

HPLC 法测定金银花中常春藤皂苷元、齐墩果酸、槲皮素、木犀草苷和绿原酸

张 雪^{1,2}, 何丙辉^{1*}, 杨 宪^{1,2}, 李隆云³

(1. 西南大学, 重庆 400716; 2. 重庆赛诺生物药业股份有限公司, 重庆 400041;

3. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘 要:目的 用反相高效液相色谱法, 同时测定重庆武陵山区金银花药材5种成分的量。方法 采用SHIMADZU C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱; 以乙腈-0.4%磷酸水溶液为流动相, 检测波长为210和350 nm, 进行梯度洗脱。结果 上述5种成分分离效果较好。结论 本法简单, 准确, 快速, 可同时测定金银花药材中5种成分的量。

关键词:金银花; HPLC; 常春藤皂苷元; 齐墩果酸; 槲皮素; 木犀草苷; 绿原酸

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)10-1576-02

金银花 *Lonicera japonica* Thunb. 为忍冬属 (*Lonicera* L.) 缠绕亚组的忍冬干燥花蕾或初开的花, 重庆地区主要集中在梁平、秀山等地^[1]。药理研究表明, 金银花具有抗病毒、解热、抗炎、保肝、止血、抗氧化、抗生育、降血脂作用^[2]。其化学成分有黄酮类如槲皮素和木犀草苷^[3], 有机酸类如绿原酸^[4], 三萜皂苷类如常春藤皂苷元和齐墩果酸等成分, 这5种成分都是解热抗炎作用的活性成分^[5]。故本实验采用高效液相紫外检测法, 建立了同时测定金银花中常春藤皂苷元、齐墩果酸、槲皮素、木犀草苷和绿原酸5种成分的方法, 为制定金银花药材的质量标准和开发更多的活性成分提供了科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂: 岛津2010系统高效液相色谱仪, 含四元梯度泵、自动进样器以及Labsolution色谱工作站, 二极管阵列检测器。甲醇、乙腈为色谱纯 (Tedia 公司, 美国), 水为纯化水。常春藤皂苷元、齐墩果酸、槲皮素、木犀草苷和绿原酸对照品均购自中国药品生物制品检定所。

1.2 采样: 样品于2007年8月中旬采集于重庆武陵山区, 在12个基地的每一个地方, 分别随机采集5年生金银花干燥花蕾或初开的花。由重庆市中药研究院生药教研室李隆云研究员鉴定。采集好的样品及时置于干燥、通风、无阳光照射处阴干。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 日本岛津 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 梯度洗脱, 流动相 A 乙腈-水 (85:15), B 为乙腈-0.4%磷酸溶液 (13:87), 梯度洗脱程序:

从 0~13 min, A 100%; 13~15 min, B 0~100%; 15~30 min, B 100%; 30~60 min, A 50%。体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长: 0~13 min 为 210 nm, 30~60 min 为 350 nm。柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液的制备: 取金银花药材, 干燥, 研细 (过四号筛), 精密称取约 0.5 g, 置圆底烧瓶中, 精密加入 1 mol/L 硫酸溶液 25 mL, 再加入甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 2 h 后, 放冷, 用甲醇补足损失的质量, 摇匀, 用微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取上述各对照品适量, 加 50% 甲醇溶解制成常春藤皂苷元、齐墩果酸约 0.51 mg/mL, 槲皮素为 0.021 mg/mL, 木犀草苷为 0.022 mg/mL, 绿原酸为 0.024 mg/mL 的各对照溶液。

2.4 方法的专属性: 在拟定的色谱条件下, 分别取对照品溶液和供试品溶液进样测定, 得到特征峰, 与杂质分离良好, 无干扰, 见图 1。

2.5 标准曲线制备: 分别精密吸取上述各对照品溶液, 按上述色谱条件测定, 分别进样 2、4、6、8、10 μL, 以峰面积 (Y) 为横坐标, 进样量 (X) 为纵坐标制工作曲线, 结果见表 1。

2.6 精密度试验: 精密量取各对照品溶液, 连续测量 6 次, 测得上述 5 种成分峰面积值, 结果表明, 以峰面积计算常春藤皂苷元 RSD 为 0.97%, 齐墩果酸 RSD 为 1.58%, 槲皮素 RSD 为 1.02%, 木犀草苷 RSD 为 0.86%, 绿原酸 RSD 为 0.58%, 表明精密度良好。

2.7 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别于 0、2、

收稿日期: 2007-12-03

基金项目: 科技部支撑计划项目 (2006BAI06A12-14)

作者简介: 张 雪 (1981—), 女, 研究生, 从事中药质量分析研究。

* 通讯作者 何丙辉 Tel: (023) 68251249 13752836711 E-mail: zhangxue0012003@163.com



1-常春藤皂苷元 2-齐墩果酸 3-槲皮素
4-木犀草苷 5-绿原酸
1-hederagenin 2-oleanolic acid 3-quercetin
4-luteolin-7-O-glucoside 5-chlorogenic acid

图1 5种成分对照品(A)和梁平产金银花药材样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of five mixed reference substances (A) and samples of *Flos Loniceræ Japonicæ* (B)

表1 回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficient, and measure range

对照品	回归方程	r	线性范围/ μg
常春藤皂苷元	$Y=5.68 \times 10^5 X + 2.37 \times 10^4$	0.999 9	1.18~29.25
齐墩果酸	$Y=4.04 \times 10^5 X - 3.56 \times 10^4$	0.999 8	1.12~26.24
槲皮素	$Y=3\ 168\ 159 X - 1\ 715$	0.999 9	0.237~2.372
木犀草苷	$Y=5\ 792 + 1\ 461.8 X$	0.999 1	0.201~2.614
绿原酸	$Y=1.95 \times 10^5 X - 4.77 \times 10^3$	0.999 8	0.085~0.820

4.8、12、24 h 进样,测得上述5种成分峰面积值,结果表明,以峰面积计算常春藤皂苷元 RSD 为 1.55%,齐墩果酸 RSD 为 1.38%,槲皮素 RSD 为 1.43%,木犀草苷 RSD 为 1.36%,绿原酸 RSD 为 1.45%,结果表明,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重现性试验:精密称取同批金银花药材 6 份,每份约 0.5 g,按“供试品溶液制备”项下操作,进样。测定并计算 5 种成分的质量分数,春藤皂苷元 RSD 为 1.37%,齐墩果酸 RSD 为 0.89%,槲皮素为 1.47%,木犀草苷 RSD 为 0.72% 和绿原酸 RSD 为 1.23%。

2.9 回收率试验:采用加样回收法。取已知质量分数的同批样品 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,按拟定的定量方法试验,精密加入各对照品溶液适量,按“供试品溶液制备”项下操作,测定并计算各成分的回收率,结果 5 种成分平均回收率分别为 98.18%、99.24%、99.01%、99.25%、100.08%,RSD 分别为 2.1%、1.8%、0.73%、1.15%、0.99%。

2.10 样品测定:取所收集的 12 批重庆地区不同产地的金银花药材,按“供试品溶液”制备项下操作,进样,测得上述 5 种成分的质量分数,结果见表 2。

3 讨论

绿原酸的 50% 甲醇溶液应避光阴凉处保存,否则峰面积会有所改变而影响测定的准确性。从测定

表2 金银花药材中常春藤皂苷元、齐墩果酸、槲皮素、木犀草苷和绿原酸的测定结果(n=3)

Table 2 Contents of hederagenin, oleanolic acid, quercetin, luteolin-7-O-glucoside, and chlorogenic acid in *Flos Loniceræ Japonicæ* (n=3)

产地	常春藤皂苷元/%	齐墩果酸/%	槲皮素/%	木犀草苷/%	绿原酸/%
梁平	0.75	0.13	0.91	0.84	1.68
酉阳	0.42	0.12	0.63	0.17	2.05
石柱	0.45	0.16	0.16	0.078	1.84
云阳	0.49	0.17	0.21	0.19	1.92
巫山	0.59	0.25	0.34	0.16	1.87
黔江	0.74	0.28	0.18	0.20	1.94
秀山	0.81	0.20	0.21	0.19	2.26
南川	0.35	0.24	0.22	0.16	2.03
涪陵	0.78	0.25	0.23	未检出	2.16
丰都	0.79	0.23	0.35	0.24	1.64
彭水	0.65	0.28	0.46	0.30	2.19
奉节	0.66	0.26	0.37	0.67	1.54

结果来看(表2),不同产地的金银花样品中常春藤皂苷元、木犀草苷量差别较大。

三萜皂苷类成分是金银花的另一类有效成分。为了全面评价药材的质量,有必要同时对金银花药材中的三萜皂苷类成分进行定量分析。本实验建立了先采用硫酸水解金银花药材中的三萜皂苷类成分,这样就能用高效液相色谱法测定金银花药材中的常春藤皂苷元和齐墩果酸量。

通过对样品在 190~400 nm 的三维色谱图和各对照品的最大吸收波长的测定,以 50% 甲醇为溶剂,结果槲皮素最大吸收波长在 360 nm 处;木犀草苷最大吸收波长在 350 nm 处;绿原酸最大吸收波长在 327 nm 处;齐墩果酸和常春藤皂苷元最大吸收波长在 210 nm 处;对 4 个波长下的色谱图进行比较,发现选用 210、350 nm 两种检测波长时,基线较稳,且能最大限度地显示出药材中所含的样品信息,故选用 210、350 nm 两波长作为测定波长。

实验中考察了不同系统的流动相,包括甲醇-水(含 0.2 mol/L 的冰醋酸水溶液)、乙腈-水(含 0.4% 的磷酸水溶液)、甲醇-乙腈-水系统。结果表明以乙腈-水(含 0.4% 的磷酸水溶液)效果为最好,各类药主要成分在 60 min 内洗脱,且得到良好的分离。

参考文献:

- [1] 苟占平,万德光. 四川忍冬属药用植物资源调查[J]. 华西药理学杂志, 2005, 20(6): 480-482.
- [2] 梁生旺,崔永霞,王淑美,等. 金银花的 HPLC 药效指纹图谱研究[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1489-1493.
- [3] 方传代,邹盛勤. 反相高效液相色谱法测定金银花中黄酮类成分的含量[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(11): 2321-2322.
- [4] 刘恩荔,李青山. 大孔吸附树脂分离纯化金银花中总有机酸的研究[J]. 中草药, 2006, 37(12): 1972-1976.
- [5] 马双成,刘燕,毕培曦,等. RP-HPLC 法测定金银花药材中常春藤皂苷元及齐墩果酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 885-887.