

高效液相色谱法测定金银花中绿原酸及木犀草苷含量

倪洁*

(金陵药业股份有限公司, 南京 210009)

摘要:目的 建立一种反向高效液相色谱分析方法,同时检测鲜金银花样品中绿原酸与木犀草苷的含量。

方法 该方法采用了超声波辅助萃取作为样品预处理手段,并对提取溶剂、温度及流动相等关键参数进行了优化。**结果** 实验结果显示,在0.5~100.0 mg/mL的浓度范围内,两种化合物展现出优秀的线性关系,相关系数 $r > 0.999$ 。此外,该方法的加标回收率范围为96%~108%,重复性RSD分别为2.05%和2.44%。**结论** 本文提出的方法操作简便且结果精确,适用于鲜金银花中绿原酸和木犀草苷含量的准确测定,能够为鲜金银花活性成分的定量分析提供可靠的工具,有助于其质量控制和药效评价。

关键词: 高效液相色谱法; 金银花; 绿原酸; 木犀草苷

0 引言

金银花作为传统中药材,具有清热解毒、疏散风热等功效,广泛应用于感冒、咽喉肿痛等疾病的治疗。绿原酸和木犀草苷作为金银花中的主要活性成分,具有抗氧化、抗炎、抗菌等多种药理作用,其含量直接关系到金银花药材的药效与质量。因此,准确测定金银花中绿原酸及木犀草苷的含量对于保证药材质量、优化生产工艺及开发新型药物具有重要意义。在采用高效液相色谱法时测定金银花中绿原酸、木犀草苷含量,具有方法简便、准确、可靠的特点,能够大幅度降低金银花中功效成分测试的时间,以此降低人力、物力成本的浪费。本研究旨在通过优化高效液相色谱法来实现对金银花中含有的绿原酸、木犀草苷含量测定,以此为金银花药材的质量控制提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本实验中所选用的金银花样本采集自山东省平邑县,实验过程中采用热风干燥方式进行初步处理。实验中选用的其他实验材料中,乙醇采购自国药集团化学试剂有限公司,乙腈和磷酸均具有色谱纯度,使用的超纯水为本次实验室自备超纯水。金银花中的木犀草苷和绿原酸作为标准品,其检测纯度在98%以上,均由上海麦克林生化科技股份有限公司提供^[1]。

1.2 设备仪器

实验设备选用如下:U-3000高效液相色谱系统,来自美国Thermo Fisher Scientific;Milli-Q Integral纯水系统,由美

国MilliporeSigma制造;KQ-5200DE数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司产品;IKA Vortex Genius 3涡旋混合器,德国IKA Werke GmbH & Co. KG出品;Sorvall Legend XTR高速冷冻离心机,美国Thermo Fisher Scientific生产;Mettler Toledo MS105DU/01十万分之一精密电子天平,瑞士Mettler Toledo International Inc.制造;Mettler Toledo PL203/02S万分之一电子天平,来自瑞士Mettler Toledo International Inc;Qihe KS-1053高速多功能粉碎机,广州祁和电器有限公司产品^[2];GZX-9056MBE热风循环烘箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂制造。

1.3 实验方法

1.3.1 制备样品

选取新鲜材料500 g,运用热风干燥工艺使其水分含量降至大约11%,其干燥步骤如下。

第一,温度设置为45°C,风速2 m/s,湿度65%,持续4 h。第二,温度调整至50°C,风速不变,湿度下调至50%,干燥6 h。第三,在55°C,相同风速与30%湿度条件下干燥,直至含水量稳定在11%。当制备样品进行干燥完成后,随后将其放在粉碎机中进行粉碎,而粉碎后的样品需要筛至65目。

1.3.2 样品预处理

第一,称取2.00 g样品置于50 mL离心管内,加入20 mL乙醇,使用涡旋振荡器混合1 min,接着超声处理20 min(条件:60°C,2500 W)。

第二,完成超声后,将样品进行5 min的离心处理,离心

* 通信作者:倪洁,主管药师,研究方向为中药化学。E-mail: 13548105@qq.com

机转速至少需要达到 1000 r/min, 经过离心后的样品清液转到 50 mL 的容量瓶中, 并将剩余的残余物提取后, 合并两次以上的清液并予以补充到标记线位置^[3]。

第三, 取 10 mL 混合液倒入氮吹管, 于 40°C 条件下吹干至接近完全, 随后将残留的 1 mL 流动相溶解, 并使用 0.22 μm 的过滤膜予以过滤后再进行分析。

1.3.3 色谱分析条件

在对其进行色谱分析时, 可使用规格为 4.6 mL×250 mL, 5 μm 的 Thermo Scientific Acclaim C₁₈ 色谱柱作为固定相。同时, 针对流动相组成部分, 使用乙腈和磷酸水混合容易。其中, 磷酸水溶液的浓度为 0.1%, 两者的混合比例按照 15:85 的比例进行混合。最后, 在对其样本体积的设定要求在 20 μL, 同时柱温应控制在 40°C, 确保其检测的波长在 340 nm 即可。

1.4 实验数据处理

实验中, 每项测定重复三次以确保数据的准确性与可靠性, 数据分析采用 Thermo Scientific 的 Chromeleon 7 软件进行处理^[4]。在色谱分析中, 以绿原酸和木犀草苷作为参照物质, 利用它们的相对保留时间来准确定位对应的色谱峰位置。定量分析通过外标法来确保目标化合物浓度测量的精确度。

2 结果与分析

2.1 前处理条件优化

提取相关溶液的过程中应基于以往的研究结果, 还需要充分考虑绿原酸与木犀草苷之间的独有特性。本实验通过对比甲醇和乙醇水溶液的方式, 提取两种 50% 比例水溶液作为最终的实验提取效果。为此, 准确称量三份样品, 分别使用上述不同的溶剂, 按照既定的预处理步骤进行处理后进行分析。值得注意的是, 当使用 50% 甲醇水溶液和 50% 乙醇水溶液提取时, 无须进行氮吹浓缩步骤^[5]。其分析结果如表 1 所示, 显示纯乙醇作为提取溶剂时, 能够更有效地提取出绿原酸和木犀草苷, 因此后续实验决定采用纯乙醇作为提取溶液。

表 1 提取溶液优化

提取溶液	绿原酸(g/100 g)	木犀草苷(g/100 g)
50% 甲醇水溶液	2.68	0.57
50% 乙醇水溶液	2.64	0.62
乙醇	2.84	0.68

在提取方法的优化方面, 根据相关文献资料可知, 木犀草苷在受热情况下具有较高的溶解性^[6]。因此, 在实验中, 共处理了 18 份样品, 遵循样品预处理所述的流程进行分析, 所得绿原酸和木犀草苷的含量如表 2 所示。分析结果显示, 采用 60°C、20 min 的条件, 重复提取三次能达到最佳提取效果, 不过与同一温度和时间下重复提取两次的结果相差不大。考虑到实验效率、人力及资源成本, 最终决定采用 60°C、20 min 重复

提取两次的方案作为最优提取方法, 实现了效果与成本之间的平衡。

表 2 提取方法优化

温度	时间 (min)	提取次数	木犀草苷 (g/100 g)	绿原酸 (g/100 g)	
室温	5	1	0.28	1.95	
		2	0.36	2.08	
		3	0.48	2.34	
	10	1	1	0.35	2.08
			2	0.48	2.21
			3	0.57	2.45
		20	1	0.58	2.56
			2	0.62	2.68
			3	0.66	2.71
60°C	5	1	0.34	2.18	
		2	0.42	2.21	
		3	0.52	2.32	
	10	1	1	0.45	2.18
			2	0.56	2.46
			3	0.58	2.68
		20	1	0.55	2.62
			2	0.68	2.85
			3	0.068	2.85

2.2 高效液相色谱法条件选择

在对高效液相色谱法的色谱柱进行选择时, 依据《中华人民共和国药典》标准及相关研究, 绿原酸与木犀草苷在 C₁₈ 反相色谱柱上展现出优良的保留特性和分离效果^[7]。基于此, 实验中选用了 Thermo Scientific 品牌的 Acclaim C₁₈ 色谱柱(规格: 4.6 mm×250 mm, 粒径 5 μm)作为分析平台, 以确保这两种化合物的高效分离与精确检测。对流动相及洗脱程序进行优化时, 关于流动相的选定, 参照《中华人民共和国药典》指南相关学者的研究, 如图 1 所示, 实验比较了三种不同的流动相比, 其中流动相 1(乙腈:0.1% 磷酸水=15:85)、流动相 2(乙腈:0.5% 乙酸水=5:95)及流动相 3(乙腈:0.1% 磷酸水=5:95)。通过分析所得色谱图, 观察到流动相 1 展现出更佳的分离效果, 色谱峰形态清晰, 且样品的洗脱时间相对较短。基于这些观察结果, 确定流动相 1(乙腈:0.1% 磷酸水=15:85)属于最佳的洗脱选择方式, 能够有效检测出金银花中绿原酸与木犀草苷的含量。

针对波长的优化检测过程中, 根据相关文献资料, 木犀草苷的峰值紫外吸收位于 255~350 nm, 而绿原酸的峰值吸收波长则为 329 nm, 实际测量的光谱图分别如图 2 所示。鉴于此, 实验中选定 340 nm 作为检测波长, 以同时满足对金银花中绿原酸和木犀草苷的同步监测需求, 确保两者的检测效率与准确性。这一波长的选择是在考虑了两种化合物的光谱特性后做出的, 旨在实现高效、全面的分析效果^[8]。

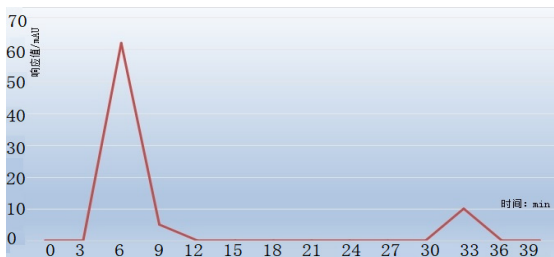


图1 绿原酸及木犀草苷标准液相色谱图

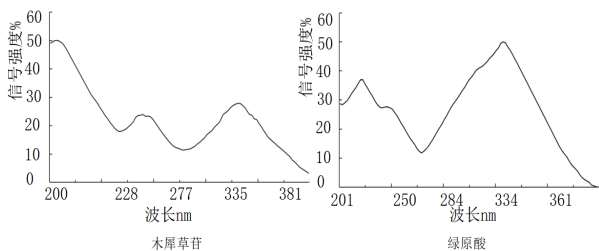


图2 木犀草苷和绿原酸吸收200~400 nm 紫外线光谱图

2.3 定性和定量分析

本实验在标准曲线中,使用绿原酸与木犀草苷标准品20 mg,并将绿原酸与木犀草苷各自转移到50 mL的容量瓶内,随后使用乙醇溶解定量后,可得到浓度为400 μg/mL的标准储备液。然后从储备液中分别取出0.0125、0.025、0.25、1.25、2.5 mL,移至10 mL容量瓶。在对流动相稀释时,以初始流动相刻度为准,在得到相应的标准混合液后,配比相同梯度的标准混合液注入到液相色谱仪中进行测试,从而得到如表3所示的数据。其数据显示结果在0.5~100.0 μg/mL范围内,两种成分均呈现出良好的线性关系,相关系数高于0.999,满足分析标准的要求。此过程确保了标准曲线的准确性和可靠性,为后续样品中绿原酸和木犀草苷的定量分析提供了坚实的基础^[9]。

表3 绿原酸及木犀草苷线性关系

物质	出峰时间(min)	线性范围(mg/mL)	线性回归方程	r ² (n=5)
绿原酸	6.68	0.5~100	y=0.488x+0.001	0.9995
木犀草苷	32.988	0.5~100	y=0.812x+0.038	0.9997

在本实验的检测限评估中,可采用多次重复测量的方式,对其进行至少20次的测量,以此获得其样品标准偏差三倍值和标准曲线斜率占比。根据上述方式进行计算,可得出绿原酸与木犀草苷分别为0.00565 mg和0.00703 mg。随后,将这些数据代入到相应的计算公式中,能够直接计算出绿原酸与木犀草苷的实际浓度分别为0.000141 g/100 g和0.000176 g/100 g。与标准最低含量要求相比,实验中的绿原酸与木犀草苷数值显著低于标准值。这一结果不仅验证了实验方法的灵敏度和可靠性,还表明了所分析的金银花样品中目标成分的浓度远超标准规定

的最低限,确保了其品质符合规范^[10]。

3 结论

本文通过优化高效液相色谱法的各项分析参数,成功建立了一种快速、准确、可靠的金银花中绿原酸及木犀草苷含量测定方法。该方法不仅实现了对金银花活性成分的有效分离与精确定量,还展现了高效液相色谱法在中药复杂体系分析中的强大潜力。本研究成果不仅为金银花药材的质量控制提供了科学依据,还为其他中药材活性成分的分析检测提供了参考。随着高效液相色谱法技术的不断发展与创新,其在中药领域的应用将更加广泛,为推动中药现代化、国际化进程贡献力量。同时,进一步深入研究金银花中其他活性成分及其药效机制,将为金银花药材的综合开发利用开辟新的途径。

参考文献

- [1] 吕光辉,李星雨,叶方,等.高效液相色谱法同时测定毛连菜中绿原酸和异绿原酸A及木犀草苷含量[J].医药导报,2020,39(07):999-1001.
- [2] 石雨荷,谢舒平,王丽君,等.高效液相色谱法同时测定湖南不同产地金银花中不同部位绿原酸与木犀草苷含量[J].中南药学,2019,17(04):552-555.
- [3] 王智聪,傅荣杰,吉建国,等.高分辨采样二维液相色谱法同时测定金银花中绿原酸和木犀草苷含量[J].色谱,2019,37(02):201-206.
- [4] 王玉洁,接伟光,郭娜,等.高效液相色谱法同时检测金银花中绿原酸和总黄酮及其提取工艺[J].粮食与油脂,2022,35(02):157-162.
- [5] 郑江娜,李雪娇,任士福,等.氮、钾配施追肥对金银花二、三、四茬花产量及药用成分含量的影响[J].林业与生态科学,2021,36(03):306-313.
- [6] 陈红,邓萌萌,周波,等.复方J含片中金银花的薄层鉴别及绿原酸的高效液相色谱含量测定[J].四川中医,2018,36(11):192-195.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:人民卫生出版社,1963.
- [8] 范婉思,张贞婵,胡建焜.高效液相色谱法测定复方金银花颗粒中绿原酸的含量[J].中国药物经济学,2017,12(02):22-25.
- [9] 张作军.测定皮炎合剂的金银花中绿原酸含量的高效液相色谱法实验研究[J].北方药学,2017,14(01):5-6.
- [10] 曹宁,闫新焕,刘雪梅,等.高效液相色谱法测定金银花中绿原酸及木犀草苷含量[J].中国果菜,2024,44(07):17-21,28.