

HPLC 法测定忍冬藤中绿原酸及咖啡酸含量

杨 刚 杜守颖 吴 清 郝 博 洪燕龙(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘要 本文以绿原酸、咖啡酸为含量测定指标,采用 HPLC 法测定了不同产地忍冬藤中绿原酸、咖啡酸含量。色谱柱为 Diamonsil™C₁₈, 4.6mm×250mm, 10μm 柱,流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(11:89),检测波长为 324nm。线性范围:绿原酸为 0.08~0.40μg, r=0.9995, 咖啡酸为 0.03~0.15μg, r=0.9996;加样回收率:绿原酸为 100.79%, RSD=2.17%, 咖啡酸为 98.05%, RSD=2.44%。本法快速、简便,重现性好,可用于控制忍冬藤的内在质量。

关键词 HPLC 法;忍冬藤;绿原酸;咖啡酸

The Determination of the Content of Chlorogenic Acid and Caffeic Acid in Bine of Lonicera Japonica Thunb. by HPLC

Yang Gang, Du Shouying, Wu Qing, Hao Bo, Hong Yanlong (Beijing University of TCM, Beijing, 100102)

Abstract An HPLC method for determination of the content of chlorogenic acid and caffeic acid in bines of Lonicera Japonica Thunb. from different sources was established using Diamonsil™C₁₈ (4.6mm×250mm, 10μm) column. The mobile phase was HCN-0.2%H₃PO₄ (11:89) and the detection wavelength was 324nm. The calibration curve of chlorogenic acid was linear in the range of 0.08~0.40μg, r=0.9995. The mean recovery of chlorogenic acid was 100.79%, RSD%=1.4%. The calibration curve of caffeic acid was linear in the range of 0.03~0.15μg, r=0.9996. The mean recovery of caffeic acid was 98.05%, RSD%=2.44%. This method was found to be convenient, quick with good reproducibility. It can be used as a method of quality control.

Key words HPLC method; bines of Lonicera Japonica Thunb.; chlorogenic acid; caffeic acid

中药忍冬藤为忍冬科植物忍冬 *Lonicera Japonica* Thunb. 的干燥茎枝,收载于《中国药典》2000 年版一部,具有清热解毒,疏风通络的作用,用于瘟病发热,热毒血痢,痈肿疮疡,风湿热痹,关节红肿热痛等症^[1]。忍冬藤含有绿原酸、异绿原酸、咖啡酸等有机酸类化合物,常春藤皂苷元-3-O-α-L-吡喃阿拉伯糖苷等皂苷类化合物,以及忍冬素、木犀草素等黄酮类化合物。据文献报道,绿原酸、咖啡酸为其主要活性成分,具有显著的抗菌、抗病毒作用^[2,3]。本文以绿原酸、咖啡酸为含量测定指标,对产于我国山东、河南、河北等地的忍冬藤中绿原酸、咖啡酸进行了含量测定,为忍冬藤内在质量控制提供了科学依据。

一、实验部分

(一)仪器与试剂

HP-1100 高效液相色谱仪(美国)、VWD 紫外检测(美国);

忍冬藤由北京双鹤高科天然药物有限责任公司及长春大政国际经贸集团制药有限责任公司提供;绿原酸、咖啡酸(供含量测定用)购自中国药品生物

制品检定所,水为双重蒸馏水,乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

(二)测定条件

色谱条件及系统适用性 色谱柱:Diamonsil™C₁₈, 4.6mm×250mm, 10μm 柱;流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液(11:89);流速:1ml/min;检测波长:324nm;柱温:室温。理论板数以绿原酸峰计不低于 1000,以咖啡峰计不低于 3000。

(三)测定方法

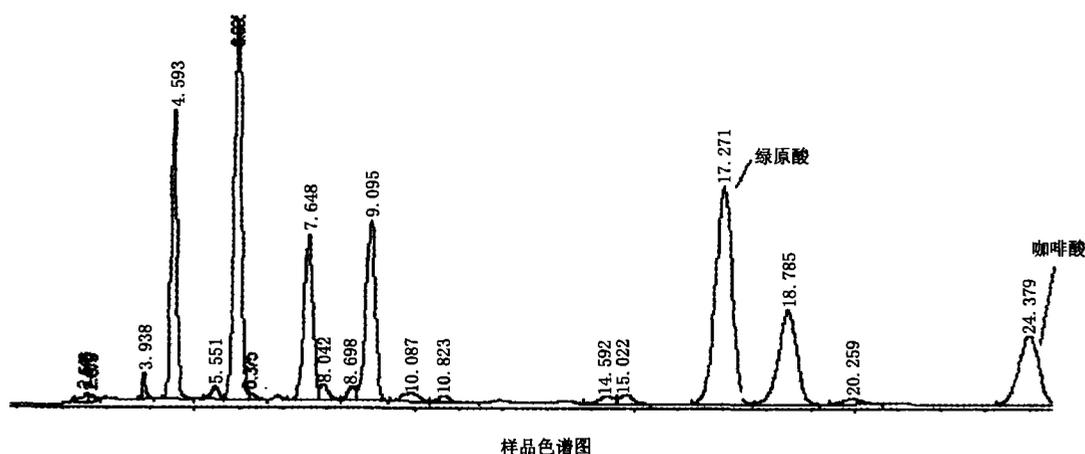
1. 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量,置棕色瓶中,加甲醇制成每 1ml 含 80μg 的溶液,即得。另精密称取咖啡酸对照品适量,加甲醇制成每 1ml 含 15μg 的溶液,即得。

2. 样品供试液的制备 取忍冬藤粉末(过 40 目筛)1g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加 50%乙醇 20ml,称定重量,超声处理 30 分钟,放冷,再称定重量,用 50%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

3. 精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 6μl,注

入液相色谱仪,测定,即得。见下图。

二、测定结果



样品色谱图



绿原酸标准品色谱图



咖啡酸标准品色谱图

(一) 样品提取方法的考察

1. 样品提取溶剂的考察 取忍冬藤粉末(产地:河北,过 40 目筛)1g 共四份,分别以 50%乙醇、50%甲醇为溶剂按上述方法制备供试品溶液,进样,测定。测定结果见表 1。

表 1 提取溶剂的确定

提取溶剂	称样量 (g)	绿原酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)	咖啡酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)
50%乙醇	0.9859	0.74	0.75	0.15	0.15
	0.9990	0.75			
50%甲醇	0.9606	0.75	0.74	0.15	0.15
	0.9937	0.72			

由表可见以乙醇或是甲醇作为提取溶剂所得绿原酸或咖啡酸含量基本一致,但考虑到,乙醇廉价易得且无毒,故以乙醇为提取溶剂。

2. 提取溶剂浓度的考察 取忍冬藤粉末 1g 共 6 份,分别以 50%乙醇、75%乙醇、无水乙醇为溶剂按上述方法制备供试品溶液、进样、测定。测定结果

见表 2。

表 2 提取溶剂浓度的考察

提取溶剂	称样量 (g)	绿原酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)	咖啡酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)
50%乙醇	0.9561	0.84	0.83	0.17	0.17
	0.9858	0.81			
75%乙醇	0.9701	0.77	0.77	0.16	0.17
	0.9524	0.78			
无水乙醇	0.9453	0.18	0.17	0.10	0.10
	0.9397	0.17			

由表可见,乙醇浓度为 50%时,绿原酸、咖啡酸提出量最高,故选择 50%乙醇为提取溶剂。

表 3 是否加入甲酸的确定

提取溶剂	称样量 (g)	绿原酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)	咖啡酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)
50%乙醇	0.9876	0.82	0.83	0.17	0.17
	1.0026	0.84			
乙醇加酸	0.9954	0.84	0.83	0.18	0.17
	1.0156	0.82			

3. 提取溶剂中加入甲酸与否的考察 取忍冬藤粉末 1g 共四份, 分别以 50% 乙醇、甲酸-乙醇-水 (5:50:45) 为溶剂按上述方法制备供试品溶液, 进样, 测定。测定结果见表 3。

由表可见, 加入甲醇与否对绿原酸及咖啡酸的提取均无显著影响, 故提取溶剂选择不加入甲酸。

4. 不同提取方法的考察 取忍冬藤粉末 1g 共 6 份, 加 50% 乙醇分别进行超声处理 30 分钟, 回流提取 2h, 索氏提取至浸出液无色, 进行测定, 结果见表 4。

表 4 提取方法的确定

提取方法	称样量 (g)	绿原酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)	咖啡酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)
超声处理	1.0320	0.87	0.87	0.18	0.18
	1.0215	0.88			
回流提取	1.0579	0.77	0.76	0.18	0.18
	1.0924	0.75			
索氏提取	0.9565	0.72	0.72	0.12	0.12
	0.9258	0.73			

由表可见, 以超声处理时绿原酸、咖啡酸含量最高, 故选择提取方法为超声处理。

5. 超声处理时间的考察 取忍冬藤粉末 1g 共 8 份, 加 50% 乙醇分别超声处理 15、30、45、60 分钟, 进行测定。测定结果见表 5。

表 5 超声处理时间的确定

提取方法	称样量 (g)	绿原酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)	咖啡酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)
15 分钟	0.9733	0.85	0.84	0.18	0.18
	0.9896	0.84			
30 分钟	1.0320	0.87	0.87	0.18	0.18
	1.0215	0.88			
45 分钟	0.9853	0.87	0.87	0.18	0.18
	0.9661	0.88			
60 分钟	0.9416	0.84	0.83	0.17	0.17
	0.9837	0.82			

由表可见超声处理 30 分钟后绿原酸、咖啡酸含量就不再增加, 故确定超声处理的时间为 30 分钟。

(二) 线性关系的考察

绿原酸线性关系考察 精密吸取绿原酸对照品溶液 (绿原酸含量为 80 μ g/ml) 1、2、3、4、5 μ l 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以绿原酸量 (μ g) 为横坐标, 以绿原酸峰面积 (mAU * S) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为 $Y = -23.748 + 4994.1X$, 相关系数 $r = 0.9995$, 结果表明绿原酸在 0.08~0.40 μ g 范围内线性关系良好。

咖啡酸线性关系考察 精密吸取咖啡酸对照品

溶液 (咖啡酸含量为 15 μ g/ml) 2、4、6、8、10 μ l 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以对照品咖啡酸量 (μ g) 为横坐标, 以咖啡酸峰面积 (mAU * S) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为 $Y = -7.4905 + 8494.1X$, 相关系数 $r = 0.9996$, 结果表明咖啡酸在 0.03~0.15 μ g 范围内线性关系良好。

(三) 精密度试验

分别精密吸取同一浓度的绿原酸对照品溶液 3 μ l、咖啡酸对照品溶液 6 μ l, 各 5 份注入液相色谱仪测定峰面积。结果为: 绿原酸 $\bar{X} = 1126.5$ RSD = 1.56%; 咖啡酸 $\bar{X} = 732.3$ RSD = 1.16%。

(四) 重现性实验

取忍冬藤粉末 (产地: 河北, 过 40 目筛) 1g 共 5 份, 按上述方法制备供试品溶液, 分别精密吸取 6 μ l 进样、测定。结果见表 6。

表 6 绿原酸、咖啡酸重现性实验

实验次数	绿原酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)	RSD% (n=5)	咖啡酸含量 (mg/g)	\bar{X} (mg/g)	RSD% (n=5)
1	0.905	0.910	1.36	0.192	0.192	2.24
2	0.900			0.186		
3	0.927			0.198		
4	0.898			0.193		
5	0.919			0.192		

实验结果表明本方法重现性良好。

(五) 稳定性实验

取忍冬藤粉末 1g, 按上述方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8 小时精密吸取 6 μ l 进样、测定一次。结果见表 7。

表 7 绿原酸、咖啡酸稳定性实验

时间 (h)	绿原酸峰面积 (mAU * s)	\bar{X} (mAU * s)	RSD% (n=5)	咖啡酸峰面积 (mAU * s)	\bar{X} (mAU * s)	RSD% (n=5)
0	1260.5	1289.4	1.41	456.6	464.2	1.15
2	1285.2			463.8		
4	1292.3			462.0		
6	1300.0			468.1		
8	1309.2			470.5		

实验结果表明供试品溶液在 8 小时内基本稳定。

(六) 加样回收率实验

取忍冬藤粉末 (绿原酸含量为 0.910mg/g, 咖啡酸含量为 0.192mg/g) 0.45g 共 5 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 10ml 和绿原

酸咖啡酸混合对照品溶液(绿原酸含量为 0.0456mg/g, 咖啡酸含量为 0.0101mg/g)10ml, 按

上述方法制备供试品溶液, 精密吸取 6 μ l 进样, 测定。结果见表 8、表 9。

表 8 绿原酸回收率实验

序号	样品绿原酸的含量 (mg)	加入绿原酸的量 (mg)	测出绿原酸的总量 (mg)	检出绿原酸的量 (mg)	回收率%	\bar{X} %	RSD%(n=5)
1	0.402	0.456	0.857	0.455	99.84		
2	0.412	0.456	0.863	0.451	98.82		
3	0.392	0.456	0.860	0.468	102.63	100.79	2.17
4	0.416	0.456	0.867	0.452	99.05		
5	0.390	0.456	0.863	0.472	103.60		

表 9 咖啡酸回收率实验

序号	样品咖啡酸的含量 (mg)	加入咖啡酸的量 (mg)	测出咖啡酸的总量 (mg)	检出咖啡酸的量 (mg)	回收率%	\bar{X} %	RSD%(n=5)
1	0.084	0.101	0.182	0.098	97.40		
2	0.086	0.101	0.183	0.097	96.38		
3	0.082	0.101	0.184	0.102	100.68	98.05	2.44
4	0.087	0.101	0.183	0.096	95.38		
5	0.081	0.101	0.183	0.101	100.41		

以上结果表明, 本法具有良好的回收率。

(五) 样品测定

取十三批样品, 按样品供试液制备方法制备, 测定, 结果见表 10。

表 10 十三批样品测定结果

产地	绿原酸含量 (mg/g)	RSD% (n=2)	咖啡酸含量 (mg/g)	RSD% (n=2)
山东*	1.755	1.28	0.290	3.03
北京*	1.242	4.13	0.205	2.64
河北*	0.910	1.36	0.192	2.24
山东费县	0.082	0.89	0.135	1.89
山东平邑	0.076	2.29	0.138	0.65
山东日照	0.077	1.54	0.140	1.61
山东苍山	0.076	1.23	0.130	0.84
山东滕洲	0.092	1.18	0.125	1.09
河南密县	0.075	1.40	0.120	1.19
河南巩县	0.074	0.69	0.123	1.54
河南丰丘	0.074	1.10	0.155	0.64
河南荥阳	0.072	0.59	0.136	1.91
河南安阳	0.075	1.41	0.122	1.47

* 为 2003 年 3 月送的样品, 其余为 2003 年 8 月送的样品。

三、讨论

根据文献报道^[4], 曾试用过甲醇-水-冰醋酸(20:80:1), 分离效果均不理想。后参考药典^[5], 以乙腈-0.4%磷酸溶液(11:89), 乙腈-0.2%磷酸溶液(11:89)为流动相, 均使绿原酸与咖啡酸得到了较好的分离, 但考虑到 pH 过低对色谱柱的损坏, 故最终采用乙腈-0.2%磷酸溶液(11:89)为流动相。

参考文献

- [1] 中国药典 2000 年版一部:150
- [2] 冯延明, 姜秋, 孙延波, 等. 金银花对不同血清突变链球菌的抑菌试验研究. 白求恩医科大学学报, 1996, 22(2):150
- [3] 董杰德, 陈晨华, 仇素英, 等. 四种中草药抗柯萨奇病毒及埃柯病毒的研究. 山东中医学院学报, 1993, 17(4):46
- [4] 闻平, 张清波, 张树杰, 等. HPLC 法测定忍冬藤中绿原酸含量. 中国药品标准, 2002, 3(4):47
- [5] 中国药典 2000 年版一部:177

HPLC 法测定新星癣特灵中水杨酸和苯甲酸的含量

朱碧君 程奇珍 李平 (江西省药品检验所 南昌 330046)

摘要 目的: 建立了 HPLC 法测定新星癣特灵中水杨酸和苯甲酸的含量。方法: 采用 Hypersil ODS 柱(4.6mm \times 200mm, 5 μ m), 0.1mol \cdot L⁻¹磷酸氢二钠溶液-甲醇(60:40, 用磷酸调节 pH 至 5.2)为流动相, 流速为 0.8ml \cdot min⁻¹, 检测波长为 240nm, 进样量 20 μ l。结果: 水杨酸与苯甲酸的线性范围均为: 18~162 μ g \cdot ml⁻¹, r=0.9999(n=5)。平均回收率分别为: 水杨酸 100.1%, RSD=0.47%; 苯甲酸 99.99%, RSD=0.74%。结论: 本法分离度好, 快速, 简便。2 种组分同时测定, 可作为产品的质量