

金沙藤对照提取物的质量控制研究

李耀磊¹, 李海亮¹, 周艳林², 王莹¹, 金红宇^{1*}, 咎珂^{1*}, 马双成¹

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

摘要: 目的 建立基于多指标含量测定及特征图谱的金沙藤 *Lygodii Herba* 对照提取物的质量控制方法。方法 采用 Waters symmetry shieldTM RP18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈为流动相 A、0.4% 磷酸为流动相 B, 梯度洗脱 (0~40 min: 90%~75% B, 40~45 min: 75%~60% B, 45~50 min: 60%~10% B), 柱温 30 °C, 体积流量为 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 354 nm; 测定 3 批次金沙藤对照提取物中咖啡酸、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和紫云英苷的含量; 建立特征图谱方法, 并对 3 批次提取物特征峰进行指认; 同时考察引湿性和水分含量。结果 咖啡酸、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和紫云英苷各化合物在检测质量浓度范围内线性关系良好 ($r>0.999\ 9$), 进样精密性 RSD 在 0.2%~0.3%, 重复性 RSD 在 0.4%~0.5%, 4 种成分的加样回收率在 92.5%~101.0%, 样品溶液中各成分在 48 h 内稳定性良好。3 批次对照提取物中, 咖啡酸质量分数为 0.50%~0.64%, 异槲皮苷质量分数为 0.14%~0.21%, 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷质量分数为 0.11%~0.36%, 紫云英苷质量分数为 0.66%~0.80%。通过建立的提取物 HPLC 特征图谱, 确定了 4 个共有特征峰, 并根据对照品对色谱峰进行确认, 3 批次提取物质量差异较小。金沙藤对照提取物水分含量为 1.4%~2.3%, 具引湿性。结论 建立的多指标含量测定方法和特征图谱方法简便、快速、准确性高、重复性好, 可用于金沙藤对照提取物的质量控制。

关键词: 对照提取物; 金沙藤; 特征图谱; 质量控制; 含量测定; 咖啡酸; 异槲皮苷; 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷; 紫云英苷
中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 06-1108-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.06.013

Study on quality control of *Lygodii Herba* reference extract

LI Yaolei¹, LI Hailiang¹, ZHOU Yanlin², WANG Ying¹, JIN Hongyu¹, ZAN Ke¹, MA Shuangcheng¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China

Abstract: **Objective** To determine the multi-index content of the reference extract of *Lygodii Herba* and the quality control method of characteristic spectrum. **Method** Waters symmetry shieldTM RP18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used. Using acetonitrile as mobile phase A, 0.4% phosphoric acid as mobile phase B, gradient elution (0—40 min: 90%—75% B, 40—45 min: 75%—60% B, 45—50 min: 60%—10% B), column temperature 30 °C, flow rate 1 mL·min⁻¹, detection wavelength 354 nm. Determined the content of caffeic acid, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside and astragaloside in three batches of *Lygodii Herba* control extracts. Moreover, a characteristic map method was established and the characteristic peaks of the three batches of extracts were identified. Simultaneously examine moisture absorption and moisture. **Results** Caffeic acid, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside and astragaloside had a good linear relationship in the respective detection mass concentration ranges ($r > 0.999\ 9$), and the injection precision RSD was 0.2%—0.3%, the reproducible RSD was 0.4%—0.5%, and the recovery of the six components was 92.5%—101.0%. The stability of each component in the sample solution was good within 48 h. In the three batches of control extracts, the content of caffeic acid was between 0.50% and 0.64%, the content of isoquercitrin was between 0.14% and 0.21%, and the content of kaempferol-3-*O*-rutinoside was between 0.11% and 0.36%, the content of astragalus glycosides was between 0.66% and 0.80%. Through the established HPLC characteristic spectrum of the extract, four common characteristic peaks were determined, and the chromatographic peaks were confirmed according to the reference substance. The quality difference of the three batches of extracts

收稿日期: 2021-10-22

基金项目: 科技部重大新药创制(2018ZX09303-024, 2018ZX09735-006)

第一作者: 李耀磊, 博士, 助理研究员, 从事中药及天然药物质量控制研究。Tel: (010)53852464 E-mail: liyaolei@nifdc.org.cn

*共同通信作者: 金红宇, 主任药师, 从事中药及天然药物质量控制研究。Tel: (010)53851413 E-mail: jhyu@nifdc.org.cn

咎珂, 博士, 副研究员, 从事中药及天然药物质量控制研究。Tel: (010)53852092 E-mail: 6206310@qq.com

was small. The moisture content of the control extract of *Lygodii Herba* was between 1.4%—2.3%, which was hygroscopic. **Conclusion** The multi-index content determination method and fingerprint method established in this study were simple, rapid, accurate and reproducible, and can be used for quality control of *Lygodii Herba* control extract.

Key words: reference extract; *Lygodii Herba*; characteristic spectrum; quality control; determination; caffeic acid; isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside; astragaloside

近年来,随着中药质量控制关键技术的发展,中药对照提取物的研制及其应用越来越广泛。传统的单一指标成分的控制逐渐向多指标、整体质量控制发展,无论是多成分定性还是标志物定量,对照提取物在中药质量控制中发挥着巨大的优势。相对于对照药材,其用法简单且成本低^[1-2]。在前期研究中,本课题组对丹参多酚酸对照提取物、银杏叶提取物等系列品种进行了较多的研究^[3-5],研究结果均表明,对照提取物在单味药材、成方制剂等质量监督工作中发挥了巨大的作用,在技术方面和监管方面具有较强的适用性^[6-7]。

金沙藤为海金沙科植物海金沙 *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw.、小叶海金沙 *L. microphyllum* (Cav.) R. Br.、曲轴海金沙 *L. flexuosum* (L.) Sw. 的干燥地上部分,目前收载于《广西中药材标准》《广西壮药质量标准》等地方药材标准^[8]。文献报道表明,金沙藤药材主要含挥发油、黄酮类、酚酸类和苯丙素类化合物,成分种类丰富^[9-11]。金沙藤具有清热解毒、利尿通淋功效,其甘,寒,归膀胱、小肠经。研究表明金沙藤具有显著的药理作用,临床常用于治疗尿路感染、尿路结石、小便不利、肾炎水肿、感冒发热、咽喉肿痛等疾病^[12-13]。金沙藤在成方制剂中的应用也较多,如三金片等,临床应用较为广泛^[14]。但目前金沙藤药材及含金沙藤的成方制剂质量控制缺乏相应的方法,因此,开发金沙藤对照提取物具有重要的意义,通过研制金沙藤对照提取物及其应用,发挥对照提取物重要的优势来弥补质量标准的缺陷。

金沙藤对照提取物由金沙藤药材经系列提取、浓缩、萃取、干燥后得到,其在金沙藤药材及三金片等质量控制中具有潜在的应用价值,但目前缺乏关键的质量控制方法。本研究基于上述背景,对研制的金沙藤对照提取物的多指标含量、特征图谱、水分和引湿性等质量控制方法进行研究,以期金沙藤对照提取物的应用、金沙藤药材及其相关制剂的标准提升奠定基础。

1 材料

Waters 2695型高效液相色谱仪,配备PDA紫外

检测器,色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Waters symmetry shieldTM RP18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 超声波清洗器(型号 KQ-500E, 昆山超声仪器有限公司); 电子天平(型号 XS 105DU、型号 FX-200, 瑞士梅特勒托利多公司); 甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 水由 Milli-Q 系统(美国 Millipore 公司)制备。

金沙藤对照提取物(批号 191103、191104、190904)、金沙藤药材(批号 191103、191104、190904),均由桂林三金药业股份有限公司提供,其中金沙藤对照提取物由金沙藤药材经水提取,提取液浓缩后经醋酸乙酯进一步萃取得到的干燥粉末。金沙藤药材经中国食品药品检定研究院咎珂副研究员鉴定为海金沙科植物海金沙 *L. japonicum* (Thunb.) Sw. 的干燥地上部分。对照品咖啡酸(批号 110885-201703, 质量分数 99.7%)、异槲皮苷(批号 111809-201804, 质量分数 97.2%)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷(批号 112007-201602, 质量分数 90.8%)由中国食品药品检定研究院提供,紫云英苷(批号 20191422, 质量分数 98.61%)由桂林三金药业股份有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters symmetry shieldTM RP18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈为流动相 A, 0.4% 磷酸为流动相 B, 梯度洗脱, 洗脱程序: 0~40 min (90%~75% B), 40~45 min (75%~60% B), 45~50 min (60%~10% B), 50.1~60.0 min (90% B); 柱温 30 °C, 检测波长 354 nm; 体积流量 1.0 mL·min⁻¹; 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液制备 取咖啡酸、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和紫云英苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每毫升中含咖啡酸 0.01 mg、异槲皮苷 0.04 mg、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 0.06 mg、紫云英苷 0.02 mg 的溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取金沙藤对照提取物

约 50 mg,精密称定,置 20 mL 具塞量瓶中,加甲醇溶解定容并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得金沙藤对照提取物供试品溶液。

取金沙藤药材粉末 1 g,精密称定,置 50 mL 具塞量瓶中,加水 25 mL 后水浴回流提取 1 h,提取液浓缩后经乙酸乙酯进一步萃取得到萃取溶液,滤过,取续滤液,即得药材供试品溶液。

表 1 方法的线性范围、检出限及定量限

Table 1 Linear range, detection limit and quantification limit of method

成分	线性方程	线性范围/ μg	R^2	检出限/ng	定量限/ng
咖啡酸	$y=162\,730x-7\,402$	0.104 9~3.147	0.999 9	20.98	52.45
异槲皮苷	$y=79\,652x-11\,686$	0.036 5~1.095	1.000 0	7.30	18.25
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$y=101\,003x-13\,376$	0.064 3~1.929	1.000 0	12.86	32.15
紫云英苷	$y=29\,648x-6\,075$	0.017 66~0.529 8	1.000 0	3.53	17.66

2.3.2 精密度 取“2.2.1”项制备的对照品溶液 20 μL ,按照“2.1”项色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。咖啡酸、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和紫云英苷峰面积的 RSD($n=6$)分别为 0.3%、0.2%、0.3% 和 0.2%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性 取金沙藤对照提取物(191103)6 份,精密称定,按照“2.2.2”项供试品溶液制备方法制成样品溶液,按照“2.1”项色谱条件进样 20 μL ,分别计算咖啡酸、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和紫云英苷的含量。上述 4 个成分的平均质量分数($n=6$)为 0.51%、0.16%、0.24% 和 0.75%,RSD 分别为 0.4%、0.5%、0.4% 和 0.5%,表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性 取同一份供试品溶液,放置于室温,分别于 0、2、5、12、24、36、48 h 进样测定,记录峰面积。咖啡酸、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和紫云英苷峰面积的 RSD($n=7$)分别为 0.3%、0.6%、0.6% 和 0.2%,表明方法稳定性良好。

2.3.5 回收率 取同一批次已知含量的 6 份金沙藤对照提取物(批号 191103)约 25 mg,精密称定,分别加入“2.2.1”项制备的对照品溶液 10 mL,按照“2.2.2”项供试品溶液制备方法制成样品溶液,按照“2.1”项色谱条件进样 20 μL ,分别计算咖啡酸、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和紫云英苷的回收率。上述 4 个成分的平均回收率($n=6$)为 100.1%、97.7%、92.5% 和 101.0%,RSD 分别为 0.3%、0.5%、0.3% 和 1.0%,表明方法准确性良好。

2.4 特征图谱分析

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪测定。供试品色谱中呈现与

2.3 方法学考察

2.3.1 灵敏度和线性 分别精密吸取“2.2.1”项制备的对照品溶液 1、5、10、20、30 μL 进样,以峰面积对进样量进行回归计算,结果表明线性关系在相应范围内良好($R^2>0.999$);采用逐级稀释法,信噪比(S/N)大于 3 为检出限, S/N 大于 10 为定量限,结果见表 1。

对照品色谱保留时间相同的色谱峰。为了考察不同批次提取物之间的差异性,分别对 3 批次金沙藤提取物采用所建立的方法进行测定,记录 55 min 色谱图,并对不同批次提取物所得图谱进行分析,选择稳定性较好、吸收强、特征明显的色谱峰为共有峰,共标定了 4 个峰。最后确立的图谱各特征峰峰号、保留时间如图 1 所示,确定峰 1(咖啡酸)、峰 2(异槲皮苷)、峰 3(山柰酚-3-O-芸香糖苷)、峰 4(紫云英苷)为共有峰,并作为特征峰。另外,通过对比咖啡酸、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和紫云英苷对照品的光谱图,在对照提取物中对应峰与对照品的光谱图一致,因此,综合 4 种成分的批间稳定性及现有已知对照品,确定对照提取物中峰 1(咖啡酸)、峰 2(异槲皮苷)、峰 3(山柰酚-3-O-芸香糖苷)、峰 4(紫云英苷)为定性及定量的指标成分。

2.5 样品测定

按所建立的方法对 3 批次对照提取物进行测定,测定结果见表 2。

2.6 水分含量及引湿性考察

参照 2020 年版《中国药典》四部通则 0832 水分测定法和 9103 药物引湿性试验指导原则,进行金沙藤对照提取物水分及引湿性考察。3 批次对照提取物的水分含量分别为 2.3%(批号 191103)、1.4%(批号 191104)、1.8%(批号 190904)。引湿增重分别为 7.8%(批号 191103)、6.5%(批号 191104)、8.3%(批号 190904),引湿性特征描述均为有引湿性。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

本实验以 0.4% 磷酸和乙腈为流动相,分别选用色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm,

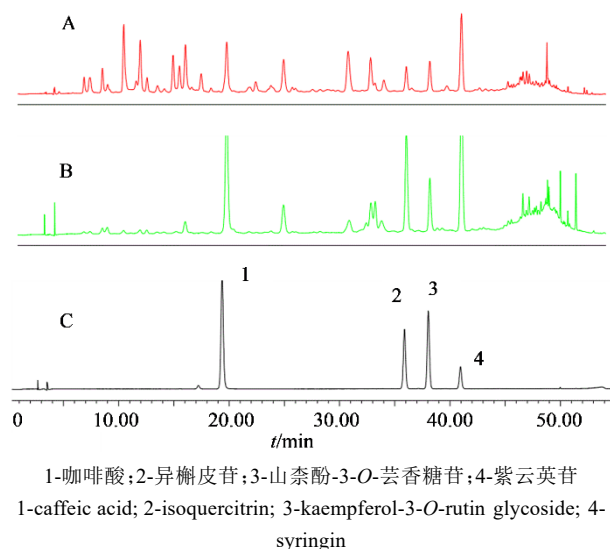


图1 提取物(A)、药材(B)和对照品(C)色谱图

Fig. 1 Chromatogram of extract (A), medicinal material (B) and reference substance (C)

表2 3批次对照提取物测定结果

Table 2 Test results of three batches of control extracts				
批号	咖啡酸/%	异槲皮苷/%	山柰酚-3-O-芸香糖苷/%	紫云英苷/%
101103	0.50	0.16	0.24	0.74
101104	0.64	0.14	0.11	0.66
190904	0.56	0.21	0.36	0.80

5 μm)和 Waters symmetry shieldTM RP18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)进行色谱条件优化,通过优化梯度洗脱程序。两色谱柱分离效果均可达到测定要求,进一步通过分离度及峰形比较,最后选用 Waters symmetry shieldTM RP18 色谱柱进行分析。

3.2 检测波长选择

由于不同波长下,金沙藤对照提取物的成分较为复杂,通过提取不同波长下的色谱图比较,发现检测波长为354 nm左右,测定的指标成分(咖啡酸、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和紫云英苷)干扰较少,且峰形较好,吸收值较为一致。故本实验选定检测波长为354 nm。

3.3 方法耐用性

本研究通过选用不同的色谱柱考察方法的耐用性。分别用ECLIPSE XDB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、Waters symmetry shieldTM RP18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)色谱柱,采用建立的色谱条件分别分析10%甲醇对照提取物(10%甲醇溶解对照提取物)、金沙藤药材、对照提取物及对照品溶液。对比

了不同色谱柱对不同极性跨度下溶剂(甲醇与10%甲醇)溶解对照提取物的差异性,10%甲醇对照提取物供试品制备方法:金沙藤对照提取物约50 mg,精密称定,置20 mL具塞量瓶中,加10%甲醇超声处理30 min,滤过,取续滤液,即得。结果表明,主要目标峰在不同溶剂溶解的供试品中差异较小,不同色谱柱的耐用性较好。

3.4 包装、储藏及应用

本研究对金沙藤对照提取物进行了水分实验及引湿性实验,结合实验结果及国家对对照品储藏相关要求,金沙藤对照提取物应采用全封闭的棕色安剖瓶,由此不仅能够防止储藏过程中潮解吸湿,同时也给具体实验操作使用时带来便利;储藏条件为4 $^{\circ}\text{C}$,避光保存。在装量方面,建议金沙藤对照提取物装量为250 mg,能够满足1次常规分析所需的全部用量。另外,金沙藤对照提取物使用前无需处理,同时应在使用说明书中注明本品具引湿性,应快速完成称样。由于金沙藤对照提取物具引湿性,容易带来测定误差,因此建议本品也仅作为薄层色谱法(TLC)鉴别及HPLC多指标含量测定过程中色谱峰定位用。

3.5 结论

本研究通过对研制的金沙藤对照提取物的多指标含量、特征图谱等质量控制方法进行综合研究,方法学验证结果表明,建立的多指标含量测定方法和特征图谱方法简便、快速、准确性高、重复性好,可用于金沙藤对照提取物的质量控制。本研究同时结合水分和引湿性考察结果,对金沙藤对照提取物包装、储藏及应用给出建议,为金沙藤对照提取物的应用、金沙藤药材及其相关制剂的标准提升奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈沛, 金红宇, 孙磊, 等. 对照提取物在中药整体质量控制中的应用[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 185-195.
Chen P, Jin H Y, Sun L, et al. Application of extractive reference substance in holistic quality control of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(2): 185-195.
- [2] 李耀磊, 刘丽娜, 王莹, 等. 丹参多酚酸对照提取物在丹参药材及注射用丹参多酚酸质量控制中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5446-5450.
Li Y L, Liu L N, Wang Y, et al. Study on application of salvianolic acids reference extract in quality control of

- Salvia miltiorrhiza* and salvianolic acids for injection [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(24): 5446-5450.
- [3] 李耀磊, 刘丽娜, 王莹, 等. 丹参多酚酸对照提取物的质量控制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(10): 136-140.
- Li Y L, Liu L N, Wang Y, et al. Quality control of salvianolic acids reference extract [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(10): 136-140.
- [4] 刘丽娜, 金红宇, 何轶, 等. 银杏叶提取物及其制剂质量监督专项工作中的风险控制 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 1081-1086.
- Liu L N, Jin H Y, He Y, et al. Risk control in the special supervision on *Ginkgo biloba* extract and its preparations [J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(6): 1081-1086.
- [5] 刘丽娜, 何轶, 李耀磊, 等. 银杏叶提取物及其制剂补充检验方法的建立 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(5): 856-862.
- Liu L N, He Y, Li Y L, et al. Supplemental testing methods for *Ginkgo biloba* extract and its preparations [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(5): 856-862.
- [6] The United States Pharmacopieial Convention. United States Pharmacopeia36 [S]. USA: United States Pharmacopeial Convention, 2012.
- [7] The United States Pharmacopieial Convention. United States Pharmacopeia36 [S]. USA: United States Pharmacopeial Convention, 2013: 1531.
- [8] 彭海燕, 钟小清, 吕高荣, 等. 金沙藤药材的名实考证 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 3063-3066.
- Peng H Y, Zhong X Q, Lv G R, et al. Herbological study on *Lygodii Herba* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(21): 3063-3066.
- [9] Zhou Y L, Zhao X, Hua J, et al. Chemical constituents from *Herba Lygodii* and evaluation of antioxidant activity by TLC-DPPH [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28(5): 1392-1396.
- [10] 王采奕, 胡筱希, 闵建国, 等. HPLC法测定金沙藤中绿原酸、咖啡酸和

-香豆酰葡萄糖 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 273-275.

Wang C Y, Hu X X, Min J G, et al. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid, and 6-*O*-*p*-coumaroyl-*D*-glucopyranose in *Lygodii Herba* by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(2): 273-275.

[11] 张道英, 王妙飞, 程庚金生, 等. 赣南产金沙藤中异槲皮苷和紫云英苷的含量测定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(8): 3133-3137.

Zhang D Y, Wang M F, Cheng G, et al. Content determination of isoquercetin and astragalin in *Lygodii Herba* produced in Gannan [J]. Genom Appl Biol, 2017, 36(8): 3133-3137.

[12] 莫凯, 黄瑀莘, 阮公梁, 等. 金沙藤乙酸乙酯提取物对小鼠巨噬细胞炎症因子的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2014, 31(3): 361-363.

Mo K, Huang Y X, Ruan G L, et al. Anti-inflammatory effect of the ethyl acetate extract from *Herba Lygodii* with acetoacetate [J]. J Guangxi Med Univ, 2014, 31(3): 361-363.

[13] 何开仁. 傣药绿谷根金沙藤汤治疗热淋62例疗效观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2013, 19(2): 17-18.

He K R. Clinical observation of lugugen Jinshateng Decoction in treating 62 cases of heat shower [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2013, 19(2): 17-18.

[14] 陈锐. 三金片临床应用解析 [J]. 中国社区医师, 2012, 28(25): 19.

Chen R. Clinical application analysis of Sanjin tablets [J]. Chin Community Dr, 2012, 28(25): 19.

[责任编辑 兰新新]