

“一测多评法”与外标法测定金银花中 8 种活性成分含量

王玲娜, 刘红燕, 张金, 李佳, 张永清*

(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:**采用“一测多评法”(QAMS)与外标法(ESM)同时测定金银花药材中 8 种活性成分(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C)的含量,并进行比较,确定“一测多评法”在金银花药材质量控制中的应用价值。**方法:**以绿原酸为参照物,采用 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 325, 350 nm,以特征图谱鉴别 8 种活性成分。**结果:**两种方法测得的活性成分含量间无显著性差异,RSD < 5%。**结论:**“一测多评法”测定金银花 8 种活性成分含量结果可信,可用于金银花药材质量评价。

[关键词] 金银花; 一测多评法; 外标法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0057-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200057

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140829.1403.004.html>

[网络出版时间] 2014-08-29 14:03

Simultaneous Determination of Eight Bioactive Components in Lonicerae Japonicae Flos by Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker

WANG Ling-na, LIU Hong-yan, ZHANG Jin, LI Jia, ZHANG Yong-qing*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to establish a method for simultaneous assay of eight kinds of active ingredients in Lonicerae Japonicae Flos (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin, cynaroside, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C) by quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) and external standard method (ESM), and determine the application value of QAMS in the quality control of Lonicerae Japonicae Flos. **Method:** The chromatographic separation was carried out on a ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with gradient elution of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wave-length was 325 nm and 350 nm. A characteristic spectrum was used for identification of eight components. By using chlorogenic acid as reference, the relative corrective factors (RCF) of eight components were calculated. The method was evaluated by comparison of the quantitative results through external standard method and QAMS method. **Result:** The results from QAMS method were not significantly different from those from external standard method. **Conclusion:** The method is of high sensitivity and nice reproducibility, and it could be used to control the quality of Lonicerae Japonicae Flos with QAMS.

[Key words] Lonicerae Japonicae Flos; quantitative analysis of multi-components by single marker; relative correction factor; content determination

[收稿日期] 20140411(013)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI06B01);山东省自主创新专项课题(2013CXC20401)

[第一作者] 王玲娜, 硕士, 从事中药资源及其质量控制研究, Tel:13583190126, E-mail:wanglingna88@163.com

[通讯作者] * 张永清, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药资源及其质量控制研究, Tel:1369053200, E-mail:zyq622003@126.com

金银花具有清热解毒、疏散风热之功效^[1]。研究表明,金银花临床药效的发挥是多种成分综合作用的结果^[2-3],而现行《中国药典》金银花项下仅以绿原酸和木犀草苷含量作为质量检测指标,难以体现中药材的整体质量,但因一些活性成分对照品制备困难导致货源不足或价格昂贵而难以实现多指标定量。“一测多评法”^[5]的提出为解决该难题提供了良好的思路。目前,此法已成功应用到 20 余种中药质量研究中,涉及皂苷、黄酮、生物碱、萜醌等多类成分,其中黄连药材的“一测多评”测定法已被 2010 年版《中国药典》收载。高慧敏等^[7]认为一测多评法将会成为未来中药质量评价的重要发展方向。目前有人用此法对金银花药材中 6 种有机酸类成分的含量进行了同时测定^[8-10],在此基础上,本实验采用“一测多评”技术,进一步完善了其质量评价体系,以绿原酸为参照物,建立了同时测定金银花中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 等 8 种成分的“一测多评法”,并采用常规外标法对其结果的准确性和可靠性进行了验证。

1 材料

1.1 仪器 1260 系列高效液相色谱仪(包括 G1311C 四元泵、G1329B 自动进样器、G1315B 二极管阵列检测器、G1316A 柱温箱和 Agilent Chem Station 工作站,美国安捷伦公司),KQ-500DE 型超声仪(河南兄弟仪器设备有限公司)。

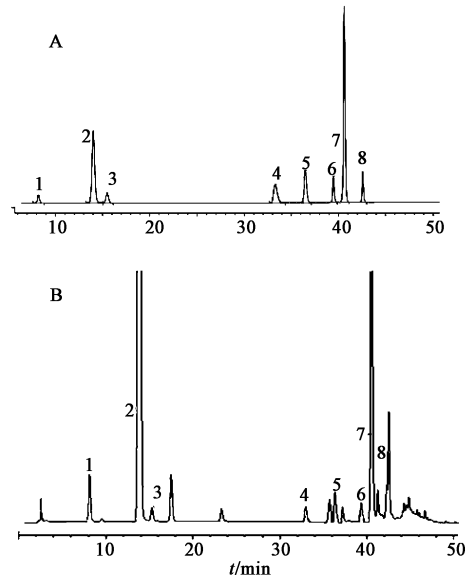
1.2 试剂 对照品芦丁(100080-200306)购于中国食品药品检定研究院,新绿原酸(PA0819RA13)、绿原酸(20130415)、隐绿原酸(ZS0922BA13)、木犀草苷(20130521)、异绿原酸 B(20131021)、异绿原酸 A(20130816)、异绿原酸 C(20130924)由上海源叶生物科技有限公司提供。乙腈、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 金银花药材 金银花药材于 2013 年 7 月—8 月采集于山东、河南、河北等种植基地,统一以硅胶干燥。药材样品经山东中医药大学周凤琴教授鉴定,确认为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ZORBAXSB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.1% 磷酸溶液(A)-乙腈(B)二元梯度洗脱(0~10 min, 92%~90% A, 10~20 min, 90%~85% A, 20~30 min, 85% A, 30~40 min, 85%~75% A, 40~60 min, 75%~0% A),柱温 30 °C,检测波长 325, 350 nm,进样量 20 μL。理论

板数按绿原酸峰计算不低于 10 000。见图 1。



1. 新绿原酸;2. 绿原酸;3. 隐绿原酸;4. 芦丁;
5. 木犀草苷;6. 异绿原酸 B;7. 异绿原酸 A;8. 异绿原酸 C

图 1 混合对照品(A)及金银花药材(B)的 HPLC

2.2 混合对照品溶液制备 精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品适量,用 50% 的甲醇配制成单个对照品储备液,分别精密量取各储备液适量,配置成质量浓度为 0.013 4, 0.130 3, 0.022 0, 0.026 7, 0.035 6, 0.018 5, 0.174 0, 0.043 6 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取 1.0 g 金银花药材粉末,精密称定,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 100 W,频率 100 Hz)30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,离心(4 000 r·min⁻¹)10 min,精密量取上清液过滤(0.22 μm)作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系的考察 分别吸取不同体积新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 8 种活性成分储备液,50% 甲醇溶解并稀释制成 8 个活性成分不同质量浓度的系列溶液。按上述色谱条件测定,以对照品的质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行回归处理,得到 8 个回归方程,如表 1 所示。

2.4.2 精密度试验 在线性范围内,分别进行日内精密度(1 d 连续分析 6 次)和日间精密度(3 d 内每天分析 1 次)的考察。结果表明,8 种活性成分的日

表1 8种活性成分质量浓度与峰面积的线性关系

成分	线性范围 /mg·g ⁻¹	线性方程	相关系数
新绿原酸	0.026 8 ~ 1.342 5	$Y = 1\ 822.3X + 10.364$	0.999 6
绿原酸	0.026 0 ~ 15.624	$Y = 1\ 851.3X + 13.69$	0.999 8
隐绿原酸	0.044 0 ~ 0.432 0	$Y = 1\ 432.7X + 3.391\ 0$	0.999 3
芦丁	0.019 15 ~ 4.413 2	$Y = 591.67X - 0.622\ 1$	0.999 9
木犀草苷	0.071 2 ~ 5.140 0	$Y = 867.31X - 4.310\ 1$	0.999 9
异绿原酸 B	0.03 70 ~ 0.277 5	$Y = 2\ 497.9X - 9.600\ 4$	0.999 7
异绿原酸 A	0.522 0 ~ 12.570	$Y = 2\ 229.8X + 27.950$	0.999 6
异绿原酸 C	0.130 8 ~ 3.033	$Y = 1\ 068.4X - 4.968\ 9$	0.999 4

内精密密度 RSD 均 < 3%, 日间精密密度 RSD 均 < 3%, 表明该方法具有满意的精密密度。

2.4.3 稳定性试验 将供试品溶液置于室温下, 分别在 0, 2, 4, 6, 16, 24 h 后进样分析, 结果显示, 在该色谱条件下, 8 种活性成分的稳定性 RSD 均 < 3%, 表明在 24 h 内 8 种成分溶液稳定。

2.4.4 重复性试验 取同一产地金银花样品约 1.0 g, 精密称定, 平行 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 含量的 RSD 分别为 2.1%, 3.0%, 1.6%, 2.3%, 3.2%, 2.8%, 3.3%, 3.2%, 表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的样品 0.25 g, 精密称定, 平行操作 6 份, 精密加入新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品溶液适量, 按供试品溶液的制备方法制备并测定。试验结果见表 2。

表2 金银花中8种成分加样回收率测定

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回 收率/%	RSD /%
新绿原酸	0.153	0.134	0.290	102.42	2.22
绿原酸	5.021	5.008	10.031	100.05	2.29
隐绿原酸	0.054	0.056	0.111	102.11	1.47
芦丁	0.232	0.247	0.483	101.73	0.51
木犀草苷	0.171	0.187	0.359	100.65	0.51
异绿原酸 B	0.035	0.034	0.069	101.88	1.02
异绿原酸 A	4.002	3.371	7.392	100.55	0.27
异绿原酸 C	0.424	0.419	0.849	101.39	1.28

2.5 校正因子与相对保留值的计算

校正因子计算公式:

$$f_{k/s} = (C_s \times A_k) / (C_k \times A_s)$$

待测成分质量浓度计算公式:

$$C_k' = (C_s \times A_k') / (f_{k/s} \times A_s)$$

上述两式中, C_s 为参照物质质量浓度, A_s 为参

照物质色谱峰峰面积, C_k 为其他对照组分质量浓度, A_k 为其他对照组分色谱峰峰面积, C_k' 为待测组分质量浓度, A_k' 为待测组分色谱峰峰面积。

以多个质量浓度点计算所得 $f_{k/s}$ 的平均值作为定量用 $f_{k/s}$ 。

相对保留值计算公式:

$$RRT = T_k / T_s$$

上式中 T_s 为内标物保留时间, T_k 为某待测成分保留时间。

取 2.2 项下的混合对照品溶液, 稀释成系列混合溶液, 平行 3 次, 根据在一定线性范围内, 活性成分的量(质量或质量浓度)与检测器响应成正比的原理, 分别计算新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、槲皮素与内参物绿原酸的相对校正因子及相对保留值。表 3, 4 结果显示, 不同浓度所得到的校正因子和相对保留值基本一致。

2.6 校正因子与相对保留值重复性考察 考察了不同色谱柱 [Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), ZORBAX SB-Phenyl (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)] 对校正因子和相对保留值的影响, 结果二者测定数据的 RSD < 3.0%, 表明校正因子与相对保留值在不同色谱柱下具有良好的重复性。

2.7 外标法与 QAMS 法结果比较 对 9 个不同产地的金银花药材样品, 按 2.3 项方法制备供试品溶液, 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液进行测定, 采用常规外标法和一测多评法对样品中 8 种活性成分进行定位并计算含量。表 5, 6 结果显示, 以外标法和一测多评法测定所得的含量及对色谱峰的定位均非常接近, 无显著性差异, RSD < 5%。表明一测多评法与外标法均可用于测定金银花药材中活性成分的含量。

3 讨论与结论

一测多评法的前提条件是准确的色谱峰定位, 即在同一色谱条件下, 色谱峰的相对保留时间比较恒定(应在规定值的 ± 5% 范围内)。本实验考察了在同一色谱条件下, 改变混合对照品溶液浓度及使用不同色谱柱, 其相对保留值的 RSD 均 < 3%, 因此根据其特征谱图进行色谱峰定位是可行的。

对不同流动相、流动相比例、提取溶剂进行分析比较, 确定以 0.1% 磷酸水-乙腈为流动相、50% 甲醇为提取溶剂较为合适。采用二极管阵列检测器在 190 ~ 380 nm 扫描混合对照品溶液各成分紫外吸收时, 为使各成分均在其最大吸收波长下测定, 分别采

表 3 金银花中其他成分以绿原酸为参照物的相对保留值

混合溶液	相对保留值						
	新绿原酸	隐绿原酸	芦丁	木犀草苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
1	0.590	1.098	2.358	2.583	2.791	2.875	3.008
2	0.588	1.103	2.346	2.566	2.772	2.856	2.988
3	0.587	1.104	2.35	2.574	2.781	2.865	2.997
4	0.588	1.101	2.327	2.541	2.742	2.825	2.952
5	0.588	1.101	2.335	2.537	2.735	2.817	2.943
6	0.586	1.103	2.337	2.548	2.749	2.832	2.959
7	0.589	1.102	2.338	2.548	2.75	2.833	2.959
均值	0.588	1.102	2.342	2.557	2.76	2.843	2.972
RSD/%	0.239	0.162	0.443	0.687	0.767	0.772	0.834

表 4 金银花中其他成分以绿原酸为参照物的相对校正因子

混合溶液	相对校正因子						
	新绿原酸	隐绿原酸	芦丁	木犀草苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
1	0.988	1.350	3.262	2.248	0.773	0.860	1.800
2	1.002	1.359	3.348	2.321	0.808	0.887	1.889
3	1.006	1.346	3.349	2.331	0.824	0.886	1.885
4	0.996	1.325	3.326	2.311	0.813	0.849	1.858
5	0.993	1.342	3.367	2.370	0.805	0.859	1.855
6	0.988	1.307	3.270	2.299	0.797	0.845	1.822
7	0.981	1.387	3.300	2.390	0.852	0.875	1.900
均值	0.994	1.345	3.317	2.324	0.810	0.866	1.858
RSD/%	0.87	1.87	1.23	2.01	2.99	2.00	1.97

表 5 外标法与 QAMS 法测定金银花中 8 种成分含量

编号	方法	mg·g ⁻¹							
		绿原酸	新绿原酸	隐绿原酸	芦丁	木犀草苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
2013071901	外标	24.08	0.795	0.419	0.679	0.412	0.266	14.671	2.218
	QAMS		0.793	0.421	0.682	0.414	0.267	14.589	2.25
2013071902	外标	24.698	0.810	0.498	0.285	0.506	0.25	16.170	2.482
	QAMS		0.806	0.498	0.285	0.511	0.249	16.044	2.515
2013071903	外标	20.335	0.605	0.369	0.427	0.401	0.197	10.642	1.566
	QAMS		0.605	0.370	0.427	0.401	0.194	10.549	1.580
2013072301	外标	16.441	0.383	0.282	0.731	0.580	0.151	6.452	1.005
	QAMS		0.387	0.284	0.730	0.585	0.146	6.395	1.007
2013072302	外标	22.357	0.514	0.543	1.168	0.921	0.341	11.512	2.997
	QAMS		0.513	0.539	1.166	0.933	0.342	11.363	3.021
2013072303	外标	14.376	0.410	0.297	0.730	0.582	0.159	6.319	1.135
	QAMS		0.438	0.275	0.661	0.482	0.138	6.403	1.111
2013080603	外标	17.175	0.298	0.294	0.789	0.512	0.154	5.576	1.076
	QAMS		0.305	0.296	0.792	0.517	0.150	5.553	1.084
2013080604	外标	18.768	0.424	0.357	1.136	0.312	0.158	6.941	1.400
	QAMS		0.430	0.360	1.146	0.311	0.154	6.932	1.419
2013080601	外标	19.573	0.446	0.369	1.121	0.561	0.152	7.332	1.392
	QAMS		0.448	0.368	1.119	0.563	0.147	7.248	1.397

用变波长检测法对 8 种活性成分进行了测定。根据保留时间差异,0~30 min 设定检测波长为 325 nm,用于测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸;30~36 min

设定检测波长为 350 nm,用于测定芦丁、木犀草苷;36~45 min 设定检测波长为 325 nm,用于测定异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C。

表6 外标法与QAMS法对金银花中8种成分色谱峰的定位($n=3$)

min

编号	方法	绿原酸	新绿原酸	隐绿原酸	芦丁	木犀草苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
2013071901	外标	14.007	8.270	15.540	33.232	36.446	39.405	40.574	42.553
	QAMS		8.236	15.436	32.804	35.816	38.659	39.822	41.629
2013071902	外标	14.127	8.373	15.642	33.626	36.691	39.569	40.718	42.565
	QAMS		8.307	15.568	33.085	36.123	38.991	40.163	41.985
2013071903	外标	13.992	8.194	15.461	33.198	36.419	39.411	40.554	42.542
	QAMS		8.227	15.419	32.769	35.778	38.618	39.779	41.584
2013072301	外标	14.048	8.296	15.532	33.543	36.635	39.556	40.711	42.649
	QAMS		8.260	15.481	32.900	35.921	38.772	39.938	41.751
2013072302	外标	14.124	8.261	15.675	33.570	36.668	39.560	40.714	42.634
	QAMS		8.305	15.565	33.078	36.115	38.982	40.155	41.977
2013072303	外标	13.963	8.275	15.462	33.737	36.363	39.382	40.556	42.525
	QAMS		8.210	15.387	32.701	35.703	38.538	39.697	41.498
2013080603	外标	13.881	8.157	15.364	33.323	36.320	39.362	40.540	42.524
	QAMS		8.162	15.297	32.509	35.494	38.312	39.464	41.254
2013080604	外标	13.924	8.276	15.424	33.412	36.357	39.369	40.545	42.520
	QAMS		8.187	15.344	32.610	35.604	38.430	39.586	41.382
2013080601	外标	13.843	8.127	15.342	32.995	36.312	39.351	40.526	42.519
	QAMS		8.140	15.255	32.420	35.397	38.207	39.356	41.141

关于 $f_{k/s}$ 计算,除本文所采用的多个浓度点计算 $f_{k/s}$ 再取平均值的方法做定量 $f_{k/s}$ 之外(即多点校正法),还可采用斜率校正法,即在标准曲线 $Y = aX + b$ 中, $X = (Y - b)/a = Y/a - b/a$,由于 b 值通常为误差引起,在 a/b 值大于100时, b/a 值可以忽略不计,可用 $X = Y/a$ 直接计算,即 $C_s = A_s/a_s$ ($a_s = A_s/C_s$), $C_k = A_k/a_k$ ($a_k = A_k/C_k$)。故 $f_{k/s}$ 可以二者的斜率 a 之比直接计算($f_{k/s} = A_k C_s / C_k A_s = a_k / a_s$), $C_k = A_k C_s / A_s f_{k/s} = A_k / (a_s \times f_{k/s})$, a_s 为参照物斜率, a_k 为其他对照组分斜率, A_k 为其他组分参照物的峰面积^[11]。本实验除采用多点校正法计算 $f_{k/s}$ 外,还采用斜率校正法对 $f_{k/s}$ 进行了计算。结果表明,用计算所得 $f_{k/s}$ 进行含量计算后与外标法所得数据有一定差异。查阅相关文献发现,斜率校正法的应用有一定的局限性,在某些情况下可根据其标准曲线进行 $f_{k/s}$ 计算^[9]。

综上所述,校正因子的运用能够在对照品短缺的情况下实现多指标成分的含量同步测定。对金银花药材来讲,在活性成分对照品缺乏的情况下,通过较易得到的绿原酸对照品与相对保留时间进行绿原酸含量外标法测定,利用相对校正因子可实现对金银花药材中其他7种活性成分含量的测定,从而为金银花药材质量的有效控制提供了新方法。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

京:中国医药科技出版社,2010:52,412.

- [2] 刘琪. 金银花化学成分及药理作用分析[J]. 科技创新与应用,2012(4):45.
- [3] 王迎菊,王凯,梁文红,等. 金银花在口腔医学中的应用[J]. 中国医药指南,2013,11(14):68.
- [4] 张志美,郭时金,付石军,等. 金银花活性成分及药理作用研究进展[J]. 家畜生态学报,2013,34(6):89.
- [5] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(23):1925.
- [6] 沈小钟,刘瑶,杨燕军,等. 一测多评法研究进展[J]. 中国药业,2013,22(13):1.
- [7] 高慧敏,宋宗华,王智民,等. 适合中药特点的质量评价模式-QAMS研究概述[J]. 中国中药杂志,2012,37(4):405.
- [8] 李文龙,张文明,薛东升,等. 测定金银花中6种有机酸类化合物含量的一种新方法[J]. 浙江大学学报:医学版,2012,41(1):13.
- [9] 郑荣,郑征伟,王柯,等. 金银花提取物中6种有机酸类成分的测定[J]. 中成药,2013,35(3):560.
- [10] 朱粉霞,张亚丽,汪晶,等. 一测多评法测定金银花复方制剂中新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸[J]. 中成药,2013,35(12):2666.
- [11] 刘永利,李冬梅,冯丽,等. “一测多评”法测定咳喘宁片中5种生物碱类成分的含量[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(4):464.

【责任编辑 顾雪竹】