

HPLC测定金银花药材中木犀草苷含量的优化

马玲云, 姚令文, 马双成, 林瑞超

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 优化金银花药材中木犀草苷的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 以苯基硅烷键合硅胶为填充剂, 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-phenyl (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 流动相为乙腈-0.5% 醋酸溶液系统, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。结果: 木犀草苷进样量在 0.09~0.91 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999$); 平均回收率 ($n=6$) 为 103.1%, RSD 为 2.1%; 检测限 ($SN=3$) 为 3.48 ng 定量限 ($SN=10$) 为 8.70 ng 结论: 本法简便准确, 可用于金银花药材中木犀草苷的含量测定。

关键词: 金银花; 木犀草苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2009)09-1496-05

Optimization of an HPLC method for determination of luteolin-7-O-glucoside in Flos Lonicerae Japonicae

MA Ling-yun, YAO Ling-wen, MA Shuang-cheng, LIN Rui-chao

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Objective To develop an HPLC method for the determination of luteolin-7-O-glucoside in Flos Lonicerae Japonicae. **Method** An Agilent ZORBAX SB-phenyl column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was acetonitrile-0.5% acetic acid with gradient elution mode at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detecting wavelength was 350 nm, the column was 25 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The calibration curve was linear in the range of 0.09-0.91 μg of luteolin-7-O-glucoside with correlation coefficient of 0.9999. The average recovery ($n=6$) was 103.1% with RSD of 2.1%; The limit of detection ($SN=3$) was 3.48 ng and the limit of quantification ($SN=10$) was 8.70 ng. **Conclusion** This method is accurate and can be used to determine the content of luteolin-7-O-glucoside in Flos Lonicerae Japonicae.

Key words Flos Lonicerae Japonicae; luteolin-7-O-glucoside; HPLC

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 干燥花蕾或带初开的花, 为常用中药。具有清热解毒、凉散风热之功效, 主治痈肿、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等症, 应用历史悠久^[1]。金银花药材中的黄酮类成分具有抗呼吸道病毒的活性^[2], 并有相关的文章对金银花中黄酮类成分的定量进行了研究^[3], 中国药典 2005 年版一部金银花药材标准^[4]中增加了木犀草苷的含量测定方法。在该标准的实施过程中, 多个实验室在检验中发现木犀草苷的含量测定结果, 以十八烷基硅烷键和硅胶为填充剂的色谱柱分离选择性差异较大,

不同品牌十八烷基硅烷键和硅胶色谱柱的测定结果差异较大, 影响标准的实施。本实验通过对不同键合相填料和不同品牌的色谱柱进行方法及方法学考察, 优化了金银花药材中木犀草苷的测定方法, 为金银花药材的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (G1322A 在线脱气机, G1311A 四元梯度泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, DAD 检测器), ChemStation 工作站; Waters 2695 高效液相色谱仪, 996 DAD 检测器, ZQ 2000 质谱仪, masslynx V 4.0 工作站。

无水乙醇、冰醋酸为分析纯(北京化工试剂厂),乙腈为色谱纯(J.T. Baker),纯净水为RO-ZY-30型纯水机和Milli-Q纯水系统二次制备;木犀草苷对照品(批号111720-200604)由中国药品生物制品检定所提供;金银花药材主要由浙江省食品药品检验所提供及药材市场购买得到,由中国药品生物制品检定所中药标本馆张继副主任药师鉴定。

2 溶液的制备

2.1 供试品溶液 取本品粉末(过4号筛)约2 g精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇50 mL,称定重量,超声处理(250 W, 35 kHz)1 h放冷,再称定重量,用70%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过^[4],精密量取续滤液10 mL,回收溶剂至干,残渣用70%乙醇溶解,转移至5 mL量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 对照品溶液 同中国药典2005年版一部金银花项下木犀草苷对照品溶液的制备方法^[4]。

3 色谱条件

色谱柱:苯基硅烷键合硅胶为填充剂,Agilent ZORBAX SB-phenyl(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.5%醋酸溶液,梯度洗脱(0~15 min, 10%乙腈→20%乙腈;15~30 min, 20%乙腈;30~40 min, 20%乙腈→30%乙腈);流速1 mL·min⁻¹;检测波长350 nm;柱温为25℃;进样量10 μL。在本文色谱条件下,木犀草苷色谱峰与相邻峰间的分离度均大于1.5,理论板数为23406。

3.1 色谱柱的优化 选择不同品牌、不同键合相填料的色谱柱进行了考察,结果表明十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱的分离选择性差异较大,且目前市场中的以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱未能将样品中木犀草苷色谱峰与干扰峰完全分离。然而以苯基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱分离效果明显优于以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,可将样品中木犀草苷色谱峰与干扰峰完全分离。分离情况分别见图1。

3.2 流动相的选择 采用乙腈-0.5%醋酸溶液梯度系统,待测成分可得到较好分离,采用乙腈-0.5%醋酸+0.5%四氢呋喃溶液梯度系统,待测成分的分离效果并未明显提高。所以,本方法选择用乙腈-0.5%醋酸溶液梯度系统为流动相。

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 按上述色谱条件,分别精密吸取对照品溶液2, 4, 8, 10, 15, 20 μL,注入液相色谱仪,测得峰面积积分值,计算回归方程:

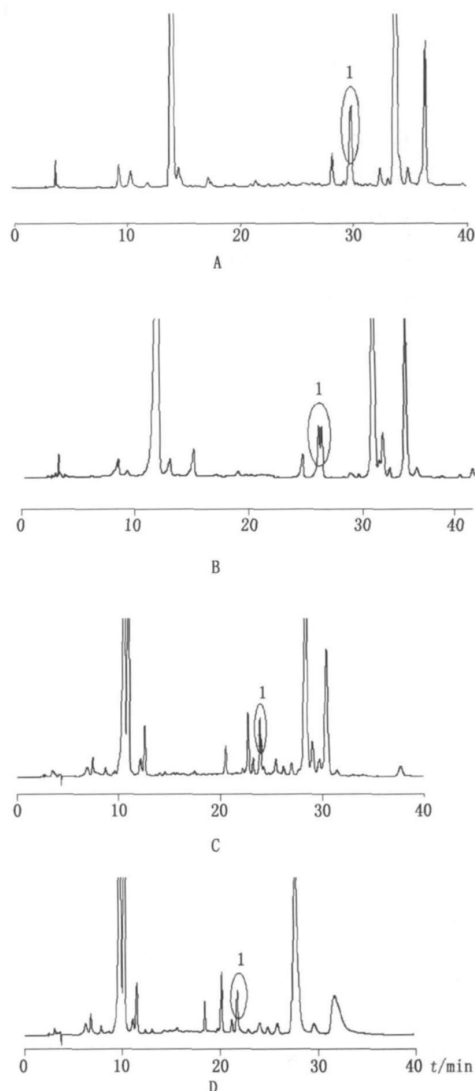


图1 不同品牌、不同固定相填料的色谱柱分离色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms using different chromatographic columns with different brand and stationary phase

A. H Q-silC₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) B. Phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) C. Phenomenex Synergi POLAR-RP 80A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) D. Agilent ZORBAX SB-phenyl (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)

1. 木犀草苷(luteolin-7-O-glucoside)

$$Y = 2.6 \times 10^6 X + 527 \quad r = 0.9999$$

结果表明木犀草苷进样量在0.09~0.91 μg范围内呈现良好的线性关系。

4.2 重复性试验 取同一批金银花药材粉末约2 g共6份,按“2”项下方法制备供试品溶液,依上述色谱条件进样测定,计算平均含量($n=6$)为0.056%,RSD为0.4%。

4.3 稳定性试验 取同一批金银花药材制备成供试品溶液后,分别在0, 1, 3, 7, 12 h进样测定,峰面积

值的 RSD 为 0.4%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内木犀草苷的含量稳定。

4.4 加样回收试验 精密称取已测知含量的金银花药材粉末 1 g 置具塞锥形瓶中, 精密加入木犀草苷对照品溶液适量 (含木犀草苷 0.486 mg), 按“2”项下方法制备所需溶液, 并按上述色谱条件进样, 计算平均回收率 ($n=6$) 为 103.1%, RSD 为 2.1%。

4.5 专属性 应用液相色谱质谱联用法 (ESI 源,

正离子模式检测, 干燥气为氮气, 干燥气流速 $9.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 干燥气温度 300°C , 扫描范围 m/z 200~1000 采用 Agilent ZORBAX SB-phenyl ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) 色谱柱分析测定, 对金银花药材样品进行了 HPLC-MS 分析测定, 并与对照品木犀草苷色谱峰进行了比较与确证, 结果表明, 样品中分离得到的木犀草苷色谱峰与对照品色谱峰一致, 见图 2。

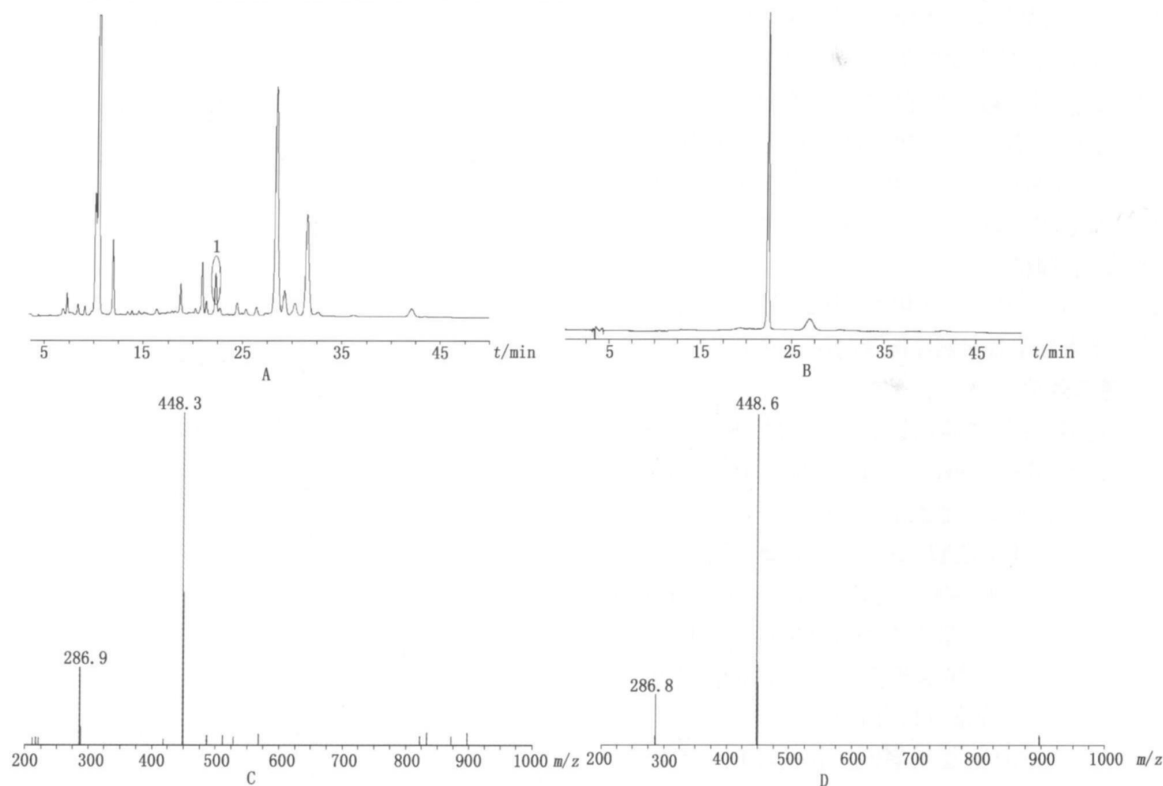


图 2 专属性测定 HPLC-MS 图

Fig 2 HPLC-MS of the specificity

A. 样品色谱图 (HPLC chromatogram of sample) B. 对照品色谱图 (HPLC chromatogram of reference substance) C. 样品 ESI⁺ 质谱图 (ESI⁺ - MS spectrum of sample) D. 对照品 ESI⁺ 质谱图 (ESI⁺ - MS spectrum of reference substance)

4.6 检测限 将木犀草苷色谱峰测出的信号与 70% 乙醇溶剂测出的信号进行比较, 以信噪比为 3:1 时注入仪器的量确定检测限, 测得检测限为 3.48 ng。

4.7 定量限 将木犀草苷色谱峰测出的信号与 70% 乙醇溶剂测出的信号进行比较, 以信噪比为 10:1 的木犀草苷对照品溶液重复进样 6 次, 峰面积值的 RSD 为 2.0%, 测得定量限为 8.70 ng。

4.8 范围 取同一批浙江省食品药品检验所 II 金银花药材粉末 2.5 g 与 1.5 g 各 6 份, 按“2”项下方法制备供试品溶液, 依上述色谱条件测定木犀草苷的含量。结果: 高取样量时, 平均含量 ($n=6$) 为 0.056%, RSD 为 1.8%; 低取样量时, 平均含量 ($n=6$) 为 0.053%, RSD 为 1.9%。试验结果表明

按正常测定取样量 2 g 的 75% 至 125% 取样量测定, 在高、低取样量测定的精密度均符合要求。

4.9 耐用性 采用不同品牌苯基硅烷键合硅胶色谱柱, 分别测定了 3 批金银花样品中木犀草苷的含量, 结果表明不同品牌苯基硅烷键合硅胶色谱柱对测定结果影响较大。见表 1 与图 3。图 3 为浙江丽水 II 金银花样品在 4 种品牌苯基硅烷键合相色谱柱上的分离情况。在不同色谱上木犀草苷与相邻峰的分离有的为基本分离 (图 3-A, D), 有的则与前面一个色谱峰合并为一个峰 (图 3-B, C)。采用色谱柱 1 和 4 测得含量基本相同, 采用色谱柱 2 和 3 测得含量偏高。因此本文选择 Agilent ZORBAX SB-phenyl ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) 色谱柱。

表 1 不同品牌苯基色谱柱的含量测定结果 (%)

Tab 1 Results of detemination using different brand phenyl columns

编号 (No.)	色谱柱品牌 (brand of the using columns)	宁夏 (Ningxia)	浙江丽水 (Lishui Zhejiang) I	浙江丽水 (Lishui Zhejiang) II
1	Agilent ZORBAX SB-phenyl(4.6mm×250mm, 5 μm)	0.043	0.068	0.062
2	XTerra phenyl(4.6mm×250mm, 5 μm)	0.069	0.079	0.086
3	Agilent phenyl(4.6mm×250mm, 5 μm)	0.046	0.080	0.088
4	Phenomenex Synergi POLAR-RP 80A (4.6mm×250mm, 4 μm)	0.043	0.071	0.066
	RSD %	25.0	7.94	17.8

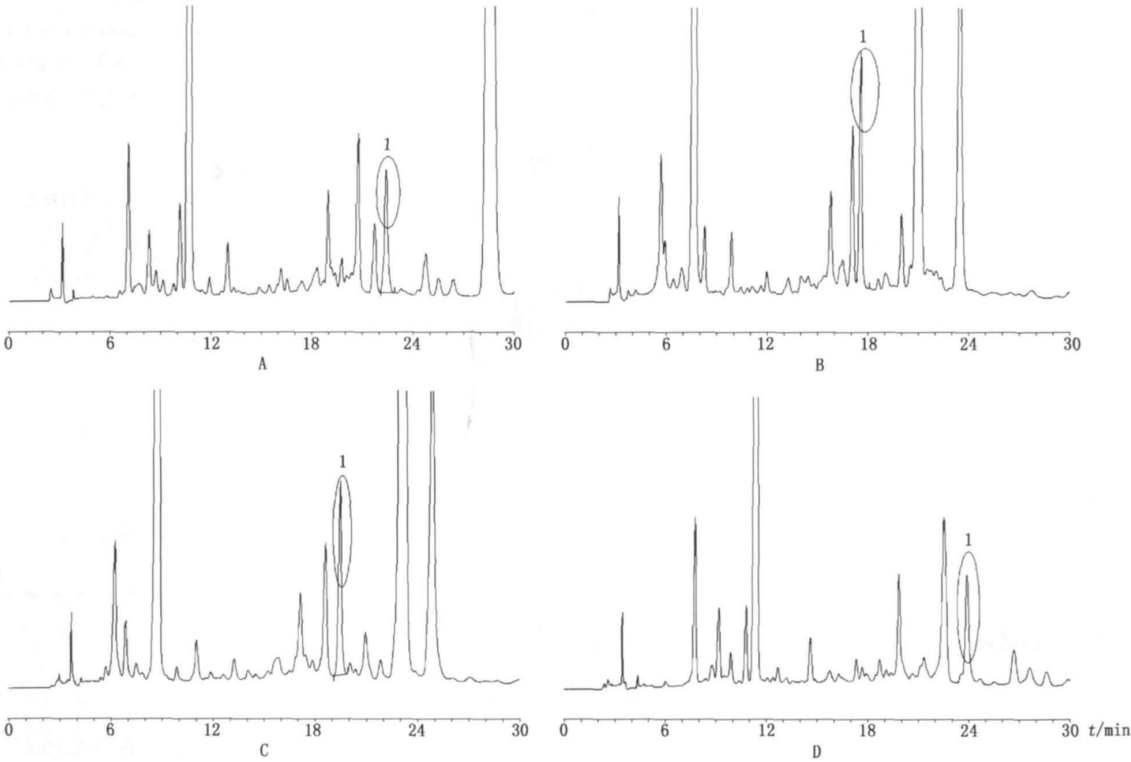


图 3 不同品牌苯基色谱柱分离得到的色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms using different brand phenyl columns

A. 色谱柱 1 (column 1) B. 色谱柱 2 (column 2) C. 色谱柱 3 (column 3) D. 色谱柱 4 (column 4)

1 木犀草苷 (luteolin-7-O-glucoside)

5 样品测定

按上述条件, 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 进样测定, 以外标法计算样品中木

犀草苷的含量。11 批金银花药材样品结果见表 2 (表中含量值均未折算水分)。

表 2 金银花样品木犀草苷含量测定结果 (n= 4)

Tab 2 Results of luteolin- 7- O- glucoside in in Fbs Lonicerae Japonicae

来源(source)	含量 (content) %	RSD %
山东平邑 (Pingyi Shandong)	0. 063	0. 51
山东 (Shandong)	0. 074	1. 8
河南 (Henan)	0. 058	0. 17
浙江 (Zhejiang)	0. 052	0. 89
宁夏 (N ingxia)	0. 043	2. 2
浙江丽水 (Lishui Zhejiang) I	0. 068	0. 57
浙江丽水 (Lishui Zhejiang) II	0. 062	0. 71
浙江省食品药品检验所 (Zhejiang Institute for Food and Drug Control)I	0. 096	0. 89
浙江省食品药品检验所 (Zhejiang Institute for Food and Drug Control)II	0. 063	0. 45
浙江省食品药品检验所 (Zhejiang Institute for Food and Drug Control)III	0. 053	1. 5
北京同仁堂药店 (Beijing Tongrentang Pharmacy)	0. 056	0. 43

6 小结

本文对金银花中木犀草苷的含量测定方法进行

了优化,实验中所采用的提取方法按中国药典 2005 年版方法进行,在本文所设定的 HPLC 条件下,木犀草苷均能获得良好的分离,并经实验研究选择了 Agilent ZORBAX SB- phenyl(4. 6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱,采用乙腈- 0. 5%醋酸梯度系统为流动相进行含量测定。本方法较简单,灵敏度高,重复性好,可作为木犀草苷的含量测定方法。

参考文献

1 LIU En- li(刘恩荔), LIQ ing- shan(李青山). Fbs Lonicerae's re- search progress(金银花的研究进展). *J Shanxi Med Univ* (山西医科大学学报), 2006, 37(3): 331

2 WANG Tian- zhi(王天志), LI Yong- mei(李永梅). Flos Lonicerae's research progress(金银花的研究进展). *West China J Pham Sci*(华西药科学杂志), 2000, 15(4): 292

3 MA Shuang- cheng(马双成), LU Yan(刘燕), PaulBUT Pai- Hay (毕培曦), *et al*. Antiviral activities of flavonoids isolated from Lon- cera japonica Thunb. (金银花药材中抗呼吸道病毒感染的黄酮类成分的定量研究). *Chin J Pham Anal*(药物分析杂志), 2006, 26 (4): 426

4 ChP(中国药典). 2005. VolII (一部): 152

(本文于 2009年 7月 2日修改回)

李云龙所长会见世界卫生组织质量、安全
和标准部协调官员 David Wood博士

2009年 9月 3日下午,中国药品生物制品检定所所长李云龙及副所长王军志会见了世界卫生组织质量、安全和标准部协调官员 David Wood博士。双方就生物制品质量控制及生物制品标准化研究等相关领域进行了会谈。王军志对中检所组织科研攻关,研究甲型 H1N1流感疫苗抗原定量检测方法,为甲型 H1N1流感疫苗研制提供强有力的技术支持进行了介绍。会谈后,David Wood博士参观了疫苗三室、菌种室和安评中心,并与相关技术人员进行了交流。

详见: www. nicpbp. org. cn