

# HPLC 法测定芪桂痛风片中新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸和蒙花苷

廉维俊<sup>1</sup>, 林夏<sup>2,3</sup>, 胡军华<sup>2,3</sup>, 章晨峰<sup>2,3</sup>, 肖伟<sup>1,2,3</sup>, 王振中<sup>1,2,3\*</sup>

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室, 江苏 连云港 222001

**摘要:** 目的 建立测定芪桂痛风片中新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷的 HPLC 方法。方法 采用 ACE Excel C<sub>18</sub>-AR 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 3 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 - 乙腈, 梯度洗脱; 检测波长 325 nm (新绿原酸、绿原酸、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸)、334 nm (秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、蒙花苷); 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。结果 新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷的线性范围分别为 1.86~59.45、26.21~838.80、8.01~256.47、3.60~115.45、17.79~569.18、1.93~61.76、3.67~117.51、2.27~72.76 μg/mL, 线性关系良好 ( $r=1.0000$ ), 平均回收率分别为 95.56%、92.88%、95.49%、92.15%、93.03%、96.03%、99.90%、95.42%, RSD 值分别为 3.40%、3.11%、3.25%、3.17%、3.10%、3.52%、3.40%、3.34%。结论 建立的芪桂痛风片中 8 种成分 HPLC 定量方法简便、快速、准确, 可以用于评价芪桂痛风片的质量。

**关键词:** 芪桂痛风片; 新绿原酸; 秦皮甲素; 绿原酸; 秦皮乙素; 秦皮苷; 秦皮素; 蒙花苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2023)03-0571-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.03.012

## Determination of neochlorogenic acid, esculin, chlorogenic acid, esculetin, fraxin, fraxetin, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, and linarin in Qigui Tongfeng Tablets by HPLC

LIAN Wei-jun<sup>1</sup>, LIN Xia<sup>2,3</sup>, HU Jun-hua<sup>2,3</sup>, ZHANG Chen-feng<sup>2,3</sup>, XIAO Wei<sup>1,2,3</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>1,2,3</sup>

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. National Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Lianyungang 222001, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for determination of neochlorogenic acid, esculin, chlorogenic acid, esculetin, fraxin, fraxetin, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, and linarin in Qigui Tongfeng Tablets. **Methods** The separation was carried out on Ace Excel C<sub>18</sub>-AR column (150 mm × 4.6 mm, 3 μm). The mobile phase was acetonitrile - 0.1% formic acid with gradient elution. The detection wavelength was set at 325 nm (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, and 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid) and 334 nm (esculin, esculetin, fraxin, fraxetin, and linarin). The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 30 °C, and the volume of injection was 10 μL. **Results** Neochlorogenic acid, esculin, chlorogenic acid, esculetin, fraxin, fraxetin, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, and linarin had good linear relationships in concentration range of 1.86 — 59.45, 26.21 — 838.80, 8.01 — 256.47, 3.60 — 115.45, 17.79 — 569.18, 1.93 — 61.76, 3.67 — 117.51, and 2.27 — 72.76 μg/mL ( $r=1.0000$ ), and their average recoveries were 95.56%, 92.88%, 95.49%, 92.15%, 93.03%, 96.03%, 99.90%, and 95.42% with RSD values as 3.40%, 3.11%, 3.25%, 3.17%, 3.10%, 3.52%, 3.40%, and 3.34%, respectively. **Conclusion** The established HPLC quantitative method for eight components in Qigui Tongfeng Tablets is simple, rapid, and accurate, and can be used to evaluate the quality of Qigui Tongfeng Tablets.

**Key words:** Qigui Tongfeng Tablets; neochlorogenic acid; esculin; chlorogenic acid; esculetin; fraxin; fraxetin; linarin; HPLC

收稿日期: 2023-01-15

基金项目: 国家中医药管理局岐黄学者项目 (2021)

作者简介: 廉维俊 (1997—), 女, 辽宁丹东人, 硕士研究生, 研究方向为中药制药技术与产品开发。E-mail: lianweijun1997@163.com

\*通信作者: 王振中 (1968—), 男, 博士, 研究员级高级工程师, 硕士生导师, 从事中药新药研发及应用。E-mail: kyyywzz@163.com

芪桂痛风片是由黄芪、五加皮、桂枝、浙贝母、刘寄奴、海风藤、秦皮、野菊花 8 味中药经适宜工艺制成的片剂，具有扶正祛邪、通络止痛的功效，是治疗脏腑气弱、痰瘀阻滞、经络不通所致的慢性痛风性关节炎（症见关节肿痛、屈伸不利等）之良剂<sup>[1]</sup>。原质量标准中仅对方剂黄芪中黄芪甲苷进行了测定，张小强等<sup>[2]</sup>运用高效液相色谱-蒸发光散射法测定芪桂痛风片中黄芪甲苷。有研究表明，蒙花苷具有抗炎作用，给予蒙花苷后小鼠血清中尿酸水平显著降低，血清、肝脏中黄嘌呤氧化酶活性均显著降低，提示蒙花苷可能通过抑制尿酸生成途径能发挥降尿酸作用<sup>[3-4]</sup>。秦皮甲素既能利尿以促进尿酸的排泄，又能通过抑制黄嘌呤氧化酶活性来抑制尿酸的生成；秦皮乙素也具有抑制黄嘌呤氧化酶活性的作用<sup>[5-6]</sup>。咖啡酰基奎宁酸酯类化合物具有突出的抗炎作用，其中绿原酸显示出了较好的降尿酸药效，同时对肾功能无影响，其发挥降尿酸的机制可能与抑制黄嘌呤氧化酶、腺苷脱氨酶活性有关<sup>[7-8]</sup>。为了更好地控制芪桂痛风片的质量，结合提取制备工艺路线，本实验建立了同时测定芪桂痛风片中新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷 8 个成分的定量方法，以期为芪桂痛风片质量标准提升研究提供参考依据。

## 1 仪器与试剂

Waters Arc 高效液相色谱仪（美国沃特世公司）；Mettler Toledo XP6 型电子分析天平（百万分之一）、Mettler Toledo MS204 型电子分析天平（十万分之一）、Mettler Toledo 105Du 型电子分析天平（十万分之一）（瑞士梅特勒公司）；KB-500DB 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；TG16MW 台式高速离心机（湖南赫西仪器装备有限公司），Milli-Q 超纯水仪（美国密理博公司）。

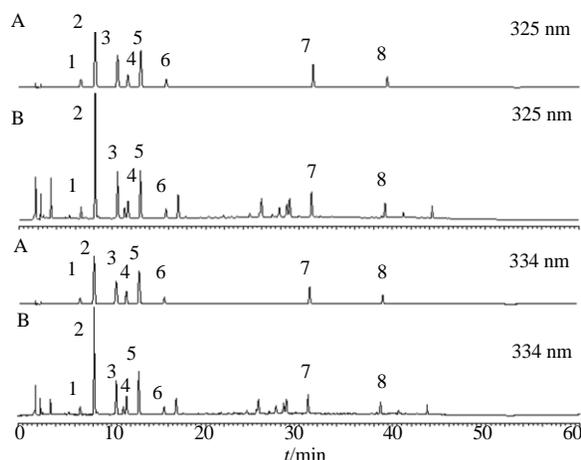
芪桂痛风片（规格 0.65 g/片，江苏康缘药业股份有限公司，批号 220601、220602、220603）；甲醇（分析纯，批号 20211105，国药集团化学试剂有限公司）；乙腈（色谱纯，批号 023636，MREDA）；甲酸（分析纯，批号 200515906D，南京化学试剂股份有限公司），超纯水（自制）。秦皮甲素（批号 110740-201806）、绿原酸（批号 110753-202119）、秦皮乙素（批号 110741-202109）、秦皮素（批号 111731-202103）、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸（批号 111894-202104）、蒙花苷（批号 111528-202112）对

照品均购自中国食品药品检定研究院；秦皮苷（质量分数大于 98%，批号 ST00130120-2864）、新绿原酸（质量分数大于 98%，批号 ST06230120-3209）对照品均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

ACE Excel C<sub>18</sub>-AR 色谱柱（150 mm×4.6 mm，3 μm）；流动相为 0.1% 甲酸水（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~7 min: 7%~10% B；7~19 min: 10%~16% B；19~24 min: 16%~19% B；24~36 min: 19%~26% B；36~45 min: 26%~40% B；45~50 min: 40% B）；检测波长 325 nm（新绿原酸、绿原酸、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸）、334 nm（秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、蒙花苷）；体积流量为 1 mL/min；柱温为 30 °C；进样量 10 μL。色谱图见图 1。



1-新绿原酸 2-秦皮甲素 3-绿原酸 4-秦皮乙素 5-秦皮苷  
6-秦皮素 7-4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸 8-蒙花苷  
1-neochlorogenic acid 2-esculin 3-chlorogenic acid 4-esculetin  
5-fraxin 6-fraxetin 7-4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid 8-linarin

图 1 混合对照品 (A) 和芪桂痛风片 (B) 的 HPLC 图谱  
Fig. 1 HPLC Chromatograms of Reference substances (A) and Qigui Tongfeng Tablets (B)

### 2.2 对照品溶液的制备

分别取新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度分别为 0.01、0.10、0.04、0.02、0.10、0.01、0.02、0.01 mg/mL 的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

将芪桂痛风片去除薄膜衣后研磨成细粉，取样品约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入

50% 甲醇溶液 25 mL, 称定质量, 超声处理 (500 W、40 kHz) 30 min, 放冷, 补足失去的质量, 摇匀, 离心, 即得。

#### 2.4 线性关系考察

取对照品适量, 制成分别含新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷 59.45、838.81、256.47、

115.45、569.18、61.76、117.51、72.76  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品母液。精密量取各混合对照品溶液 5 mL 于 10 mL 量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。依此操作, 制得系列标准曲线浓度的混合对照品溶液 1~5。依次进样测定, 记录峰面积。以质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标进行线性回归, 分别绘制标准曲线, 并得到回归方程, 见表 1。

表 1 8 种成分的回归方程、相关系数、线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficient, and linear range of eight components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
新绿原酸	$Y=31\ 213.400\ 6\ X+3\ 270.854\ 9$	1.000 0	1.86~59.45
秦皮甲素	$Y=23\ 253.148\ 1\ X+73\ 242.615\ 3$	1.000 0	26.21~838.80
绿原酸	$Y=32\ 101.820\ 9\ X+14\ 634.615\ 3$	1.000 0	8.01~256.47
秦皮乙素	$Y=35\ 995.534\ 9\ X+6\ 853.886\ 4$	1.000 0	3.60~115.45
秦皮苷	$Y=15\ 384.226\ 4\ X+24\ 448.551\ 4$	1.000 0	17.79~569.18
秦皮素	$Y=34\ 703.966\ 5\ X+2\ 664.550\ 6$	1.000 0	1.93~61.76
4,5- <i>O</i> -二咖啡酰奎宁酸	$Y=40\ 911.431\ 8\ X+666.476\ 8$	1.000 0	3.67~117.51
蒙花苷	$Y=29\ 202.709\ 3\ X+4\ 623.035\ 7$	1.000 0	2.27~72.76

#### 2.5 精密性试验

精密吸取线性混合对照品溶液 3 (含新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷 7.43、104.85、32.06、14.43、71.15、7.72、14.69、9.10  $\mu\text{g/mL}$ ) 和芪桂痛风片供试品溶液 (批号 220601), 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算峰面积 RSD 值。结果对照品中新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷峰面积 RSD 值分别为 1.24%、0.99%、1.06%、1.02%、0.92%、0.99%、1.08%、0.94%, 供试品中各成分峰面积 RSD 值分别为 0.56%、0.13%、0.75%、0.22%、0.14%、0.29%、0.39%、0.60%。

#### 2.6 稳定性试验

精密吸取线性混合对照品溶液 3 (含新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷 7.43、104.85、32.06、14.43、71.15、7.72、14.69、9.10  $\mu\text{g/mL}$ ) 于室温下放置 0、3、5、8、16、26 h; 取芪桂痛风片供试品溶液 (批号 220601) 于室温下放置 0、3、5、8、17、25 h, 进样分析, 记录峰面积, 计算峰面积 RSD 值, 结果对照品中新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎

宁酸、蒙花苷峰面积 RSD 值分别为 1.08%、1.00%、1.17%、0.99%、0.97%、1.00%、1.13%、0.88%; 供试品中各成分峰面积 RSD 值分别为 0.53%、0.15%、0.87%、0.30%、0.16%、0.63%、0.66%、0.44%。结果表明对照品溶液在 26 h 内、供试品溶液在 25 h 内稳定。

#### 2.7 重复性试验

取批号 220601 芪桂痛风片粉末, 精密称取 6 份, 制备供试品溶液, 分别进样分析, 记录新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷的峰面积, 用外标法计算各成分质量分数, 计算 RSD 值, 结果样品中新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷质量分数分别为 0.41、6.59、1.98、0.84、4.58、0.43、0.88、0.68 mg/g, RSD 值分别为 0.62%、0.25%、0.66%、0.75%、0.28%、0.65%、1.28%、0.93%。

#### 2.8 回收率试验

精密称定批号 220601 芪桂痛风片粉末 9 份, 每组 3 份, 各 0.25 g, 分别精密加入混合对照品溶液 (含新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷 0.12、1.68、0.51、0.23、1.14、0.12、0.24、0.15 mg/mL)

0.5、1、1.5 mL, 制备供试品溶液, 进样分析, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷的平均回收率分别为 95.56%、92.88%、95.49%、92.15%、93.03%、96.03%、99.90%、95.42%, RSD 值分别为 3.40%、3.11%、

3.25%、3.17%、3.10%、3.52%、3.40%、3.34%。

### 2.9 样品测定

取芪桂痛风片, 分别制备供试品溶液, 进样分析, 记录峰面积, 采用外标法计算新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸、蒙花苷的质量分数, 结果见表 2。

表 2 芪桂痛风片中新绿原酸、秦皮甲素、绿原酸、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸和蒙花苷的测定结果 ( $n=3$ )

Table 2 Determination of neochlorogenic acid, esculin, chlorogenic acid, esculetin, fraxin, fraxetin, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, and linarin in Qigui Tongfeng Tablets ( $n=3$ )

批号	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )							
	新绿原酸	秦皮甲素	绿原酸	秦皮乙素	秦皮苷	秦皮素	4,5- <i>O</i> -二咖啡酰奎宁酸	蒙花苷
220601	0.40	6.48	1.98	0.86	4.52	0.42	0.90	0.69
220602	0.47	6.27	2.17	0.83	4.38	0.48	1.02	0.75
220603	0.43	7.15	2.10	1.06	4.83	0.54	0.96	0.72

## 3 讨论

### 3.1 专属性考察

前期对芪桂痛风片中化学成分进行定性研究, 并对各成分进行了归属, 其中秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素来源于秦皮, 蒙花苷来源于野菊花, 新绿原酸、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸来源于五加皮和野菊花, 绿原酸来源于黄芪、五加皮和野菊花。

### 3.2 检测波长选择

在 DAD 全波长扫描模式下, 新绿原酸、绿原酸和 4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸在 325 nm 下吸收最强, 秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素和蒙花苷在 334 nm 附近有最强吸收, 因此选取 325、334 nm 两个波长作为检测波长。

### 3.3 提取方法优选

为使指标成分提取完全, 对提取方式(超声、回流)、提取溶剂(50%甲醇、70%甲醇、甲醇)进行了考察, 结果表明, 以 50%甲醇或 70%甲醇超声提取时, 结果相当。考虑环保和节约, 最终选择采用 50%甲醇进行超声提取。

本研究建立的芪桂痛风片中 8 种成分 HPLC 定量的方法简便、快速、准确, 可以用于评价芪桂痛风片的质量。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 杨保林, 丁岗. 芪桂痛风舒颗粒治疗痛风性关节炎 16 例疗效观察 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 276-277.
- [2] 张小强, 李英, 吴云, 等. 芪桂痛风片的质量标准研究 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(2): 169-173.
- [3] 郑璐璐, 张贵君, 王晶娟, 等. 野菊花药效组分抗炎的生物效应研究 [J]. 天津中医药, 2011, 28(3): 251-253.
- [4] 钱永帅, 黄林生, 娄锐, 等. 蒙花苷体内降尿酸作用及对高尿酸血症小鼠尿酸转运蛋白的影响 [J/OL]. 中药药理与临床, <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEV12pW9UrhTDCdPD65LayGDX49vZvxHC1-l3nxcIwoVSz53EnGehjaI6iDNZxxHDbWph5eR&uniplatform=NZKPT>.
- [5] Wang C J, Hsieh Y J, Chu C Y. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin [J]. *Cancer Lett*, 2002, 183(2): 163-168.
- [6] Li J M, Zhang X, Wang X. Protective effects of cortex fraxini coumarines against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 666(1/3):196-204.
- [7] 鲍红松, 侯靖宇, 胡贺佳, 等. 平衡透析法测定羊耳菊提取物中 9 个成分的血浆蛋白结合率 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1475-1484.
- [8] 朱春胜, 张冰, 林志健, 等. 菊苣降尿酸药效验证 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 4933-4936.

[责任编辑 解学星]