

不同种质金银花中有机酸类及苷类成分的测定

沈娟^{1,2}, 崔培超¹, 王永香^{1,2}, 张桥^{1,2}, 李家春^{1,2}, 毕宇安^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定不同种质资源金银花中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸等7种有机酸及断氧马钱子苷的量。**方法** 采用高效液相色谱法测定, 色谱条件为phenomenex C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相0.1%磷酸溶液和甲醇采用梯度洗脱, 检测波长225 nm, 体积流量0.8 mL/min。**结果** 金银花中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸及断氧马钱子苷在各自的线性范围内均呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为99.41%、99.05%、99.01%、98.71%、98.79%、98.82%、98.89%、99.16%, RSD分别为0.56%、0.37%、0.93%、1.11%、0.90%、0.87%、0.71%、1.04%。**结论** 该方法快速、简便、准确, 可用于不同种质金银花中7种有机酸及断氧马钱子苷的定量测定。

关键词: 金银花; 种质资源; 高效液相色谱法; 有机酸; 断氧马钱子苷; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 3,4-二咖啡酰奎尼酸; 3,5-二咖啡酰奎尼酸; 4,5-二咖啡酰奎尼酸

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)20-2993-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.023

Determination of organic acids and glycosides in different species of *Lonicerae Flos*

SHEN Juan^{1,2}, CUI Pei-chao¹, WANG Yong-xiang^{1,2}, ZHANG Qiao^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, BI Yu-an^{1,2},
WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To determine and compare the contents of seven kinds of organic acids (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, 4-dicaffeoylquinic acid, caffeic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-dicaffeoylquinic acid) and secoxyloganin in *Lonicerae Flos*. **Methods** The contents were determined by HPLC. The analysis was carried out with gradient elution on a Phenomenex C₁₈ column eluted with methanol and 0.1% phosphoric acid. The detection wavelength was set at 225 nm. **Results** Neochlorogenic acid, chlorogenic acid, 4-dicaffeoylquinic acid, caffeic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-dicaffeoylquinic acid in *Lonicerae Flos* and secoxyloganin in their linear ranges showed good linear relationship, the average recoveries ($n=9$) were 99.41%, 99.05%, 99.01%, 98.71%, 98.79%, 98.82%, 98.89%, and 99.16%, and RSD values were 0.56%, 0.37%, 0.93%, 1.11%, 0.90%, 0.87%, 0.71%, and 1.04%. **Conclusion** The method is rapid, simple, accurate, and can be used for quality evaluation of the seven kinds of organic acids in *Lonicerae Flos* from different germplasm and secoxyloganin.

Key words: *Lonicerae Flos*; germplasm resources; HPLC; organic acid; secoxyloganin; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; 4-dicaffeoylquinic acid; caffeic acid; 3,4-dicaffeoylquinic acid; 3,5-dicaffeoylquinic acid; 4,5-dicaffeoylquinic acid

金银花 *Flos Loniceræ* 又名银花、双花、忍冬, 为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 性味甘寒, 归肺、心胃经, 具有清热解毒, 疏散风热之功效, 用于痈肿疮疖、

喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等症^[1-2], 为临床常用中药。金银花含黄酮类、有机酸、肌醇、皂苷及鞣质等^[3-4], 有机酸及挥发油是金银花的主要有效成分。绿原酸常作为金银花质量控制^[5]的指标

收稿日期: 2014-02-19

基金项目: 科技部重大新药创制: 现代中药创新集群与数字制药技术平台(2013ZX090402203)

作者简介: 沈娟(1980—), 女, 工程师, 主要从事中药材规范化种植与质量标准研究。Tel: (0518)81152322 E-mail: sample221@163.com

*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337/13905136437 E-mail: wzhhz-nj@163.net

成分,但还不能全面地反映金银花药材的内在质量。为全面控制金银花药材的质量,选取江苏省东海县金银花规范化种植基地药材为研究对象,建立了高效液相色谱法同时测定江苏东海不同种质资源金银花中7种有机酸:新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸及断氧马钱子苷量的方法^[6-10]。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),真空脱气机,自动进样器,柱温箱,紫外检测器(MWD),Agilent 化学工作站;Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);Sartorius ME5 型电子分析天平(赛多利斯公司,百万分之一);Sartorius BP121s 型电子天平(赛多利斯公司,万分之一);KQ—250DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药

绿原酸(110753-200412)、咖啡酸(110885-200102)购于中国食品药品检定研究院,批号,新绿原酸对照品(09070125,质量分数≥97.0%)、隐绿原酸对照品(S09080721,质量分数≥98.0%)、3,4-二咖啡酰奎尼酸对照品(09070123,质量分数≥97.0%)、3,5-二咖啡酰奎尼酸对照品(09070122,质量分数≥96.0%)、4,5-二咖啡酰奎尼酸对照品(09070124,质量分数≥97.0%)均由上海同田生物技术有限公司提供;断氧马钱子苷对照品(实验室自制,批号20090802,质量分数≥98.0%)。甲醇和磷酸为分析纯;色谱甲醇为色谱纯;水为超纯水。

1.3 金银花种质

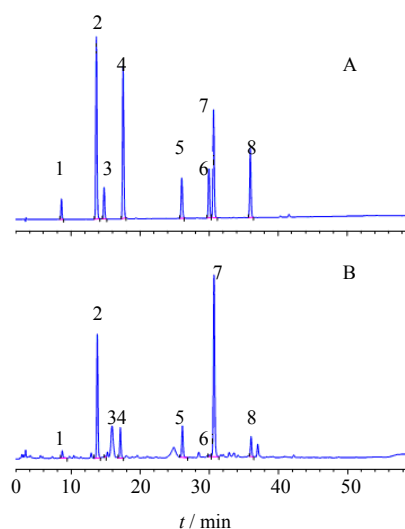
金银花由江苏省连云港市东海县连云港康缘生态农业发展有限公司种质资源圃提供9个不同种质,所有种质均于2009年至2011年11月采自山东省平邑县、河南省封丘县、河北省巨鹿县及湖南省隆回县,经中国中医科学院中药研究所黄璐琦研究员鉴定忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的品种为大毛花、鸡爪花、九丰一号、四季金银花、豫金一号、巨花一号、亚特以及同属品种红腺忍冬 *L. hypoglauca* Miq. 和灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* Hand. -Mazz., 二白期采摘,烘房

烘干后,粉碎成粉末(过四号筛)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱0~50 min,20%~60%A;50~60 min,60%A;柱温为30℃;检测波长为225 nm,体积流量0.8 mL/min。理论板数按绿原酸峰计算应不低于10 000。在此色谱条件下,7种有机酸及断氧马钱子苷与供试品中其他成分均达到较好分离。供试品溶液与混合对照品溶液的色谱图见图1。



1-新绿原酸 2-绿原酸 3-隐绿原酸 4-咖啡酸 5-断氧马钱子苷 6-3,4-二咖啡酰奎尼酸 7-3,5-二咖啡酰奎尼酸 8-4,5-二咖啡酰奎尼酸

1—5-caffeoylquinic acid 2-chlorogenic acid 3-cryptochlorogenic acid 4-caffeic acid 5-secoxyloganin 6-3,4-dicaffeoylquinic acid 7-3,5-dicaffeoylquinic acid 8-4,5-dicaffeoylquinic acid

图1 对照品混合物(A)及样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substance mixtures (A) and sample (B)

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取7种有机酸和断氧马钱子苷对照品适量,混合后用50%甲醇超声溶解并定容,制成含新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧马钱子苷、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸分别为450.72、445.02、460.80、424.80、442.40、480.00、478.80、464.40 μg/mL的混合溶液,作为混合对照品贮备液。

2.3 供试品溶液的制备

取金银花及同属品种粉末(过四号筛)约0.5 g,

精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇溶液 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 即得。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品贮备液 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 加 50% 甲

醇制成一系列不同质量浓度的混合对照品溶液。精密吸取前述对照品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 记录峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 将所得数据进行线性回归。结果表明, 在上述质量浓度范围内, 峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, 结果见表 1。

表 1 线性关系测定结果

Table 1 Results of linear relationship

成分	线性方程	r	线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
新绿原酸	$Y=22.402 X+29.373$	0.999	4.507~450.720
绿原酸	$Y=23.964 X+71.450$	0.999	4.450~445.020
隐绿原酸	$Y=21.870 X+44.257$	0.999	4.608~460.800
咖啡酸	$Y=47.562 X-26.799$	1.000	2.124~214.400
断氧马钱子苷	$Y=16.000 X-6.147$	0.999	4.424~442.400
3, 4-二咖啡酰奎尼酸	$Y=20.745 X+120.750$	0.999	4.800~480.000
3, 5-二咖啡酰奎尼酸	$Y=29.291 X+45.718$	1.000	4.788~478.800
4, 5-二咖啡酰奎尼酸	$Y=28.270 X+104.270$	0.999	4.644~464.400

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧马钱子苷、3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸、4, 5-二咖啡酰奎尼酸峰面积的 RSD 分别为 1.01%、0.92%、1.12%、0.88%、0.97%、1.22%、1.33%、0.82%。

2.6 重复性试验

取大毛花样品一式 6 份, 精密称定, 按供试品溶液制备项下依法操作, 测定, 结果表明本方法重复性较好, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧马钱子苷、3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸、4, 5-二咖啡酰奎尼酸质量分数的 RSD 分别为 1.66%、1.31%、1.55%、1.80%、1.27%、1.43%、1.60%、1.74%。

2.7 稳定性试验

取大毛花供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析测定, 结果表明, 在 0~24 h 内供试品溶液中各色谱峰基本稳定, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧马钱子苷、3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸、4, 5-二咖啡酰奎尼酸峰面积的 RSD 分别为 0.72%、0.91%、1.02%、0.85%、1.17%、0.74%、1.11%、0.84%。

2.8 加样回收率试验

取大毛花供试品 0.2 g, 共 9 份, 精密称定, 以

3 份为一组, 分别精密加入对照品溶液适量, 按供试品溶液制备项下方法操作, 作为 3 个质量浓度添加水平的加样回收, 测定, 计算各成分的回收率, 结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧马钱子苷、3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸、4, 5-二咖啡酰奎尼酸的回收率分别为 99.41%、99.05%、99.01%、98.71%、98.79%、98.82%、98.89%、99.16%, RSD 分别为 0.56%、0.37%、0.93%、1.11%、0.90%、0.87%、0.71%、1.04%。

2.9 样品测定

取不同种质的金银花或 2 个同属品种样品按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 参照“2.1”项色谱条件测定, 结果见表 2。

2.10 结果分析

由表 2 可以看出, 为江苏东海县金银花基地所种金银花各种质绿原酸量 1.8%~2.8%, 均高于《中国药典》2010 年版金银花测定绿原酸量项 $\geq 1.5\%$, 属优质品种, 再结合各种质间产量对比即可优选出符合当地种植的高产优良品种。

同属品种山银花—灰毡毛忍冬的绿原酸为 3.7%, 3, 4-二咖啡酰奎尼酸 3.0%, 远高于金银花各品种; 观赏性的红腺忍冬中断氧马钱子苷量是各忍冬种质的 3.8~15 倍, 均出现了单成分优势, 可用于绿原酸、3, 4-二咖啡酰奎尼酸与断氧马钱子苷的提取。

表2 不同种质金银花样品测定结果

Table 2 Determination of samples from different species of *Lonicerae Flos*

品种	质量分数 / (mg·g ⁻¹)							
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	断氧马钱子苷	3, 4-二咖啡酰奎尼酸	3, 5-二咖啡酰奎尼酸	4, 5-二咖啡酰奎尼酸
大毛花	0.51	28.28	1.07	1.09	5.69	13.95	0.93	1.54
鸡爪花	0.01	22.24	1.08	0.89	2.13	10.02	1.21	1.52
九丰一号	0.48	18.02	0.78	1.37	8.50	17.86	0.91	2.46
四季花	0.35	28.06	0.90	0.81	4.46	14.35	0.99	2.02
豫金一号	0.15	24.04	1.37	0.64	3.41	13.48	1.05	1.53
巨花一号	0.40	21.75	0.63	1.04	6.55	16.23	0.88	1.95
亚特	0.40	25.13	1.32	0.64	4.84	10.04	1.05	1.17
红腺忍冬	0.21	19.12	0.29	3.10	32.30	5.08	0.53	0.93
灰毡毛忍冬	0.02	37.53	0.18	2.43	8.54	30.52	0.09	2.20

3 讨论

本实验通过有机酸与断氧马钱子苷的最大吸收波长测定,并结合其他成分影响,确定波长为 225 nm;通过对流动相组成、梯度洗脱条件、柱温、体积流量、不同品牌及柱长的色谱柱的分离情况进行了比较,结果表明采用本实验所述条件,各种质金银花均可以获得分离效果较为满意的色谱图。

本实验建立了高效液相色谱法同时测定各种质金银花中有机酸类及苷类量的方法,方法简单,准确度和重复性均较好,为金银花药材的质量控制提供了参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 葛冰, 卢向阳, 易克, 等. 金银花活性成分、药理作用及其应用 [J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(5): 13-16.
- [3] 王天志, 李永梅. 金银花的研究进展 [J]. 华西药学报, 2000, 15(4): 292.
- [4] 张燕, 王文全, 郭兰萍, 等. 不同采收期金银花的产量和质量研究 [J]. 中草药, 2013, 44(18): 2611-2614.
- [5] 刘雄, 高建德. 金银花质量控制、化学成分及药理学研究进展 [J]. 甘肃中医学院学报, 2006(4): 68-71.
- [6] 杨荣, 周晶, 宁娜, 等. RP-HPLC 法测定金银花及金芪降糖片中的绿原酸 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 237-240.
- [7] 邢丽红, 李文龙, 瞿海. 金银花提取物中 5 种有机酸含量测定的紫外光谱法 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 547-551.
- [8] 王建寰, 张霞. 高效液相色谱法测定金银花中 4 种有机酸含量 [J]. 宁夏医科大学学报, 2013, 35(3): 350-352.
- [9] 秦双双, 袁媛. 金银花及其变种有效成分含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 81-82.
- [10] 李淼, 王永香, 孟谨, 等. HPLC 法测定金银花中新绿原酸等 8 种成分的量 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 1006-1010.