

HPLC 测定不同产地金银花中绿原酸和木犀草苷

辛华¹, 丰杰², 程若敏¹, 辛宁^{1*}

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 中国科学院理化技术研究所, 北京 100190)

摘要 目的:建立高效液相转换波长法,同时测定金银花中绿原酸和木犀草苷的含量。方法:采用 Hypersil gold C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),乙腈-0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱;流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温 25℃,检测波长 327 nm, 350 nm。结果:绿原酸和木犀草苷的质量浓度分别在 0.06×10³~0.42×10³ mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$) 和 0.716~5.728 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 95$) 与峰面积呈良好的线性关系($n=5$),平均回收率($n=6$)分别为 101.15% 和 99.80%。结论:该方法同时测定金银花中的绿原酸和木犀草苷的含量,结果准确度高,精密度好,可为金银花药材的质量控制研究提供一种可靠的参考方法。

关键词 金银花;绿原酸;木犀草苷;转换波长法

中图分类号 R283.6 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9903(2011)02-0060-04

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Galuteolin in Honeysuckle

XIN Hua¹, FENG Jie², CHENG Ruo-min¹, XIN Ning^{1*}

(1. Guang Xi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530001, China;

2. Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a wavelength conversion method for determination of chlorogenic acid and galuteolin in honeysuckle simultaneously. **Method:** The separation was performed on a Hypersil gold C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). Acetonitrile-0.05% H₃PO₄ was used as the mobile phase with gradient elution. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. The detection wavelength was at 327 nm and 350 nm. **Result:** The linear range ($n=5$) was 0.06×10³-0.42×10³ mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$) and 0.716-5.728 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 95$) respectively. The average recoveries ($n=6$) of chlorogenic acid and galuteolin were 101.15% and 99.80% respectively. **Conclusion:** This method is sensitive, reliable and can be applied to determine chlorogenic acid and galuteolin in the raw material of honeysuckle.

[Key words] honeysuckle flower; chlorogenic acid; galuteolin; wavelength conversion method

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica*

Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花,性味甘寒,归肺、心、胃经,具有清热解毒、凉散风热的功能,用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热诸病^[1]。

有机酸类和黄酮类化合物为金银花药材的主要有效成分^[2]。本文以绿原酸和木犀草苷作为指标性成分,采用高效液相转换波长法同时测定绿原酸和木犀草苷含量,为金银花药材提供了更为简单合理的质控方法。

1 材料

1.1 仪器 安捷伦 Agilent1100 高效液相色谱仪,

收稿日期] 20100813(004)

基金项目] 中药资源保护及可持续利用共性关键技术研究(桂科攻 0815005-2-5);广西山银花生长环境、生长特征与药材质量相关性研究(gzzc0907)

第一作者] 辛华,讲师,硕士研究生,研究方向:药物分析, Tel:0771-3111585, E-mail: iamhorse@126.com

通讯作者] * 辛宁,教授,研究生 研究方向:中药商品质量与标准研究, Tel: 0771-3101908, E-mail: xn@gxtcmu.edu.cn

含在线真空脱气机器(G-4322A),高压四元泵(G-1311A),标准自动进样器(G-4313A),智能化柱温箱(G-4316A),可变波长检测器(G-4313A),二极管阵列检测器,Agilent1100 series 色谱工作站;CG-46W 高速微量离心机;SB3200T 超声波清洗仪;Millipore Simplicity-185 超纯水仪;BP211D 电子天平分析天平。

1.2 试药 乙腈为色谱纯,乙醇和磷酸为分析纯,水为高纯水。绿原酸对照品(批号 110753-200413),木犀草苷对照品(批号 111720-200602)由中国药品生物制品检定所提供。金银花药材为忍冬科忍冬属植物忍冬 *L. japonica* 的干燥花蕾或带初开的花,样品经广西中医药研究所方鼎教授鉴定。实验所用各产地金银花药材见表 1。

表 1 不同产地的金银花药材

No.	来源
01	河南密县
02	河南封丘
03	河南安阳
04	山东平邑郑城
05	山东平邑东阳
06	山东日照
07	甘肃
08	湖南
09	安徽兴谿
10	安徽亳州
11	广州

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil gold C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A(乙腈)-B(0.05% 磷酸水溶液);流速 0.5 mL·min⁻¹;检测波长 0 ~ 20 min 为 327 nm,20 ~ 43 min 为 350 nm;柱温 25 ℃;进样量 5 μL。梯度洗脱:0 ~ 21 min(10% ~ 17% A),21 ~ 33 min(17% ~ 23% A),33 ~ 43 min(23% ~ 26% A);理论板数不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 6 mg,用 70% 乙醇定容至 2 mL,制备成 3 g·L⁻¹ 对照品溶液;另精密称取木犀草苷对照品 5.73 mg,用 70% 乙醇定容至 100 mL,制备成 0.057 3 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取过四号筛金银花药材粉末 0.1 g,置锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇

25 mL,称定质量,超声 30 min,放冷后补足质量,过滤,取续滤液置微型离心管中以 10 000 r·min⁻¹ 的速度离心 10 min,取上清液作为供试品溶液。

2.4 线形关系考察 分别精密吸取上述绿原酸对照品溶液(3 g·L⁻¹)0.1,0.2,0.3,0.5,0.7 mL;木犀草苷对照品溶液(0.057 3 g·L⁻¹)62.5,125,250,375,750 μL 置 5 mL 量瓶中,加入 70% 乙醇定容至刻度,摇匀,制成 5 个不同浓度的标准溶液,分别进样 5 μL。以对照品标准溶液进样量(绿原酸 μg,木犀草苷 ng)为横坐标(X),其峰面积为纵坐标(Y)线性回归,绿原酸和木犀草苷的回归方程分别为 $Y = 5\,659.5X - 160.82$, $r = 0.999\,9$; $Y = 5.276\,3X - 0.214\,9$, $r = 0.999\,9$ 。表明绿原酸在 0.3 ~ 2.1 μg,木犀草苷在 3.58 ~ 28.64 ng 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取同一批次(7 号甘肃产)金银花供试品溶液,连续进样 6 次,结果绿原酸和木犀草苷的 RSD 分别为 0.36%,0.95%,精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一批次(7 号甘肃产)金银花供试品溶液,分别于 0,3,6,9,12,18,24 h 进行测定,结果绿原酸和木犀草苷的 RSD 分别为 0.41%,0.87%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批次(7 号甘肃产)金银花药材 6 份,每份 0.1 g,精密称定,按供试品溶液的制备方法制备,照高效液相色谱条件测定。结果绿原酸和木犀草苷的 RSD 分别为 0.67%,1.08%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取同一批次(7 号甘肃产)金银花药材 6 份,每份 0.05 g,精密称定,分别精密加入与药材相当量的绿原酸对照品溶液(1.496 g·L⁻¹)1 mL 和木犀草苷对照品溶液(0.031 2 g·L⁻¹)1 mL,按上述供试品溶液制备方法制备,并按上述色谱条件进行测定,分别计算绿原酸和木犀草苷的加样回收率,结果见表 2,3。

表 2 金银花中绿原酸加样回收率

No.	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	1.534	1.496	3.053	101.54	101.21	0.51
2	1.528	1.496	3.034	100.67		
3	1.531	1.496	3.038	100.74		
4	1.537	1.496	3.059	101.74		
5	1.540	1.496	3.062	101.74		
6	1.534	1.496	3.042	100.80		

表 3 金银花中木犀草苷加样回收率

No.	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.030 6	0.031 2	0.061 5	99.04	99.04	2.31
2	0.030 5	0.031 2	0.061 6	99.68		
3	0.030 6	0.031 2	0.061 0	97.44		
4	0.030 7	0.031 2	0.060 6	95.83		
5	0.030 8	0.031 2	0.062 8	102.56		
6	0.030 8	0.031 2	0.061 9	99.68		

2.9 不同产地金银花样品中绿原酸和木犀草苷的含量测定 取不同产地的金银花药材干燥粉末约 0.1 g,精密称定,按供试品制备方法制备,按上述色谱条件注入液相色谱仪,测定峰面积,计算绿原酸和木犀草苷含量。见表 4。对照品及样品图见图 1。

表 4 不同产地金银花样品中绿原酸和木犀草苷 ($n=3$)

No.	来源	绿原酸 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	木犀草苷 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
01	河南密县	34.5	0.709
02	河南封丘	28.4	0.818
03	河南安阳	26.6	0.915
04	山东平邑郑城	30.6	0.515
05	山东平邑东阳	35.6	0.847
06	山东日照	26.8	0.709
07	甘肃	30.7	0.609
08	湖南	25.5	0.544
09	安徽兴谿	34.4	0.711
10	安徽亳州	30.1	0.699
11	广州	20.1	0.502

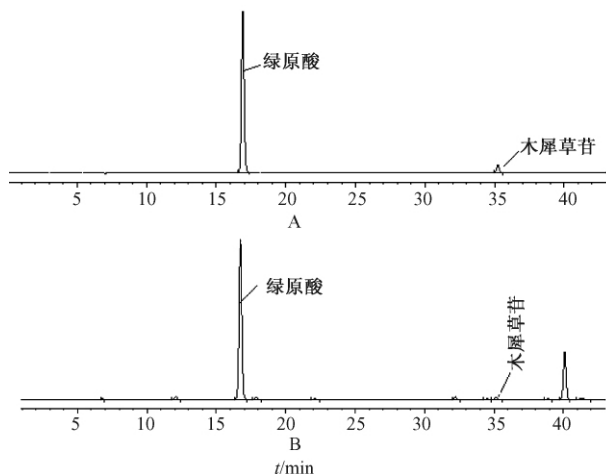


图 1 对照品图(A)及金银花样品图(B)的 HPLC

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择 取金银花粉末(7号甘肃产)0.1 g,精密称定,分别精密加入 50% 甲醇 25 mL, 70% 甲醇 25 mL, 50% 乙醇 25 mL, 70% 乙醇 25 mL 超声提取 30 min。结果以 70% 甲醇和 70% 乙醇作溶剂提取出的绿原酸和木犀草苷含量高,考虑到两者提取的量几乎一致,而前者成本高,毒性大,所以选择 70% 乙醇作为提取溶剂。

3.2 提取方法选择 取金银花粉末(7号甘肃产)0.1 g,精密称定,精密加入 70% 乙醇 25 mL,采用冷浸提取、回流提取和超声提取 3 种方法进行对比试验,结果表明相同提取时间,超声和回流提取的量多,而超声操作简单,避免了热不稳定物质的破坏,故选择超声提取。

3.3 提取时间的选择 取金银花粉末(7号甘肃产)0.1 g,精密称定,精密加入 70% 乙醇 25 mL,分别超声处理 15, 30, 45 min。结果 30 min 即可将 0.1 g 金银花中的绿原酸和木犀草苷提取完全。

3.4 分析方法的确定 最终选择用过 65 目筛的金银花中粉,直接加入 70% 乙醇超声提取 30 min,滤过后取续滤液,置微型离心管中以 $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 10 min,取上清液备用。

4 小结

目前,绿原酸和木犀草苷已作为金银花药材含量测定的指标性成分收入 2010 年版《中国药典》,金银花中绿原酸、异绿原酸和部分黄酮类成分的含量测定方法,文献^[3-5]已有报道。但尚未见采用高效液相转换波长法同时测定绿原酸和木犀草苷的含量的相关文献。

绿原酸在 350 nm 处吸收值是 327 nm 吸收值的一半,木犀草苷在 327 nm 处吸收值比 350 nm 处低 20% 左右,所以我们采用转换波长法。本文建立了同时测定金银花药材中绿原酸和木犀草苷的 HPLC 测定方法。该方法充分考虑了两个不同含量测定指标的最大吸收波长差异,结合了高效液相检测器的转换波长功能,采用了转换波长法,保证了绿原酸和木犀草苷都能在各自己最大吸收波长下检测。

实验中选择在 20 min 从波长 327 nm 转换波长为 350 nm,能保证了绿原酸和木犀草苷都能在各自己最大吸收波长区域有稳定的紫外吸收,在 20 min 转换波长不影响两者的紫外检测。

通过本试验研究,初步表明了以绿原酸为指标

计算,5 号山东平邑东阳产的金银花含量最高,其次是河南密县(1 号)和安徽兴谯(9 号)产的金银花。而以木犀草苷为指标计算,3 号河南安阳产的金银花含量最高,其次是 5 号山东平邑东阳产的金银花。因此可初步确定山东平邑东阳产的金银花质佳,可以以此地区为 GAP 考察目标,分析其生长环境,以规范种植金银花提高其质量。

参考文献]

[1] 中国药典.一部 [S]. 2010:205.

[2] 邢俊波,李会军,李萍,等.忍冬花蕾化学成分研究 [J]. 中国新药杂志, 2002,11(11):856.

[3] Huang X, Li S L, Li P, et al. Simultaneous determination of eight main flavonoids in Flos Ionicerae by high performance liquid chromatography [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2005,40 (3):285.

[4] 黄雄,李萍,张重义,等. HPLC 同时分析金银花中绿原酸和黄酮类成分的方法处理及应用 [J]. 中国药学杂志,2005,40(10):781.

[5] 林丽美,刘菊妍,王燕,等. RP-HPLC 法测定金银花中绿原酸的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(9):22.

责任编辑 顾雪竹]