

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)24-0103-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.24.023



高效液相色谱法同时测定艾绒中 4 种成分

任荣军¹, 湛建峰^{1△}, 陈虹球², 卢大良¹, 江宏池³

(1. 湖南省岳阳市检验检测中心, 湖南 岳阳 414022; 2. 湖南理工学院, 湖南 岳阳 414006; 3. 湖南省高圣生物科技股份有限公司, 湖南 岳阳 414301)

摘要:目的 建立同时测定艾绒中 4 种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Phenomenex Luna C₁₈(2)100A 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 325 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 进样量分别在 39.16~391.64 ng($r=0.999\ 1$)、41.08~410.82 ng($r=0.999\ 7$)、46.49~464.91 ng($r=0.999\ 7$)、47.12~471.18 ng($r=0.999\ 9$) 范围内与峰面积线性关系良好; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率分别为 100.06%, 99.90%, 100.12%, 100.19%, RSD 分别为 2.31%, 2.65%, 2.01%, 1.29% ($n=6$)。结论 该方法操作简便, 结果准确, 重复性好, 可用于艾绒的质量控制。

关键词: 艾绒; 绿原酸; 异绿原酸 A; 异绿原酸 B; 异绿原酸 C; 高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of Four Components in Moxa Floss by HPLC

REN Rongjun¹, ZHAN Jianfeng¹, CHEN Hongqiu², LU Daliang¹, JIANG Hongchi³

(1. Yueyang Inspection and Testing Center, Yueyang, Hunan, China 414022; 2. Hunan Institute of Science and Technology, Yueyang, Hunan, China 414006; 3. Hunan Gaosheng Biotechnology Co., Ltd., Yueyang, Hunan, China 414301)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of four components in moxa floss. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex Luna C₁₈(2)100A column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.4% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 325 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C were 39.16-391.64 ng ($r=0.999\ 1$), 41.08-410.82 ng ($r=0.999\ 7$), 46.49-464.91 ng ($r=0.999\ 7$), 47.12-471.18 ng ($r=0.999\ 9$) respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of the above four components were 100.06%, 99.90%, 100.12%, 100.19% with RSDs of 2.31%, 2.65%, 2.01%, 1.29% ($n=6$) respectively. **Conclusion** This method is simple, accurate and repeatable, which can be used for the quality control of moxa floss.

Key words: moxa floss; chlorogenic acid; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid C; HPLC; content determination

艾绒是制作灸疗用品的主要原料,其质量直接影响临床效果^[1-5]。其为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Van. 的叶片及叶柄经反复晒杵、捶打、碾碎,筛去梗,去除杂质及微小粉尘而得到的细软绒状物。2020 年版《中国药典(一部)》艾叶项下炮制品仅收录了醋艾炭,而未收录艾绒^[6],同时,全国共有 15 个省(自治区)市的中药炮制规范中收录了艾绒及其炮制方法,但无相关的质量标准内容。有研究报道,艾叶中酚酸类含量达 3.28%~4.81%,是主要潜在的药效活性物质之一^[6-10]。鉴于此,本研究建立了同时测定艾绒中绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 含量的高效液相色谱(HPLC)法,以其质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2695e/2489 型高效液相色谱仪,含二极管阵

列检测器(美国 Waters 公司);XS-105 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司,精度为 0.01 mg);SB 5200D 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试药

绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 110753-201716,含量 99.3%);异绿原酸 A 对照品(批号为 B21539,含量 98%),异绿原酸 B 对照品(批号为 B21540,含量 98%),异绿原酸 C 对照品(批号为 B21541,含量 98%),均购自上海源叶生物科技有限公司;艾绒样品(湖南省高圣生物科技股份有限公司,批号分别为 20210101,20210201,20210301,等级分别为 1,2,3 级,编号分别为 S1, S2, S3);甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

第一作者:任荣军,男,硕士研究生,副主任中药师,研究方向为中药检验分析与质量控制,(电子信箱)345014254@qq.com。

△通信作者:湛建峰,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药品分析与质量控制,(电子信箱)393695368@qq.com。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈(2)100A柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A) - 0.4%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min时 10%A → 12%A, 10~15 min时 12%A → 20%A, 15~35 min时 20%A → 28%A, 35~36 min时 28%A → 90%A, 36~40 min时 90%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:325 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL^[11-14]。

2.2 溶液制备

分别取绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C对照品9.86 mg、10.48 mg、11.86 mg、12.02 mg,精密称定,置同一20 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得混合对照品贮备液;精密量取1 mL,置25 mL棕色容量瓶中,用甲醇定容,即得混合对照品溶液。取样品0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇50 mL,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理30 min,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

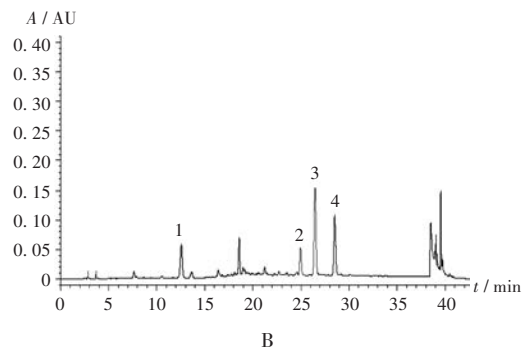
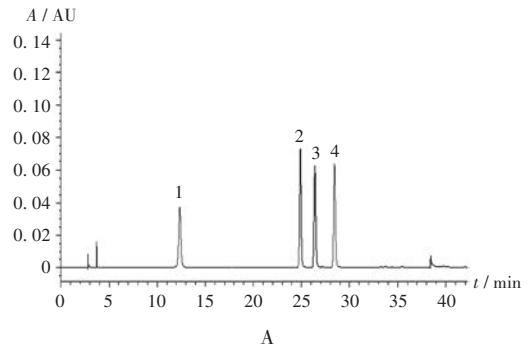
系统适用性试验:精密量取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱图中,在与混合对照品溶液色谱图相应位置有色谱峰,且分离度均大于1.5,理论板数按待测成分峰计均大于3 000。详见图1。

线性关系考察:分别精密吸取2.2项下混合对照品溶液(含绿原酸19.58 μg/mL、异绿原酸A 20.54 μg/mL、异绿原酸B 23.25 μg/mL、异绿原酸C 23.56 μg/mL)2,5,10,15,20 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(*X*, ng)为横坐标、峰面积(*Y*)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C峰面积的RSD分别为0.92%,0.30%,0.34%,0.33%(*n* = 6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密量取2.2项下供试品溶液适量,室温下分别于0,2,4,8,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C峰面积的RSD分别为1.02%,0.34%,0.32%,0.31%(*n* = 6),表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一样品适量,精密称定,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算平均含量。结果绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C的平均含量分别为



1. 绿原酸 2. 异绿原酸B 3. 异绿原酸A 4. 异绿原酸C

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Chlorogenic acid 2. Isochlorogenic acid B 3. Isochlorogenic acid A
4. Isochlorogenic acid C

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 线性关系考察结果(*n* = 5)

Tab. 1 Results of the linear relation test (*n* = 5)

待测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围(ng)
绿原酸	$Y_1 = 2\,897.515\,6\,X_1 - 27\,700.555\,1$	0.999 1	39.16~391.64
异绿原酸A	$Y_2 = 4\,009.835\,7\,X_2 - 60\,876.329\,3$	0.999 7	41.08~410.82
异绿原酸B	$Y_3 = 3\,728.335\,0\,X_3 - 64\,167.341\,5$	0.999 7	46.49~464.91
异绿原酸C	$Y_4 = 3\,588.205\,8\,X_4 - 64\,382.663\,4$	0.999 9	47.12~471.18

0.409, 1.841, 0.379, 0.893 mg/g, RSD分别为1.72%, 1.72%, 1.44%, 1.32%(*n* = 6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:称取已知含量的同一样品(绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C的平均含量分别为0.409, 1.841, 0.379, 0.893 mg/g)约0.5 g,精密称定,分别精密加入混合对照品贮备液(含绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C 0.489 5, 0.524 0, 0.593 0, 0.601 0 mg/mL)1 mL,水浴蒸干,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果见表2。

耐用性考察:精密称取样品(编号S1)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件[色谱柱分别为Phenomenex Luna C₁₈(2)100A柱和Topsil C₁₈柱,规格均为(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)]进样测定,记

表 2 加样回收试验结果($n = 6$)
Tab. 2 Results of the recovery test ($n = 6$)

待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
绿原酸	0.205 0	0.489 5	0.700 0	101.12	100.06	2.31
	0.205 3	0.489 5	0.687 7	98.55		
	0.203 8	0.489 5	0.702 1	101.80		
	0.206 9	0.489 5	0.696 1	99.94		
	0.204 4	0.489 5	0.676 0	96.34		
	0.204 4	0.489 5	0.706 7	102.61		
异绿原酸 A	0.922 4	0.524 0	1.445 0	99.73	99.90	2.65
	0.923 7	0.524 0	1.428 7	96.37		
	0.916 7	0.524 0	1.464 3	104.50		
	0.931 0	0.524 0	1.449 0	98.85		
	0.919 5	0.524 0	1.445 1	100.31		
	0.919 7	0.524 0	1.441 9	99.66		
异绿原酸 B	0.189 8	0.593 0	0.770 0	97.84	100.12	2.01
	0.190 1	0.593 0	0.780 7	99.60		
	0.188 7	0.593 0	0.803 2	103.63		
	0.191 6	0.593 0	0.791 0	101.08		
	0.189 2	0.593 0	0.775 8	98.92		
	0.189 3	0.593 0	0.780 2	99.65		
异绿原酸 C	0.447 5	0.601 0	1.042 1	98.94	100.19	1.29
	0.448 1	0.601 0	1.045 9	99.47		
	0.444 7	0.601 0	1.060 5	102.46		
	0.451 7	0.601 0	1.051 6	99.82		
	0.446 1	0.601 0	1.044 5	99.57		
	0.446 2	0.601 0	1.052 7	100.92		

录峰面积并计算样品含量。结果表明,色谱柱发生变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取样品各适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果(mg / g, $n = 3$)

Tab. 3 Results of the content determination of four components in samples (mg / g, $n = 3$)

待测成分	样品编号		
	S1	S2	S3
绿原酸	0.296 5	0.727 1	0.860 2
异绿原酸 A	1.099 3	2.363 5	3.928 3
异绿原酸 B	0.255 9	0.603 3	0.806 8
异绿原酸 C	0.682 3	1.629 7	1.896 2

3 讨论

现有报道对艾绒的质量标准研究较少,而采用 HPLC 法检测其活性成分含量的研究尚未见报道。武娟等^[12]以蕲艾艾绒为研究对象,从挥发油、总黄酮含量、燃烧

热值等方面进行了较系统的研究,笔者既往以湘艾艾绒为研究对象,在薄层鉴别、色值、总灰分、含绒量等方面对艾绒的等级分级标准进行了探索性研究,在薄层鉴别上采用艾叶作为对照药材,检视条件相比 2020 年版《中国药典(一部)》^[6]增加了荧光检视,可有效鉴别艾绒及其常见伪品青蒿;在等级标准研究中采用色值、总灰分和含绒量 3 个指标参数,可较好地对不同的艾绒样品进行等级划分。基于以上数据,本研究中拟建立能同时测定艾绒中 4 种成分含量的 HPLC 法。

预试验中,考察比较了甲醇-0.4% 磷酸水溶液、乙腈-0.4% 磷酸水溶液 2 种流动相(等度洗脱),结果发现待测成分分离效果均不理想,又选择后者进行梯度洗脱,发现主峰峰形和分离度均较好;提取溶剂分别选择 20%, 50%, 70%, 90% 甲醇,结果以 50% 甲醇提取时 4 种成分提取率均较高;考察比较了加热回流与超声处理 2 种方法,提取结果差异无统计学意义,故选择简便快速的超声处理;同时考察了超声处理 30, 60, 90 min 时的效果,结果无显著差异,故选择超声处理 30 min。样品含量测定结果表明,样品含绒量越高等级越高,4 种酚酸类成分含量越低。艾绒在制作过程中,筛选次数越多,含绒量和纯度越高,含艾叶碎片就越少,由此推断,艾绒中酚酸类成分主要存在于叶肉碎片中,但需通过分拣艾叶不同部位进行进一步检测加以证明。

综上所述,本研究中建立的 HPLC 法操作简便,结果准确,重复性好,可用于艾绒的质量控制。

参考文献

[1] 黄杰文,蔡波,高志清,等. 艾灸联合中药防治乳腺癌化疗后白细胞减少的临床研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2022, 32(22): 37-40.

[2] 曾芳芳,杨润成. 电针、艾灸联合个体化康复护理改善老年脊髓损伤神经源性尿失禁临床研究[J]. 新中医, 2022, 54(12): 219-224.

[3] 温会军. 拨筋手法联合艾灸治疗膝关节滑膜皱襞综合征临床研究[J]. 中医临床研究, 2022, 14(7): 47-49.

[4] 张军,张玥,刘小敏,等. 针灸疗法预防深静脉血栓形成的临床研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2022, 28(6): 920-924.

[5] 卢壮,吴棕冰. 针灸治疗术后尿潴留的临床研究进展[J]. 广西中医药大学学报, 2022, 25(3): 60-62.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 91.

[7] 任凌丽,李浩,钱雪,等. 新鲜艾叶与陈化艾叶挥发油化学成分研究[J]. 中国野生植物资源, 2022, 41(11): 39-42.

[8] 兰晓燕,张元,朱龙波,等. 艾叶化学成分、药理作用及质量研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17): 4017-4030.

[9] 张雪琳,陈新旺,吴毅明. 近 10 年来艾叶挥发油的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(5):