HPLC 法测定金银花中 8 种成分的量

李　淼[1, 2]，王永香[1, 2]，孟　谨[1, 2]，付小环[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　建立测定金银花药材中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、断氧化马钱子苷 8 种成分的 HPLC 方法。**方法**　采用 RP-HPLC 法，色谱柱为 Luna 5 μ C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱，0～20 min，12%～30% A；20～60 min，30%～50% A，体积流量 1.0 mL/min；检测波长 237、324 nm，柱温 30 ℃。**结果**　8 种成分均达到基线分离，各成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系（r＞0.999 9）；回收率在 98.72%～102.50%。**结论**　本方法准确灵敏、重复性好，能较全面地评价金银花药材的质量。

关键词：金银花；新绿原酸；绿原酸；隐绿原酸；咖啡酸；断氧化马钱子苷

中图分类号：R286.022　　　**文献标志码：**A　　　**文章编号：**0253 - 2670(2014)07 - 0 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.07.

Determination of eight components in *Lonicera japonica* by HPLC

LI Miao[1, 2], WANG Yong-xiang[1, 2], MENG Jin[1, 2], FU Xiao-huan[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 establish an HPLC method for simultaneously determining eight components such as neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C, and secoxyloganin in *Lonicera japonica*. **Methods**　An RP-HPLC method was established with Luna C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column by a gradient elution using methanol and 0.1% phosphoric acid; The flow rate was 1.0 mL/min with double wavelength (237 and 324 nm), and the column temperature was 30 ℃. **Results**　Baseline of eight components was separated; Each component had a wide linear range and a good linear relationship (r > 0.999 8); the recoveries were 98.72% to 102.50%. **Conclusion**　The method is accurate, sensitive, reliable, and with good reproducibility. It could be used for the quality control of *L. japonica*.

Key words: *Lonicera japonica* Thunb; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; secoxyloganin

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb 的干燥花蕾或带初开的花。作为一种传统中草药，它有清热解毒、疏散风热之功效，临床用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等症[1]。金银花原产我国，在各省均有分布，是温带及亚热带树种，适应性很强，喜阳、耐阴，耐寒，也耐干旱和水湿，根系繁密发达，萌蘖性强，茎蔓着地即能生根。每年春夏 2 次发梢，在当年生新枝上孕蕾开花。现有研究表明，金银花中含有多种有机酸类成分均为活性成分[2]。《中国药典》2010 年版一部采用 HPLC 法只测定了绿原酸与木犀草苷的量，为更好地控制金银花的质量，本实验建立了测定金银花中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 和断氧化马钱子苷 8 种成分[3-6]的 HPLC 法，具有简便可行，准确、快速的特点。本实验所建立的色

收稿日期：2013-11-30

基金项目：国家科技部国家重大新药创制专项“现代中药创新集群与数字制药技术平台”（2013ZX09402203）

作者简介：李　淼（1982—），女，工程师，主要从事中药制药新技术和工艺过程研究。E-mail: limiao4569092@126.com

***通信作者**　萧　伟，博士，高级工程师，主要从事中药制剂和创新中药的开发与研究。

Tel: (0518)81152337/13905136437　E-meil: wzhzh-nj@163.net

谱条件及样品处理方法也为测定金银花中有机酸类及环烯醚萜苷类成分[7]的定量研究提供了方法学参考。

1　仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司，包括二元泵，自动进样器，DAD 紫外检测器）；JK—250DB 型数控超声波清洗器（合肥金尼克机械制造有限公司）；HY—04B 型高速粉碎机（北京环亚天元机械技术有限公司）；Satorius BP 211D 电子分析天平（德国 Sartorius 公司 0.01 mg）；Mettler TOLEDO AB 204—S 电子分析天平（METTLER TOLEDO 仪器有限公司 0.1 mg）；USA 纯净水发生器。

绿原酸（批号 110753-200413，质量分数≥98%）、咖啡酸（批号 110885-200102，质量分数≥98%）对照品由中国食品药品检定研究院提供，异绿原酸 A（批号：A0025）、异绿原酸 B（批号：071130）、异绿原酸 C（批号：MUST-09041001）、隐绿原酸（批号：905997）、新绿原酸（批号：MUST-10091501）对照品由成都曼思特生物科技有限公司提供，质量分数均质量分数≥98%；断氧化马钱子苷对照品为自制，经色谱法检测质量分数在98%以上（面积归一化）。甲醇为色谱纯（上海星可生化有限公司），甲醇、磷酸（分析纯，南京化学试剂有限公司），水为超纯水。金银花采自江苏东海县和山东平邑县 2 个产地，共 18 批，经康缘大药房吴舟经理鉴为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb 的干燥花。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱为 phenomenex Luna 5μ C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇（A）-0.1%磷酸水溶液（B），梯度洗脱：0～20 min，12%～30% A；20～60 min，30%～50% A；体积流量 1.0 mL/min，进样量 10 μL，检测波长 237 nm、324 nm，柱温 30 ℃。

2.2　溶液的制备

2.2.1　混合对照品溶液制备　分别称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、断氧化马钱子苷、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 对照品 5.90、16.79、5.26、4.88、4.58、8.46、4.64、7.03 mg，置于 20 mL 容量瓶中，加入 50%甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度分别为 295.00、839.50、263.00、244.00、229.00、423.00、232.00、351.50 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2　供试品溶液制备　供试品溶液 a：取金银花粉末（过四号筛）约 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50%甲醇 50 mL，称定质量，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用 50%甲醇补足减失的质量，滤过，弃去初滤液，取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜，得滤液即得供试品溶液。供新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 C 和断氧化马钱子苷量测定用。

供试品溶液 b：精密量取上述供试品溶液 a 5.0 mL，置 25 mL 量瓶中，加 50%甲醇稀释至刻度摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液即得供试品溶液。供绿原酸和异绿原酸 A 量测定用。

2.3　系统适应性试验

分别精密吸取混合对照品溶液及供试品溶液各 10 μL，按“2.1”项色谱条件分析，结果见图 1。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、断氧化马钱子苷、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 与其相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，拖尾因子在 1.00～1.10，理论塔板数以各色谱峰计均在 10 000 以上。

2.4　线性关系考察

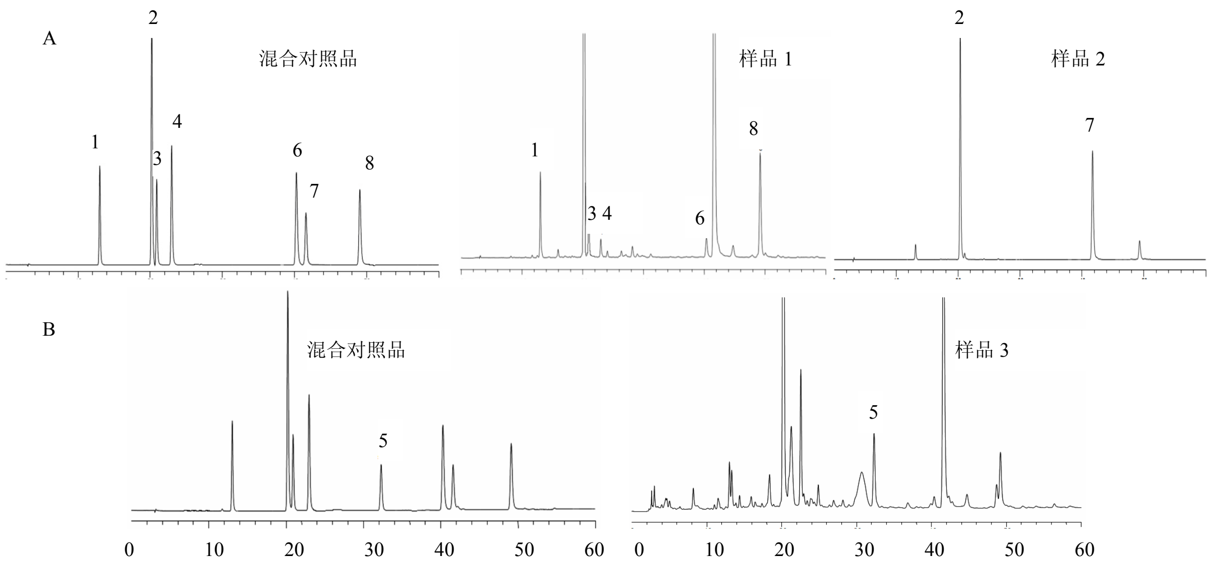
精密量取对照品混合溶液 0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、4.0、和 10.0 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加 50%甲醇定容至刻度，摇匀，分别按照“2.1”项下色谱条件依次进样，记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标（*Y*），对照品质量浓度为横坐标（*X*），绘制标准曲线，进行线性回归。回归方程及线性范围见表 1。结果表明，各对照品在各自质量浓度范围内线性关系良好。

2.5　精密度试验

精密吸取混合对照品溶液，分别在“2.1”项色谱条件下重复进样 6 次，进样体积为 10 μL，以对照品峰面积进行计算，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、断氧化马钱子苷峰面积的 RSD 分别为 0.19%、0.28%、0.35%、0.31%、0.18%、0.69%、0.26%、0.47%。

2.6　稳定性试验

取待测金银花（批号 110801）供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件操作，分别在 0 h、2 h、4 h、6h、8 h、12 h、24 h 进样，测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异



1-新绿原酸　2-绿原酸　3-隐绿原酸　4-咖啡酸　5-断氧化马钱子苷　6-异绿原酸 B　7-异绿原酸 A　8-异绿原酸 C

1-neochlorogenic acid　2-chlorogenic acid　3-cryptochlorogenic acid　4-cafferic acid　5-secoxyloganin　6-isochlorogenic acid B　7-isochlorogenic acid A　8-isochlorogenic acid C

图 1　324 nm（A）和 237 nm 波长（B）下混合对照品和样品的 HPLC 图

Fig. 1　HPLC of mixed reference substances and samples at wavelengths of 324 (A) and 237 (B) nm

表 1　线性关系考察结果

Table 1　Results of linear relationship

成分	回归方程	r^2	线性范围 / μg
新绿原酸	Y＝29.659 4 X－10.551 9	0.999 9	0.030～2.950
绿原酸	Y＝29.39 X＋11.52	1.000 0	0.084～8.395
隐绿原酸	Y＝30.859 8 X－9.634 2	0.999 9	0.026～2.630
咖啡酸	Y＝54.33 X－12.60	1.000 0	0.023～2.290
异绿原酸 B	Y＝31.967 1 X－34.270 3	0.999 9	0.042～4.230
异绿原酸 A	Y＝34.799 9 X－29.400 2	0.999 9	0.023～2.320
异绿原酸 C	Y＝35.503 1 X－46.247 8	0.999 9	0.035～3.515
断氧化马钱子苷	Y＝14.825 7 X－2.465 5	0.999 9	0.024～2.440

绿原酸 C、断氧化马钱子苷的峰面积，按峰面积计算得 RSD 分别为 1.23%、0.47%、1.27%、1.86%、1.59%、0.69%、0.36%、0.81%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7　重复性试验

取同一批次(批号 110801)金银花粉末约 1.0 g，平行称定 6 份，按“2.2”项下方法操作，制备供试品溶液 12 份，每份精密吸取 10 μL 按“2.1”项下色谱条件测定，分别测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、断氧化马钱子苷质量分数 RSD 分别为 1.30%、0.89%、1.90%、1.00%、1.86%、1.45%、0.97%、1.94%。

2.8　加样回收率试验

取已测定的金银花药材（批号 110801）粉末 6 份，每份 0.5 g，精密称定，每份加入相同量的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 和断氧化马钱子苷对照品，按“2.2”项下方法操作，制备供试品溶液，按“2.1”项下条件测定，结果平均回收率分别为 98.72%、99.58%、100.69%、100.35%、99.97%、100.36%、102.50%、99.98%，RSD 分别为 1.21%、0.62%、1.05%、1.43%、1.08%、0.63%、

0.80%、1.02%。

2.9 样品测定

取江苏东海县与山东平邑县 2 个产地，不同批号的金银花药材，分别称取金银花粉末约 1.0 g，精密称定，按“2.2”项下方法操作，制备供试品溶液，每个批号 3 份，按“2.1”项下色谱条件进行测定，并计算样品中 8 种成分的质量分数，结果见表 2。

表 2 金银花药材中 8 种成分测定结果 ($n = 3$)

Table 2 Determination of eight components in *L. japonica* ($n = 3$)

产地	批号	质量分数 / ($mg \cdot g^{-1}$)							
		新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	断氧化马钱子苷
江苏东海	110801	1.61	26.47	0.51	0.21	0.63	16.03	2.97	3.82
	120525	1.55	26.15	0.64	0.16	0.58	16.85	1.76	5.03
	120612	1.65	25.85	0.70	0.25	0.61	16.93	3.70	4.24
	130606	1.52	30.21	0.54	0.20	0.54	15.90	2.27	4.06
	130622	1.60	25.49	0.61	0.17	0.60	16.21	1.90	4.31
	130716	1.62	28.93	0.57	0.24	0.57	15.98	2.03	4.37
	130815	1.50	27.86	0.62	0.22	0.64	16.02	2.17	3.96
	130821	1.58	26.31	0.52	0.16	0.61	16.11	2.41	4.72
	130903	1.60	29.40	0.66	0.20	0.62	16.35	2.81	4.35
山东平邑	110716	1.19	27.80	0.67	0.12	0.54	15.90	2.27	3.52
	120601	1.13	26.73	0.60	0.19	0.64	16.07	2.01	3.47
	120623	1.06	25.36	0.55	0.24	0.50	15.21	1.93	4.02
	130602	0.96	28.15	0.52	0.20	0.61	16.78	2.18	4.21
	130613	1.08	27.31	0.61	0.18	0.59	16.02	2.05	4.15
	130708	0.82	30.11	0.68	0.23	0.60	15.59	2.20	3.58
	130712	1.20	26.57	0.60	0.17	0.53	16.17	1.97	3.61
	130809	1.13	29.42	0.52	0.20	0.51	16.35	2.18	4.07
	130811	1.07	27.83	0.63	0.21	0.62	16.09	2.30	4.22

3 讨论

本实验比较了甲醇-水、甲醇-醋酸水溶液、甲醇-磷酸水溶液洗脱系统，结果表明以甲醇-0.1%磷酸水溶液洗脱系统分离效果最好。又分别比较了甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.2%磷酸水溶液洗脱系统，结果表明两者无明显差别，故选用甲醇-0.1%磷酸水溶液洗脱系统。

在样品处理过程中，参照《中国药典》2010 年版金银花定量测定项下的样品处理方法，比较甲醇、50%甲醇、水 3 种提取溶媒，结果表明以 50%甲醇为最佳提取溶媒；以 50%甲醇为提取溶媒，比较了 3 种不同的提取方面，冷浸法、回流提取法、超声提取法，结果超声提取法的提取率明显优于前两种提取方法；采用超声提取法，分别考察了加入 40、50、60、70 mL 50%甲醇的提取效果，结果表明 50、60、70 mL 提取量无明显差别，故选择 50 mL 50%甲醇进行提取；采用超声提取法，加入 50 mL 50%甲醇，又分别考察了提取 10、15、30、45、60 min 的提取效果，结果表明从超声 30 min 后，延长提取时间，提取量无明显差别，故提取时间选择 30 min；由于金银花中绿原酸与异绿原酸 A 量较高，故在供试品处理过程中取续滤液稀释后检测其量。

在测定波长的选择上，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的最大吸收波长为 324 nm。在此波长下，样品中该七种有机酸成分的峰响应较高，与其他杂质峰分离度符合要求。断氧化马钱子苷的紫外光谱显示其最大吸收波长为 237 nm，故确定其量测定波长为 237 nm。

仅选用一种或两种成分作为评价其质量优劣的指标，已经不能满足中药材质量标准研究的需要，应尽可能多地对其成分进行研究，而大量成分分别

检测耗时、耗力，效率低下，故同时测定多种成分量的方法，是实现中药材有效质控的重要方法之一。本实验建立了 HPLC 法测定其中 8 种成分的方法，避免了测定单个成分的繁琐步骤。

样品测定选取了江苏东海县、山东平邑县 2 个产地不同批次的金银花药材，从 8 种成分的量来看，仅新绿原酸量稍有差异其他成分并无显著性差别，分析可能与两地地域接壤、环境差别不大有关。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 王力川. 金银花的化学成分及功效研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(5): 2036-2037.

[3] 毕宇安, 王振中, 宋爱华, 等. 热毒宁注射液高效液相色谱指纹图谱研究及多成分定量分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(2): 298-303.

[4] 何 兵, 杨世艳, 张 燕. 金银花提取物多指标成分含量及指纹图谱同时检测研究 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(16): 1280-1284.

[5] 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.

[6] 孟晓岩, 丁 勇. 高效液相色谱法同时对金银花中 5 种有效成分的含量测定 [J]. 实用药物与临床, 2012, 15(2): 93-94.

[7] 毕跃峰, 田 野, 裴珊珊, 等. 金银花中裂环环烯醚萜苷类化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 18-21.