

- 方制剂)第十九册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 82.
- [7] 田文艺, 兰芳, 李淑平, 等. 隔山香的初步药理研究[J]. 中国药理学通报, 1989, 5(4): 249.
- [8] 马允慰, 吴皓, 胡小鹰, 等. 隔山香成分-异苾苈脑抑制平滑肌作用的初步实验研究[J]. 中成药研究, 1985, 9: 183.
- [9] 张军, 李润美, 李文周, 等. 隔山香药材的薄层色谱鉴别[J]. 中药材, 2009, 32(3): 359-360.
- [10] 冯枫. 止咳定喘片的薄层鉴别[J]. 广西医学, 2000, 22(5): 986-987.
- [11] 唐超, 谢小明. 隔山香药材性状及鉴别检查的研究[J]. 中医药导报, 2008, 14(5): 106-107.
- [12] 张军, 李润美, 卫罡, 等. 隔山香挥发油化学成分的研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1221-1222.
- [13] 张军. 隔山香药效物质基础及其复方大孔吸附树脂精制工艺“谱效结合”的评价研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.

(编辑: 邓响潮)

HPLC 法同时测定杏香兔耳风不同制剂中 8 种咖啡酰奎宁酸含量

黄 骏¹, 冯育林^{1,2}, 李志峰^{1,2}, 宋永贵^{1,2}, 陆兔林³, 毛春芹³, 苏 丹^{1,2} (1. 江西中医药大学, 江西南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西南昌 330006; 3. 南京中医药大学, 江苏南京 210046)

摘要: **目的** 建立同时测定杏香兔耳风制剂中 8 种咖啡酰奎宁酸有效成分含量测定的方法, 并比较不同厂家生产的杏香兔耳风单方与复方制剂的含量差异。**方法** 采用 Cosmosil RP-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱; 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 328 nm; 柱温: 35 ℃; **结果** 8 种被测咖啡酰奎宁酸成分分离度良好; 各成分质量浓度与峰面积在测定范围内均呈良好的线性关系 ($r > 0.9995$); 重复性良好; 平均加样回收率在 98.14%~101.73% (RSD 为 1.26%~2.73%) ($n=9$)。所收集的不同厂家杏香兔耳风制剂中, 酚酸含量相差较大; 杏香兔耳风胶囊(厂家 1) 中咖啡酰奎宁酸的含量相对较高, 其他厂家的杏香兔耳风制剂酚酸含量相近。**结论** 该方法准确、简单, 重复性良好, 可用于不同杏香兔耳风制剂中 8 种酚酸的含量测定。

关键词: 杏香兔耳风制剂; 咖啡酰奎宁酸; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)04-0476-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.021

Simultaneous Determination of Eight Caffeoylquinic Acids from Different *Ainsliaea fragrant* Champ Preparations by HPLC

HUANG Jun¹, FENG Yulin^{1,2}, LI Zhifeng^{1,2}, SONG Yonggui^{1,2}, LU Tulin³, MAO Chunqin³, SU Dan^{1,2} (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006 Jiangxi, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation of Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006 Jiangxi, China; 3. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210046 Jiangsu, China)

Abstract: Objective To establish a method for the simultaneous determination of eight kinds of caffeoylquinic acids in different preparations of *Ainsliaea fragrant* Champ, and to compare the content difference in single herb and compound preparations of *Ainsliaea fragrant* Champ from different producers. **Methods** HPLC was performed on Cosmosil RP - C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution, and acetonitrile-0.1 % formic acid aqueous solution was used as the mobile phase. Flow rate was 1 mL·min⁻¹ and detection wavelength was set at 328 nm. The column temperature was 35 ℃. **Results** Good separation was shown in eight kinds of caffeoylquinic acids and

收稿日期: 2014-03-07

作者简介: 黄骏, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药活性成分研究。Email: hjnature@163.com。通讯作者: 苏丹, 副教授, 研究方向: 药物分析研究。Email: sudan_nj@163.com。

基金项目: 国家自然青年科学基金项目(81102787); 江西省青年科学基金计划重点项目(2013ACB21005); 江西中医药大学博士启动基金(Y055); 江西省卫生厅中医药科研计划(2012A026, 2012A158); 江西中医药大学科研基金(ZX1001)。

good linear relationship was presented between concentration and peak area ($r > 0.9995$). The average recovery was from 98.14 % ~ 101.73 %, and RSD was 1.26 % ~ 2.73 % ($n=9$). Great difference of the content of caffeoylquinic acids was shown in *Ainsliaea fragrant* Champ preparations: the capsule from producer 1 had higher contents of caffeoylquinic acids, but the contents of caffeoylquinic acids from the others were similar. **Conclusion** The established method is accurate, simple, and with good repeatability, which can be used for the simultaneous determination of 8 kinds of caffeoylquinic acids in different *Ainsliaea fragrant* Champ preparations.

Keywords: *Ainsliaea fragrant* Champ preparations; Caffeoylquinic acids; Content determination; HPLC

杏香兔耳风(*Ainsliaea fragrant* Champ)为菊科兔耳风属植物,干燥全草入药,其性寒,味苦,归肺、肝经。具有凉血止血、利湿解毒等功效,主治虚劳骨蒸,妇女崩漏,湿热黄疸,瘰疬结核等症^[1-2]。咖啡酰奎宁酸类化合物是一类由奎宁酸和不同数目的咖啡酸通过酯化反应缩合而成的酚酸类天然化合物,主要有单咖啡酰奎宁酸(caffeoylquinic acid, CQA),二咖啡酰奎宁酸(dicaffeoylquinic acid, DCQA),三咖啡酰奎宁酸及相应的衍生物^[3-5]。其中, CQA 和 DCQA 是杏香兔耳风的主要酚酸成分。这类化合物具有显著的抗炎活性^[6],是杏香兔耳风单方或复方制剂作为妇科炎症常用药的物质基础。目前生产杏香兔耳风制剂的厂家约 25 个,临床常见制剂主要包括杏香兔耳风颗粒、杏香兔耳风片、杏香兔耳风胶囊、复方杏香兔耳风胶囊等。

关于杏香兔耳风相关制剂的质量标准收载于卫生部颁标准《中药成方制剂》第十四册^[9],未见含量测定项。针对抗炎活性成分咖啡酰奎宁酸,本研究首次建立隐绿原酸(4-CQA)、绿原酸(3-CQA)、新绿原酸(5-CQA)、1,3-二咖啡酰奎宁酸(1,3-DCQA)、1,5-二咖啡酰奎宁酸(1,5-DCQA)、3,4-二咖啡酰奎宁酸(3,4-DCQA)、3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-DCQA)、4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-DCQA)^[5-7] 8 种成分的同时含量测定方法,并采用此法对市售 5 个厂家生产的杏香兔耳风单方或复方制剂进行含量测定,以期能够较准确全面评价和监控不同厂家的产品质量,为进一步提高其质量标准提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 岛津高效液相色谱仪(SPD-M10A 二极管阵列检测器, LC-10AT 系列配件, SIL-10AD vp 自动进样器),日本岛津公司; Class-VP 色谱工作站、万分之一分析天平(sartorius BS 124S)、超声清洗器(KQ-250型),昆山市超声仪器有限公司;纯水

仪(Milli-Q),美国Millipore公司。

1.2 试药 杏香兔耳风胶囊(厂家 1,批号:130506)、复方杏香兔耳风颗粒(厂家 2,批号:1209019)、复方杏香兔耳风胶囊(厂家 3,批号:1310011)、杏香兔耳风胶囊(厂家 4,批号:20130301)、复方杏香兔耳风片(厂家 5,批号:130501),购于南昌各零售药店。乙腈,色谱纯,山东禹王集团;甲酸,色谱级,美国 Sigma 公司;3-CQA(批号:120926)、4-CQA(批号:130502)、5-CQA(批号:130502)、1,3-DCQA(批号:130502)、1,5-DCQA(批号:120926)、3,4-DCQA(批号:130502)、3,5-DCQA(批号:120622)、4,5-DCQA(批号:120926),均购于成都普菲德生物技术有限公司(纯度均大于 99%)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备及色谱条件

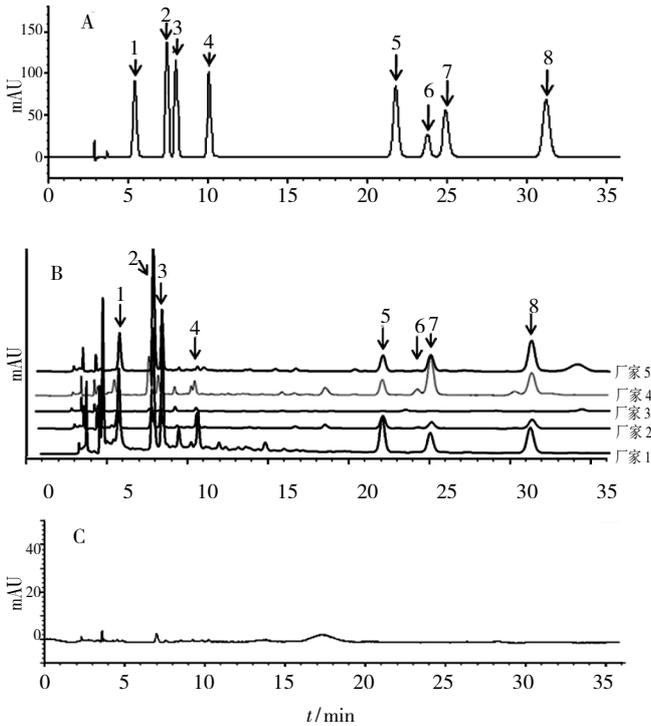
2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取 5-CQA、3-CQA、4-CQA、1,3-DCQA、3,4-DCQA、1,5-DCQA、3,5-DCQA、4,5-DCQA 各 6.75, 10.5, 8.75, 2.5, 3.75, 3.75, 3.75, 3.75 mg,置 25.0 mL 量瓶中,甲醇定容,避光保存备用,作为对照品贮备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取片剂 20 片,颗粒剂 10 g 或 10 粒胶囊剂内容物分别于碾钵中碾碎,各取 0.8 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 8.0 mL,称定质量,超声处理 45 min,放冷,再称定质量,加入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。

2.1.3 阴性对照品溶液的制备 杏香兔耳风复方制剂由白术和杏香兔耳风两味药材制得^[9],按处方比例除去杏香兔耳风的白术药材适量,依照复方制剂的制备工艺和供试品溶液的制备方法制得不含杏香兔耳风的阴性样品溶液。

2.1.4 色谱条件 色谱柱:Cosmosil RP-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水

溶液 (B), 流速: 1 mL·min⁻¹, 检测波长: 328 nm, 柱温: 35 °C。梯度洗脱条件: 0.01 ~ 2.5 min, 85 % ~ 80 % B相; 2.5 ~ 27 min, 80 % ~ 79 % B相; 27 ~ 30 min, 79 % ~ 78 % B相; 30 ~ 36 min, 78 % ~ 85 % B相, 在上述色谱条件下, 得到对照品及样品色谱图, 见图 1。



A. 对照品; B. 样品(杏香兔耳风胶囊, 厂家1); C. 阴性对照品
1. 5-CQA; 2. 3-CQA; 3. 4-CQA; 4. 1,3-DCQA; 5. 3,4-DCQA
6. 1,5-DCQA; 7. 3,5-DCQA; 8. 4,5-DCQA

图 1 杏香兔耳风胶囊 HPLC 色谱图

Figure 1 The chromatogram of reference substance

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系 见表 1。分别精密吸取混合对照品贮备液 0.1, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度。精密吸取各质量浓度混合对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 测定。以峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归, 得到 8 种酚酸成分的含量范围。

2.2.2 精密度试验 取混合对照品溶液, 在 2.1.4 项色谱条件下, 重复进样 6 次, 测定峰面积。5-CQA、3-CQA、4-CQA、1,3-DCQA、3,4-DCQA、1,5-DCQA、3,5-DCQA、4,5-DCQA 的峰面积 RSD 分别为 2.3 %、2.1 %、1.8 %、1.7 %、2.6 %、1.9 %、1.8 %、2.1 %。

2.2.3 供试品溶液稳定性试验 取供试品溶液, 室温下放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 测定,

表 1 杏香兔耳风制剂中 8 种酚酸成分的标准曲线

Table 1 The standard curves of eight kinds of caffeoylquinic acids from different *Ainsliaea fragrant* Champ preparations

成分	回归方程	线性范围/μg·mL ⁻¹	r
5-CQA	$Y=3.64 \times 10^4x-4.40 \times 10^3$	2.7 ~ 108.0	0.9992
3-CQA	$Y=2.84 \times 10^4x-5.91 \times 10^3$	4.2 ~ 168.0	0.9995
4-CQA	$Y=2.76 \times 10^4x+8.46 \times 10^3$	3.5 ~ 140.0	0.9996
1, 3-DCQA	$Y=9.96 \times 10^4x-2.59 \times 10^3$	1.0 ~ 40.0	0.9998
3, 4-DCQA	$Y=3.91 \times 10^4x+7.60 \times 10^3$	1.5 ~ 60.0	0.9994
1, 5-DCQA	$Y=4.23 \times 10^4x-1.69 \times 10^3$	1.5 ~ 60.0	0.9991
3, 5-DCQA	$Y=4.80 \times 10^4x-1.22 \times 10^3$	1.5 ~ 60.0	0.9992
4, 5-DCQA	$Y=6.60 \times 10^4x-1.97 \times 10^3$	1.5 ~ 60.0	0.9993

5-CQA、3-CQA、4-CQA、1,3-DCQA、3,4-DCQA、1,5-DCQA、3,5-DCQA、4,5-DCQA 峰面积 RSD 分别为 1.7 %、1.9 %、2.1 %、2.3 %、1.8 %、2.1 %、1.9 %、2.7 %。

2.2.4 重复性试验 称取杏香兔耳风胶囊(厂家 1, 批号: 130506)内容物 6 份, 按 2.1.2 项下方法操作, 在上述色谱条件下进行测定, 计算 5-CQA、3-CQA、4-CQA、1,3-DCQA、3,4-DCQA、1,5-DCQA、3,5-DCQA、4,5-DCQA 含量的 RSD 分别为 1.7 %、1.3 %、1.8 %、1.7 %、2.1 %、1.7 %、2.1 %、2.6 %。

2.2.5 加样回收率试验 见表 2。取含量已知的杏香兔耳风胶囊(厂家 1, 批号: 130506)共 9 份, 每份取约 0.4 g, 精密称质量, 3 份为 1 组, 每 3 组按低、中、高浓度分别精密加入相当于药材含量 50 %、100 %、150 % 的对照品溶液, 依 2.1.2 项下方法操作, 测定, 计算加样回收率和 RSD 值, 结果均符合要求。

2.3 样品含量测定 见表 3。取不同厂家不同类型制剂粉末按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 依照 2.1.4 项下色谱条件进样测定, 用外标法计算含量。

3 讨论

本实验曾分别采用了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液等流动相体系。结果显示, 相比于甲醇, 使用乙腈所得到色谱峰的峰形更加尖锐, 理论塔板数更高。由于咖啡酰奎宁酸含有酚羟基, 具有酸性, 采用了反相离子抑制色谱, 在流动相中添加少甲酸, 抑制其解离, 解决了其色谱峰拖尾和展宽的问题。最终确定乙腈-0.1% 甲酸水系统为流动相。

为了使所检测的色谱峰分离度好, 出峰时间合

表 2 8 种咖啡酰奎宁酸加样回收率实验结果(n=9)

Table 2 The result of recovery test of eight caffeoylquinic acids

成分	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
5-CQA	417.784	209.116	629.367	100.66	99.69	1.75
	418.232	418.232	839.000	98.64		
	418.818	627.348	1041.333	99.76		
3-CQA	659.251	329.625	992.667	103.48	99.78	2.73
	659.251	659.251	1315.000	99.57		
	662.509	988.876	1635.000	96.29		
4-CQA	537.130	267.463	803.000	98.47	98.44	1.73
	534.927	534.927	1075.000	100.30		
	530.080	802.390	1323.667	96.55		
1,3-DCQA	59.087	29.544	89.400	100.75	101.73	2.17
	59.087	59.087	118.733	102.42		
	59.379	88.631	149.933	102.03		
3,4-DCQA	200.162	100.048	300.300	98.00	99.61	1.26
	200.095	200.095	400.733	101.69		
	202.289	300.143	499.933	99.13		
3,5-DCQA	115.786	57.931	173.800	102.64	100.88	2.16
	115.863	115.863	231.500	98.45		
	115.403	173.794	289.833	101.54		
4,5-DCQA	120.974	60.387	180.600	97.82	98.14	2.68
	120.774	120.774	240.967	98.30		
	120.474	181.161	301.100	98.29		

表 3 杏香兔耳风制剂中 8 种咖啡酰奎宁酸的含量(n=6)

Table 3 The content of eight caffeoylquinic acids in different preparations

厂家	5-CQA	RSD/%	3-CQA	RSD/%	4-CQA	RSD/%	1,3-DCQA	RSD/%	3,4-DCQA	RSD/%	1,5-DCQA	RSD/%	3,5-DCQA	RSD/%	4,5-DCQA	RSD/%
1	0.414	1.27	0.652	1.23	0.529	0.87	0.058	1.6	0.199	2.5	-	-	0.115	1.36	0.12	0.62
2	3.272	0.92	4.461	1.67	3.974	0.95	0.786	1.7	3.289	1.8	0.273	1.3	1.621	2.15	1.946	1.29
3	0.003	1.35	0.018	1.36	0.007	1.26	0.005	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0.066	2.1	0.193	1.57	0.079	2.1	0.017	0.78	0.097	0.78	0.037	2.3	0.246	2.87	0.121	1.38
5	0.183	0.89	0.682	2.23	0.271	2.3	-	-	0.116	1.23	-	-	0.115	0.98	0.19	0.63

注：(1)厂家 1, 4 为杏香兔耳风单方制剂，厂家 2, 3 为杏香兔耳风复方制剂；(2)规格：厂家 1(0.4 g/粒)，厂家 2(18 g/袋)，厂家 3(0.47 g/粒)，厂家 4(0.42 g/粒)，厂家 5(0.5 g/片)。

酸含量较高，而加工成杏香兔耳风制剂后主要为单咖啡酰奎宁酸，这可能是由于二咖啡酰奎宁酸不稳定，在工艺过程中易转化成单咖啡酰奎宁酸所致。有研究^[8]表明，二咖啡酰奎宁酸在治疗乙肝及艾滋病上有显著疗效，相关产家应将其作为有效成分进行质量控制。

参考文献：

[1] 徐希科, 柳润辉, 李慧梁, 等. 兔耳风属植物的化学和药理研究进展[J]. 药学实践杂志, 2009, 27(4): 245-247.
 [2] 王惠云, 张治芬, 陈建萍. 促进宫颈粘膜修复 - 杏香兔耳风片已被证实的治疗功效[J]. 中国处方药, 2009, 3(4): 86.

理，采用梯度洗脱方法。单咖啡酰奎宁酸极性较大，适合在水比例较大的系统中分离，而二咖啡酰奎宁酸相对较小，适宜在乙腈比例较大的系统中分离，8 种成分同步检测时，调节梯度比例，由水相向有机相增大。在此调整过程中，曾尝试将乙腈比例增大，二咖啡酰奎宁酸出峰时间提前，但分离度明显降低，故最终确定 5 min 到 32 min 范围内，水相比例由 85% 到 78%。本梯度条件，基线平稳，既保证了 8 种成分同时测定，又缩短了分析时间。

本实验采用超声提取法并考察了溶媒（纯水、50% 甲醇、甲醇）和超声时间（15, 30, 45, 60, 90 min）对提取效率的影响。结果显示，选择甲醇超声提取 45 min，提取效率最佳，且杂质干扰相对较少。

共收集到本地药房当前所售的 5 个不同厂家的杏香兔耳风制剂。含量测定结果表明，不同厂家不同制剂间 8 种指标成分的含量存在差异，其中二咖啡酰奎宁酸的含量均较低，差异较小，且 1,5- 二咖啡酰奎宁酸几乎检测不到；单咖啡酰奎宁酸的含量差异显著，最大值可达最小值的 6.5~87 倍，其中 5- 咖啡酰奎宁酸、4- 咖啡酰奎宁酸含量相对较高，可作为除绿原酸外的另一个质量控制指标。药材中二咖啡酰奎宁

[3] 陈明华, 冯锋, 柳文媛, 等. 杏香兔耳风化学成分分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(10): 803-806.
 [4] 刘波, 谢亮亮, 王英锋. 杏香兔耳风化学成分研究[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2007, 28(6): 36-37.
 [5] 张锐, 曾宪仪, 张正行. 杏香兔耳风的化学成分研究 (II)[J]. 中草药, 2006, 37(3): 347-348.
 [6] 中华人民共和国卫生部药典委员会, 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂)第 14 册[M]. 北京: 1994: 118.
 [7] 邢春秀, 谢宁, 杨念云, 等. 杏香兔耳风的化学成分[J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(2): 39-41.
 [8] 董俊兴. 抗乙肝和艾滋病新药二咖啡酰奎宁酸进入临床[J]. 中国科技, 2006, 12(4): 63-63.

(编辑：邓响潮)