

# UPLC-PDA-ELSD 测定贵州山银花中绿原酸、 灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量

赵留存<sup>1</sup>, 叶世芸<sup>1\*</sup>, 杨春<sup>2</sup>, 林昌虎<sup>3</sup>, 赵巡<sup>1</sup>, 郭云<sup>1</sup>

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 贵州理工学院, 贵阳 550003;  
3. 贵州科学院, 贵阳 550001)

**[摘要]** 目的:建立超高效液相色谱-紫外检测器-蒸发光检测器联用(UPLC-PDA-ELSD)同时测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙含量的方法,并考察贵州地区山银花的质量。方法:采用 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.4% 乙酸水(B),梯度洗脱(0~2 min, 7% A; 2~2.3 min, 7%~28% A; 2.3~10 min, 28% A; 10~10.5 min, 28%~7% A),梯度流速(0~2 min, 0.35 mL·min<sup>-1</sup>; 2~2.3 min, 0.35~0.25 mL·min<sup>-1</sup>; 2.3~2.6 min, 0.25~0.15 mL·min<sup>-1</sup>; 2.6~2.8 min, 0.15~0.1 mL·min<sup>-1</sup>; 2.8~4 min, 0.1~0.2 mL·min<sup>-1</sup>; 4~4.3 min, 0.2~0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 4.3~4.5 min, 0.3~0.35 mL·min<sup>-1</sup>; 4.5~10.5 min, 0.35 mL·min<sup>-1</sup>),PDA(紫外检测器)检测绿原酸(330 nm);ELSD(蒸发光散射检测器)检测灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙,漂移管温度 60 ℃,喷雾器温度 48 ℃,气体压力 20 psi,色谱柱温度 50 ℃。结果:绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙 3 种成分分别在 0.304 5~1.522 5 ( $R^2 = 0.999 4$ ), 0.449~1.436 8 ( $R^2 = 0.999 3$ ), 0.044 6~0.223 μg ( $R^2 = 0.999 4$ ) 呈良好的线性关系。结论:该方法能方便准确的测定贵州山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量,并能有效缩短测量时间和节省试剂。此方法适用于测定考察贵州地区山银花的质量。

**[关键词]** 山银花; 绿原酸; 灰毡毛忍冬皂苷乙; 川续断皂苷乙

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0064-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070064

**Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Macranthoidin B and Dipsacoside B in Lonicerae Flos by UPLC with PDA and ELSD** ZHAO Liu-cun<sup>1</sup>, YE Shi-yun<sup>1\*</sup>, YANG Chun<sup>2</sup>, LIN Chang-hu<sup>3</sup>, ZHAO Xun<sup>1</sup>, GUO Yun<sup>1</sup> (1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550003, China; 3. Guizhou Academy of Sciences, Guiyang 550001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for determination of chlorogenic acid, galuteolin and dipsacoside B in Lonicerae Flos using Ultra Performance Liquid Chromatography, and inspect the quality of the Lonicerae Flos in Guizhou. **Method:** ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column was adopted. Two solution were acetonitrile and water containing 0.4% acetic acid, with gradient elution of (0-2 min, 7% A; 2-2.3 min, 7%-28% A; 2.3-10 min, 28% A; 10-10.5 min, 28%-7% A), and velocity gradient (0-2 min, 0.35 mL·min<sup>-1</sup>; 2-2.3 min, 0.35-0.25 mL·min<sup>-1</sup>; 2.3-2.6 min, 0.25-0.15 mL·min<sup>-1</sup>; 2.6-2.8 min, 0.15-0.1 mL·min<sup>-1</sup>; 2.8-4 min, 0.1-0.2 mL·min<sup>-1</sup>; 4-4.3 min, 0.2-0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 4.3-4.5 min, 0.3-0.35 mL·min<sup>-1</sup>; 4.5-10.5 min, 0.35 mL·min<sup>-1</sup>). The PDA detection wavelength was 330 nm for chlorogenic acid. The ELSD detection was for macranthoidin B and dipsacoside B. The temperature of drift tube was maintained at 60 ℃, the temperature of nebulizer was 48 ℃, with the nitrogen flow rate of 20 psi, and the column temperature was maintained at 50 ℃. **Result:** The linear response ranges of chlorogenic acid, galuteolin and dipsacoside B were 0.304 5-1.522 5 ( $R^2 = 0.999 4$ ), 0.449-1.436 8 ( $R^2 = 0.999 3$ ), 0.044 6-0.223 μg ( $R^2 = 0.999 4$ ).

**[收稿日期]** 20140502(005)

**[基金项目]** 贵州省中药现代化重大专项[黔科合重大专项字(2012)6010号]

**[第一作者]** 赵留存, 硕士, 从事中药质量控制与新药研发, Tel:13877880740, E-mail:zhaoliucun@126.com

**[通讯作者]** \*叶世芸, 教授, 从事药物分析研究, Tel:0851-5615344, E-mail:lihaolora@sina.com

( $R^2 = 0.9994$ ), respectively. **Conclusion:** The method is convenient and accurate to determine the content of chlorogenic acid, macranthoidin B and dipsacoside B in *Lonicerae Flos*, and can shorten the measuring time and saves reagent effectively. The established method has used to measure quality of the *Lonicerae Flos* in Guizhou.

[**Key words**] *Lonicerae Flos*; chlorogenic acid; macranthoidin B; dipsacoside B

山银花为忍冬科植物灰毡毛忍冬、红腺忍冬或黄褐毛忍冬的干燥花蕾或带初开的花<sup>[1]</sup>。其主要含有绿原酸、挥发油、黄酮、有机酸、三萜、皂苷等<sup>[2-4]</sup>。具有清热解毒、凉散风热的功效,可用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温热发病等疾病的治疗。超高效液相色谱(UPLC),与传统的高效液相色谱(HPLC)技术相比,灵敏度高,节省试剂和时间,提供了更高的效率。关于山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量测定已有报道,有谷筱玉用 HPLC-UV-ELSD 和卢凤来用 HPLC-ELSD 测定山银花中这3种成分的含量<sup>[5-6]</sup>,张璐用 HPLC-ELSD 同时测定山银花中绿原酸、木犀草苷和川续断皂苷乙的含量和李红霞不同产地金银花与山银花主要成分的含量比较<sup>[7-8]</sup>,但对山银花的含量检测均采用 HPLC,分析时间较长,未见有 UPLC 同时测定山银花中这3种成分含量的报道。本研究采用 UPLC 同时测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量,相比 HPLC 分析时间短,有机溶剂用量少,检测成本低,高效准确。

## 1 材料

**1.1 仪器** UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪,配有四元超高压溶剂系统、在线真空脱气机、自动进样恒温样本管理器、ELSD 检测器、PDA 检测器和 Empower 3 色谱工作站(美国 Waters);XS20S 型电子分析天平(瑞士梅特勒)。

**1.2 药材** 山银花分别采自贵州绥阳县小关乡、丹寨兴仁镇、金沙龙坝乡、施秉县白垛乡和安顺西秀区七眼桥镇,经贵阳中医学院魏升华副教授鉴定,各地山银花均为忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* 的干燥花蕾或带初开的花。

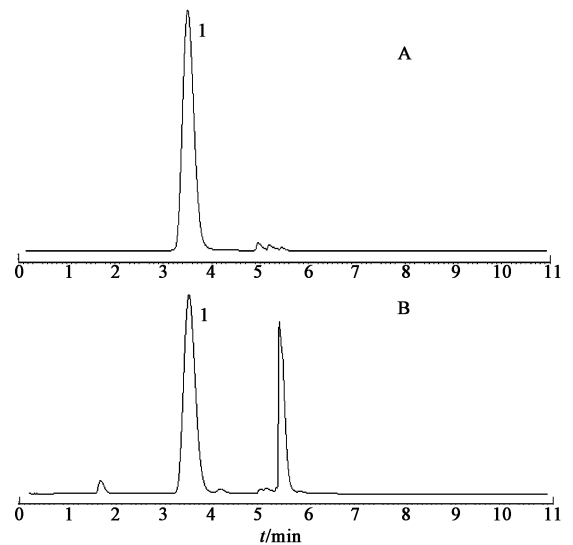
**1.3 试剂** 乙腈(色谱纯,德国 Merck),水为娃哈哈纯净水,其余所用试剂均为分析纯。

**1.4 对照品** 绿原酸(批号 110753-201314),灰毡毛忍冬皂苷乙(批号 111814-201001),川续断皂苷乙(批号 111813-201202)对照品均购自中国食品药品检定研究院。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件及系统适应性** 采用 ACQUITY

UPLC BEH  $C_{18}$  色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ),流动相乙腈(A)-0.4% 乙酸水(B),梯度洗脱(0 ~ 2 min, 7% A; 2 ~ 2.3 min, 7% ~ 28% A; 2.3 ~ 10 min, 28% A; 10 ~ 10.5 min, 28% ~ 7% A),梯度流速(0 ~ 2 min, 0.35 mL · min<sup>-1</sup>; 2 ~ 2.3 min, 0.35 ~ 0.25 mL · min<sup>-1</sup>; 2.3 ~ 2.6 min, 0.25 ~ 0.15 mL · min<sup>-1</sup>; 2.6 ~ 2.8 min, 0.15 ~ 0.1 mL · min<sup>-1</sup>; 2.8 ~ 4 min, 0.1 ~ 0.2 mL · min<sup>-1</sup>; 4 ~ 4.3 min, 0.2 ~ 0.3 mL · min<sup>-1</sup>; 4.3 ~ 4.5 min, 0.3 ~ 0.35 mL · min<sup>-1</sup>; 4.5 ~ 10.5 min, 0.35 mL · min<sup>-1</sup>), PDA(紫外检测器)绿原酸检测,波长 330 nm; ELSD(蒸发光散射检测器)检测灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙,漂移管温度 60 °C,喷雾器 48 °C,增益值 100,气体压力 20 psi,柱温 50 °C。绿原酸分离度为 5.4,川续断皂苷乙分离度为 2.0,灰毡毛忍冬皂苷乙分离度为 2.3; 色谱图见图 1, 2。



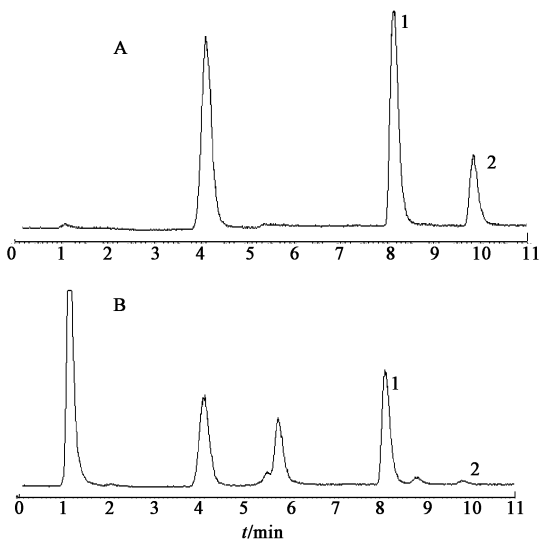
A. 对照品; B. 供试品; 1. 绿原酸

图1 山银花 HPLC-PDA

Fig. 1 HPLC-PDA of *Lonicerae Flos* sample

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 混合对照品溶液:取绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 0.573 mg,灰毡毛忍冬皂苷乙 0.588 mg,川续断皂苷乙 0.232 mg 的混合溶液,即得。



A. 对照品; B. 样品; 1. 灰毡毛忍冬皂苷乙; 2. 川续断皂苷乙

图 2 山银花 HPLC-ELSD

Fig. 2 HPLC-ELSD of Lonicerae Flos sample

6.09 mg, 灰毡毛忍冬皂苷乙 8.98 mg, 川续断皂苷乙 2.23 mg, 分别用 50% 甲醇定容至 10 mL, 即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取山银花粉末(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 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 260 W, 频率 40 kHz)40 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过 0.20 μm 微孔滤膜, 即得。

**2.3 线性关系考察** 取单一成分对照品溶液(绿原酸 0.609 g·L<sup>-1</sup>、灰毡毛忍冬皂苷乙 0.898 g·L<sup>-1</sup>、川续断皂苷乙 0.223 g·L<sup>-1</sup>)按上述色谱条件, 绿原酸分别进样 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 μL; 灰毡毛忍冬皂苷乙分别进样 0.5, 0.8, 1, 1.3, 1.6 μL; 川续断皂苷乙分别进样 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3 μL, 测定峰面积。其中绿原酸以峰面积 Y 对进样量 X 进行线性回归, 灰毡毛忍冬皂苷乙与川续断皂苷乙则分别以峰面积 Y 的对数与对照品进样量 X 的对数进行线性回归。3 个成分的线性方程见表 1。

单一成分对照品溶液: 精密量取对照品绿原酸

表 1 绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的线性方程

Table 1 Linear regression equation of chlorogenic acid, macranthoidin B and dipsacoside B

成分	线性范围/μg	线性方程	R <sup>2</sup>
绿原酸	0.304 5 ~ 1.522 5	$Y = 6.5 \times 10^{-8} X + 0.121 6$	0.999 4
灰毡毛忍冬皂苷乙	0.449 ~ 1.436 8	$\ln Y = 0.670 2 \ln X - 10.962$	0.999 3
川续断皂苷乙	0.044 6 ~ 0.223	$\ln Y = 0.880 1 \ln X - 14.274$	0.999 4

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次进样 2 μL, 绿原酸与灰毡毛忍冬皂苷乙峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 2.1%。取川续断皂苷乙对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次进样 1 μL, 川续断皂苷乙峰面积的 RSD 3.6%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取同一批次山银花样品 6 份, 按供试品溶液方法制备进样测定, 计算含量。绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙含量的 RSD 分别为 2.8%, 1.6%, 3.9%。表明重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一批供试品溶液, 室温避光放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进行测定, 结果绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 0.7%, 2.9%; 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.4.4 回收率试验** 精密称定一定量已知含量的绥阳县山银花样品, 分别精密加入绿原酸 17.10 mg、灰毡毛忍冬皂苷乙 22.45 mg 和川续断皂苷乙 2.23 mg, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样 1.5 μL, 测定峰面积, 分别计算各成分的回收率。

结果见表 2。

**2.5 样品含量测定** 取山银花样品, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 山银花中 3 种成分测定结果见表 3。

## 3 讨论

本文利用 UPLC 对山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙进行同时测定, 11 min 内即可同时完成 3 个成分的准确测定, 与传统的 HPLC 相比分析效率高, 溶剂消耗少, 分析方法灵敏、准确、快速, 具有进一步推广和应用的价值。

由于 Waters 所提供的 HPLC-UPLC 方法转换器并不能完全解决方法转换的问题<sup>[9]</sup>, 实验中所需的色谱条件是经过优化最终确定的。

**提取条件考察** 在查阅参考文献中发现样品处理方法超声 1 h<sup>[6]</sup>, 与药典规定的超声 40 min<sup>[1]</sup>有一定出入, 故对提取时间进行考察, 考察结果为超声提取 40 min 效果最优。

**色谱条件选择** 考察了 0.1%, 0.4%, 1% 不同乙酸浓度对峰的保留时间和分离度的影响, 以及考察了以甲酸作为流动相与以乙酸作为流动相进行对

表 2 山银花中 3 种成分的加样回收率测定 (n=6)

Table 2 Results of recovery test of Lonicerae Flos (n=6)

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
绿原酸	0.253 4	18.37	17.10	35.11	97.89	98.19	3.8
	0.250 4	18.15	17.10	35.96	104.15		
	0.248 8	18.04	17.10	35.35	101.23		
	0.242 9	17.61	17.10	33.94	95.50		
	0.242 2	17.56	17.10	33.85	95.26		
	0.239 9	17.39	17.10	33.65	95.09		
灰毡毛忍冬皂苷乙	0.250 2	25.24	22.45	46.68	95.50	97.15	2.2
	0.251 8	25.41	22.45	47.86	100.00		
	0.251 9	25.42	22.45	47.79	99.64		
	0.251 6	25.39	22.45	46.92	95.90		
	0.252 0	25.43	22.45	47.16	96.79		
	0.242 4	24.46	22.45	45.80	95.06		
川续断皂苷乙	0.266 5	2.96	2.23	5.13	97.31	99.18	3.7
	0.268 3	2.98	2.23	5.31	104.48		
	0.267 6	2.97	2.23	5.27	103.14		
	0.208 1	2.31	2.23	4.46	96.40		
	0.209 3	2.32	2.23	4.50	97.76		
	0.237 8	2.64	2.23	4.78	95.96		

表 3 山银花样品中 3 种成分含量测定 (n=2)

Table 3 Three component determination of Lonicerae Flos (n=2) %

产地	绿原酸	灰毡毛忍冬皂苷乙	川续断皂苷乙
绥阳县小关乡	3.32	7.34	0.62
丹寨兴仁镇	1.99	5.47	0.35
金沙龙坝乡	6.51	5.74	0.48
施秉县白垛乡	6.39	5.42	0.24
安顺西秀区	6.47	5.12	0.39

比,结果表明以 0.4% 乙酸做为流动相效果最佳。考察了 35, 45, 50, 60 °C 柱温对保留时间和分离度的影响,在 50 °C 柱温条件下,各峰分离效果最好。为缩短测量时间,尝试使用梯度流速方法,结果表明梯度流速比恒定流速能有效地缩短保留时间。

ELSD 参数的优化 考察了气体增益 100, 300, 500 PMT, 气体压力 20, 30, 40 psi, 漂移管温度 40, 60, 80 °C, 喷雾器 24, 36, 48 °C, 综合测定结果,从噪声大小对基线影响情况来看,选择 100 PMT, 20 psi, 漂移管 60 °C, 喷雾器 48 °C 效果最好。

将此方法用于测定考察贵州地区山银花的质量。从实验结果得知不同产地的山银花其绿原酸和皂苷类的含量也不同,测量结果除丹寨兴仁镇的绿原酸含量达不到 2010 年版《中国药典》一部的规定外,其他均符合药典标准。

[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: 28.
- [2] 栗时颖, 郑兴, 廖端芳. 山银花研究进展[J]. 南华大学学报, 2009, 37(6): 744-746.
- [3] 柴兴云, 王林, 宋越, 等. 山银花中黄酮类成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(4): 299-302.
- [4] 柴兴云, 李萍, 窦静, 等. 山银花中皂苷类成分的研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(2): 83-86.
- [5] 谷筱玉, 陈振鹏, 陈乾平, 等. HPLC-UV-ELSD 测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5): 884-887.
- [6] 卢凤来, 蒋海英, 陈月圆, 等. HPLC-ELSD 法测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1821-1823.
- [7] 张璐, 曾文雪. HPLC-ELSD 法同时测定山银花中绿原酸、木犀草苷和川续断皂苷乙的含量[J]. 江西中医学报, 2011, 23(4): 40-42.
- [8] 李红霞, 王雪芹, 李振国, 等. 不同产地金银花与山银花主要成分的含量比较[J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2935-2937.
- [9] 周新, 陈会明, 白桦, 等. HPLC 与 UPLC 色谱条件转换方法研究[J]. 分析试验室, 2008, 27(4): 56-58.

[责任编辑 顾雪竹]