

# HPLC 同时测定消癌平注射液中 7 种主要成分的含量

谢丽艳<sup>1</sup>, 徐洁<sup>1</sup>, 戴国梁<sup>1</sup>, 居文政<sup>1,2\*</sup>, 谈恒山<sup>3</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210009; 2. 南京中医药大学附属医院临床药理科, 南京 210029;  
3. 南京军区总医院, 南京 210002)

**[摘要]** 目的:测定消癌平注射液中绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、香草酸和 4-香豆素的含量。方法:Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 磷酸, 梯度洗脱, 检测波长 300 nm; 柱温 30 ℃, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>。结果:新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、香草酸和 4-香豆酸的线性范围分别为 0.1~3.2 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 3$ ), 0.025~0.8 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 9$ ), 0.1~3.2 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 8$ ), 0.075~2.4 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 9$ ), 0.037 5~1.2 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 9$ ), 0.02~0.64 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 9$ ), 0.01~0.32 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 9$ ), 加样回收率分别为 99.6% (RSD 0.24%), 100.0% (RSD 0.15%), 98.7% (RSD 1.00%), 99.1% (RSD 1.36%), 96.4% (RSD 1.37%), 98.3% (RSD 1.80%), 97.3% (RSD 1.64%)。结论:该方法简便, 准确, 重复性好, 可为消癌平注射液提供质量控制依据。

**[关键词]** 消癌平注射液; 新绿原酸; 原儿茶醛; 绿原酸; 隐绿原酸; 香草酸; 咖啡酸; 4-香酸

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0086-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013210086

## Simultaneous Determination of Seven Major Compound in Xiaoaiping Injection by HPLC

XIE Li-yan<sup>1</sup>, XU Jie<sup>1</sup>, DAI Guo-liang<sup>1</sup>, JU Wen-zheng<sup>1,2\*</sup>, TAN Heng-shan<sup>3</sup>

**[收稿日期]** 20130726(015)

**[基金项目]** 重大新药创制(2012ZX09303009-002); 江苏省中医药领军人才项目(LJ200906); 江苏高校优势学科建设工程项目 2010

**[第一作者]** 谢丽艳, 硕士研究生, 从事中药学研究, E-mail:xieliyan\_2008@163.com

**[通讯作者]** \*居文政, 主任药师, 博士生导师, 从事中药临床药代动力学研究, Tel:025-86617141-80518, E-mail:wzhu333@163.com

收载的另外 3 种秦艽, 粗茎秦艽在产量方面有明显优势<sup>[7]</sup>, 药效亦较好<sup>[8]</sup>。粗茎秦艽野生抚育不仅解决了秦艽商品药材紧缺的情况, 对满足临床应用和成药生产需求, 保护和合理利用濒危药材秦艽野生资源都具有重要意义。云南西北部兰坪县、维西县等地有大面积的荒地, 轮歇地及高山草地, 是粗茎秦艽生长的适宜之地<sup>[9]</sup>, 在适生区大力发展粗茎秦艽野生抚育种植, 对云南建设“云药之乡”和发展道地药材具有重要的现实意义。

### [参考文献]

- [1] 朱俊儒, 宋平顺, 马潇, 等. 甘肃产秦艽植物资源及商品调查[J]. 中药材, 2000, 23(9):521.
- [2] 聂燕琼, 孙娜, 周洋, 等. 粗茎秦艽资源研究进展[J]. 中国现代中药, 2012, 14(5):37.

- [3] 曹晓燕, 王喆之. 云南粗茎秦艽不同采收期 4 种环烯醚萜苷类成分的测定[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4):623.
- [4] 曾育麟. 云南的秦艽[J]. 药学通报, 1959, 5(7):340.
- [5] 陈士林, 贾敏如, 王瑀, 等. 川贝母野生抚育之群落生态研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(5):398.
- [6] 陈士林. 道地药材与生态型的相关性[J]. 中草药, 1988(8):40.
- [7] 曹晓燕. 秦艽种质资源研究[D]. 西安:陕西师范大学, 2010.
- [8] 楼之岑. 常用中药材品种整理和质量研究. 北方编写组第 3 册[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2003.
- [9] 赵仁. 秦艽栽培技术[M]. 昆明:云南科技出版社, 2009.

[责任编辑 顾雪竹]

- (1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210009, China;
2. Department of Clinical Pharmacology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
3. General Hospital of Armed Forces of Nanjing, Nanjing 210002, China.)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for the simultaneous determination of seven major compound in Xiaoaiping injection. **Method:** The analytical column was Kromasil 100-5C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid, gradient elution. The flow was 0.8 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 300 nm. The column temperature was 30 °C. **Result:** The linear ranges of seven compounds were as follows: 0.1-3.2 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 3) for neochlorogenic acid, 0.025-0.8 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 9) for protocatechuic aldehyde, 0.1-3.2 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 8) for chlorogenic acid, 0.075-2.4 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 9) for 4-dicaffeoylquinic acid, 0.037 5-1.2 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 9) for vanillic acid, 0.02-0.64 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 9) for caffeic acid, 0.01-0.32 mg · L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 9) for 4-coumararate. The average recoveries were 99.6% (RSD 0.24%), 100.0% (RSD 0.15%), 98.7% (RSD 1.00%), 99.1% (RSD 1.36%), 96.4% (RSD 1.37%), 98.3% (RSD 1.80%), 97.3% (RSD 1.64%) respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and available for the quality control of Xiaoaiping Injection.

**[Key words]** Xiaoaiping injection; neochlorogenic acid; protocatechuic aldehyde; chlorogenic acid; 4-dicaffeoylquinic acid; vanillic acid; caffeic acid; 4-coumararate

消癌平注射液由萝藦科植物通关藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎经水提醇沉制得的制剂,具有清热解毒、化痰软坚的功效<sup>[1]</sup>。消癌平注射液中主要含有甾体皂苷类、酚酸类及多糖等化合物,其中甾体皂苷为主要抗癌活性成分<sup>[4]</sup>。该注射液临床上主要用于治疗食管癌、胃癌、肺癌、肝癌等多种恶性肿瘤<sup>[5-6]</sup>,并可配合放疗、化疗的辅助治疗。有关文献<sup>[7-9]</sup>中报道的HPLC法测定的是消癌平注射液中绿原酸、咖啡酸成分的含量,且未发现同时测定该注射液中的7种成分。为更有效控制消癌平注射液质量标准提供实验依据。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪,配有G1311A四元泵、G1313A自动进样器、G1316A柱温箱、G1315B(DAD)检测器及Chemstation(A.10.02)工作站。

新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸对照品(成都曼思特生物科技有限公司,纯度98%),原儿茶醛、咖啡酸对照品(中国药品生物制品检定所,纯度98%),香草酸、4-香豆酸对照品(南京圣和药业有限公司,纯度98%),消癌平注射液(南京圣和药业有限公司,20 mL/支,批号201004165,201011101,201011161,201011171),甲醇、乙腈均为色谱纯,乙醇为分析纯,超纯水由Millipore超纯水系统制备。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适应性试验

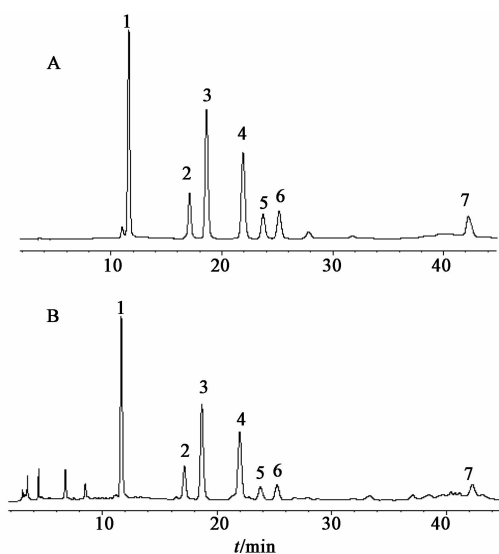
**2.1.1 色谱条件** Kromasil 100-5C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温30 °C,检测波长300 nm,流速0.8 mL · min<sup>-1</sup>,进样量10 μL,流动相A-乙腈,B-0.2%磷酸,梯度洗脱(0~8 min,8% A,8~30 min,8%~10% A,30~35 min,10%~15% A,35~40 min,15%~12% A,40~45 min,12%~8% A)。

**2.1.2 系统适应性试验** 在上述色谱条件下,绿原酸,咖啡酸,新绿原酸,隐绿原酸,香草酸,4-香豆酸和原儿茶醛的理论塔板数不低于3 000,与其他峰分离度均>1.5,对照品及供试品的色谱图见图1。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 供试品溶液的配制** 精密移取1 mL消癌平注射液于50 mL量瓶中,50%甲醇定容至刻度,摇匀,12 000 r · min<sup>-1</sup>离心10 min,上清液即为供试品溶液。

**2.2.2 对照品储备液的配制** 精密称取新绿原酸,原儿茶醛,绿原酸,隐绿原酸,香草酸,咖啡酸,4-香豆酸对照品适量,分别置于10 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得新绿原酸(1.025 g · L<sup>-1</sup>),原儿茶醛(1.080 g · mL<sup>-1</sup>),绿原酸(0.514 g · L<sup>-1</sup>),隐绿原酸(1.130 g · L<sup>-1</sup>),香草酸(0.997 g · L<sup>-1</sup>),咖啡酸(1.274 g · L<sup>-1</sup>)和4-香豆酸(0.982 g · L<sup>-1</sup>)的混合对照品储备液。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 新绿原酸; 2. 原儿茶醛;  
3. 绿原酸; 4. 隐绿原酸; 5. 香草酸; 6. 咖啡酸; 7. 4-香豆酸

图 1 消癌平注射液 HPLC

**2.3 线性关系考察** 精密吸取 2.2.2 项下的混合对照品溶液适量, 倍比稀释成 6 个不同浓度的混合对照品溶液摇匀, 吸取上述混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪进行测定, 按 2.1 方法进行分析。分别以峰面积积分值  $A$  为纵坐标, 进样量  $C$  为横坐标, 得标准曲线回归方程及线性范围, 结果见表 1。

**2.4 精密度试验** 分别取新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、香草酸、咖啡酸和 4-香豆酸混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 在以上色谱条件下, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、香草酸、咖啡酸和 4-香豆酸的 RSD 分别为 2.58%, 2.78%, 1.84%, 0.93%, 1.81%, 1.62% 和 1.60%。

表 1 7 种成分线性关系考察

化合物	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}$	$r$
新绿原酸	$A = 25.5C - 54.8$	0.1 ~ 3.2	0.999 3
原儿茶醛	$A = 44C + 1.99$	0.025 ~ 0.8	0.999 9
绿原酸	$A = 34.8C - 28.3$	0.1 ~ 3.2	0.999 8
隐绿原酸	$A = 28.7C - 2.3$	0.075 ~ 2.4	0.999 9
香草酸	$A = 20C + 0.359$	0.0375 ~ 1.2	0.999 9
咖啡酸	$A = 54.8C - 0.174$	0.02 ~ 0.64	0.999 9
4-香豆酸	$A = 100C + 17.6$	0.01 ~ 0.32	0.999 9

**2.5 重复性试验** 取同一批 (批号 201004161) 样品, 按 2.2.1 项下方法制备 6 份供试品溶液, 分别测定。结果新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、香

草酸、咖啡酸和 4-香豆酸的平均含量分别为 42.36, 7.38, 27.39, 27.10, 11.39, 3.93, 2.24  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , RSD 分别为 0.53%, 1.99%, 2.18%, 0.96%, 3.91%, 2.54%。

**2.6 稳定性试验** 取上述供试品溶液, 自配制后 0, 2, 6, 12, 24, 48 h 按 2.1 下进行分析测定。结果新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、香草酸、咖啡酸和 4-香豆酸峰面积积分值的 RSD 分别为 0.78%, 2.21%, 1.62%, 0.78%, 2.40%, 2.64% 和 2.14%, 说明样品在 48 h 内稳定。

**2.7 加样回收率试验** 取已知含量的消癌平注射液 0.5 mL, 分别加入适量的新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、香草酸、咖啡酸和 4-香豆酸对照品储备液, 按 2.2.2 项方法制备供试品溶液, 平行操作 6 份, HPLC 检测各成分的含量, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 消癌平注射液中 7 种成分加样回收率试验

成分	No.	样品量 / $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
新绿原酸	1	48.62	38.40	86.97	99.9	99.6	0.24
	2	48.62	38.40	86.75	99.3		
	3	48.62	48.62	97.07	99.7		
	4	48.62	48.62	97.11	99.7		
	5	48.62	58.34	106.65	99.5		
	6	48.62	58.34	106.55	99.3		
原儿茶醛	1	7.42	5.94	13.35	99.8	100.0	0.15
	2	7.42	5.94	13.37	100.2		
	3	7.42	7.42	14.85	100.1		
	4	7.42	7.42	14.83	99.9		
	5	7.42	8.90	16.31	99.9		
	6	7.42	8.90	16.33	100.1		
绿原酸	1	26.90	21.52	48.02	98.1	98.7	1.00
	2	26.90	21.52	47.91	97.6		
	3	26.90	26.90	53.28	98.1		
	4	26.90	26.90	53.47	98.8		
	5	26.90	32.28	59.16	99.9		
	6	26.90	32.28	59.14	99.9		
隐绿原酸	1	27.88	22.30	50.13	99.8	99.1	1.36
	2	27.88	22.30	50.10	99.6		
	3	27.88	27.88	54.75	96.4		
	4	27.88	27.88	55.72	99.9		

续表2

成分	No.	样品量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
香草酸	5	27.88	33.46	61.23	99.7	96.4	1.37
	6	27.88	33.46	61.09	99.3		
	1	8.74	6.99	15.39	95.1		
	2	8.74	6.99	15.51	96.8		
	3	8.74	8.74	17.11	95.8		
	4	8.74	8.74	17.29	97.8		
咖啡酸	5	8.74	10.49	19.02	98.0	98.3	1.80
	6	8.74	10.49	18.71	95.1		
	1	4.12	3.30	7.45	101.0		
	2	4.12	3.30	7.32	97.1		
	3	4.12	4.12	8.14	97.6		
	4	4.12	4.12	8.21	99.3		
4-香豆酸	5	4.12	4.94	9.01	98.9	97.3	1.64
	6	4.12	4.94	8.87	96.1		
	1	2.24	1.79	4.01	98.8		
	2	2.24	1.79	3.97	96.5		
	3	2.24	2.24	4.38	95.5		
	4	2.24	2.24	4.41	96.9		
	5	2.24	2.69	4.83	96.4		
	6	2.24	2.69	4.92	99.7		

**2.8 样品测定** 4个批次消癌平注射液,按2.2.1项下方法制备供试品,精密吸取新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、香草酸、咖啡酸和4-香豆酸供试品溶液10 μL进样,测定峰面积,外标法计算含量,结果见表3。

### 3 讨论

酚酸类成分是消癌平注射液中的主要化学成分,因此,本实验选择测定文献报道中消癌平注射液含有的7个主要化合物的含量做为质量控制的指标。

**3.1 流动相的选择** 根据酚酸类成分的化学性质,比较了不同比例的流动相在相同波长处的出峰时间、分离度、峰型均不同。有机相比较了乙腈和甲醇,还对酸的种类和含量进行了比较,结果显示选择乙腈-0.2%磷酸梯度洗脱,分离效果最理想。

**3.2 检测波长的选择** 采用DAD进行光谱扫描,酚酸类成分最大吸收波长在(320±10) nm处,而香草酸的最大吸收波长在250 nm处,根据注射液中各峰的出峰情况,结果表明了300 nm波长为7种成分的最佳测量波长。

表3 4个批次消癌平注射液中7种酚酸类化合物含量

mg·L<sup>-1</sup>

批次	新绿原酸	原儿茶醛	绿原酸	隐绿原酸	香草酸	咖啡酸	4-香豆酸
201011101	94.47	14.32	59.17	53.80	18.85	7.68	4.45
201011161	99.53	14.53	57.84	53.67	23.93	10.50	4.51
201011171	89.31	14.92	60.28	52.46	19.05	7.90	4.57
201012051	97.24	14.83	53.79	55.76	17.48	8.23	4.47

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005:315.
- [2] 成冠蓝,孔令义,张仓. 通关藤化学成分和药理作用研究进展[J]. 药学与临床研究, 2009,17(2):135.
- [3] Hu Y J, Shen X L, Lu H L, et al. Tenacigenin B derivatives reverse p-glycoprotein-mediated multidrug resistance in HepG2/Dox cells[J]. J Nat Prod, 2008, 71(6):1049.
- [4] 钱军,华海涛,秦叔逵. 通关藤制剂抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009,34(1):11.
- [5] 钱军. 通关藤注射液联合铂类药物治疗原发性肝癌

的实验研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2010.

- [6] Han S Y, Zhao M B, Zhuang G B, et al. Marsdenia tenacissima extract restored gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cells [J]. Lung Cancer, 2011, 16:3870.
- [7] 王青. HPLC法测定消癌平注射液中绿原酸的含量[J]. 中医药导报, 2006,12(3):60.
- [8] 施能胜,石涛. 基于HPLC指纹图谱的消癌平注射液的稳定性[J]. 江苏医药, 2010,36(15):1814.
- [9] 刘峰群,曹红,靳守东,等. 通关藤注射液酚酸类成分指纹图谱的HPLC测定[J]. 中成药, 2003, 25(3):175.

[责任编辑 顾雪竹]