

# HPLC-UV-ELSD测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量\*

谷筱玉, 陈振鹏, 陈乾平, 李吾来, 缪剑华\*\*, 覃强

(广西壮族自治区药用植物园, 南宁 530023)

**摘要** 目的: 建立同时测定传统中药山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙含量的 HPLC 分析方法。方法: 采用 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相 0.4% 醋酸 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~12 min 80% A; 12~13 min 80% A → 67% A; 13~30 min 67% A → 65% A; 30~35 min 65% A → 80% A), 流速 0.5 mL · min<sup>-1</sup>; UV 检测: 检测绿原酸, λ = 326 nm; ELSD 检测: 检测灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙, 雾化室温度 88 °C, 漂移管温度 108 °C, N<sub>2</sub> 气流速度 1.0 L · min<sup>-1</sup>。结果: 线性范围内 3 个化合物呈良好的线性关系 (R<sup>2</sup> > 0.9959), 加样回收率在 99% ~ 101% 之间 (n = 6), 该方法精密性、稳定性和重复性良好, RSD < 2%。结论: 该方法能够方便、准确地测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量。

**关键词:** HPLC-UV-ELSD; 山银花; 绿原酸; 灰毡毛忍冬皂苷乙; 川续断皂苷乙

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0884-04

## HPLC with UV and ELSD simultaneous determination of chlorogenic acid, macranthoidin B and dipsacoside B in Flos Lonicerae\*

GU Xiaoyu, CHEN Zhenpeng, CHEN Qianping

LIWulaj, MIAO Jianhua\*\*, QIN Qiang

(Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China)

**Abstract Objective** To establish a new analysis method for the determination of three analytes, namely chlorogenic acid, macranthoidin B and dipsacoside B in Flos Lonicerae, a commonly used traditional Chinese medicine (TCM) herb with HPLC. **Methods** Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was adopted. The mobile phase consisted of 0.4% aqueous acetic acid (A) and acetonitrile (B) with a gradient elution of 80% A at 0-12 min, 80% A → 77% A at 12-13 min, 67% A → 65% A at 13-30 min and 65% A → 80% A at 30-35 min, at a flow rate of 0.5 mL · min<sup>-1</sup>. The UV detection wavelength was 326 nm for chlorogenic acid. The drift tube temperature of ELSD was set at 108 °C, with the nitrogen flow rate of 1.0 L · min<sup>-1</sup> for macranthoidin B and dipsacoside B. **Results** Good linear regression (R<sup>2</sup> > 0.9959) was within wide test ranges. The recovery rate was between 99% and 101% (n = 6). This method had better precision, stability and repeatability, RSD < 2%. **Conclusion** This method is convenient and accurate for determination of chlorogenic acid, macranthoidin B and dipsacoside B in Flos Lonicerae.

**Key words** HPLC-UV-ELSD; Flos Lonicerae; chlorogenic acid; macranthoidin B; dipsacoside B

山银花为 2010 年版中国药典收载品种, 由 2010 年版中国药典金银花项下分离出来的新增品种。山银花来源为灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. 和 红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq. 和 华南忍冬 *Lonicera confusa* DC. 的干燥花蕾或带初开的花<sup>[1]</sup>。山银花作为常用中药, 具有清热解毒、凉

散风热的功效, 常用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热。同时山银花还是重要的化工原料和优良饮品原料<sup>[2]</sup>。金银花和山银花都含有绿原酸、木犀草苷, 其中金银花中木犀草苷含量比较高, 而山银花中木犀草苷含量很少。因此, 仅依据绿原酸和木犀草苷这 2 个化学成分来对金银花

\* 广西中药材标准体系研究 (桂科攻 0815005-1-21)

\*\* 通讯作者 Tel: (0771)2443050 E-mail: mj1962@vip.163.com

和山银花进行 HPLC 分析鉴别, 条件还不够充分。贺清辉等<sup>[4]</sup>从红腺忍冬藤茎乙醇提取物中分离得到灰毡毛忍冬皂苷乙, 为首次从该种分离得到; 陈君等<sup>[4]</sup>从灰毡毛忍冬花蕾中分离得到灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙; 刘丹<sup>[5]</sup>等从华南忍冬中分离出灰毡毛忍冬皂苷乙。而国内尚未见有文献关于灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙的 HPLC 检测的报道, 国外未见绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙 3 个成分的同时 HPLC 检测文献报道。因此, 摸索绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙这 3 个化学成分的同时 HPLC 检测条件, 以及根据此条件来对山银花进行 HPLC 分析鉴别具有重要意义。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 HPLC 系统配置 Varian ProStar240 四元低压梯度泵、UV325 检测器、PL-ELS2100 蒸发光检测器、Galaxie 色谱工作站; 电子分析天平为德国 Sartorius CP224S、CP225D; 超声波清洗器, KQ 5200 型, 功率 250 W, 频率 25 kHz (昆山超声波仪器有限公司); 超纯水机为美国 Millipore Milli-Q Academic。

1.2 供试药材 山银花采自广西壮族自治区马山县和富川县, 经广西药用植物园副研究员吴庆华鉴定, 马山山银花为红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq., 富川山银花为灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.

1.3 试剂 乙腈为色谱纯, 乙酸、甲醇为分析纯。

1.4 对照品 绿原酸 (批号 110753-200413, 20 mg) 购自中国药品生物制品检定所, 灰毡毛忍冬皂苷乙 (A0523, ≥98%) 和川续断皂苷乙 (A0527, 20 mg, ≥98%) 购自成都曼斯特科技有限公司。

2 色谱条件

采用 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.4% 醋酸 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~12 min, 80% A; 12~13 min, 80% A → 67% A; 13~30 min, 67% A → 65% A; 30~35 min, 65% A → 80% A), 流速 0.5 mL · min<sup>-1</sup>; UV 检测: 检测绿原酸, λ = 326 nm; ELSD 检测: 检测灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙, 雾化室温度 88 °C, 漂移管温度 108 °C, N<sub>2</sub> 气流量 1.0 L · min<sup>-1</sup>。

3 溶液的制备

3.1 单一成分对照品溶液 精密称量对照品绿原酸 2.78 mg, 灰毡毛忍冬皂苷乙 2.50 mg, 川续断皂苷乙 2.26 mg 分别用 50% 甲醇定容至 2 mL, 即得。

3.2 混合对照品溶液 精密称取对照品绿原酸

4.18 mg 用 50% 甲醇定容至 10 mL, 即得绿原酸对照品溶液; 精密称取对照品灰毡毛忍冬皂苷乙 4.32 mg 及川续断皂苷乙 6.07 mg 置于 2 mL 量瓶中, 用上述配制好的绿原酸对照品溶液定容至 2 mL。

3.3 供试品溶液 取山银花干燥样品, 粉碎, 过 4 号筛, 精密称取样品 0.1 g 置于 10 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇 8 mL, 超声处理 (功率 250 W、频率 25 kHz) 40 min, 冷却后用 50% 甲醇定容至 10 mL, 过滤, 取续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

4 线性关系的考察

将混合对照品溶液 (绿原酸浓度 0.418 mg · mL<sup>-1</sup>, 灰毡毛忍冬皂苷乙浓度 2.16 mg · mL<sup>-1</sup>, 川续断皂苷乙浓度 3.035 mg · mL<sup>-1</sup>) 用 50% 甲醇分别稀释 0.005, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 倍, 按上述色谱条件进样 5 μL, 测定峰面积。其中绿原酸以峰面积 Y 对绿原酸对照品浓度 X 进行线性回归, 而灰毡毛忍冬皂苷乙与川续断皂苷乙则分别以峰面积 Y 对相对应的对照品浓度 X 的 ln 对数进行线性回归。3 个成分的线性方程见表 1。

表 1 绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的线性方程  
Tab 1 The linear regression equation of chlorogenic acid, macranthoidin B and dipsacoside B

成分 (compound)	线性范围 (linear range) / mg · mL <sup>-1</sup>	线性方程 (linear regression equation)	R <sup>2</sup> (n = 5)
绿原酸 (chlorogenic acid)	0.021 ~ 0.418	Y = 1.953 × 10 <sup>4</sup> X - 31.74	0.9996
灰毡毛忍冬皂苷乙 (macranthoidin B)	0.108 ~ 2.160	ln Y = 1.660 ln X + 7.490	0.9970
川续断皂苷乙 (dipsacoside B)	0.152 ~ 3.035	ln Y = 1.625 ln X + 7.094	0.9959

5 精密度试验

精密吸取稀释后的混合对照品溶液 5 μL, 按上述色谱条件连续进样 5 次, 测得绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙峰面积的 RSD (n = 5) 分别为 0.74%, 0.99%, 1.6%, 表明仪器精密度良好。

6 最低检测限和定量限

以信噪比 3:1 为标准测得绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的最低检测限分别为 0.07, 0.22, 0.23 μg。以信噪比 10:1 时的进样量作为定量限, 测得绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的定量限分别为 0.23, 0.75, 0.77 μg。

7 重复性试验

取同一批山银花 (马山山银花), 按“3.3”项下方法制得 5 份供试品溶液, 分别进样 5 μL 进行测定。

测得绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的平均含量 ( $n=5$ ) 分别为 10.43%, 4.36%, 7.01%; RSD 分别为 0.13%, 0.47%, 0.77%。表明本方法重复性良好。

**8 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液 5  $\mu$ L, 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样, 测得绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙峰面积的 RSD ( $n=8$ ) 分别为 1.6%, 1.4%, 1.6%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 9 耐用性试验

取样品, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2”项下色谱条件进样 5  $\mu$ L, 测定绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙的峰面积。同时按上述制备、测定方法考察流动相中 0.1% ~ 0.5% 醋酸溶液、不同品牌色谱柱 (Kromasil KR100-5C<sub>18</sub>柱、Varian Pursuit C<sub>18</sub>柱和 Phenomenex Gemini C<sub>18</sub>柱等) 和流动相流速变化 (0.4~1.0 mL·min<sup>-1</sup>) 对 3 个组分峰面

积分的影响。从考察以上 4 个方面的因素来看, RSD 均小于 3.0%, 符合 HPLC 条件的要求。因此可以判断: 本方法测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量的耐用性较好。

### 10 回收率试验

精密称定已测定含量的广西马山县山银花 6 份, 每份约 0.05 g 精密称定, 精密加入对照品绿原酸 5.2 mg 灰毡毛忍冬皂苷乙 2.1 mg 和川续断皂苷乙 3.4 mg 按“3.3”项下方法制备供试溶液, 精密吸取 5  $\mu$ L 进样测定峰面积, 计算回收率。结果绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙平均回收率 ( $n=6$ ) 分别为 99.7%, 100.8%, 101.5%; RSD 分别为 1.2%, 1.2%, 0.41%。

### 11 样品测定

取广西马山和富川的山银花各 3 份, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 每份溶液进样 3 次, 按“4”项下线性方程计算。结果见表 2 色谱图见图 1。

表 2 样品含量 ( $n=3$ )

Tab 2 Sample content

产地 (sources)	绿原酸 (chlorogenic acid)	灰毡毛忍冬皂苷乙 (macranthoidin B)	川续断皂苷乙 (dipsacoside B)
广西马山 (Mashan, Guangxi)	10.50 $\pm$ 0.18	4.31 $\pm$ 0.04	6.89 $\pm$ 0.02
广西富川 (Fuchuan, Guangxi)	1.23 $\pm$ 0.03	10.67 $\pm$ 0.50	3.03 $\pm$ 0.05

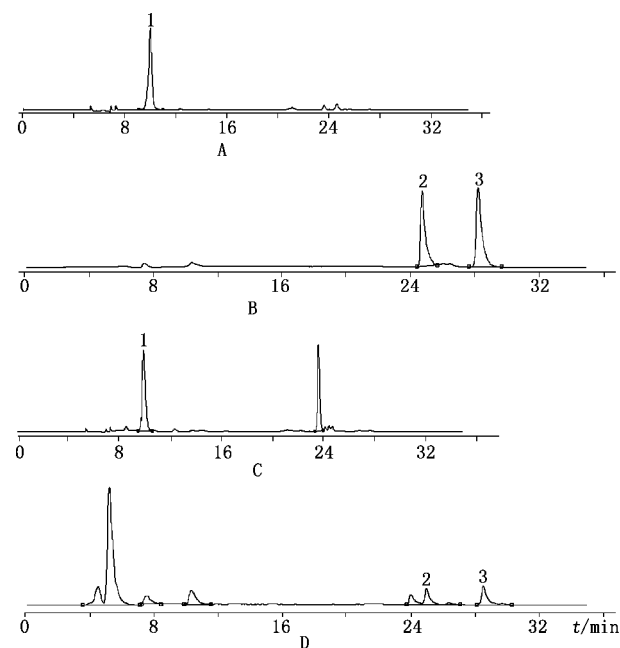


图 1 对照品绿原酸 (A)、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙 (B) 及马山山银花中绿原酸 (C)、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙 (D) 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances of chlorogenic acid (A), macranthoidin B and dipsacoside B (B), and chlorogenic acid (C), macranthoidin B and dipsacoside B (D) in Flos Lonicerae of Mashan

1 绿原酸 (chlorogenic acid) 2 灰毡毛忍冬皂苷乙 (macranthoidin B) 3 川续断皂苷乙 (dipsacoside B)

### 12 讨论

由于绿原酸的极性要大于灰毡毛忍冬皂苷乙与川续断皂苷乙, 而这 2 个皂苷的极性较为接近, 因此洗脱绿原酸的流动相中水相所占比例比较大, 但是洗脱 2 个皂苷的流动相中有机相比例也不能太大, 以免无法分离这 2 个极性接近的皂苷, 由以上条件限制而优化得到的整个梯度洗脱程序中, 水相所占的比例都比较大, 而对于 ELSD 来说, 漂移管温度和气流量是很重要的 2 个参数, 它们在优化被测物质的响应值的时候扮演着重要的角色<sup>[6]</sup>。由于水相所占比例较大, 因此漂移管温度和气流量经过优化得到的最终条件为漂移管温度 108  $^{\circ}$ C, N<sub>2</sub> 气流量 1.0 L·min<sup>-1</sup>。线性考察数据分析显示, 3 个物质在较宽的浓度检测范围内的标准曲线都显示出良好的线性 ( $R^2 > 0.9959$ ), 有利于分析鉴定不同产地和物种的山银花。

本研究建立了山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的 HPLC-UV-ELSD 联用的检测方法, 能够方便、快捷地检测山银花中这些有效物质的含量, 为鉴别山银花药材和相关产品, 并制定相应的质量标准提供了可靠依据。

## 参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010 VolI (一部): 28
- 2 ZHOU Rong-han(周荣汉). Resource Science of Chinese Medicinal Materials(中药资源学). Beijing(北京): China Medicinal Science and Technology Publishing House(中国医药科技出版社), 1993. 426
- 3 HE Qing-hui(贺清辉), LI Hui-jun(李会军), BI Zhi-ming(毕志明). Chemical constituents in the stem of *Lonicera hypoglauca*(红腺忍冬藤茎的化学成分). *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2006, 4(5): 385
- 4 CHEN Jun(陈君), XU Xiao-fang(许小方), CHAI Xing-yun(柴兴云). Chemical constituents in the buds of *Lonicera macranthoides*(灰毡毛忍冬花蕾的化学成分). *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2006, 4(5): 347
- 5 LIU Dan(刘丹), XIA Lin-lin(夏琳琳). Study on chemical constituents of *Lonicera confusa* DC. (山银花化学成分研究). *Heilongjiang J Sci Technol Inf*(黑龙江科技信息), 2007, 12: 298
- 6 LI Hui-jun, LI Ping, YE Wen-cai. Determination of five major iridoid glycosides in Flos *Lonicerae* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A*, 2003, 1008(2): 167

(本文于 2010年 11月 2日收到)

## 第二届全国药品质量分析论坛 在江苏省泰州市成功召开(二)

2011年4月19~21日在江苏省泰州市召开的第二届全国药品质量分析论坛,主题是"药物分析与质量提高"。中国食品药品检定研究院资深专家、药物分析杂志主编金少鸿研究员任本次论坛主席,中国食品药品检定研究院李波副院长任论坛副主席。

本次论坛邀请6位专家作了大会报告。药物分析杂志主编金少鸿研究员作了《药品检验药品质量评价的新概念》专题报告;上海市食品药品检验所陈钢主任药师作了《生化类药品的质量现状与质量标准研究原则》专题报告;中国食品药品检定研究院孙会敏研究员作了《药用辅料吐温80质量分析与致敏源探究》专题报告;中国食品药品检定研究院林瑞超研究员作了《中药分析与质量提高》专题报告;江苏省食品药品检验所樊夏雷主任药师作了《以科学的谋划与发展的思维全力做好药品评价抽验工作》专题报告;国家食品药品监督管理局药品市场监督办公室黄志禄主任助理作了《2011年药品质量评价的思路和设想》专题报告。

论坛全程分为六个阶段,第一阶段为开幕式和主题报告(一);第二阶段和第三阶段为分组报告,包括了化学药、生化抗生素药、中药天然药、中药注射剂、药包材辅料五个分会场;第四阶段为互动交流;第五阶段为主题报告(二)和总结发言;第六阶段为参观医药博览。

本届论坛有260余篇论文以会刊摘要形式交流。经专家审稿推荐,有130篇论文分别参与了五个分会场交流,40篇论文以展板形式进行了交流。参加演讲的报告有118个化学药报告37个生化抗生素药报告22个中药天然药报告26个中药注射剂报告20个药包材辅料报告13个。此外,论坛适当考虑了新技术、新设备、新系统在药品质量研究中的应用的介绍,为药物分析、药品检测领域的专家学者们提供了更多的思路。

《药物分析杂志》编辑部