

金银花炒炭前后6种成分的含量变化研究^Δ

吴明侠*,李 会,崔永霞#,侯珊珊,丁亚慧(河南中医药大学分析测试中心,郑州 450046)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)15-2112-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.15.27

摘 要 目的:建立同时测定金银花中6种成分含量的方法,并研究金银花炒炭前后上述成分含量的变化。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse Plus C₁₈ RRHD,流动相为0.1%磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为0.2 mL/min,检测波长为350 nm,柱温为25 ℃,进样量为1 μL。结果:绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C检测进样量线性范围分别为21.2~424 μg($r=0.999\ 3$)、1.17~23 μg($r=0.999\ 5$)、2.18~43 μg($r=0.999\ 8$)、5.10~102 μg($r=0.999\ 3$)、2.60~52 μg($r=0.999\ 1$)、4.95~99 μg($r=0.999\ 8$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为97.11%~99.76%(RSD=1.20%, $n=6$)、95.20%~99.90%(RSD=2.20%, $n=6$)、95.71%~100.30%(RSD=2.20%, $n=6$)、95.00%~96.98%(RSD=0.88%, $n=6$)、96.47%~103.00%(RSD=2.40%, $n=6$)、95.78%~103.80%(RSD=3.20%, $n=6$)。与炮制前比较,炮制后的金银花中芦丁、异绿原酸B、异绿原酸C的含量增加,绿原酸、异绿原酸A的含量明显下降,而木犀草苷的含量无明显变化。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于金银花中6种成分含量的同时测定;金银花炒炭前后化学成分有一定变化。
关键词 金银花;炒炭;超高效液相色谱法;含量;变化

Study on Content Changes of 6 Components in *Lonicera japonica* before and after Carbonized

WU Mingxia, LI Hui, CUI Yongxia, HOU Shanshan, DING Yahui(Center of Analysis and Testing Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of 6 components in *Lonicera japonica*, and to study the content changes of them before and after before and after carbonized. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Eclipse Plus C₁₈ RRHD column with mobile phase consisting of 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.2 mL/min. The detection wavelength was set at 350 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 1 μL. RESULTS: The linear ranges of chlorogenic acid, rutin, galuteolin, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C were 21.2-424 μg($r=0.999\ 3$), 1.17-23 μg($r=0.999\ 5$), 2.18-43 μg($r=0.999\ 8$), 5.10-102 μg($r=0.999\ 3$), 2.60-52 μg($r=0.999\ 1$), 4.95-99 μg($r=0.999\ 8$), respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. Recoveries were 97.11%-99.76%(RSD=1.20%, $n=6$), 95.20%-99.90%(RSD=2.20%, $n=6$), 95.71%-100.30%(RSD=2.20%, $n=6$), 95.00%-96.98%(RSD=0.88%, $n=6$), 96.47%-103.00%(RSD=2.40%, $n=6$), 95.78%-103.80%(RSD=3.20%, $n=6$). Compared with before processing, the contents of rutin, isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C in *L. japonica* were increased along with processing, the contents of chlorogenic acid and isochlorogenic acid A were decreased significantly, while the content of galuteolin had no significant change. CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable and repeatable, and can be used for simultaneous determination of 6 components in *L. japonica*. Those chemical components have certain changes before and after carbonized.
KEYWORDS *Lonicera japonica*; Carbonize; UPLC; Content; Change

金银花炭收载于1990年版《中国药典》、1988年版《全国中药炮制规范》及各省炮制规范。金银花炒炭后

寒性减弱,并具涩性,有止血作用,多用于血痢、崩漏,亦可用于吐血、衄血^[1]。目前,国内外对金银花药材的化学

皂苷a与柴胡皂苷d[J].安徽医药,2015,19(3):453-456.
[9] 靳淑敏,王宏侠,田玉路,等.三黄糖敏汤中9种化学成分
的LC-MS/MS法测定[J].中国医药工业杂志,2014,45

Δ 基金项目:河南省高等学校重点科研项目(No.17A360022);河南中医药大学科研苗圃工程项目(No.MP2016-17)
* 副教授。研究方向:中药质量控制和新药研发。E-mail: mxwu711@163.com
通信作者:副教授。研究方向:中药质量控制和新药研发。
E-mail:1020076356@qq.com

(9):876-879.
[10] 吴茵,王蕊,任炳楠,等.UPLC-MS/MS法同时测定沙参
麦冬汤中9种成分的含量[J].中国药房,2016,27(9):
1240-1244.
[11] 吴茵,穆华,刘勇,等. UPLC-MS/MS法同时测定玄麦甘
桔颗粒中8种有效成分[J].中草药,2015,46(20):
3034-3038.
(收稿日期:2016-11-02 修回日期:2017-03-21)
(编辑:刘 柳)

成分、药理活性及作用机制研究较多^[2-5],而对金银花炭止血机制研究尚不深入^[6-8]。本课题组从金银花炒炭前后多种化学成分变化来分析其炮制机制,旨在为从药效学、药理学的角度研究金银花炭的止血机制提供理论基础。

1 材料

1.1 仪器

1290 型超高效液相色谱仪,包括 1260 DAD 检测器(美国 Agilent 公司);JP-1500B-8 型高速多功能粉碎机(永康市久品工贸有限公司);KQ5200 DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:300 W,频率:70 kHz);XS105DU 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);FA2004B 型万分之一电子分析天平(上海精科天美科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(批号:110753-200212)、芦丁对照品(批号:110080-200306)、木犀草苷对照品(批号:111520-200201)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均>98%;异绿原酸 A 对照品(批号:MUST-09061601)、异绿原酸 B 对照品(批号:MUST-09061602)、异绿原酸 C 对照品(批号:MUST-09041001)均购自成都曼思特生物科技有限公司,以上对照品纯度均>98%;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

金银花药材购于河南中医药大学第三附属医院,经河南中医药大学董诚明教授鉴定为真品;金银花炭是在河南中医药大学炮制学科石延榜高级实验师指导下炒制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈ RRHD(50 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相:0.1% 磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~2 min,15% B;2~2.5 min,15%→18% B;2.5~8 min,18% B);流速:0.2 mL/min;检测波长:350 nm;柱温:25 ℃;进样量:1 μL^[9]。色谱见图 1。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取待测成分对照品各适量,加甲醇溶解制成绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 质量浓度分别为 106.00、5.86、10.90、25.50、13.00、24.75 μg/mL 的混合对照品溶液。

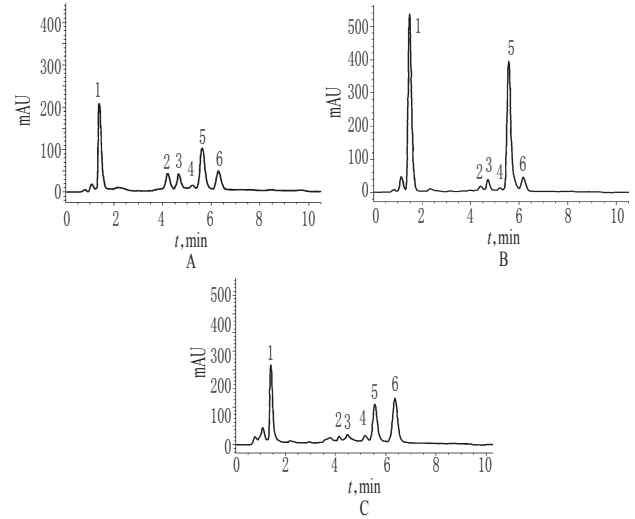
2.3 金银花炭样品的制备

取金银花药材适量,共 3 份,每份约 200 g,分别置于炒锅中,炒制温度为 270 ℃,炒制时间为 8.5 min,炒至外焦褐色内焦黄色,取出,晾干,即得。

2.4 供试品溶液的制备

取金银花药材及其炭品粉末(过 4 号筛)各约 0.25 g,精密称定,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 30 mL,超声处理 45 min,称定质量,加 70% 乙醇补足

减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。



A.混合对照品;B.金银花药材供试品;C.金银花炭供试品;1.绿原酸;2.芦丁;3.木犀草苷;4.异绿原酸 B;5.异绿原酸 A;6.异绿原酸 C
A.mixed control;B.*Lonicera japonica* medicinal material sample;C.carbonized *L. japonica*;1.chlorogenic acid;2.rutin; 3.luteoloside; 4.isochlorogenic acid B; 5.isochlorogenic acid A; 6.isochlorogenic acid C

图 1 超高效液相色谱图

Fig 1 UPLC chromatograms

2.5 线性关系考察

分别精密量取“2.2”项下混合对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表 1。

表 1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
绿原酸	y=13.880x+11.241	0.999 3	21.2~424
芦丁	y=18.264x-8.032	0.999 5	1.17~23
木犀草苷	y=51.946x-19.421	0.999 8	2.18~43
异绿原酸 A	y=22.713x-15.189	0.999 3	5.10~102
异绿原酸 B	y=18.745x-8.727	0.999 1	2.60~52
异绿原酸 C	y=28.399x-12.712	0.999 8	4.95~99

2.6 精密度试验

取“2.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 0.28%、0.47%、0.83%、1.01%、0.74%、0.66%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.4”项下金银花炭供试品溶液适量,分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 0.33%、0.51%、0.79%、0.85%、0.46%、0.53%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密称取同一批金银花炭样品适量,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、芦丁、木犀草苷、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C峰面积的RSD分别为0.95%、1.07%、1.22%、1.56%、1.37%、1.78%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量金银花炭样品适量,共6份,分别加入一定质量的待测成分对照品,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)
Tab 2 Results of recovery test($n=6$)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
绿原酸	0.124 9	4.170 4	4.15	8.310 4	99.76	98.36	1.20
	0.125 1	4.170 6	4.10	8.220 6	97.59		
	0.125 0	4.170 5	4.15	8.290 5	99.28		
	0.124 9	4.170 4	4.15	8.210 6	97.35		
	0.125 0	4.170 5	4.15	8.200 5	97.11		
	0.125 0	4.170 5	4.15	8.280 5	99.04		
芦丁	0.125 0	0.098 8	0.098	0.196 7	99.90	97.65	2.20
	0.125 1	0.099 0	0.098	0.196 0	98.98		
	0.124 9	0.098 7	0.098	0.192 5	95.71		
	0.124 9	0.098 0	0.098	0.192 0	95.20		
	0.125 0	0.099 0	0.098	0.193 5	96.43		
	0.125 0	0.098 8	0.098	0.196 5	99.69		
木犀草苷	0.124 9	0.070 2	0.07	0.140 0	99.71	97.95	2.20
	0.125 1	0.070 4	0.07	0.137 4	95.71		
	0.125 0	0.070 3	0.07	0.137 6	96.14		
	0.125 0	0.070 3	0.07	0.137 5	96.00		
	0.125 0	0.070 3	0.07	0.140 3	99.86		
	0.124 9	0.070 2	0.07	0.140 4	100.30		
异绿原酸A	0.125 0	0.611 6	0.60	1.185 0	95.57	95.85	0.88
	0.124 9	0.611 5	0.60	1.181 5	95.00		
	0.125 0	0.611 6	0.60	1.186 5	95.83		
	0.125 1	0.611 7	0.60	1.192 0	96.72		
	0.124 9	0.611 5	0.60	1.181 5	95.02		
	0.125 0	0.611 6	0.60	1.193 5	96.98		
异绿原酸B	0.125 0	0.085 3	0.085	0.168 3	97.65	99.44	2.40
	0.125 1	0.085 4	0.085	0.167 4	96.47		
	0.125 1	0.085 4	0.085	0.169 0	98.35		
	0.125 0	0.085 3	0.085	0.170 0	99.76		
	0.125 0	0.085 3	0.085	0.172 9	103.00		
	0.124 9	0.085 2	0.085	0.171 4	101.40		
异绿原酸C	0.125 1	0.842 5	0.84	1.680 0	99.70	99.46	3.20
	0.125 0	0.842 5	0.84	1.700 0	102.10		
	0.125 0	0.842 5	0.84	1.647 0	95.78		
	0.124 9	0.842 4	0.84	1.652 0	96.38		
	0.125 0	0.842 5	0.84	1.714 0	103.80		
	0.124 9	0.842 4	0.84	1.674 0	98.99		

2.10 样品含量测定

取样品各适量,分别按“2.4”项下方法制备供试品溶

液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

Tab 3 Results of content determination of samples ($n=3$, mg/g)

样品	绿原酸	芦丁	木犀草苷	异绿原酸A	异绿原酸B	异绿原酸C
生药	33.87	0.813 0	0.606 2	17.050	0.256 9	2.782
炭药	13.46	1.112 6	0.561 9	5.148	0.682 0	6.739

3 讨论

通过炮制前后化学成分的变化发现,金银花经炒炭后,增加的主要成分有芦丁、异绿原酸B、异绿原酸C,而绿原酸和异绿原酸A的含量明显下降,木犀草苷的含量变化不明显。分析各成分含量变化的原因,可能是绿原酸和异绿原酸类化合物结构不稳定,随着炮制时间延长及炮制温度改变其结构发生改变,加热后一部分转化成异绿原酸B、C,一部分结构分解破坏,总绿原酸类成分含量呈现下降趋势。但金银花炮制前后这6种成分含量的变化,是否与金银花炒炭后止血作用增强、抑菌能力下降等药理活性改变有关,仍有待进一步的试验验证。

参考文献

[1] 孙赫.金银花药性与临床应用的文献研究及系统性评价[D].长沙:湖南中医药大学,2015.

[2] 宋亚玲,倪付勇,赵祎武,等.金银花化学成分研究进展[J].中草药,2014,45(24):3656-3664.

[3] 庄丽,张超,阿里穆斯.金银花的药理作用与临床应用研究进展[J].辽宁中医杂志,2013,40(2):378-381.

[4] 罗时旋,赵稷,张宇,等.代谢组学法考察金银花醇提取物对模型小鼠肝损伤的预防作用[J].中国药房,2015,26(22):3109-3112.

[5] 马官英,张庆刚,钟瑞华,等.金银花总黄酮对氧化应激中肝星状细胞的保护作用[J].中国药房,2014,25(31):2895-2897.

[6] 王英姿,张兆旺.金银花炮制研究述评[J].山东中医药大学学报,2000,24(1):66-59.

[7] 黄艳英,黄敏,陆中海.金银花炮制的实验研究[J].中药材,1994,17(1):25-26.

[8] 丛悦,王艳,李勉.金银花炮制机制的初步探讨[J].河南大学学报(医学版),2009,28(4):242-246.

[9] 韩永成,刘伟,陈宁,等.UPLC法同时测定金银花中6种有效成分的含量[J].天然产物研究与开发,2015,27(1):89-93.

(收稿日期:2016-06-31 修回日期:2016-11-03)

(编辑:张 静)