

HPLC 测定金银花及金芪降糖片中 6 种成分的含量

于静,邓雁如*,陈奇,宋丽丽,高樱,郭利平

(天津中医药大学 天津市中药化学与分析重点实验室,天津 300193)

摘要 目的:建立同时测定金银花及金芪降糖片中 6 种成分的反相高效液相色谱法。方法:色谱柱为依利特 ODS C_{18} (4.6 mm×250 mm,5 μ m);乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相,梯度洗脱;流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 355 nm;柱温 30 ℃。结果:6 种成分在上述条件下分离良好。绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷和 4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸分别在 3.24~64.80, 0.24~4.79,1.22~24.40,0.09~0.44,0.68~13.55,1.19~23.87 mg·L⁻¹ 线性良好,平均回收率均大于 97% (RSD < 3%,*n* = 9)。结论:本方法操作简单、结果准确、回收率高、重复性好,可用于金芪降糖片及其相关制剂的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;金芪降糖片;绿原酸;4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸;芦丁;木犀草苷

中图分类号 R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9903(2011)19-0057-04

Simultaneous Determination of Six Constituents in Flos Lonicerae and Jingqi Jiangtang Tablets by HPLC

YU Jing, DENG Yan-ru*, CHEN Qi, SONG Li-li, GAO Ying, GUO Li-ping

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Chemistry and Analysis, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography method of simultaneously determining 6 constituents in Flos Lonicerae and Jingqi Jiangtang tablets. **Method:** The separation was carried out on an ODS C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) with acetonitrile-0.1% H_3PO_4 as mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was at 355 nm. The column temperature was at 30 ℃. **Result:** The six ingredients were separated well. The linear ranges of chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, hyperoside, luteolin-7-*O*-glucoside and 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid were 3.24-64.80, 0.24-4.79, 1.22-24.40,

收稿日期 20101202(001)

基金项目 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2009CB523003)

第一作者 于静,在读硕士,研究方向为药物分析,Tel: 13821107104, E-mail: janejingyu@126.com

通讯作者 * 邓雁如,教授,Tel: 022-23052125, E-mail: dyanru@yahoo.com

三七通舒胶囊各元素指标均符合《中国药典》要求。这就提示我们,对于三七,由于样品采收地点、时间和批次均不同,其 As 超标可能是三七对 As 有天然蓄积作用,或者与药材栽培、加工、运输等过程受到重金属污染有关;对于此类情况,有必要进一步结合 GAP 种植规范要求,探索重金属蓄积原因;此外,由本试验可知,尽管三七中重金属元素含量超标,但通过乙醇提取和大孔吸附树脂纯化等工艺可以使有害元素 As 得以除去,从而保证 PTS 及其制剂中的 As

残留量符合相关要求。因此,今后需在多批工业化生产的基础上,进一步对减少制剂中重金属及有害元素的影响因素和方法进行研究。

参考文献

- 中国药典.一部[S].2010:附录 48.
- European Pharmacopoeia. 6.0[S].2008.

责任编辑 蔡仲德

0.09-0.44, 0.68-13.55, 1.19-23.87 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. The average recoveries were above 97% (RSD < 3%, $n=9$). **Conclusion:** This method is simple and accurate with good recovery and repeatability, and can be used in Jinqi Jiangtang tablets and the related preparation quality control.

[Key words] HPLC; Jinqi Jiangtang tablets; chlorogenic acid; 4,5-*O*-dicafeoylquinic acid; rutin; luteolin-7-*O*-glucoside

金芪降糖片是由金银花、黄芪和黄连组成的一种纯中药制剂,具有清热益气、生津止渴之功效,用于糖尿病前期及轻、中型非胰岛素依赖型糖尿病的治疗。该药物耐受性良好,具有二甲双胍和噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂作用的特点,同时对早期糖尿病肾病有积极的治疗作用。已报道有以该制剂中小檗碱、巴马汀、药根碱、黄芪甲苷和绿原酸为质控指标。该制剂中的金银花具有消炎抗菌、止咳补气及增强免疫力减少胆固醇吸收等显著功效,其主要活性成分为以绿原酸、咖啡酸等为代表的有机酸类和以木犀草苷、金丝桃苷等为代表的黄酮类。为了进一步完善质量标准,本文采用 HPLC,以绿原酸、咖啡酸、木犀草苷和金丝桃苷等 6 种成分为指标,对金银花及金芪降糖片进行质量控制。

1 仪器和试剂

岛津 LC-1020A 型高效液相色谱仪(SPD-20A 紫外检测器、SIL-20A 自动进样器), BT125D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司), KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110753-200413, 110885-200102, 100080-200707, 111521-200303); 木犀草苷、4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸对照品(成都曼斯特生物科技有限公司), 金芪降糖片(天津隆顺榕制药厂), 乙腈为色谱纯(天津市协和昊鹏色谱有限公司), 水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备 绿原酸:称量 4.73 mg 甲醇定容于 10 mL 棕色量瓶中,取 1 mL 母液甲醇稀释定容于 10 mL 棕色量瓶,得绿原酸对照品溶液(47.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

咖啡酸:称量 4.79 mg 甲醇定容于 10 mL 棕色量瓶中,取 1 mL 母液甲醇稀释定容于 10 mL 棕色量瓶,得咖啡酸对照品溶液(47.9 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸:称量 4.34 mg 甲醇定容于 10 mL 棕色量瓶中,取 1 mL 母液甲醇稀释定容

于 10 mL 棕色量瓶,得 4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸对照品溶液(43.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

芦丁:称量 2.44 mg 甲醇定容于 10 mL 量瓶中,取 1 mL 母液甲醇稀释定容于 10 mL 量瓶,得芦丁对照品溶液(24.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

金丝桃苷:称量 2.09 mg 甲醇定容于 10 mL 量瓶中,取 1 mL 母液甲醇稀释定容于 100 mL 量瓶,得金丝桃苷对照品溶液(2.09 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

木犀草苷:称量 4.37 mg 甲醇定容于 10 mL 量瓶中,取 1 mL 母液甲醇稀释定容于 100 mL 量瓶,得木犀草苷对照品溶液(4.37 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.2 金银花药材提取液的制备 将金银花药材粉碎,过 40 目筛,混合均匀,称取样品 0.3 g,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,称重,超声处理 1 h,放冷,称重,加甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液为供试液。

2.3 金芪降糖片提取液的制备 取同一批号的金芪降糖片 20 片,除去包衣,称取平均片重,粉碎,过 40 目筛,混合均匀,称取 0.2 g,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,称重,超声处理 1 h,放冷,称重,加甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液为供试液。

2.4 色谱条件 大连依利特 ODS C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B), 流动相梯度设定如表 1, 流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 355 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 20 μL 。

表 1 梯度洗脱流动相比比例

t/min	A/%	B/%
0	10	90
5	13	87
20	15	85
30	18	82
45	20	80
52	23	77

2.5 线性关系考察 分别移取绿原酸母液 1.37 mL、咖啡酸母液 0.1 mL、芦丁母液 1 mL、金丝桃苷母液 0.21 mL、木犀草苷母液 3.1 mL、4,5-*O*-双咖啡

酰奎宁酸母液 0.55 mL 至于同一 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得对照品混合液。然后取对照品混合液分别进样 1,2,4,8,12,16,20 μL 注入高效液相色谱仪。以标准品的浓度为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y) 分别得到 6 种成分的标准曲线(表 2),线性关系良好。

表 2 回归方程与线性

成分	回归方程	r	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
绿原酸	$Y = 8\,609.4X + 3\,652.2$	0.999 6	3.24 ~ 64.80
咖啡酸	$Y = 13\,628X - 719.48$	0.999 5	0.24 ~ 4.79
芦丁	$Y = 14\,770X - 1\,038.9$	0.999 9	1.22 ~ 24.40
金丝桃苷	$Y = 24\,185X - 751.2$	0.999 7	0.09 ~ 0.44
木犀草苷	$Y = 25\,181X - 3\,784.1$	0.999 6	0.68 ~ 13.55
4,5- <i>O</i> -双咖啡酰奎宁酸	$Y = 13\,478X - 3\,744.5$	0.999 9	1.19 ~ 23.87

2.6 精密度试验 取同一份供试品溶液 20 μL ,在 2.4 色谱条件下,连续重复进样 6 次,测定峰面积,计算。绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷和 4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸峰面积的 RSD 分别为 0.55%,1.59%,0.38%,1.19%,0.79%,1.02%。

2.7 重复性试验

2.7.1 金银花 精密称取同一批金银花粉末 5 份,各 0.3 g,按 2.2 项下制备金银花的提取液,并在 3 色谱条件下进行测定,计算。绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷和 4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸峰面积的 RSD 分别为 0.37%,1.07%,0.68%,0.78%,0.37%,0.42%。

2.7.2 金芪降糖片 精密称取同一批金芪降糖片(过 40 目筛)5 份,各 0.2 g,按 2.3 项下制备金芪降糖片的提取液,并在 3 色谱条件下进行测定,计算。绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷、4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸峰面积的 RSD 分别为 0.77%,1.66%,0.70%,0.58%,0.19%,0.92%。

2.8 稳定性试验

2.8.1 金银花 精密称取同一批金银花粉末 0.3 g,按 2.2 项下制备金银花的提取液,并于 0,2,4,8,12 h 分别进样,测定峰面积。绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷和 4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸峰面积的 RSD 分别为 0.77%,0.50%,0.61%,0.37%,0.49% 和 0.31%。

2.8.2 金芪降糖片 精密称取同一批金芪降糖片(过 40 目筛)0.2 g,按 2.3 项下制备金芪降糖片的

提取液,并于 0,2,4,8,12 h 分别进样,测定峰面积。绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷和 4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸峰面积 RSD 分别为 0.68%,0.57%,0.59%,0.91%,0.83%,0.97%。

2.9 加样回收率试验

2.9.1 金银花 精密称取同一批金银花粉末 9 份,各 0.2 g,加入各对照品的量相当于金银花中各对照品量的 80%,100%,120%。按 2.2 项下制备金银花的提取液,并在 3 色谱条件下进行测定,以外标法计算各成分含量。绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷和 4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸的回收率平均值分别为 101.14%,98.61%,100.82%,101.59%,99.91%,100.74%。RSD 分别为 0.71%,0.51%,0.64%,1.75%,0.33%,0.77%。

2.9.2 金芪降糖片 精密称取同一批金芪降糖片(过 40 目筛)9 份,各 0.1 g,加入各对照品的量相当于金芪降糖片中各对照品量的 80%,100%,120%。按 2.3 项下制备金芪降糖片的提取液,并在 3 色谱条件下进行测定,以外标法计算各成分含量。绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷、4,5-*O*-双咖啡酰奎宁酸的回收率平均值分别为 101.18%,100.78%,98.05%,102.45%,100.38%,100.89%。RSD 分别为 0.36%,1.07%,0.87%,1.75%,1.49%,0.63%。

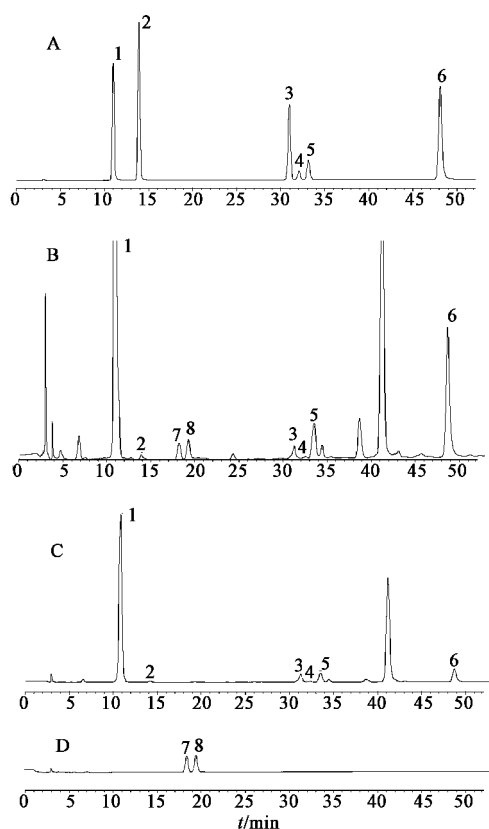
2.10 阴性对照试验 取除金银花以外的各原药材,按照 2.3 项下方法制备金芪降糖片阴性对照液,测定,见图 1。结果表明,本实验条件下,金芪降糖片中的黄芪、黄连等对实验结果没有影响。

2.11 样品含量测定 精密称取不同批金银花粉末各 0.2 g,按 2.2 项下制备金银花的提取液,并在 3 色谱条件下进行测定,结果见表 3。

表 3 金银花药材测定($n=2$) %

No.	绿原酸	咖啡酸	芦丁	金丝桃苷	木犀草苷	4,5- <i>O</i> -双咖啡酰奎宁酸
天津 1 ¹⁾	3.760	0.022	0.143	0.002 1	0.096	0.256
天津 2	2.518	0.025	0.128	0.001 3	0.112	0.348
天津 3	0.914	0.014	0.062	0.001 3	0.056	0.261
天津 4	1.877	0.016	0.181	0.002 9	0.096	0.317
天津 5	2.760	0.026	0.106	0.003 2	0.191	0.356
天津 6	3.611	0.012	0.161	0.002 9	0.044	0.258
河南	1.817	0.015	0.099	0.001 5	0.087	0.171
辽宁	2.554	0.014	0.143	0.001 9	0.086	0.269
广东	2.476	0.020	0.145	0.002 2	0.111	0.258
山东	2.744	0.022	0.159	0.002 0	0.108	0.254

注: ¹⁾ 为在天津不同药店购买。



A. 对照品; B. 供试品; C. 金银花药材; D. 阴性
1. 绿原酸; 2. 咖啡酸; 3. 芦丁; 4. 金丝桃苷;
5. 木犀草苷; 6. 4,5-O-双咖啡酰奎宁酸

图 1 金芪降糖片色谱

2.2 取金芪降糖片(每片平均片重为 0.407 g),分别按照 2.3 项下的方法处理,测定,结果见表 4。

3 讨论

《中国药典》中根据绿原酸,木犀草苷的含量对金银花进行质量控制,但除此 2 种成分外,金银花中异绿原酸等的含量亦比较高。本试验通过对 6 种成分的含量测定对金银花及金芪降糖片进行质量控制。

金银花中绿原酸,异绿原酸等稳定性较差,若放置时间过长或温度过高,会产生分解。因此,在配置和储存相关溶液时应尽量选用棕色瓶,并放置于冰

表 4 金芪降糖片测定

mg/片

批号	绿原酸	咖啡酸	芦丁	金丝桃苷	木犀草苷	4,5-O-双咖啡酰奎宁酸
0802263	6.386	0.042	0.127	0.014	0.237	1.518
0805358	6.395	0.042	0.126	0.014	0.240	1.519
0809304	6.371	0.039	0.127	0.014	0.235	1.521
0902417	6.297	0.040	0.125	0.013	0.238	1.522
0902422	6.269	0.040	0.130	0.014	0.236	1.518
0904435	6.300	0.035	0.131	0.017	0.241	1.513
0905459	6.394	0.044	0.128	0.009	0.237	1.517
0910498	6.416	0.039	0.127	0.011	0.237	1.522
0911475	6.201	0.040	0.122	0.010	0.235	1.518
0912506	6.353	0.041	0.127	0.012	0.239	1.518
1001514	6.397	0.042	0.128	0.014	0.240	1.515

箱储存。

考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 醋酸、乙腈-0.1% 磷酸和乙腈-0.4% 磷酸等流动相。甲醇-水峰分离度不好,乙腈-水峰略有拖尾,乙腈-0.1% 磷酸和乙腈-0.4% 磷酸峰的分离度和峰型均较好,考虑到 pH,选择乙腈-0.1% 磷酸。

参考文献

- [1] 中国药典. 一部 [S]. 2010:205.
- [2] 黄雄,李松林,李萍,等. HPLC 法同时测定金银花中 8 种黄酮的含量 [J]. 药学学报,2005,40(3):285.
- [3] 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建立及其应用 [J]. 中国药理学杂志,2005,40(10):780.
- [4] 马玲云,姚令文,马双成,等. HPLC 测定金银花药材中木犀草苷含量的优化 [J]. 药物分析杂志,2009,29(9):1496.
- [5] 李丽,田义杰,毛崇武,等. RP-HPLC 测定金银花 3 种成分的含量 [J]. 中成药,2008,30(1):134.
- [6] 张宇平,黄可龙. 高效液相色谱法同时测定金银花中 5 种有机酸 [J]. 分析实验室,2007,26(7):67.

责任编辑 蔡仲德