

文章编号:1001-6880(2015)01-0089-05

# UHPLC 法同时测定金银花中 6 种有效成分的含量

韩永成, 刘伟\*, 陈宁, 崔永霞, 黄丽杰

河南中医学院分析测试中心, 郑州 450008

**摘要:**本实验建立了 UHPLC 同时测定不同产地金银花中绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 含量的分析方法。采用 Agilent 1290 超高效液相色谱系统, Agilent ZORBAX RH C<sub>18</sub> 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水, 以 0.2 mL/min 的流速进行梯度洗脱, 柱温 30 °C, 检测波长 350 nm。结果表明在该色谱条件下, 金银花的 6 种有效成分在 8 min 内可达到基线分离。方法的加样回收率为 96.88% ~ 99.16%, 相对标准偏差为 0.23% ~ 1.06%。UHPLC 法分析速度快, 重复性好, 结果准确, 可用于金银花中绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的含量测定。

**关键词:**金银花;UHPLC;绿原酸;芦丁;木犀草苷;异绿原酸 A;异绿原酸 B;异绿原酸 C

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.019

## Simultaneous Determination of Six Compounds in *Lonicera japonica* Thunb by UHPLC

HAN Yong-cheng, LIU Wei\*, CHEN Ning, CUI Yong-xia, HUANG Li-jie

Center of Analysis and Measurement, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

**Abstract:** To establish an UHPLC method for simultaneous determination of six compounds, namely chlorogenic acid, rutin, luteoloside, 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 3,4-O-dicaffeoylquinic acid and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid in *Lonicera japonica* Thunb from different areas. The chromatographic separation was performed on an Agilent ZORBAX RH C<sub>18</sub> (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column with gradient elution. The flow rate was 0.2 mL/min. The column temperature was 30 °C. The detection wavelength was 350 nm. The recoveries of rutin, luteoloside and four kinds of organic acids were 96.88% -99.16%, and the relative standard deviations were 0.23% -1.06%. The developed UHPLC method was reproducible, accurate and efficient. It can be used for the simultaneous detection and determination of chlorogenic acid, rutin, luteoloside, 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 3,4-O-dicaffeoylquinic acid, 4,5-O-dicaffeoylquinic acid in *L. japonica*.

**Key words:** *Lonicera japonica* Thunb; UHPLC; chlorogenic acid; rutin; luteoloside; 3,5-O-dicaffeoylquinic acid; 3,4-O-dicaffeoylquinic acid; 4,5-O-dicaffeoylquinic acid

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<sup>[1]</sup>。金银花含有绿原酸、咖啡酸、异绿原酸、阿魏酸、木犀草苷、芦丁、金丝桃苷、忍冬苷、槲皮素等成分<sup>[2]</sup>。现代药理实验研究证明其具有广谱抗菌、解热消炎作用, 相关文献报道较多<sup>[3-5]</sup>。

目前, 同时测定金银花中有机酸和黄酮类含量的文献报道较少, 且测定金银花中有效成分主要采用 HPLC 法<sup>[1]</sup>, 但未见 UHPLC 法的研究报道。超高效技术与传统的采用 5.0 μm 颗粒度的色谱柱填料

的 HPLC 技术相比能获更高的柱效, 且在更宽的线速度范围内柱保持恒定, 因而有利于提高流动相速度, 缩短分析时间, 提高分析通量; 使新型液相色谱的峰容量、分析效率、灵敏度较常规 HPLC 有了很大的提高, 可为复杂体系的分离分析提供良好的平台<sup>[6]</sup>。2010 版《中国药典》仅以绿原酸和木犀草苷为指标评价金银花质量, 为了更好地控制金银花的质量及综合评价金银花的整体质量, 本实验研究 UHPLC 法同时测定金银花中的绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C。

## 1 仪器与试药

Agilent1290 UHPLC 超高效液相色谱仪 (1290 二元梯度泵、1260DAD 检测器) (美国 Agilent 公

收稿日期:2014-01-10 接受日期:2014-06-11

基金项目:河南省教育厅自然科学研究计划项目(2010A360016)

\*通讯作者 Tel:86-371-65575838; E-mail:hnliuwei2088@sina.com

司);色谱乙腈(美国天地试剂公司);市售纯净水;其他试剂均为分析纯。绿原酸对照品(批号:110753-200212),芦丁(批号:100080-200707),木犀草昔(批号:111520-200201)购自中国药品生物制品检定所,含量≥98%;异绿原酸A(批号:MUST-09061601),异绿原酸B(批号:MUST-09061602),异绿原酸C(批号:MUST-09061603)均购自成都曼思特生物科技有限公司,含量均≥98%。实验所需药材,采自于不同产地的金银花,经河南中医学院董诚明教授鉴定为金银花:忍冬科植物忍冬*Lonicera japonica* Thunb 的干燥花蕾或带初开的花。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱 Agilent ZORBAX RH C<sub>18</sub>(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm),流动相为0.2%磷酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序:0~2 min, 13% B; 2~3.1 min, 13%~25% B; 3.1~8 min, 25% B; 流速0.2 mL/min, 检测波长350 nm, 柱温30 °C, 进样量0.5 μL。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸、芦丁、木犀草昔、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C对照品适量分别置50 mL容量瓶中,用70%乙醇定容,制成绿原酸39.6 μg/

mL、芦丁46.2 μg/mL、木犀草昔40.0 μg/mL、异绿原酸A44.6 μg/mL、异绿原酸B38.9 μg/mL、异绿原酸C36.8 μg/mL的溶液;精密取40.0 μg/mL木犀草昔、44.6 μg/mL异绿原酸A、36.8 μg/mL异绿原酸C1mL分别置10mL容量瓶中,70%乙醇定容;分别取以上标品母液1mL混合,作为混合对照品。密封存放于4 °C冰箱中备用,临用时需用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为对照品溶液,即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

精密称取金银花粉末0.25 g,置具塞150 mL锥形瓶中,精密加70%乙醇30 mL,超声(功率250W,频率35KHZ)提取45 min,放冷,抽滤,用70%乙醇洗涤滤纸,合并滤液,置50 mL棕色容量瓶定容。临用时需用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液,即得。

### 2.4 线性关系考察

分别取“2.2”项下的绿原酸39.6 μg/mL、芦丁46.2 μg/mL、木犀草昔4.0 μg/mL、异绿原酸A4.5 μg/mL、异绿原酸B38.9 μg/mL、异绿原酸C3.7 μg/mL标品溶液,分别以0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μL进样量进样,按“2.1”项下色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,结果见表1。

表1 回归方程和线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of the 5 investigated components

成分 Analyte	线性方程 Calibration curve	相关系数 <i>r</i>	线性范围 Linear range(μg/mL)
绿原酸 Chlorogenic acid	y = 3.6675x - 3.929	1.0000	15.84~316.80
芦丁 Rutin	y = 8.0869x - 7.0057	0.9999	18.48~369.60
木犀草昔 Luteoloside	y = 16.675X - 34.67	0.9999	1.60~32.00
异绿原酸 A3,5-O-Dicaffeoylquinic acid	y = 7.895x - 5.6438	0.9998	1.78~35.68
异绿原酸 B3,4-O-Dicaffeoylquinic acid	y = 8.432x - 4.6782	0.9999	15.56~311.20
异绿原酸 C4,5-O-Dicaffeoylquinic acid	y = 7.6542x - 18.967	0.9998	1.47~29.44

### 2.5 精密度试验

取“2.2”混合对照品溶液,以0.5 μL进样量,连续进样6次,计算得绿原酸、芦丁、木犀草昔、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C峰面积的RSD分别为0.13%、0.14%、0.15%、0.20%、0.16%、0.18%,结果表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取封丘贾庄金银花样品,按“2.3”项下制备供试品溶液,分别在0、2、4、8、12、24 h进样,按“2.1”

项下方法测定峰面积,结果绿原酸、芦丁、木犀草昔、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C峰面积的RSD分别为0.57%、0.42%、0.45%、0.51%、0.46%、0.37%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

### 2.7 重复性试验

取同一批金银花样品(封丘贾庄)精密称取0.25 g(6份),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下方法测定,测定样品中绿原酸、芦丁、木犀草昔、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C的

含量, 测得质量分数的 RSD 分别为 0.34%、0.42%、1.05%、0.87%、1.01%、1.12%, 表明重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

取已知含量的金银花(封丘贾庄)6 份, 精密称取 0.125 g, 精密加入一定量对照组分, 其余按“2.3”项下方法制备样品, 作为加样回收供试品溶

液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的平均回收率分别为 98.99%、98.90%、98.43%、96.88%、99.16%、97.35%; RSD 分别为 0.49%、0.23%、0.30%、0.56%、0.35%、1.06% ( $n=6$ ), 结果见表 2。

表 2 回收率试验结果( $n=6$ )

Table 2 Results for recovery tests ( $n=6$ )

指标性成分 Analytes	称样量 Sample amount (g)	样品含量 Content in sample (mg)	加入量 Standard added (mg)	测得量 Measured value (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Averagerecovery (%)	RSD (%)
绿原酸 Chlorogenic acid	0.1249	3.2718	3.2500	6.4702	98.41	98.99	0.49
	0.1250	3.2744	3.2500	6.473	98.42		
	0.1250	3.2744	3.2500	6.4893	98.92		
	0.1250	3.2744	3.2500	6.5082	99.50		
	0.1249	3.2718	3.2500	6.5025	99.41		
	0.1250	3.2744	3.2500	6.5008	99.27		
芦丁 Rutin	0.1249	0.1624	0.1848	0.3449	98.77	98.90	0.23
	0.1250	0.1625	0.1848	0.3448	98.65		
	0.1250	0.1625	0.1848	0.3456	99.08		
	0.1250	0.1625	0.1848	0.3451	98.81		
	0.1249	0.1624	0.1848	0.3454	99.04		
	0.1250	0.1625	0.1848	0.3449	98.70		
木犀草苷 Luteoloside	0.1249	0.1751	0.1900	0.3618	98.26	98.43	0.30
	0.1250	0.1752	0.1900	0.3615	98.05		
	0.1250	0.1752	0.1900	0.3621	98.37		
	0.1250	0.1752	0.1900	0.3621	98.37		
	0.1249	0.1751	0.1900	0.3625	98.63		
	0.1250	0.1752	0.1900	0.3631	98.89		
异绿原酸 A3,5-O-Dicaffeoylquinic acid	0.1249	0.0325	0.03345	0.06483	96.73	96.88	0.56
	0.1250	0.0325	0.03345	0.06512	97.52		
	0.1250	0.0325	0.03345	0.06473	96.35		
	0.1250	0.0325	0.03345	0.06500	97.16		
	0.1249	0.0325	0.03345	0.06503	97.33		
	0.1250	0.0325	0.03345	0.06468	96.20		
异绿原酸 B3,4-O-Dicaffeoylquinic acid	0.1249	2.3107	2.2200	4.5206	99.55	99.16	0.35
	0.1250	2.3125	2.2200	4.5127	99.11		
	0.1250	2.3125	2.2200	4.5085	98.92		
	0.1250	2.3125	2.2200	4.5142	99.18		
	0.1249	2.3107	2.2200	4.5201	99.52		
	0.1250	2.3125	2.2200	4.5028	98.66		
异绿原酸 C4,5-O-Dicaffeoylquinic acid	0.1249	0.4834	0.4500	0.9199	97.01	97.35	1.06

0.1250	0.4838	0.4500	0.9137	95.54
0.1250	0.4838	0.4500	0.9228	97.57
0.1250	0.4838	0.4500	0.9275	98.61
0.1249	0.4834	0.4500	0.9218	97.43
0.1250	0.4838	0.4500	0.9245	97.94

注:样品加入 46.2 μg/mL 芦丁标品溶液 4.000 mL, 加入量 40.0 μg/mL 木犀草苷标品溶液 0.475 mL, 加入量 44.6 μg/mL 异绿原酸 A 标品溶液 0.750 mL, 挥干后再处理。

Note: 4.000 mL of rutin standard solution (46.2 μg/mL), 0.475 mL of luteoloside standard solution (40.0 μg/mL) and 0.750 mL of 3,5-O-dicaffeoylquinic acid standard solution (44.6 μg/mL) were added into the sample solution. Processed after volatilizing to dryness.

## 2.9 样品测定

取不同产地金银花样品,按“2.3”项下方法制

备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,计算各

样品中绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的含量,结果见表 3 和图 1、2。

表 3 不同产地金银花中绿原酸和木犀草苷含量测定结果( $n = 3$ , mg/g)

Table 3 content determination results of chlorogenic acid and luteoloside ( $n = 3$ , mg/g)

产地来源 Sources	绿原酸 Chlorogenic acid (mg/g)	芦丁 Rutin (mg/g)	木犀草苷 Luteoloside (mg/g)	异绿原酸 A 3,5-O-Dicaffeoylquinic acid (mg/g)	异绿原酸 B 3,4-O-Dicaffeoylquinic acid (mg/g)	异绿原酸 C 4,5-O-Dicaffeoylquinic acid (mg/g)
封丘贾庄	26.1953	1.3007	1.4018	0.2603	18.5011	3.8601
封丘	29.7659	1.8300	1.7242	0.2645	19.4328	3.7522
封丘申庄	30.6836	1.4609	1.3470	0.2789	19.6548	3.5548
禹州	20.1647	1.0990	1.2108	0.3026	17.5573	2.3983
商丘	19.6825	1.5011	1.1658	0.2208	19.2388	3.7834
新乡	30.6064	1.2291	1.3800	0.2757	19.0874	3.8832
郑州	30.5461	0.7540	0.7300	0.3203	18.2531	3.4730
新密	23.7079	1.2905	0.8451	0.3214	17.5782	3.9237
山东平邑	28.3501	0.8189	1.2795	0.2427	9.7561	2.1287
湖南隆回	24.3820	0.4828	0.5900	0.1875	8.8748	1.8976
河北巨鹿	27.7797	1.3798	1.2230	0.2236	13.4194	3.2677

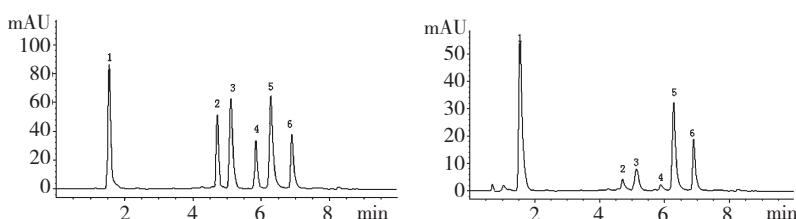


图 1 混合标品(A)及金银花供试品(B)的 UHPLC 色谱图

Fig. 1 UHPLC chromatograms of mixed standards (A) and *L. japonica* sample (B)

注:1 绿原酸;2 芦丁;3 木犀草苷;4 异绿原酸 A;5 异绿原酸 B;6 异绿原酸 C

Note 1: 1:chlorogenic acid; 2:rutin; 3:luteoloside; 4:3,5-O-dicaffeoylquinic acid; 5:3,4-O-dicaffeoylquinic acid; 6:4,5-O-dicaffeoylquinic acid

## 3 讨论

### 3.1 提取溶剂的考察

对于药材中绿原酸和木犀草苷的提取,2010 版

《中国药典》金银花项下绿原酸提取采用 50% 甲醇,

木犀草苷提取则采用 70% 乙醇,本试验采用 50% 乙醇、50% 甲醇、70% 乙醇、70% 甲醇提取进行单因素考察,结果发现采用 70% 乙醇作为溶剂提取的绿原酸、木犀草苷及六种有效成分总含量较高。

### 3.2 流动相的考察

分别考察了甲醇-水、甲醇-0.2% 磷酸水、乙腈-水、乙腈-0.2% 磷酸水不同比例的流动相系统进行梯度洗脱,结果表明采用乙腈-0.2% 磷酸水进行梯度洗脱,分离度和峰型均较好。

### 3.3 检测波长的考察

2010 版《中国药典》绿原酸和木犀草苷分别以 327、350 nm 为检测波长,而异绿原酸的最大吸收波长为 330 nm,芦丁在 350 nm 处有较大吸收。绿原酸在 350 nm 处吸收值是 327 nm 吸收值的 80% 左右,而木犀草苷在 327 nm 处吸收值比 350 nm 处低 20% 左右。由于金银花中绿原酸含量较木犀草苷及芦丁等成分的含量较高,在色谱图的 3D 图谱中以上各有效成分在 350 nm 处都有较好吸收,因此本实验选择 350 nm 作为检测波长。

### 3.4 UHPLC 与 HPLC 的比较

UHPLC 较 HPLC 峰容量、灵敏度、分析速度和检测限都有了很大的提高。采用 UHPLC,在 8 min 内完成对金银花中绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 含量测定,而 HPLC 测定其中的几个成分需要 60 min 左右完成测试<sup>[7,8]</sup>。采用 UHPLC 代替 HPLC,在保证测定结果准确的前提下,提高了分析效率,节约了大量的分析时间,减少了溶剂的消耗,降低分析成本<sup>[9]</sup>。但 UHPLC 的色谱柱柱子成本相对常规色谱柱较高。

### 3.5 结果分析

由测定结果可以看出,不同产地绿原酸和木犀草苷含量相差较大,绿原酸以新乡、封丘及平邑产地含量相对较高,而禹州和商丘的含量比较低;木犀草苷以新乡、封丘和平邑含量较高;有效成分的总含量也是以封丘和平邑的较高;所以可初步确定封丘和山东平邑产的金银花质量较好,可以以此产地为 GAP 考察目标,分析其生长环境,以此规范种植金银花提高其质量。

本实验建立 UHPLC 法同时检测金银花绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的含量,在此色谱条件下所测成分分离完全,该方

法操作简便,结果准确,分析速度快且重现性较好,可为金银花的质量控制研究提供新的分析方法和科学依据。

### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I,205.
- 2 Shi JY(石俊英), Zhang HM(张会敏) Wang Y(王颖), et al. Study on HPLC fingerprint chromatogram of Shan dong trueborn flos lonicerae. *J Shandong Univ TCM*(山东中医药大学学报), 2008, 32:69-73.
- 3 Liu EL(刘恩荔), Li QS(李青山). Research progress of honeysuckle. *J Shanxi Med Univ*(山西医科大学学报), 2006, 37:331-334.
- 4 Song HY(宋海英), Qiu SC(邱世翠), Wang ZQ(王志强). Research on the *in vitro* growth inhibition effect of *Lonicera japonica* Thunb. (LJT) on Bacteria. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2003, 14:269.
- 5 Luo ZH(罗中华). Effects of Chinese herbs on neutrophils after thermal injury in mice. *Med J Chin PLA*(解放军医学杂志), 1994, 19:271.
- 6 Jin GW(金高娃), Zhang FF(章飞芳), Xue XY(薛兴业), et al. Application of ultra-performance liquid chromatography in the separation and analysis of complicated system—traditional Chinese Medicine. *World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med Mater Med*(世界科学技术—中医药现代化), 2006, 8:106-111.
- 7 Xin H(辛华), Feng J(丰杰), Cheng RM(程若敏). Simultaneous determination of chlorogenic acid and galuteolin in honeysuckle. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(2):60-63.
- 8 Li WL(李文龙), Zhang WM(张文明), Xue DS(薛东升). A new method for simultaneous assay of six organic acids in *Lonicerae japonicae Flos*. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2012, 41:13-18.
- 9 Yang YF(杨义芳). Application of UPLC/RRLC/UFLC in study on Chinese materia medica and its preparation. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2008, 39:1259-1263.