10 家中医院(其中三甲医院 6 家, 三乙、二甲医院各 2 家), 每家医院的饮片按茵陈-梔子-大黄(3:2:1)组方, 粉碎成粗粉, 过 3 号筛, 得 1~10 号样品。经南通市药品检验所龚旭东主任中药师鉴定, 以上饮片的原植物来源分别为菊科植物茵陈蒿 *Artemisia capillaris*, 茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* 和蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum*。乙腈、甲醇均为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司), 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Symmetry C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 2% A; 5~10 min, 2%~5% A; 10~30 min, 5%~15% A; 30~45 min, 15%~17% A; 45~55 min, 17%~20% A; 55~70 min, 20%~25% A; 70~80 min, 25% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 202 nm(儿茶素), 330 nm(绿原

酸), 440 nm(西红花苷 I、西红花苷 II), 柱温 30 ℃。以上条件下对照品和样品的色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 儿茶素; 2. 绿原酸; 3. 西红花苷 I; 4. 西红花苷 II

图 1 茵陈蒿汤 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Yinchenhao decoction

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取对照品儿茶素 9.00 mg, 绿原酸 5.20 mg, 西红花苷 I 14.70 mg, 西红花苷 II 2.94 mg, 分别置 5 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 分别配成 4 个对照品储备液。精密吸取儿茶素储备液 1 mL, 绿原酸储备液 0.6 mL, 西红花苷 I 储备液 1.5 mL, 西红花苷 II 储备液 0.4 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 配成 4 种混合对照品溶液。将上述对照品储备液、混合对照品溶液于 4 ℃ 保存, 备用。

2.2.2 供试品溶液 取样品约 0.6 g, 精密称定, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 浸泡 1 h, 超声提取 30 min, 放冷, 称量, 加甲醇补足损失的量, 摇匀, 即得。进样前用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5 μL 进样, 测定 4 种成分的峰面积, 以峰面积 Y 对进样量 X(μg) 进行回归处理, 得儿茶素、绿原酸、西红花苷 I 和西红花苷 II 的回归方程分别为 $Y = 1.3 \times 10^7 X - 1.2 \times 10^6$ ($r = 0.9998$), $Y = 2.8 \times 10^6 X - 2.7 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), $Y = 4.8 \times 10^6 X - 3.2 \times 10^5$ ($r = 0.9999$) 和 $Y = 6.7 \times 10^6 X - 2.8 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), 线性范围分别为 0.18~0.9,

0.062 4 ~ 0.312, 0.441 ~ 2.205 和 0.023 52 ~ 0.117 6 μg 。

2.3.2 精密度试验 精密吸取 2 号样品供试品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 测定儿茶素、绿原酸、西红花苷 I 和西红花苷 II 峰面积, 结果峰面积 RSD 分别为 3.0%, 2.9%, 2.5%, 2.7%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 精密吸取 2 号样品供试品溶液 10 μL , 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样, 测定儿茶素、绿原酸、西红花苷 I 和西红花苷 II 峰面积, 结果峰面积 RSD 分别为 2.3%, 2.1%, 2.3%, 2.4%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取 2 号样品, 按 2.2.2 方法平行制备供试品溶液 6 份, 分别进样 10 μL , 测定儿茶素、绿原酸、西红花苷 I 和西红花苷 II 峰面积积分值, 计算得平均质量分数分别为 1.241 3, 0.557 9, 0.297 0, 0.481 7 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.7%, 3.4%, 2.7%, 3.3%, 表明该方法的重复性良好。

2.3.5 回收率试验 取 2 号样品各约 0.3 g 6 份, 精密称定, 分别精密添加一定体积 4 种对照品储备液, 按 2.2.2 项下方法制成供试品溶液, 测定并计算各成分的加样回收率以及 RSD。结果儿茶素、绿原酸、西红花苷-I 和西红花苷-II 的平均回收率分别为 98.56%, 99.07%, 97.41%, 98.46%, RSD 分别为 1.8%, 1.8%, 1.9% 和 1.9%。见表 1。

2.4 样品测定 分别精密吸取 1 ~ 10 号样品供试品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定各成分峰面积, 代入回归方程, 计算儿茶素、绿原酸、西红花苷 I 和西红花苷 II 在样品中的含量。结果见表 2。

3 讨论

3.1 提取方式的考察 分别采用加热回流和超声处理 2 种提取方式, 所测得的结果没有显著性差异, 考虑到超声处理较简便易行, 故采用超声提取方法。

3.2 流动相的选择 本实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水溶液等流动相系统, 结果表明, 采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液体系作为流动相时, 被测成分分离效果较好, 基质干扰较小。

3.3 检测波长的选择 茵陈蒿汤虽然只有 3 味药组成, 但所含化学成分众多, 实验过程中发现, 即使采用梯度洗脱, 多次调整梯度条件, 也很难在同一波长下短时间内对所有成分进行有效分离。从图 1 (B) 可以看出, 即使在目前已经优化的梯度条件下, 样品中儿茶素(1 号峰)与绿原酸(2 号峰)保留时间几乎相同, 同一波长下是不能分离的, 查文献可知,

表 1 茵陈蒿汤中不同成分加样回收率试验

Table 1 Results of recovery test of different components in Yinchenhao decoction

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
儿茶素	0.357 5	0.360 0	0.714 5	99.14	98.56	1.8
	0.357 5	0.360 0	0.710 8	98.14		
	0.357 9	0.360 0	0.724 7	101.87		
	0.357 7	0.360 0	0.708 4	97.43		
	0.357 8	0.360 0	0.708 2	97.34		
	0.358 0	0.360 0	0.708 8	97.44		
绿原酸	0.176 2	0.176 8	0.349 5	98.02	99.07	1.8
	0.176 2	0.176 8	0.349 4	97.98		
	0.176 4	0.176 8	0.350 1	98.21		
	0.176 3	0.176 8	0.355 4	101.33		
	0.176 3	0.176 8	0.355 7	101.43		
	0.176 5	0.176 8	0.348 8	97.47		
西红花苷 I	0.810 2	0.793 8	1.596 2	99.02	97.41	1.9
	0.810 1	0.793 8	1.593 8	98.74		
	0.811 1	0.793 8	1.570 7	95.70		
	0.810 5	0.793 8	1.573 5	96.12		
	0.810 7	0.793 8	1.568 7	95.49		
	0.811 3	0.793 8	1.600 1	99.38		
西红花苷 II	0.139 2	0.141 1	0.277 3	97.89	98.46	1.9
	0.139 2	0.141 1	0.279 6	99.48		
	0.139 3	0.141 1	0.276 9	97.47		
	0.139 2	0.141 1	0.282 9	101.78		
	0.139 3	0.141 1	0.276 8	97.42		
	0.139 4	0.141 1	0.275 9	96.75		

表 2 不同批次茵陈蒿汤样品中各成分含量测定

Table 2 Results of determination in different batches of Yinchenhao decoction

样品编号	儿茶素	绿原酸	西红花苷 I	西红花苷 II
1	1.928 9	1.064 8	3.010 3	0.530 0
2	0.627 8	0.763 0	0.963 5	0.111 5
3	1.865 2	1.803 2	1.317 5	0.140 3
4	0.997 7	0.420 2	2.003 0	0.249 8
5	1.227 4	0.696 3	1.114 5	0.128 8
6	1.000 9	0.818 5	1.081 5	0.097 1
7	1.873 3	1.041 6	1.662 2	0.184 1
8	1.245 5	1.745 8	0.769 4	0.058 5
9	1.047 4	0.705 1	2.155 5	0.266 0
10	1.020 3	1.077 4	2.955 1	0.265 2

儿茶素分别在 200, 280 nm 左右有最大吸收^[7], 绿原酸分别在 225, 300, 326 nm 左右有最大吸收^[8], 事实上 202, 330 nm 下茵陈蒿汤中分别只有前者和后者有吸收, 可以互不干扰将这两个成分有效分离, 样品中这两个成分的紫外光谱图与对照品完全一致。但是图 1 同样显示, 202, 330 nm 下西红花苷 I、西红花苷 II 的吸收均较弱, 而且样品中与其他成分的分度也不高, 查文献可知, 西红花酸类化合物具有很明显的光谱特征, 即在 400 ~ 500 nm 均有 2 个吸收, 且前 1 个呈最大吸收, 后 1 个为肩峰^[9-10], 该类成分一般在 440 nm 波长下检测^[11], 图 1 显示, 440 nm 下样品中西红花苷 I、西红花苷 II 均有强吸收, 且与其他成分达到有效分离, 样品中的紫外光谱图与对照品完全一致。这样一次性进样检测, 通过提取 3 个波长色谱图, 可以使 4 个待测成分有效分离而达到同时进行含量测定的目的。

3.4 不同来源饮片组方的测定结果 从检测结果看, 由来自江苏省内 10 家医院饮片组方的茵陈蒿汤中儿茶素、绿原酸、西红花苷 I 和西红花苷 II 含量分别在 0.627 8 ~ 1.928 9, 0.420 2 ~ 1.803 2, 0.769 4 ~ 3.010 3 和 0.058 5 ~ 0.530 0 mg·g⁻¹, 最高含量分别是最低含量的 3.07, 4.29, 3.91, 9.06 倍, 先期检测的 11 个成分最高含量与最低含量的倍数在 1.47 ~ 8.15 (论文另发)。鉴于茵陈蒿汤中活性成分含量的差异与药效密切相关^[12], 以上研究结果为下一步结合指纹图谱研究及药理学试验结果进行谱-效、量-效关系分析阐明该方保肝作用的药效物质奠定了坚实基础。

[参考文献]

[1] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社,

1998: 293.

[2] 窦志华, 罗琳, 候金燕, 等. 茵陈蒿汤保肝作用的血清药理学研究[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(10): 868-871.

[3] 杨爱华, 窦志华. 茵陈蒿汤药效物质基础研究方法与配伍机制的研究进展[J]. 中国药房, 2013, 24(19): 1812-1814.

[4] 曹锦花. 茵陈的化学成分和药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(6): 489-494.

[5] 王莎, 周小琴, 司徒少金, 等. 栀子药材环烯醚萜类和西红花酸类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 19(18): 85-88.

[6] 傅兴圣, 陈菲, 刘训红, 等. 大黄化学成分与药理作用研究新进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(16): 1534-1538, 1568.

[7] 孙晓莉, 刘帅华, 汪雷, 等. 高效液相色谱法同时测定五指山绿茶中 5 种儿茶素类成分[J]. 植物研究, 2011, 31(3): 377-380.

[8] 邓湘昱. 金银花和茵陈质量控制方法研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005: 22.

[9] 王莎, 周小琴, 司徒少金, 等. 栀子药材环烯醚萜类和西红花酸类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 85-88.

[10] 侯志飞, 于文国, 王刚, 等. 在线紫外光谱对栀子及其炮制品 HPLC 指纹图谱的定性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 98-101.

[11] 孟萍, 窦志华, 孟佳佳. 茵陈蒿汤主要成分的 HPLC 分析[J]. 南通大学学报: 医学版, 2014, 34(3): 170-173.

[12] 张慧芹, 蔡华丹, 杨美娟, 等. 茵陈蒿汤水提物和乙醇提物对 D-氨基半乳糖胺诱导大鼠急性肝损伤保护作用比较研究[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(2): 113-116.

[责任编辑 顾雪竹]