

## HPLC 测定醋艾炭间羟基安息香酸的含量

王永丽, 尉小慧, 赵森森, 刘伟, 李思蒙, 俞桂新\*, 王峥涛

(上海中医药大学中药研究所; 中药标准化教育部重点实验室; 中药新资源与质量标准综合评价国家中医药管理局重点研究室; 上海中药标准化研究中心 上海 201203)

**[摘要]** 目的: 对不同产地醋艾炭间羟基安息香酸的含量进行比较研究, 为醋艾炭的质量控制及合理利用提供科学依据。方法: 采用 HPLC, Prevail C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸 (15:85), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 240 nm, 柱温 25 °C。结果: 间羟基安息香酸在 0.010 02 ~ 0.501 00 μg 具有良好的线性 ( $r = 1.000 0$ ), 平均回收率 ( $n = 9$ ) 97.39%, RSD 0.99%。结论: 所建方法准确、简单、重复性好, 不同产地醋艾炭间羟基安息香酸的含量差异显著。

**[关键词]** 醋艾炭; 高效液相色谱; 间羟基安息香酸

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0078-04

**[doi]** 10.11653/syfy201318078

## Content Determination of 3-Hydroxybenzoic Acid in Artemisiae Argyi Folium (Carbonized and Processed with Vinegar) by HPLC

WANG Yong-li, WEI Xiao-hui, ZHAO Sen-miao, LIU Wei, LI Si-meng, CHOU Gui-xin\*, WANG Zheng-tao  
(Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; the MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines; Shanghai R&D Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

**[收稿日期]** 20130314(007)

**[基金项目]** 国家药品标准提高研究项目(778)

**[第一作者]** 王永丽, 在读硕士生, 从事中药活性成分与质量标准研究, Tel: 021-50271706, E-mail: ylwang521@126.com

**[通讯作者]** \* 俞桂新, 教授, 博士生导师, 从事中药活性成分与质量标准研究, Tel: 021-50271706, E-mail: chouguixinzyb@126.com

- [2] 张艳秋, 洪金波, 刘文林. HPLC 法测定裸花紫珠中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 海南医学院学报, 2009, 15(1): 5.
- [3] 张洁, 李宝泉, 冯锋, 等. 裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3297.
- [4] Mei W L, Zhuang H, Cui H B, et al. A new cytotoxic iridoid from *Callicarpa nudiflora* [J]. Nat Prod Res, 2010, 24(10): 899.
- [5] 巩珺, 麦锦富, 彭素萍, 等. Doehlert 设计法优化紫珠中苯乙醇苷的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 7.
- [6] 高飞鹏, 汪豪, 叶文才, 等. 裸花紫珠叶的化学成分[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(2): 120.
- [7] 董琳, 刘明生, 王金辉. 裸花紫珠的脂溶性化学成分[J]. 中国药物化学杂志, 2009, 19(5): 371.
- [8] 李才堂, 文萍, 郭琦丽, 等. HPLC 测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 84.
- [9] 张毛莉, 罗仓学. 石榴皮中总酚含量测定方法的比较[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 383.
- [10] 周云凯, 李伟平, 田莎莎, 等. 白及须根和块茎总酚含量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 161.
- [11] 王恩, 汪保林, 董慧君, 等. 紫外-可见分光光度法测定火绒草提取物中总酚酸含量[J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(4): 69.
- [12] 李囡囡, 贾倩, 杜海红, 等. Folin 比色法测定鹿衔草提取物中总多酚的含量[J]. 长治医学院学报, 2010, 24(1): 8.

[责任编辑 顾雪竹]

**[Abstract]** **Objective:** To study 3-hydroxybenzoic acid in *Artemisiae Argyi Folium* (carbonized and processed with vinegar) that come from different arrears, which provide the theoretical basis of the quality control and rational use of *Artemisiae Argyi Folium* (carbonized and processed with vinegar). **Method:** HPLC method, the analytical column was Prevail C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphate (15:85). The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 240 nm and the column temperature was set at 25 °C. **Result:** There was good linearity between the peak areas and concentration at the ranges of 0.010 02-0.501 00 μg for 3-hydroxybenzoic acid ( $r = 1.000 0$ ). The average recovery ( $n = 9$ ) was 97.39% with RSD 0.99%. **Conclusion:** The method is accurate, simple and repeatable. The 3-hydroxybenzoic acid in *Artemisiae Argyi Folium* (carbonized and processed with vinegar) of different arrears has significant difference.

**[Key words]** *Artemisiae Argyi Folium* (carbonized and processed with vinegar); HPLC; 3-hydroxybenzoic acid

艾叶来源于菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl. et Vant. 的干燥叶,主要含有挥发油、黄酮等化学成分<sup>[1-2]</sup>,具有散寒止痛、温经止血之功效<sup>[3]</sup>,常用的炮制方法有醋炒、醋蒸、酒炒、炒焦、炒炭等<sup>[4]</sup>。其中炮制品醋艾炭温经止血,常用于虚寒性出血<sup>[5]</sup>。2010年版《中国药典》收载醋艾炭于艾叶的炮制项下,炮制方法照炒炭法(2010年版《中国药典》附录ⅡD),每100 kg艾叶,炒至表面焦黑色,喷15 kg醋,炒干,即得。

目前,艾叶的含量测定是以桉油精为指标的气相色谱法,艾叶经加热炮制为醋艾炭后其挥发油含量大量降低<sup>[6]</sup>,以桉油精作为醋艾炭的含量测定指标显然不合适。近年来,关于醋艾炭的炮制工艺、炮制前后化学成分及药理作用变化的研究报道有许多,发现艾叶炮制为醋艾炭后,止血活性增强,但其作用机制尚不明确<sup>[7]</sup>。本实验通过对艾叶及其炮制品醋艾炭化学成分的比较研究,发现艾叶经炒炭法炮制成醋艾炭或艾炭后,产生一化合物,该化合物在醋艾炭及艾炭中含有而艾叶中不含有,经分离纯化后,鉴定为间羟基安息香酸,具有杀菌、防腐作用。

## 1 材料

Agilent 1100型高效液相色谱仪,四元泵(德国Agilent公司,DE43630806),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)。

间羟基安息香酸对照品(东京化成工业株式会社,纯度>98%,批号CAS 99-06-9),甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。药材饮片分别收集于河南、江西、安徽等地,由上海中药标准化研究中心生药学副研究员吴立宏鉴定为醋艾炭

*Artemisiae Argyi Folium*。

## 2 方法与结果

**2.1 样品分离与鉴定** 取醋艾炭粉末10 g,加甲醇超声提取,提取液浓缩后,分别采用大孔树脂、MCI柱色谱、ODS柱色谱分离,制备高效液相色谱纯化等分离纯化方法,得到化合物12 mg。通过<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR确定化合物结构,为间羟基安息香酸。

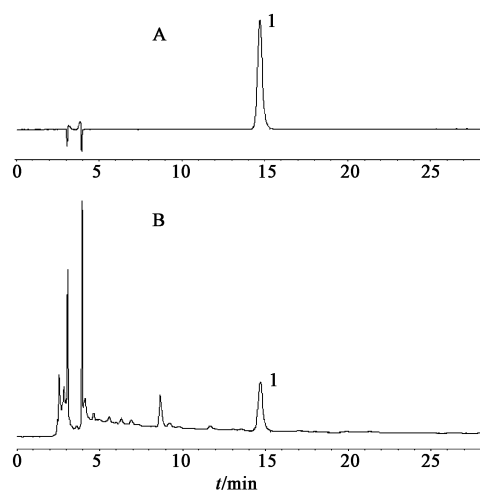
**2.2 对照品溶液的制备** 取间羟基安息香酸对照品适量,精密称定,加40%甲醇制成每1 mL含30 μg的对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取样品粉末(过3号筛)0.5 g,置100 mL具塞三角瓶中,精密加入40%甲醇25 mL,超声法提取30 min,放冷,用甲醇补足减失质量,摇匀,过0.45 μm滤膜,取续滤液即得。

**2.4 色谱条件** Prevail C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),前加预柱,EasyGuard Kit C<sub>18</sub>(4.6 mm × 10 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸(15:85),检测波长240 nm,柱温25 °C,流速1.0 mL · min<sup>-1</sup>,进样量10 μL,色谱图见图1。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 线性关系考察** 精密称取间羟基安息香酸对照品10.02 mg,制成含间羟基安息香酸100.2 mg · L<sup>-1</sup>的对照品储备液,储备液依次按以下浓度稀释50.100,40.080,30.060,20.040,10.020,5.010,1.002 mg · L<sup>-1</sup>,按2.4项下色谱条件,以峰面积积分值( $Y$ )为纵坐标,对照品浓度( $X$ )为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程,得间羟基安息香酸的回归方程 $Y = 25.622 8 X - 3.578 8 (R^2 = 1.000 0)$ ,且间羟基安息香酸在0.010 02 ~ 0.501 00 μg呈良好的线性关系。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 间羟基安息香酸

图 1 醋艾炭 HPLC

### 2.5.2 精密度试验

**2.5.2.1 日内精密度** 精密吸取同一供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 测定, 结果 RSD 0.27%, 表明仪器日内精密度良好。

**2.5.2.2 日间精密度** 精密吸取同一供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 于连续 3 d 的不同时段进样, 每天连续进样 6 次, 测定, 结果 RSD 0.65%, 表明仪器日间精密度良好。

**2.5.3 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 72 h 进样, 结果 RSD 0.50%, 表明供试品溶液在 72 h 内检测对结果无影响, 稳定性良好。

**2.5.4 重复性试验** 取同一样品按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 测定, 结果 RSD 0.32%, 表明方法重复性良好。

**2.5.5 加样回收率试验** 精密称取已测含量的样品, 分别加入已知含量的 80%, 100%, 120% 水平的间羟基安息香酸对照品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4 项下色谱条件测定, 结果, 其平均回收率为 97.39%, RSD 0.99%, 说明该测定方法可行, 加样回收率试验结果见表 1。

**2.6 样品含量测定** 取不同产地的醋艾炭粉末约 0.5 g 精密称定, 按 2.3 项下方法进行。分别精密吸取质量浓度为 30  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的对照品溶液与供试液溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 记录色谱图, 按外标法计算样品中间羟基安息香酸的含量, 结果见表 2。

## 3 讨论

**3.1 提取方法的考察** 考察了超声、加热回流、索氏提取 3 种方法, 三者提取效率相当, 因超声提取法

表 1 间羟基安息香酸加样回收率试验

取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.250 0	0.315 9	0.250 5	0.558 1	96.69		
0.250 1	0.316 1	0.250 5	0.556 8	96.09		
0.250 1	0.316 1	0.250 5	0.556 2	95.85		
0.250 0	0.315 9	0.320 6	0.628 9	97.63		
0.250 0	0.315 9	0.320 6	0.628 9	97.63	97.39	0.99
0.250 0	0.315 9	0.320 6	0.629 2	97.72		
0.250 5	0.316 6	0.380 8	0.691 0	98.32		
0.250 0	0.315 9	0.380 8	0.691 3	98.58		
0.250 1	0.316 1	0.380 8	0.689 4	98.03		

操作简单, 故选择超声提取法。另外, 还考察了溶剂种类 (甲醇、乙醇), 溶剂浓度 (20%, 40%, 60%, 80%, 100%), 溶剂倍量 (30, 50, 100, 150, 200 倍), 提取时间 (30, 45, 60, 90 min) 等因素, 最终确定提取方法为 50 倍量 40% 甲醇超声提取 30 min。

表 2 样品来源、编号及间羟基安息香酸含量测定 ( $n=3$ )

No.	购买地	产地	样品批号	平均含量 /%
1	北京海淀区	安徽亳州	8040048	1.26
2	河南郑州	河南	YG110101	0.61
3	北京中关村	湖北	20101211	1.02
4	江西乐安	江西	1011005	0.28
5	北京朝阳区	安徽	1111053	0.77
6	广西南宁	广西	20120501	0.52
7	陕西杨凌	河北	110301	0.67
8	陕西杨凌	陕西	/	0.73
9	甘肃兰州	甘肃	110502	0.69
10	上海浦东新区	山东	120717	0.61

**3.2 分离条件的选择** 取间羟基安息香酸对照品和样品溶液在 200 ~ 400 nm 进行紫外光谱扫描, 分别在 240, 300 nm 出现 2 个吸收峰, 以 240 nm 处吸收峰最大, 且分离效果较好, 背景干扰小, 故选择 240 nm 为指定检测波长。另外, 分别比较了不同比例的乙腈-磷酸水、甲醇-磷酸水以及不同浓度的磷酸的分离效果, 以乙腈-0.1% 磷酸 (15:85) 分离效果最好。

**3.3 含量测定指标的选择** 由于艾叶中挥发油的含量受产地、采集时间和储存时间的影响较大<sup>[8-9]</sup>, 且加热炮制后, 挥发油含量大量降低, 桉油精已不再适合作为醋艾炭含量测定指标, 故需要寻找新的特征性物质作为醋艾炭含量测定指标。按 2010 年版

《中国药典》规定的炮制方法,使用同一批次艾叶分别炮制获得醋艾叶、艾炭、醋艾炭3种炮制品,经HPLC分析检测发现,在艾叶、醋艾叶及米醋中未检测到间羟基安息香酸,而艾炭、醋艾炭中均检测到该物质,实验结果说明间羟基安息香酸不是添加带入的,也不是醋炙特有的,而是艾叶受高温炮制产生的。由于间羟基安息香酸在艾叶、醋艾叶中不含有,仅在醋艾炭及艾炭中含有,因此将其作为醋艾炭含量测定的指标物质。有实验表明,艾叶炮制成艾炭、醋艾炭后,其止血作用增强<sup>[10]</sup>,可以推测其止血作用可能与产生间羟基安息香酸等物质有关,具体作用有待进一步研究发现。于凤蕊等<sup>[11]</sup>研究报道,艾叶炮制成醋艾炭后其总黄酮含量减少;张学兰等<sup>[12]</sup>发现艾叶炒炭后其挥发油、鞣质含量均减少。因此,推测间羟基安息香酸可能是由艾叶中黄酮、挥发油、鞣质等成分受热分解或发生反应产生的。芹菜素是常见的黄酮类化合物,亦存在于艾叶中<sup>[13]</sup>,没食子酸是鞣质的基本单位,将芹菜素与没食子酸分别高温加热,均未检测到间羟基安息香酸的生成,表明间羟基安息香酸不是由芹菜素和单一的没食子酸受热产生的,其产生的机制及物质基础还有待进一步的研究发现。

**3.4 样品含量测定** 从样品含量测定结果可以看出,不同产地及药厂生产的醋艾炭间羟基安息香酸的含量差异明显。

#### [参考文献]

[1] 兰美兵,余永莉,卢巍,等.甘肃产艾叶挥发油的化学

成分及遗传毒性研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):252.

- [2] 吉双,卢桂荣,孟大利,等.艾叶的化学成分(Ⅱ)[J].沈阳药科大学学报,2010,27(7):516.
- [3] 《全国中草药汇编》编写组.全国中草药汇编.上册[M].北京:人民卫生出版社,1976:271.
- [4] 梅全喜.艾叶的药用古今概况[J].中医文献杂志,2000(1):40.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:83.
- [6] 王显著,段石硕.艾叶及其炮制品挥发油的研究[J].陕西中医,2008,29(8):1069.
- [7] 瞿燕,秦旭华,潘晓丽.艾叶和醋艾叶炭止血、镇痛作用比较研究[J].中药药理与临床,2005,21(4):46.
- [8] 江丹,易筠,杨梅,等.不同品种艾叶挥发油的化学成分分析[M].中国医药生物技术,2009,4(5):339.
- [9] 梅全喜,董普仁,王剑,等.不同产地艾叶中挥发油和微量元素含量的比较[J].中国中药杂志,1991,16(12):718.
- [10] 蒋纪洋,李同永,赵钦祥.艾叶炮制研究初探[J].中药材,1987(2):30.
- [11] 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.
- [12] 张学兰,吴美娟.炮制对艾叶主要成分及止血作用的影响[J].中药材,1992,15(2):22.
- [13] 王锦军,黄兆文,李瑶瑶.艾叶化学成分的研究[J].药学服务与研究,2008,8(6):465.

[责任编辑 顾雪竹]