

## RP-HPLC 法测定滇金银花中绿原酸的含量

马跃新<sup>1</sup>, 聂根宇<sup>2</sup>, 李维莉<sup>2\*</sup>

(1. 昆明市食品药品检验所 药品检验中心, 云南 昆明 650032; 2. 昆明学院 化学化工学院, 云南 昆明 650214)

**摘要:** 为建立滇金银花中绿原酸含量的测定方法, 采用反相高效液相色谱法测定滇金银花中绿原酸的含量. 以  $V(\text{乙腈}): V(0.4\% \text{ 磷酸溶液}) = 10:90$  为流动相, 检测波长为 327 nm. 结果显示, 绿原酸在 0 ~ 100.44  $\mu\text{g/mL}$  的范围内呈良好的线性关系, 方法检出限为 0.053 8  $\mu\text{g/mL}$ , 定量限为 0.182  $\mu\text{g/mL}$ , 加标回收率为 101.1%,  $RSD$  为 0.3%. 表明所用方法测定滇金银花中绿原酸的含量操作简单、稳定、准确.

**关键词:** 反相高效液相色谱法; 滇金银花; 绿原酸; 含量测定

**中图分类号:** R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2020) 06 - 0110 - 04

**DOI:** 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2020.06.024

### Content Determination of Chlorogenic Acid in *Flora Lonicerae bournei* by RP-HPLC

MA Yuexin<sup>1</sup>, NIE Genyu<sup>2</sup>, LI Weili<sup>2\*</sup>

(1. Drug Inspection Center, Kunming Institute for Food and Drug Control, Kunming, Yunnan, China 650032;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

**Abstract:** To establish a method for the content determination of chlorogenic acid in *Flora Lonicerae bournei*, RP-HPLC is used with liquid phase as Acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution (10:90), and 327 nm detection wavelength. The results show that the chlorogenic acid in 0 ~ 100.44  $\mu\text{g/mL}$  has good linear relationship within the scope; the detection limit is 0.053 8  $\mu\text{g/mL}$ , and the quantitative limit is 0.182  $\mu\text{g/mL}$ ; the standard addition recovery rate of chlorogenic acid is 101.1% and  $RSD$  is 0.3%. So the content determination method of chlorogenic acid is simple, convenient, stable and accurate.

**Key words:** RP-HPLC; *Flora Lonicerae bournei*; chlorogenic acid; content determination

滇金银花 (*Flora Lonicerae bournei*) 为忍冬科植物西南忍冬 (*Lonicerei bournei* Hemsl.) 的干燥花蕾或带初开的花, 在云南常作为药用金银花的地方习用品, 收载于 2005 年版《云南省中药饮片标准: 第 7 册》. 该药材在《全国中草药汇编》中称为“短唇忍冬”, 在《云南中药资源名录》中称为“西南忍冬”, 为了与 2015 年版《中华人民共和国药典: 一部》<sup>[1]</sup> 收载的“金银花”区别, 将该药材名称确定为“滇金银花”. 滇金银花主要产于云南省的峨山、双柏、建水、思茅、勐腊等地. 2005 年版《云南省中药材标准: 第 7 册》<sup>[2]</sup> 显示, 滇金银花中主要含有绿原酸等酚性成分、木犀草素和金丝桃苷等黄酮成分, 以及三萜皂苷、挥发油等. 目

前, 使用高效液相色谱法测定金银花中绿原酸的含量已有许多报道<sup>[3-6]</sup>, 但对滇金银花含量测定的报道却较少. 因此, 本研究尝试建立反相高效液相色谱法测定滇金银花中绿原酸含量的方法, 以期评价滇金银花的质量提供科学依据.

### 1 材料与方法

#### 1.1 药材

滇金银花 3 批 (批号: 160901; 170802; 161101), 经检验均为滇金银花.

#### 1.2 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 带紫外检测器 (美国安捷伦公司); MS205DU 电子天平 (梅特勒

收稿日期: 2020 - 09 - 23

基金项目: 基于校企“协同育人”平台下的食品与药品检验应用型人才培养模式的构建项目 (JG2018172).

作者简介: 马跃新 (1979—), 男, 云南江川人, 副主任药师, 主要从事中药检验检测研究.

\* 通讯作者: 李维莉 (1974—), 女, 云南腾冲人, 教授, 硕士, 主要从事有机化学研究, E-mail: lierkm@163.com.

公司, 1/100 000), AL204 电子天平 (梅特勒公司, 1/10 000); DFY-200 高速万能粉碎机 (温岭市林大机械有限公司); KQ 5200DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); CHORUS 超纯水系统 (英国 ELGA 公司)。

### 1.3 试药与试剂

绿原酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 110753-201716); 乙腈 (德国默克集团, 批号: JA054230, 色谱纯); 磷酸 (四川西陇化工有限公司, 批号: 170512, 分析纯); 甲醇 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20170712, 分析纯); 水为 GB/T 6682 中规定的一级水。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 对照品储备溶液的制备

精密称取绿原酸 25.00 mg, 置 50 mL 棕色容量瓶, 加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 500  $\mu\text{g}$  的溶液, 即得对照品储备溶液。

#### 1.4.2 供试品溶液的制备

取过 4 号筛的该药材粉末 0.5 g, 精密称定其质量, 平行取样 2 份, 准确加入 50% 甲醇溶液 100 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放置至室温, 称定质量, 用 50% 甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 过滤, 准确吸取续滤液 5 mL, 置于 25 mL 的棕色量瓶, 加 50% 甲醇溶液至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

#### 1.4.3 液相条件

色谱柱为 Zorbax C18 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 紫外检测器, 检测波长 327 nm, 流动相为  $V(\text{乙腈}):V(0.4\% \text{ 磷酸溶液}) = 10:90$ , 流速 1.0 mL/min, 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。对照品溶液色谱图如图 1, 供试品溶液色谱图如图 2。

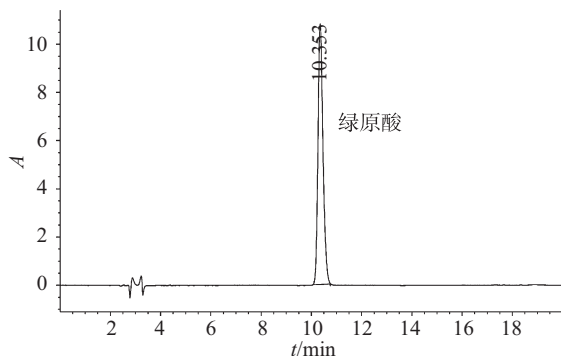


图1 对照品色谱图

## 2 结果与分析

### 2.1 系统适用性考察

将制备好的供试品溶液与对照品溶液按 1.4.3

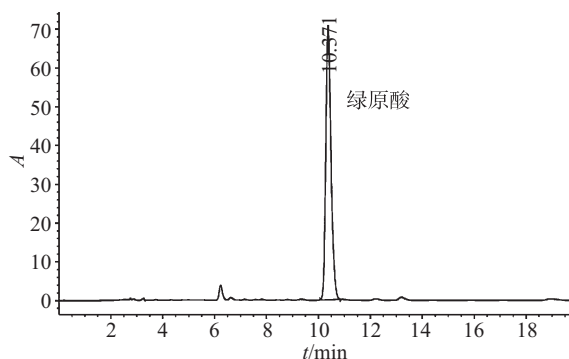


图2 供试品色谱图

项下条件注入液相色谱仪进行系统适用性考察, 结果理论板数均大于 8 000, 供试品中主色谱峰绿原酸与前后杂峰的分离度均大于 3.0。

### 2.2 线性关系考察

分别取 1.4.1 项下制备的对照品储备溶液 0.00, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 20.00 mL 至 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀即得质量浓度为 0.00, 5.00, 10.00, 20.00, 40.00, 100.00  $\mu\text{g/mL}$  系列标准溶液。按 1.4.3 项下条件进样, 然后以峰面积  $A$  为纵坐标, 以绿原酸含量  $C$  为横坐标, 绘制标准曲线图 (图 3), 回归方程为  $A = 14.58383 C + 4.97855$ ,  $R = 0.99990$ 。

### 2.3 检出限及定量限考察

#### 2.3.1 仪器检出限和定量限考察

取对照品溶液 (质量浓度 5.00  $\mu\text{g/mL}$ ) 分别稀释至信号/噪音比为  $S/N = 1:3$  和  $S/N = 1:10$  时, 通过计算得到仪器所对应的检出限为 0.0517  $\mu\text{g/mL}$ , 定量限为 0.164  $\mu\text{g/mL}$ 。

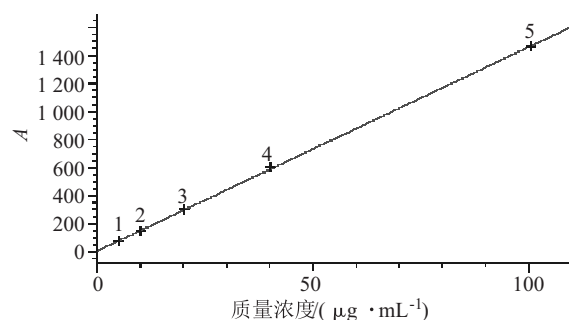


图3 绿原酸标准曲线

#### 2.3.2 方法检出限和定量限考察

取供试品溶液 (批号 160901) 分别稀释至信号/噪音比为 1:3 和 1:10 时, 计算得到方法检出限为 0.0538  $\mu\text{g/mL}$ , 定量限为 0.182  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.4 重复性实验

取滇金银花 (批号 160901), 按样品制备条件

1.4.2 制备的供试品溶液，平行制备 6 份，代入标准曲线得到供试品质量浓度，供试品中绿原酸的 *RSD* 为 0.09%，结果见表 1.

表 1 重复性实验结果

样品	绿原酸质量浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	平均质量浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	<i>RSD</i> /%
1	33.477 14	33.478 27	0.09
2	33.501 42		
3	33.495 91		
4	33.466 47		
5	33.428 84		
6	33.499 81		

由上述实验得出 *RSD* 小于 2.0%，说明该方法的重复性良好.

2.5 精密度考察

系列标准溶液与对照品溶液 4（即质量浓度 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），连续进样 6 次，测定，代入标准曲线得到供试品质量浓度，计算得到 *RSD* 为 0.07%，结果见表 2.

表 2 精密度实验结果

样品	绿原酸质量浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	<i>RSD</i> /%
1	38.477 14	0.07
2	38.501 42	
3	38.495 91	
4	38.466 47	
5	38.428 84	
6	38.499 81	

由上述实验得出 *RSD* 小于 2.0%，说明该实验有较好的精密度.

2.6 稳定性实验

2.6.1 时间稳定性考察

系列标准溶液与供试品溶液（批号 160901）分别在 0, 12, 24, 48, 72, 96 h 进样分析，以所得标准曲线计算质量浓度，并计算平均质量浓度与 *RSD*，得到供试品中绿原酸的 *RSD* 为 1.1%，结果见表 3.

由上述实验得出 *RSD* 小于 2.0%，说明供试品溶液在 96 h 内稳定.

2.6.2 柱温稳定性考察

系列标准溶液与供试品溶液（批号 160901）分别在柱温为 20, 30, 40  $^{\circ}\text{C}$  进样分析，每次平行进样 4 次，以所得标准曲线计算所得质量浓度，并计算平均质量浓度和 *RSD*，得到供试品中绿原酸的

*RSD* 为 1.2%，结果见表 4.

表 3 时间稳定性实验结果

时间/h	绿原酸质量浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	平均质量浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	<i>RSD</i> /%
0	33.477 14	33.489 28	1.1
0	33.501 42		
12	33.922 55	33.937 23	
12	33.951 91		
24	33.980 16	34.156 16	
24	34.332 16		
48	32.983 42	33.150 32	
48	33.317 22		
72	33.500 17	33.528 38	
72	33.556 58		
96	33.284 09	33.275 23	
96	33.266 36		

表 4 柱温稳定性实验结果

温度/℃	绿原酸质量浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	平均质量浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	<i>RSD</i> /%
20	33.495 76	33.510 60	1.2
20	33.493 72		
20	33.552 62		
20	33.500 30		
30	33.222 99	33.249 62	
30	33.231 18		
30	33.298 17		
30	33.246 13		
40	33.922 55	34.046 70	
40	33.951 91		
40	33.980 16		
40	34.332 16		

由上述实验得出 *RSD* 小于 2.0%，说明供试品溶液测定柱温在 20 ~ 40  $^{\circ}\text{C}$  的测定结果稳定.

2.7 回收率实验

精密称取 1 份已知含量的滇金银花粉末样品 0.50 g，加入适量绿原酸对照品，按样品制备方法操作，制成含对照品 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的加标溶液，进行分析，结果代入标准曲线计算质量浓度，依次计算回收率. 使用样品（批号 160901）制备加标溶液 6 份，同时平行制备样品溶液. 得到平均回收率为 101.1%，*RSD* 为 0.3%，结果见表 5.

2.8 样品含量测定

精密称取每批滇金银花粉末样品各两份，每份 0.5 g，按样品制备方法分别制备供试品溶液，每份进样测定 2 次，计算样品的平均含量，结果见表 6.

表5 回收率实验结果

样品编号	样品测得量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	理论加入量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	实测量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
160901-1	34.09	25.11	59.25	100.2	100.1	0.3
160901-2	34.09	25.11	59.15	99.80		
160901-3	34.09	25.11	59.24	100.2		
160901-4	34.09	25.11	59.30	100.4		
160901-5	34.09	25.11	59.11	99.6		
160901-6	34.09	25.11	59.27	100.3		

表6 样品含量测定结果

样品	取样量/g	实测质量浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	绿原酸含量/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	平均含量/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
160901-1-1	0.501 1	33.975 62	33.90	34.01
160901-1-2		34.000 80	33.92	
160901-2-1		34.178 36	34.09	
160901-2-2	0.501 3	34.202 96	34.11	25.59
161101-1-1	0.504 5	25.798 39	25.57	
161101-1-2		25.831 42	25.60	
161101-2-1	0.505 9	25.893 07	25.59	
161101-2-2		25.901 24	25.60	
170802-1-1	0.504 1	25.001 17	24.79	24.79
170802-1-2		25.044 74	24.84	
170802-2-1	0.506 7	25.078 69	24.74	
170802-2-2		25.103 87	24.77	

### 3 讨论与结论

因绿原酸分子结构中含有邻二酚羟基, 遇光很不稳定, 考虑到该因素, 绿原酸对照品溶液及供试品溶液用棕色的容量瓶盛放, 以保证测定结果的准确性与稳定性。

本实验对提取溶剂选择时, 比较了乙醇、甲醇、50%乙醇溶液和50%甲醇溶液, 最后选择峰形和提取率更好的50%甲醇溶液。

在绿原酸含量测定的过程中, 对供试品溶液的制备方法进行比较, 最终选取最佳方案为加入50%的甲醇溶液进行超声处理(功率250 W, 频率35 kHz)30 min. 对流动相和检测波长的选择, 经比较认为以 $V(\text{乙腈}):V(0.4\% \text{磷酸溶液})=10:90$ 为流动相峰形及分离度效果最好, 检测波长在327 nm处各色谱峰之间分离效果最佳。

在系统适用性实验中, 通过在不同品牌液相色谱系统(赛默飞世尔液相、岛津液相)条件下测定绿原酸的理论塔板数与分离度, 所得结果理论塔板数均大于8 000, 分离度均大于1.5, 满足文献[1]中的标准要求。

样品的生长环境、采收时间、储存条件等因素

均可能影响到滇金银花中绿原酸的含量, 这可能是造成表6中样品含量差异较大的原因之一。

本实验结果表明, 重复性RSD为0.09%, 精密度RSD为0.07%, 回收率RSD为0.3%, 说明采用反相高效液相色谱法测定滇金银花中主要成分绿原酸的含量, 方法操作简单、稳定、精确, 可为评价滇金银花的质量提供参考依据。

### 【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准: 第7册 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2005.
- [3] 林丽美, 刘菊妍, 王燕, 等. RP-HPLC法测定金银花中绿原酸的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008 (9): 22-23.
- [4] 郝凤霞, 杨敏丽. RP-HPLC测定宁夏原周区金银花中绿原酸含量的动态变化 [J]. 华西药学杂志, 2005 (6): 534-535.
- [5] 石连成, 王月华. HPLC法测定金银花中绿原酸的含量 [J]. 黑龙江医药, 2002 (2): 92-93.
- [6] 雒淑珍, 雷耀湖, 赵继荣, 等. HPLC法测定金银花中绿原酸含量 [J]. 现代农业科技, 2016 (17): 41-42.