

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 C₁₈ (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⁻¹; 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, N₂ 气流流量 1.0 L · min⁻¹。结果: 线性范围内 3 个化合物呈良好的线性关系 (R² > 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**, QN 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 C₁₈ (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⁻¹. 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⁻¹ for macranthoidin B and dipsacoside B. **Results** Good linear regression (R² > 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、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^[1]。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^[2]。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^[4]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^[4]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^[5]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 C₁₈ (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⁻¹; 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, N₂ 气流量 1.0 L · min⁻¹。

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⁻¹, 灰毡毛忍冬皂苷乙浓度 2.16 mg · mL⁻¹, 川续断皂苷乙浓度 3.035 mg · mL⁻¹) 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) / μg · mL ⁻¹	线性方程 (linear regression equation)	R ² (n = 5)
绿原酸 (chlorogenic acid)	0.021 ~ 0.418	Y = 1.953 × 10 ⁴ 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 μ 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 μ 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 KR100-5C₁₈柱、Varian Pursuit C₁₈柱和 Phenomenex Gemini C₁₈柱等) 和流动相流速变化 (0.4~1.0 mL·min⁻¹) 对 3 个组分峰面

面积的影响。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 μ 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

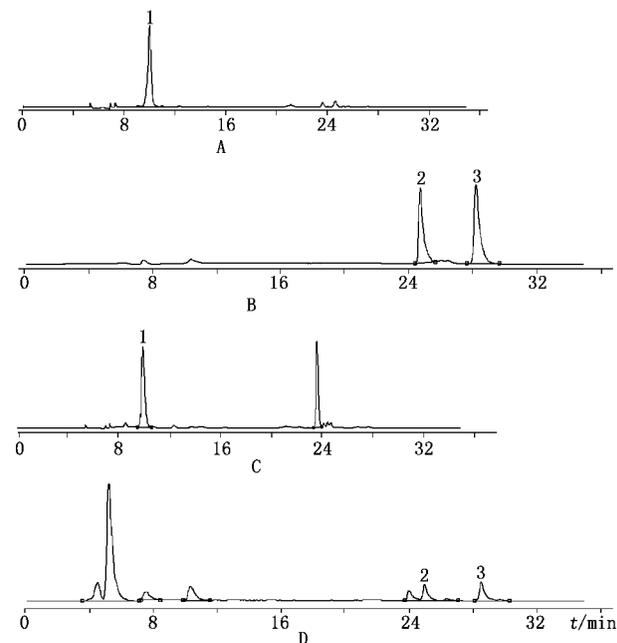


图 1 对照品绿原酸 (A)、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙 (B) 及马山山银花中绿原酸 (C)、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙 (D) 高效液相色谱图

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^[6]。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, N₂ 气流量 1.0 L·min⁻¹。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