

测定金银花中6种有机酸类化合物含量的一种新方法

李文龙¹, 张文明², 薛东升², 陈俊¹, 瞿海斌¹

(1. 浙江大学药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058; 2. 上海凯宝药业有限公司, 上海 201418)

[摘要] **目的:**为解决金银花药材分析中部分对照品价格高、不易获得的问题,建立了一测多评的分析方法。**方法:**通过测定绿原酸(CA)、咖啡酸(CfA)的含量,以及与其它有机酸的相对校正因子(RCF),计算出其它几种有机酸的含量。**结果:**在一定线性范围内,CA与新绿原酸(NCA)、3,4-二咖啡酸酰奎尼酸(3,4-DCA)、3,5-二咖啡酸酰奎尼酸(3,5-DCA)、4,5-二咖啡酸酰奎尼酸(4,5-DCA)的RCF分别为5.462、5.689、2.313、2.382,CfA与NCA、3,4-DCA、3,5-DCA、4,5-DCA的RCF分别为3.941、4.103、1.669、1.718。该方法在不同实验室、不同型号的高效液相色谱仪以及不同色谱柱上进行验证,重现性满意;与外标法相比,所得结果经方差分析均无显著性差异($P>0.05$),准确度较高。**结论:**该方法可采用较易获得的对照品测定金银花药材中多种有机酸的含量,有助于对金银花药材进行更为全面的质量控制。

[关键词] 金银花/分析; 有机酸类; 绿原酸/化学; 色谱法, 高压液相

[中图分类号] R 917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2012)01-0013-06

A new method for simultaneous assay of six organic acids in *Lonicerae Japonicae Flos*

LI Wen-long¹, ZHANG Wen-ming², XUE Dong-sheng², CHEN Jun¹, QU Hai-bin¹ (1. Institute of Pharmaceutical Informatics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Kaibao Pharmacy Co., Ltd., Shanghai 201418, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for quality control of *Lonicerae Japonicae Flos*. **Methods:** The contents of chlorogenic acid (CA) and caffeic acid (CfA) were determined, and the relative correction factors (RCF) of other organic acids were calculated, which were used for the indirect determination. **Results:** The RCFs for the neochlorogenic acid (NCA), 3,4-O-dicaffeoylquinic acid (3,4-DCA), 3,5-O-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCA), and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid (4,5-DCA) were 5.462, 5.689, 2.313, 2.382 (to CA) and 3.941, 4.103, 1.669, 1.718 (to CfA), respectively. The established method was validated in different laboratories with different high performance liquid chromatography (HPLC) instruments and different chromatographic columns; the result indicated that the reproducibility was satisfactory. There was no

收稿日期:2011-10-17 修回日期:2011-12-07

基金项目:国家科技重大专项(2009ZX09313-036)资助。

作者简介:李文龙(1980-),男,博士,助研,主要从事中药制药过程分析技术研究。

通讯作者:瞿海斌(1969-),男,教授,博士生导师,主要从事中药质量控制及中药制药工程技术研究;E-mail: quhb@zju.edu.cn

significant difference between the established QAMS method and external reference method ($P > 0.05$).

Conclusion: The established QAMS method can be used for simultaneous determination of 6 organic acids as quality control of *Lonicerae Japonicae Flos* with easy available standard substances.

[Key words] Flos *Lonicerae*/analysis; Organic acids; Chlorogenic acid/chemistry; Chromatography, high pressure liquid

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2012, 41(1):13-18.]

中药成分的复杂性决定了必须采用多成分含量测定、多指标质量评价的模式对其进行质量控制,建立这种分析方法需要有多种对照品建立标准曲线,但是部分中药标准品存在分离难度大、单体不稳定、难以供应或供应价格高等问题,使得该模式仅限于少数科研项目,而难以推广到工业生产上。为解决这一问题,王智民等^[1-3]提出,通过测定一个易得对照品成分的含量,求出其它药效成分对应于这一标准品的校正因子,来实现多个成分的“一测多评法”,尤其是对照品匮乏成分的测定。该方法可实现在对照品短缺的情况下,进行多指标成分的含量测定。此法经实践验证,具有可行性和技术适应性,已被采纳录入 2010 版《中国药典》^[4],目前有白芍、黄芩等药材^[5-12]以及喜炎平、冠脉康胶囊等中成药^[13-14]的相关研究报道。

金银花(*Lonicerae Japonicae Flos*.)为忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb)的干燥花蕾或带初开的花,味甘、性寒,为常用中药,具有清热解毒、疏散风热的功效。有机酸类化合物是金银花的主要有效成分,包括咖啡酸(CfA)、绿原酸(CA)、新绿原酸(NCA)和异绿原酸等,其中异绿原酸为一种混合物,它的异构体有 6 种,分别为 4,5-二咖啡酸酰奎尼酸(4,5-DCA)、3,4-二咖啡酸酰奎尼酸(3,4-DCA)、3,5-二咖啡酸酰奎尼酸(3,5-DCA)、1,3-二咖啡酸酰奎尼酸、3-阿魏酰奎尼酸和 4-阿魏酰奎尼酸^[15]。除绿原酸和咖啡酸外,其余标准品由于分离纯化比较困难,价格昂贵,难以应用到常规分析中。本研究以金银花药材为例,通过对其中 CA 和 CfA 含量的测定,实现了对其它 4 种有机酸类化合物(NCA、3,4-DCA、4,5-DCA、3,5-DCA)的含量测定,效果较为满意。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);MILLIPORE 超纯水器(美国 Millipore 公司);KQ-250B 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);METTLER AE240 电子天平(梅特勒-托利多公司);FL-027 高速台式离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 试剂 实验用乙腈、甲酸均为色谱纯,水为超纯水。CA、CfA 对照品购自中国药品生物制品检定所,NCA、3,4-DCA、3,5-DCA、4,5-DCA 由本实验室自制,纯度均 > 95%。金银花药材样品由上海凯宝药业有限公司提供。

2 方法与结果

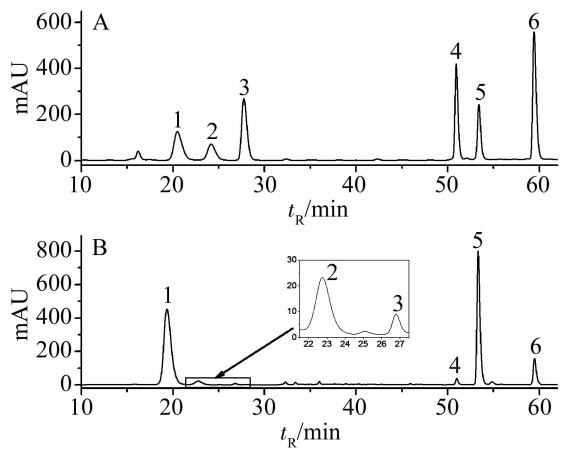
成分的浓度与检测器响应在一定的范围内成正比,即 $f = W/A$ (其中, W 表示浓度, A 表示响应值)。本研究在金银花的多指标含量测定时,分别以绿原酸和咖啡酸为参照物,计算其它成分的相对校正因子。在实际测定时,用外标法测定绿原酸或咖啡酸,再通过校正因子计算其它化学成分的含量。同时,用常规方法进行同步测定,以验证计算值的正确性和可行性。相对校正因子的计算方法^[7]:

$$f_{sk} = \frac{f_s}{f_k} = \frac{W_s \times A_k}{W_k \times A_s} \quad (1)$$

其中: s, k 分别代表内参物和其它待测成分。

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相:A 相为 0.1% 甲酸-水,B 相为 0.1% 甲酸-乙腈,采用二元梯度洗脱,洗脱程序为 0 ~ 25 min, B 相:8% ~ 8%; 25 ~ 30 min, B 相:8% ~ 19%; 30 ~ 60

min,B 相:19%~19%。另外,流速:1 ml·min⁻¹,检测波长:280 nm,柱温:25℃,进样量:10 μl。在此色谱条件下,所得混合标准品和样品的色谱图如图 1 所示。



1:新绿原酸; 2:绿原酸; 3:咖啡酸; 4:3,5-二咖啡酸酰奎尼酸; 5:3,4-二咖啡酸酰奎尼酸; 6:4,5-二咖啡酸酰奎尼酸。

图 1 混合标准品(A)及金银花药材提取液(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 The characteristic chromatograms of the mixed standards (A) and sample solution (B)

2.2 对照品溶液制备 精密称取 CA、CfA、NCA、3,4-DCA、4,5-DCA、3,5-DCA 标准品适量,用 50% 的甲醇配制成单个标准品储备液,分别精密量取各储备液适量,配制成混和标准品储备液,并稀释成系列浓度的混和标准品。以上 6 种有机酸在混合标准品储备液中的质量浓度分别为 0.960、1.05、0.975、0.435、0.945、0.870 mg·ml⁻¹。

2.3 供试品溶液制备 精密称取 1 g 金银花药材粉末置于 25 ml 容量瓶中,用 50:50 的甲醇:水定容至刻度,超声提取 2 h,取提取液 1 ml,在 10 000 r/min 下离心 10 min,取 10 μl 上清液用于液相分析。

2.4 精密度实验 在线性范围内,分别进行日内精密度(1 d 内连续分析 6 次)和日间精密度(3 d 内每天分析 1 次)的考察。结果表明,6 种有机酸的日内精密度 RSD 均 <3%,日间精密度 RSD 均 <5%。表明该方法具有满意的精密度。

2.5 重复性考察 精密称取同一批次金银花药材粉末 6 份,按照 2.3 项下的方法进行提取,提取液依次进行 HPLC 分析。在该色谱条件下,各有机酸类成分的重复性 RSD 均 <5% (表 1),表明该定量方法的重复性良好。

表 1 重复性考察结果

Table 1 The repeatability parameters of the established HPLC method

测试顺序	有机酸类化合物的含量/%					
	NCA	CA	CfA	3,4-DCA	3,5-DCA	4,5-DCA
1	1.425	0.244	0.036	0.032	1.987	0.402
2	1.449	0.235	0.038	0.032	2.000	0.377
3	1.450	0.231	0.037	0.032	1.929	0.398
4	1.460	0.249	0.034	0.035	2.110	0.387
5	1.452	0.247	0.037	0.034	2.164	0.395
6	1.541	0.238	0.035	0.032	2.143	0.411
RSD/%	2.738	2.958	4.070	4.048	4.675	3.000

2.6 稳定性考察 将供试品溶液置于室温下,分别在 0、2、4、8、16、24 h 后进样分析,结果见表 2。在该色谱条件下,各有机酸类成分的稳定性 RSD 均 <5%,表明在 24 h 以内,各有机酸

类成分在溶液中的含量稳定。

2.7 加样回收率考察 按加样回收率的测定方法,在已知含量的供试品溶液中,加入适量的混合标准品溶液,进样分析,平行制备 6 份,计

算平均回收率,6 种有机酸的平均回收率分别为: 97. 7%、102%、99. 1%、98. 6%、101%、98. 5%,表明在该色谱条件下,该定量方法的加样回收率良好。

表 2 稳定性考察结果

Table 2 The stability parameters of the established HPLC method

测试时间/h	有机酸类化合物的含量/%					
	NCA	CA	CfA	3,4-DCA	3,5-DCA	4,5-DCA
0	1. 425	0. 244	0. 036	0. 032	1. 987	0. 402
2	1. 396	0. 239	0. 035	0. 031	1. 947	0. 393
4	1. 512	0. 234	0. 036	0. 034	2. 135	0. 386
8	1. 521	0. 231	0. 037	0. 033	2. 144	0. 404
16	1. 453	0. 248	0. 034	0. 031	2. 052	0. 363
24	1. 426	0. 24	0. 038	0. 033	2. 092	0. 369
RSD/%	3. 480	2. 612	3. 928	3. 746	3. 876	4. 405

表 3 相对校正因子计算结果

Table 3 The computing results of the relative correction factors

参照物	进样体积/ μl	相对校正因子						RSD/%
		5	8	10	12	15	平均值	
绿原酸	NCA	5. 454	5. 400	5. 550	5. 421	5. 483	5. 462	1. 074
	CfA	1. 393	1. 362	1. 410	1. 357	1. 407	1. 386	1. 798
	3,4-DCA	5. 647	5. 550	5. 932	5. 499	5. 818	5. 689	3. 204
	3,5-DCA	2. 282	2. 229	2. 403	2. 211	2. 444	2. 313	4. 518
	4,5-DCA	2. 366	2. 326	2. 461	2. 303	2. 454	2. 382	3. 046
咖啡酸	NCA	3. 915	3. 965	3. 936	3. 993	3. 896	3. 941	0. 983
	CA	0. 718	0. 734	0. 709	0. 736	0. 710	0. 721	1. 791
	3,4-DCA	4. 053	4. 074	4. 206	4. 049	4. 134	4. 103	1. 627
	3,5-DCA	1. 638	1. 636	1. 704	1. 629	1. 736	1. 669	2. 899
	4,5-DCA	1. 698	1. 707	1. 745	1. 696	1. 743	1. 718	1. 413

2. 9 校正因子重现性考察 试验分别考察了 Waters 和 Agilent 1100 两种高效液相色谱系统和 Agilent ZORBAX SB- C_{18} (250 mm $\times$ 4. 6 mm, 5 μm)、Alltech Alltima- C_{18} (250 mm $\times$ 4. 6 mm, 5 μm) 和 Tigerkin C_{18} (200 mm $\times$ 4. 6 mm, 5. 0 μm) 三种色谱柱。精密吸取混合对照品溶液 5、10、15 和 20 μl 进样分析,每个浓度进样 3 次,取平均值。以绿原酸为参照物计算相对校正因子,所得的相对校正因子及其相对标准差。

2. 8 相对校正因子计算 对不同进样体积的混合标准品进行分析,分别以绿原酸和咖啡酸为参照物,按 2. 1 项下公式计算出其它目标化合物的相对校正因子,结果见表 3。

表 4 显示,不同的仪器及不同的色谱柱所得的相对校正因子差异并不显著。在浙江大学药物信息学研究所(实验室 1)和上海凯宝药业股份有限公司化验室(实验室 2)均采用 Agilent ZORBAX SB- C_{18} 色谱柱进行一测多评试验,进样量为 10 μl ,各测 3 次,测得的相对校正因子见表 5,RSD 在 0. 8% ~ 3. 8% 之间,这表明不同实验室所测得的相对校正因子差异较小。

表 4 不同仪器和不同色谱柱上测得的相对校正因子

Table 4 The relative correction factors calculated with different HPLC instruments and chromatographic columns

仪器	色谱柱	相对校正因子				
		NCA	CfA	3,4-DCA	3,5-DCA	4,5-DCA
Agilent 1100	Agilent ZORBAX SB-C ₁₈	5.55	1.41	5.932	2.403	2.461
	Alltech Alltima-C ₁₈	5.532	1.439	5.877	2.426	2.488
	Tigerkin C ₁₈	5.546	1.433	5.733	2.391	2.310
Waters	Agilent ZORBAX SB-C ₁₈	5.39	1.392	5.953	2.382	2.377
	Alltech Alltima-C ₁₈	5.422	1.389	5.866	2.379	2.369
	Tigerkin C ₁₈	5.491	1.401	5.679	2.377	2.406
Mean	5.488	1.411	5.840	2.393	2.402	
RSD/%	1.239	1.491	1.886	0.785	2.703	

表 5 不同实验室测得的相对校正因子

Table 5 The relative correction factors determined in different laboratories

参照物		NCA	CA	CfA	3,4-DCA	3,5-DCA	4,5-DCA
绿原酸	实验室 1	5.550	/	1.410	5.932	2.403	2.461
	实验室 2	5.428	/	1.377	5.726	2.467	2.396
	RSD/%	1.572	/	1.674	2.499	2.995	1.893
咖啡酸	实验室 1	3.936	0.709	/	4.206	1.704	1.745
	实验室 2	3.891	0.721	/	4.351	1.685	1.738
	RSD/%	0.813	1.187	/	2.396	3.792	2.348

2.10 一测多评法与外标法的比较结果 分别以绿原酸和咖啡酸为内参物质,用所建立的一测多评法测定了金银花药材中其他有机酸的含量,并用外标法进行验证,结果列于表 6 中。对测试结果进行方差分析,得到 NCA、3,4-DCA、3,5-DCA、4,5-DCA 对应的 *P* 值分别为 1.000、0.798、1.000、0.998,表明一测多评法与外标法测定结果之间不存在显著性差异。

表 6 采用一测多评法与外标法测得的金银花药材的含量平均值

Table 6 The average content values of the *Lonicerae Japonicae Flos* samples via QAMS and external standard method

产地	NCA/%			3,4-DCA/%			3,5-DCA/%			4,5-DCA /%		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
贵州安龙	0.168	0.177	0.173	0.002	0.002	0.002	0.875	0.886	0.883	0.108	0.111	0.112
河北邯郸	1.020	1.011	0.998	0.029	0.030	0.030	1.322	1.309	1.307	0.239	0.247	0.244
河南密县	1.211	1.190	1.197	0.029	0.030	0.029	1.653	1.643	1.649	0.546	0.518	0.527
湖北襄樊	0.598	0.592	0.604	0.040	0.042	0.041	1.176	1.190	1.184	0.458	0.438	0.449
湖南邵阳	0.189	0.195	0.192	0.003	0.029	0.003	0.770	0.782	0.774	0.109	0.108	0.112
江西修水	0.269	0.273	0.271	0.027	0.027	0.028	3.999	4.005	4.071	0.311	0.308	0.303
山东平邑	0.481	0.477	0.474	0.020	0.021	0.019	0.898	0.912	0.907	0.171	0.176	0.182

a、b 分别以绿原酸和咖啡酸为内参物的一测多评法所得的含量;c:外标法实测含量.

综上所述,在对照品缺乏的情况下,以外标法测定 CA 或 CfA,利用相对校正因子实现对金银花药材中其它有机酸的含量测定是可行的。该类方法可大大降低分析成本,提高工作效率,将其收入药典,符合质量可控的目标性原则、准确灵敏的科学性原则和简便实用的合理性原则。目前 2010 版中国药典中仅有黄连药材的质量控制采用这一方法,期望在下一版药典中能有更多的药材采用这一方法进行质量控制。

References:

- [1] WANG Zhi-min, GAO Hui-min, FU Xue-tao, et al (王智民,高慧敏,付雪涛,等). Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine [J]. **Chin J Chin Mater Med** (中国中药杂志), 2006, 31 (23): 1925-1928. (in Chinese)
- [2] WANG Zhi-min, QIAN Zhong-zhi, ZHANG Qi-wei, et al (王智民,钱忠直,张启伟,等). Technical guide for the establishment of QMAS methods [J]. **Chin J Chin Mater Med** (中国中药杂志), 2011, 36(6): 657-658. (in Chinese)
- [3] KUANG Yan-hui, ZHU Jing-jing, WANG Zhi-min, et al (匡艳辉,朱晶晶,王智民,等). Simultaneous quantitative analysis of five alkaloids in rhizoma of *Coptis chinensis* by multi-components assay by single marker [J]. **Chin Pharm J** (中国药学杂志), 2009, 44(5): 390-394. (in Chinese)
- [4] **Pharmacopoeia of the peoples republic of China, part 1** (中华人民共和国药典,一部) [M]. 2010, 285-286. (in Chinese)
- [5] HUANG Shan-jun, YANG Qi-wei, SHI Yan-hong, et al (黄山君,杨琪伟,石燕红,等). Simultaneous assay of paeoniflorin and albiflorin in *Paeoniae Radix Alba* by QAMS [J]. **Chin J Chin Mater Med** (中国中药杂志), 2011, 36(6): 780-783. (in Chinese)
- [6] ZHU Jing-jing, WANG Zhi-min, ZHANG Qi-wei, et al (朱晶晶,王智民,张启伟,等). A quantitative method for simultaneous assay of four flavones with one marker in *Radix Scutellariae* [J]. **Chin J Chin Mater Med** (中国中药杂志), 2009, 34 (24): 3229-3234. (in Chinese)
- [7] ZHU Jing-jing, WANG Zhi-min, KUANG Yan-hui, et al (朱晶晶,王智民,匡艳辉,等). quantitative method using one marker for simultaneous assay of ginsenosides in *Panax ginseng* and *P. notoginseng* [J]. **Acta Pharm Sin** (药学报), 2008, 43(12): 1211-1216. (in Chinese)
- [8] HUANG Shuai, MA Miao, HUANG Qian-qian, et al (黄帅,马淼,黄倩倩,等). Simultaneous assay of 3 saponins in *Radix bupleuri* by QAMS [J]. **Lishizhen Med Mater Med Res** (时珍国医国药), 2010, 21(4): 838-840. (in Chinese)
- [9] CAI Hai-xia, CHEN Jun, LI Ping (蔡海霞,陈君,李萍). Simultaneous assay of four isoflavonoids in *Astragali Radix* by QAMS [J]. **Chin J Chin Mater Med** (中国中药杂志), 2010, 35 (20): 2712-2717. (in Chinese)
- [10] YU Xiao, SONG Jing, XIONG Zhi-li, et al (于霄,宋静,熊志立,等). Simultaneous assay of epimedin A epimedin B, epimedin C and icariin in herba *epimedii* by QAMS [J]. **Chin J Chin Mater Med** (中国中药杂志), 2010, 35 (24): 3310-3313. (in Chinese)
- [11] KONG Jing-jing, ZHU Jing-jing, WANG Zhi-min, et al (孔晶晶,朱晶晶,王智民,等). Quantitative analysis of polytype components in *forsythia suspense* by QAMS method [J]. **Chin Pharm J** (中国药学杂志), 2010, 45 (17): 1301-1304. (in Chinese)
- [12] SONG Ya-fang, WANG Zhi-min, ZHU Jing-jing, et al (宋亚芳,王智民,朱晶晶,等). Assay of evodiol, evodiamine and rutaecarpine in fructus *evodiae* by QAMS [J]. **Chin J Chin Mater Med** (中国中药杂志), 2009, 34 (21): 2781-2785. (in Chinese)
- [13] ZOU Xiao-Li, YU Cui-cui, XU Hui, et al (邹晓丽,于翠翠,许卉,等). Study of a potency value transmission method for reference standard of andrographolide sulfonate E in Xiyianping injection [J]. **Chin J Pharm Anal** (药物分析杂志), 2010, 30(1): 134-137. (in Chinese)
- [14] ZOU Gui-xin, YOU Xian-min, ZHANG Ying, et al (邹桂欣,尤献民,张颖,等). New method of multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of *Guanmaikang capsula* [J]. **Chin J Chin Mater Med** (中国中药杂志), 2008, 33 (15): 1828-1831. (in Chinese)
- [15] LIU Xiang-lan, LIU Fang, ZHANG Ying, et al (刘祥兰,刘芳,张英,等). Study on different extraction process of chlorogenic acid in *flos loniceræ* and *optimum* [J]. **Chin Tradit Pat Med** (中成药), 2000, 22 (6): 402-404. (in Chinese)