

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.21.019

高效液相色谱法同时测定徐长卿提取物中6种酚酸类成分含量

李志霞, 李正国

(山东省济宁市食品药品检验检测研究院, 山东 济宁 272025)

摘要:目的 建立同时测定徐长卿提取物中绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为Agilent Eclipse XDB C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为0.2%甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为275 nm, 柱温为40℃。结果 绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚的质量浓度分别在3.957 5~158.3 μg/mL、2.462 5~98.5 μg/mL、2.56~102.4 μg/mL、2.862 5~114.5 μg/mL、2.64~105.6 μg/mL、3.117 5~124.7 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 6$, $n = 6$); 精密度试验结果的RSD分别为1.15%, 0.83%, 1.79%, 2.05%, 1.72%, 1.31% ($n = 6$); 加样回收率分别为98.47%, 98.74%, 98.83%, 98.45%, 98.51%, 98.69%, RSD分别为1.30%, 0.95%, 1.15%, 0.83%, 1.26%, 1.51% ($n = 6$); 3批样品中的平均含量分别为1.151, 0.434, 0.715, 1.175, 0.925, 1.542 mg/g ($n = 3$)。结论 所建立的方法简便快捷、准确可靠, 可用于徐长卿相关产品的质量评价。

关键词: 高效液相色谱法; 徐长卿; 绿原酸; 香草酸; 橙皮苷; 丹皮酚原苷; 白前苷B; 丹皮酚

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2022)21-0081-04

Simultaneous Determination of Six Phenolic Acids in the Extract of *Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma* by HPLC

LI Zhixia, LI Zhengguo

(Jining Center for Food and Drug Control of Shandong Province, Jining, Shandong, China 272025)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, vanillic acid, hesperidin, paeonolide, vincetoxicin B and paeonol in the extract of *Cynanchi Paniculati Radix et*

第一作者: 李志霞, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为中药检验检测, (电子信箱)731744949@qq.com。

设备、人员、物料、环境等多个系统, 以及无菌过程中产品可能易于被微生物污染的潜在薄弱环节进行APS试验, 结果所有灌装完成的产品都达到了零污染的目标, 符合高标准无菌保证。可见, 该冻干车间在工程设计、生产控制、活动干预、质量体系、人员培训、书面规程、环境控制、环境监测等方面均严格遵守了无菌技术, 可保障无菌制剂产品生产过程的无菌性, 确保无菌制剂的安全性。本研究结果对实际生产具有指导意义, 是日常生产操作的依据, 有助于实现与国际医药产业的接轨。

参考文献

- [1] 胡敬峰, 韩莹. 无菌工艺模拟试验中存在的问题与对策[J]. 中国药事, 2019, 33(12): 1395-1399.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 关于发布《药品生产质量管理规范(2010年修订)》无菌药品等5个附录的公告[EB/OL]. (2011-02-24)[2021-12-15]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20110224164501312.html>.
- [3] 国家食品药品监督管理局药品认证管理中心. 《药品GMP指南(无菌药品)》[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 271.
- [4] 潘友文. 无菌生产工艺验证——培养基灌装试验[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(1): 34-37.
- [5] ISO 14644-3:2019(E), Cleanrooms and associated controlled environments — Part 3: Test methods[S].
- [6] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局关于发布除菌过滤技术及应用指南等3个指南的通告(2018年第85号)[EB/OL]. (2018-07-31)[2021-12-15]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20180911170301439.html>.
- [7] 杨惠毛, 田治文, 杨文竹, 等. 在无菌隔离器内进行冻干制剂生产操作的规范性研究[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(12): 1663-1669.
- [8] 李妮勇, 刘智勇. 新版GMP中对无菌工艺验证要求的探讨[J]. 机电信息, 2011(35): 20-24.
- [9] 石景曼, 吕环哲, 王民如. 无菌粉针工艺验证——培养基模拟灌装[J]. 中国药师, 2011, 14(6): 902-903.
- [10] 袁松范. 工业指南用无菌工艺生产的无菌产品——现行GMP[J]. 医药工程设计杂志, 2005, 26(2): 42-50.
- [11] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局关于发布《药品生产质量管理规范(2010年修订)》计算机化系统和确认与验证两个附录的公告(2015年第54号)[EB/OL]. (2015-05-26)[2021-12-15]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20150526120001509.html>.

(收稿日期: 2022-01-20; 修回日期: 2022-05-01)

Rhizoma. **Methods** The chromatographic column was Agilent Eclipse XDB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.2% formic acid aqueous solution - acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 275 nm, and the column temperature was 40 °C. **Results** The linear ranges of chlorogenic acid, vanillic acid, hesperidin, paeonolide, vincetoxicoid B and paeonol were 3.957 5 - 158.3 μg/mL, 2.462 5 - 98.5 μg/mL, 2.56 - 102.4 μg/mL, 2.862 5 - 114.5 μg/mL, 2.64 - 105.6 μg/mL and 3.117 5 - 124.7 μg/mL ($r \geq 0.999 6$, $n = 6$), respectively. The RSDs of precision tests were 1.15%, 0.83%, 1.79%, 2.05%, 1.72% and 1.31% ($n = 6$), respectively. The recovery rates of the above six phenolic acids were 98.47%, 98.74%, 98.83%, 98.45%, 98.51% and 98.69% with RSDs of 1.30%, 0.95%, 1.15%, 0.83%, 1.26% and 1.51% ($n = 6$), respectively. The average contents of the above six phenolic acids in the three batches of samples were 1.151, 0.434, 0.715, 1.175, 0.925 and 1.542 mg/g ($n = 3$), respectively. **Conclusion** The established method is simple, rapid, accurate and reliable, which can be used for the quality evaluation of related products of *Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma*.

Key words: HPLC; *Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma*; chlorogenic acid; vanillic acid; hesperidin; paeonolide; vincetoxicoid B; paeonol

徐长卿始载于《神农本草经》，又名鬼督邮、别仙踪、一枝香、老君须等，为萝藦科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag. 的干燥根或根茎。性温，味辛，归肝经、胃经，具有祛风除湿、行气活血、祛痛止痒、解毒消肿功效，主治风湿痹痛、腕腹疼痛、牙痛、跌扑伤痛、泄泻、痢疾、荨麻疹、毒蛇咬伤等^[1-2]。徐长卿富含挥发油类、C21甾体类、黄酮类、生物碱类、多糖类等成分^[3-6]。现代药理学研究表明，其具有抗肿瘤、保护软骨细胞、抗炎、镇痛、抗病毒等作用^[7-12]。目前的研究中仅将丹皮酚作为其检测指标性成分，检测指标较局限。本研究中通过提取纯化方法制备徐长卿提取物，采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定徐长卿提取物中绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚的含量，旨在为徐长卿医药保健产品的开发奠定基础。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国沃特世公司)，配有Empower色谱工作站；ZFS型旋转蒸发仪(青岛聚创世纪环保科技有限公司)；Gilson型移液枪(吉而逊实验仪器<上海>有限公司)；RE30型超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司，功率为320 W，频率为30 kHz)；真空干燥机(上海一恒医疗器械有限公司)；BS型电子天平(德国Sartorius公司，精度为0.01 mg)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(批号为110753-202018，纯度≥96.1%)，香草酸对照品(批号为110776-201503，纯度≥99.8%)，橙皮苷对照品(批号为110721-201818，纯度≥96.2%)，丹皮酚对照品(批号为110708-201908，纯度≥99.8%)，均购自中国食品药品检定研究院；丹皮酚原苷对照品(九鼎生物科技有限公司，批号为P1879，纯度≥98%)；白前苷B对照品(四川艾克瑞思

检测技术有限公司，批号为202019，纯度≥98%)；徐长卿提取物(实验室自制，批号分别为20210705，20210816，20210906，以下简称a, b, c)；乙腈(色谱纯，德国默克公司)；纯化水(自制)；其余试剂均为分析纯；徐长卿药材购自安徽亳州中药材市场，经我院李正国主任中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Agilent Eclipse XDB C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相：0.2%甲酸水溶液(A) - 乙腈(B)，梯度洗脱(0~19 min时10%B~33%B, 19~32 min时33%B~58%B, 32~46 min时58%B~83%B, 46~58 min时83%B~90%B)；流速：1.0 mL/min；检测波长：275 nm；柱温：40 °C；进样量：10 μL。

2.2 徐长卿提取物制备

称取徐长卿适量，粉碎，过24目筛，加纯化水回流提取3次，第1次加13倍量水，提取1 h，第2次和第3次均加10倍量水，提取1 h，合并提取液，滤过，减压浓缩(-0.10 MPa, <80 °C)至相对密度为1.20(室温)，加乙醇充分搅拌，并使含醇量达60%，静置24 h，滤过，得醇沉清液。醇沉清液先过001 × 7阳离子树脂，收集流出液，回收乙醇，经大孔树脂[HPD300 - HPD826 (1:1.5, V/V)]吸附，大孔树脂用水洗[3 BV(柱体积)]，用60%乙醇4 BV进行洗脱，收集乙醇洗脱液，浓缩，干燥，即得。

2.3 溶液制备

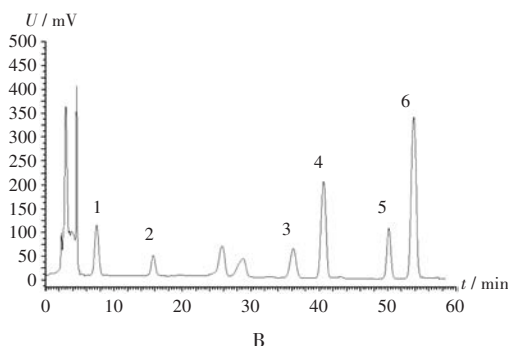
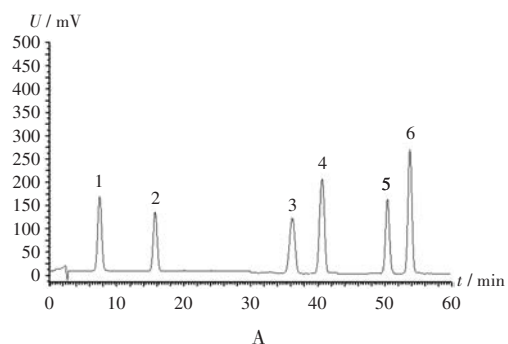
混合对照品溶液：取绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚对照品各适量，精密称定，置100 mL容量瓶中，用乙腈溶解并定容，配制成绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚质量浓度分别为158.3, 98.5, 102.4, 114.5, 105.6, 124.7 μg/mL

的混合对照品溶液,备用。

供试品溶液:取2.2项下徐长卿提取物100 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加60%乙醇超声使溶解,用乙腈定容,摇匀,即得。

2.4 方法学考察

专属性试验:取2.3项下混合对照品溶液和供试品溶液各10 μ L,按2.1项下色谱条件进样分析,色谱图见图1。可见,绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚6种成分的分离度良好,专属性强。



1. 绿原酸 2. 香草酸 3. 橙皮苷 4. 丹皮酚原苷 5. 白前苷B
6. 丹皮酚

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. Vanillic acid 3. Hesperidin 4. Paeonolide
5. Vincetoxicosid B 6. Paeonol

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察:精密吸取2.3项下混合对照品溶液10,5,2.5,1,0.5,0.25 mL,分别置10 mL容量瓶中,用

乙腈稀释并定容,得绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚质量浓度分别为3.957 5,7.915,15.83,39.575,79.15,158.3 μ g/mL,2.462 5,4.925,9.85,24.625,49.25,98.5 μ g/mL,2.56,5.12,10.24,25.6,51.2,102.4 μ g/mL,2.862 5,5.725,11.45,28.625,57.25,114.5 μ g/mL,2.64,5.28,10.56,26.4,52.8,105.6 μ g/mL,3.117 5,6.235,12.47,31.175,62.35,124.7 μ g/mL的系列对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样分析,并记录峰面积,以对照品溶液质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果各成分在其质量浓度范围内与峰面积线性关系均良好,详见表1。

精密度试验:精密吸取绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚质量浓度分别为15.83,9.85,10.24,11.45,10.56,12.47 μ g/mL的混合对照品溶液10 μ L,按2.1项下色谱条件重复进样测定6次。结果见表1,表明仪器精密度良好。

重复性试验:精密称取徐长卿提取物(批号为b)100 mg,平行6份,按2.3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1,表明方法重复性良好。

稳定性试验:取2.3项下供试品溶液适量,分别于0,1,2,3,6,9,15,30 h时进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表1,表明供试品溶液在30 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的徐长卿提取物(批号为b)50 mg,精密称定,平行6份,加60%乙醇超声使溶解,精密吸取绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚质量浓度分别为15.83,9.85,10.24,11.45,10.56,12.47 μ g/mL的混合对照品溶液4 mL,置10 mL容量瓶中,用乙腈定容,摇匀,得供试品溶液。经0.45 μ m微孔滤膜滤过,进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

2.5 样品含量测定

取3批(批号分别为a,b,c)徐长卿提取物各100 mg,

表1 线性关系考察、精密度、重复性、稳定性及加样回收试验结果(n=6)

Tab. 1 Results of the linear relation test, precision repeatability, stability tests and recovery test (n=6)

成分	线性关系考察			精密度试验 RSD(%)	重复性试验		稳定性试验 RSD(%)	加样回收试验(%)	
	回归方程	r	线性范围(μ g/mL)		含量(mg/g)	RSD(%)		RSD(%)	\bar{X}
绿原酸	$Y=7.8405 \times 10^4 X+1523.7$	0.9999	3.9575~158.3	1.15	1.172	2.34	1.79	98.47	1.30
香草酸	$Y=1.0065 \times 10^5 X-2835.4$	0.9998	2.4625~98.5	0.83	0.438	1.86	1.54	98.74	0.95
橙皮苷	$Y=8.7528 \times 10^4 X+1271.5$	0.9996	2.56~102.4	1.79	0.714	1.58	1.78	98.83	1.15
丹皮酚原苷	$Y=1.3448 \times 10^5 X+564.8$	0.9997	2.8625~114.5	2.05	1.178	1.71	2.06	98.45	0.83
白前苷B	$Y=9.5834 \times 10^4 X+3107.9$	0.9998	2.64~105.6	1.72	0.923	2.42	1.49	98.51	1.26
丹皮酚	$Y=1.7482 \times 10^5 X+1062.6$	0.9999	3.1175~124.7	1.31	1.549	1.95	1.33	98.69	1.51

精密称定,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定3次,记录峰面积,并计算含量。结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)Tab. 2 Results of the content determination of six phenolic acids in samples ($n=3$)

成分	含量(mg/g)			\bar{X} (mg/g)	RSD(%)
	a	b	c		
绿原酸	1.127	1.172	1.154	1.151	1.96
香草酸	0.426	0.435	0.441	0.434	1.73
橙皮苷	0.707	0.718	0.720	0.715	0.98
丹皮酚原苷	1.186	1.178	1.162	1.175	1.04
白前苷B	0.938	0.924	0.913	0.925	1.35
丹皮酚	1.549	1.546	1.531	1.542	0.62

3 讨论

3.1 检测波长选择

绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚各对照品分别经紫外全波长扫描,结果分别在326, 261, 283, 278, 268 / 371, 275 nm波长处有最大吸收,在275 nm波长处的色谱峰峰形及基线均良好,综合考虑,选择275 nm作为检测波长。

3.2 流动相选择

考察了甲醇-0.2%甲酸、甲醇-0.2%醋酸、甲醇-0.1%磷酸及相应乙腈体系的流动相,发现乙腈-0.2%甲酸体系的基线平稳、色谱峰峰形及分离度均显著好于其他流动相,且色谱图中的绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚的保留时间均良好,故选择乙腈-0.2%甲酸水溶液为流动相。

3.3 大孔树脂选择

采用大孔树脂联用纯化徐长卿提取物,前期通过筛选多种型号的大孔树脂发现,HPD300和HPD826 2种型号大孔树脂联用的纯化效果较好,其最佳混合比为1:1.5(V/V)。HPD826能较好地保留有机酸类及黄酮苷类成分,如绿原酸、香草酸、橙皮苷等;HPD300能较好地吸附弱极性的甙体类、萜类及黄酮类成分。两者混用可对不同类成分进行吸附,使徐长卿中相关成分达到最大保留。

3.4 考察指标选择

选择绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B、丹皮酚6种成分作为考察指标,初步探索在本工艺条件下制备的徐长卿提取物成分的含量。结果发现,徐长卿提取物中丹皮酚、丹皮酚原苷和绿原酸的含量相对较高,香草酸、橙皮苷和白前苷B亦有较高的含量。结合丹皮酚和绿原酸在肝损伤、肝纤维化、肝脂肪堆

积等肝病方面的功效显著^[13-16],进一步推测徐长卿中高含量的丹皮酚和绿原酸可能是其归肝经的物质基础。

3.5 方法评价

本研究中建立的HPLC法准确、可靠、快捷,可用于同时测定徐长卿提取物中绿原酸、香草酸、橙皮苷、丹皮酚原苷、白前苷B及丹皮酚的含量及其相关产品的质量评价。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 345-348.
- [2] 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: 298.
- [3] 李葆林, 杨梦婷, 支雅婧, 等. 徐长卿化学成分和药理作用的研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(12): 3725-3735.
- [4] 邹传生. 徐长卿化学成分研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.
- [5] 付明, 王登宇, 胡兴, 等. 徐长卿化学成分研究[J]. 中药材, 2015, 38(1): 97-100.
- [6] 李翼鹏. 徐长卿的化学成分研究[D]. 太原: 山西大学, 2016.
- [7] 秦桂福, 吴琪, 宋玉, 等. 徐长卿丹皮酚联合顺铂对骨肉瘤细胞迁移和凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2021, 29(9): 10-15.
- [8] 褚文希, 刘小红, 刘坤, 等. 徐长卿逆转肿瘤多药耐药活性部位化学成分研究[J]. 中草药, 2015, 46(18): 2674-2679.
- [9] 吴成武, 王伟, 汤休书, 等. 徐长卿丹皮酚通过调控Wnt/ β -catenin通路保护IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(23): 5346-5351.
- [10] 赫锦锦, 方东. 徐长卿丹皮酚对骨癌痛大鼠镇痛作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11): 1526-1531.
- [11] 吴琪, 周晓红, 杨德才, 等. 徐长卿-二妙散-三藤方对蛋白聚糖诱导关节炎模型小鼠血清中TNF- α 和DKK-1含量的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(31): 4369-4372.
- [12] 徐宏峰, 张耕, 王富乾, 等. 徐长卿6个提取部位体外抗水痘带状疱疹病毒作用研究[J]. 中国药房, 2014, 25(39): 3659-3662.
- [13] 司远青, 颜贵明. 丹皮酚对小鼠酒精性脂肪肝中Adip/CaMKK β /AMPK通路的影响[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(1): 80-86.
- [14] 王媛媛, 尹昕茹, 黄一可, 等. 丹皮酚对四氯化碳诱导急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中成药, 2019, 41(2): 428-431.
- [15] 王玉秋, 张丽宏, 陈巧云, 等. 绿原酸对转化生长因子- β_1 诱导人肝星形细胞分泌炎症细胞因子的影响[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(6): 452-456.
- [16] 宋丹军, 代曼云, 华慧英, 等. 绿原酸抗石胆酸胆汁淤积模型肝损伤的作用与机制研究[J]. 营养学报, 2017, 39(3): 280-286.

(收稿日期: 2022-01-20; 修回日期: 2022-04-15)