

# 高效液相色谱-蒸发光散射法同时测定山银花提取物中5种皂苷的含量

罗 艳, 杨 柳, 涂晓琴, 赵 薇\*

(湖南省药品检验研究院, 长沙 410001)

**摘要:** 目的 建立高效液相色谱-蒸发光散射法(high performance liquid chromatography-evaporative light scattering, HPLC-ELSD)同时测定山银花提取物中5种皂苷的含量的分析方法。**方法** 采用Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%甲酸溶液作为流动相进行梯度洗脱, 流速为0.8 mL/min, 柱温为30 °C, 漂移管温度为60 °C。**结果** 5种皂苷(灰毡毛忍冬皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬次皂苷乙和灰毡毛忍冬次皂苷甲)在一定范围内线性关系良好(*r*为0.9989~0.9999), 回收率为95.74%~97.02%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为0.9%~1.4% (*n*=6)。**结论** 本法简便、可靠、准确, 适用于山银花提取物的质量控制。

**关键词:** 高效液相色谱-蒸发光散射法; 山银花提取物; 皂苷; 含量测定

## Simultaneous determination of 5 kinds of saponins in *Lonicera hypoglauca* extract by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering

LUO Yan, YANG Liu, TU Xiao-Qin, ZHAO Wei\*

(Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for simultaneous determination of 5 kinds of saponins in *Lonicera hypoglauca* extract by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering (HPLC-ELSD). **Methods** Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, and gradient elution was conducted with acetonitrile-0.1% formic acid as mobile phase for determination. Flow rate was 0.8 mL/min, column temperature was 30 °C, and drift tube temperature was 60 °C. **Results** The 5 kinds of saponins (macranthoidin A, macranthoidin B, dipsacoside B, macranthoside A and macranthoside B) had a good linear correlation in certain range (*r* were 0.9989-0.9999). The average recoveries were 95.74%-97.02%, and relative standard deviations (RSD) were 0.9%-1.4% (*n*=6). **Conclusion** This method is simple, reliable, accurate, which is suitable for the quality control for *Lonicera hypoglauca* extract.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography-evaporative light scattering; *Lonicera hypoglauca* extract; saponins; content determination

\*通讯作者: 赵薇, 工程师, 主要研究方向为保健食品及化妆品检验。E-mail: 1228158190@qq.com

\*Corresponding author: ZHAO Wei, Engineer, Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China. E-mail: 1228158190@qq.com

## 1 引言

山银花提取物为以忍冬科植物灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬或黄褐毛忍冬的干燥花蕾或带初开的花为原料, 经提取、过滤、精制、浓缩、干燥等工序制成的提取物。其具有清热解毒、疏散风热之功效<sup>[1]</sup>, 被广泛应用于药品、食品饮料<sup>[2]</sup>、保健食品<sup>[3]</sup>和化妆品<sup>[4]</sup>等领域。

市售山银花提取物主要有 2 个规格: 山银花提取物(5%绿原酸)和山银花提取物(10%绿原酸)。由于绿原酸在自然界中广泛存在, 缺乏专属性, 因此, 仅以绿原酸含量作为质量控制指标, 不能客观地评价山银花提取物的质量。皂苷类是除有机酸类外发挥抗炎、抗肿瘤作用的重要药效物质基础, 主要为常春藤皂苷类, 灰毡毛忍冬皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬次皂苷甲和灰毡毛忍冬次皂苷甲等<sup>[5,6]</sup>。皂苷类成分的含量测定一般采用高效液相色谱-紫外法 (high performance liquid chromatography-ultraviolet visible detector, HPLC-UV) 和高效液相色谱-蒸发光散射检测器法 (high performance liquid chromatography-evaporative light scattering, HPLC-ELSD), 由于皂苷类成分多为紫外末端吸收, 干扰较大, 因此, 皂苷类成分的检测常采用 HPLC-ELSD 法, 但此方法也存在灵敏度相对较低的缺点, 有必要通过加大样品浓度来克服这个问题<sup>[7]</sup>。

本研究在参考相关文献的基础上<sup>[5,7-10]</sup>, 以皂苷类分为考察对象, 建立了 HPLC-ELSD 测定山银花提取物中的 5 种皂苷含量的方法, 以期为山银花提取物的质量评价提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂与材料

灰毡毛忍冬皂苷乙(批号: 111814-201604, 纯度: 94.4%)、川续断皂苷乙(批号: 111813-201403, 纯度: 92.2%)(中国食品药品检定研究院); 灰毡毛忍冬皂苷甲(批号: PS0460-0020, 纯度: 98.0%)、灰毡毛忍冬次皂苷甲(批号: PS171109-02, 纯度: 98%)和灰毡毛忍冬次皂苷乙(批号: PS171109, 纯度: 98%)(四川 PHYTOUNICO 公司); 乙腈(色谱纯)、甲酸(分析纯, 美国 Sigma 公司), 水为超纯水, 。

山银花提取物共计 10 批: 其中 7 批为市售, 购自 4 个生产厂家, 标记为 T1~T7; 另外 3 批为委托湖南九芝堂药业有限公司中试提取制得, 标记为 T8~T10, 原料购自湖南鸿利药业有限公司(湖南省邵阳市隆回县小沙江镇)。

### 2.2 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(带 Agilent 1260 蒸发光散射检测器, 美国安捷伦公司); TB-215D 十万分之一分析天平(德国赛多利斯公司); SB25-12 超声波清洗仪(天津泰

林智慧科技有限公司); UV-Toc/UF 超纯水系统(美国赛默飞公司)。

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 自制山银花提取物

取山银花原料 3 批, 每批 10 kg, 按料液比 1:20(*m*:*V*)加水煎煮 2 次, 每次 1 h, 煎液滤过, 将滤液合并, 60 °C 减压浓缩至相对密度为 1.13~1.18 g/mL, 干燥后得山银花提取物 T8、T9 和 T10。

### 2.3.2 对照品溶液的制备

分别精密称取灰毡毛忍冬皂苷甲、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬次皂苷甲、灰毡毛忍冬次皂苷乙对照品适量, 分别置于 5 个 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇制成浓度分别为 1697.4、1557.6、1488.1、2120.7 和 1781.6 μg/mL 的对照品储备溶液。分别精密吸取上述 5 种对照品储备溶液 1 mL 置于同一 10 mL 量瓶中, 以流动相稀释并定容至刻度, 摆匀, 得到混合标准溶液。

### 2.3.3 供试品溶液的制备

取过四号筛的山银花提取物(编号: T1)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30 min(300 W, 频率 40 kHz)40 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摆匀, 滤过, 取续滤液, 即得<sup>[7,10]</sup>。

### 2.3.4 色谱条件与系统适用性实验

Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈为流动相 A, 0.1% 甲酸溶液为流动相 B, 进行梯度洗脱(洗脱程序: 0~5 min, 10~20%A; 5~10 min, 20~40%A; 10~30 min, 40~65%A)。流速为 0.8 mL/min; 进样量为 5 μL; 柱温为 30 °C; 蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector)漂移管温度: 60 °C, 蒸发管温度: 90 °C, 增益: 8; 理论板数按山银花提取物皂苷乙计应 ≥ 4000。照上述色谱条件, 取混合对照品溶液和供试品溶液分别注入液相色谱仪, 记录色谱图(见图 1)。

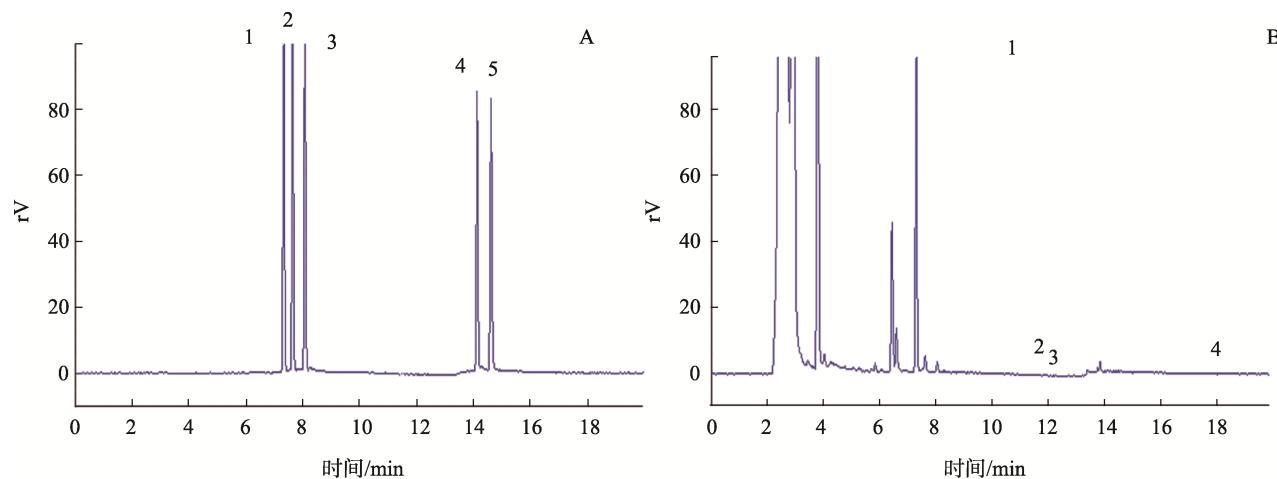
## 3 结果与分析

### 3.1 线性关系

精密吸取 5 种皂苷混合对照品溶液 1、2、5、10、15 和 20 μL, 注入高效液相色谱仪测定, 以峰面积对数为纵坐标, 进样量对数为横坐标, 绘制标准曲线。各成分线性方程、相关系数及线性范围见表 1。

### 3.2 提取条件的优化

提取方式考察了加热回流和超声, 结果两者效果无明显差异(详见表 2), 故选择相对简单的超声提取法; 提取溶剂考察了 50% 甲醇、70% 甲醇和甲醇, 结果采用 70% 甲醇为提取溶剂提取得率最高(详见表 3); 提取时间考察了 30、40 和 50 min, 结果 40 min 提取得率最高(详见表 4),



注: 1. 灰毡毛忍冬皂苷乙; 2. 灰毡毛忍冬皂苷甲; 3. 川续断皂苷乙; 4. 灰毡毛忍冬次皂苷乙; 5. 灰毡毛忍冬次皂苷甲。

图1 混合对照品(A)和山银花提取物(B)的色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed standards(A) and *Lonicera hypoglaucia* extract(B)

表1 线性方程、相关系数及线性范围  
Table 1 Linear equations, correlation coefficients and effective components

成分	线性方程	相关系数	线性范围/ng
灰毡毛忍冬皂苷乙	$Y_1=1.7090X-2.8363$	0.9999	155.76~3115.20
灰毡毛忍冬皂苷甲	$Y_2=1.7425X-3.0112$	0.9989	169.74~3394.80
川续断皂苷乙	$Y_3=1.7328X-2.9331$	0.9999	148.81~2976.20
灰毡毛忍冬次皂苷乙	$Y_4=1.3146X-1.8029$	0.9990	178.16~3563.20
灰毡毛忍冬次皂苷甲	$Y_5=1.3106X-1.8114$	0.9997	212.04~4241.40

表2 提取方法选择结果比较表  
Table 2 Results of extraction method selection

序号	取样量/g	提取方法	含量/%					总量/%
			灰毡毛忍冬皂苷甲	灰毡毛忍冬皂苷乙	川续断皂苷乙	灰毡毛忍冬次皂苷甲	灰毡毛忍冬次皂苷乙	
1	0.5011	超声	2.011	0.336	0.345	0.101	0	2.793
2	0.4950	回流	2.001	0.333	0.348	0.105	0	2.787

表3 提取溶剂选择结果比较表  
Table 3 Results of extraction solvent selection

序号	取样量/g	提取溶剂	含量/%					总量/%
			灰毡毛忍冬皂苷甲	灰毡毛忍冬皂苷乙	川续断皂苷乙	灰毡毛忍冬次皂苷甲	灰毡毛忍冬次皂苷乙	
1	0.5266	50%甲醇	2.002	0.317	0.335	0.093	0	2.747
2	0.5166	70%甲醇	2.021	0.332	0.351	0.111	0	2.815
3	0.4788	甲醇	1.826	0.288	0.305	0.0782	0	2.497

表4 提取时间选择结果比较表  
Table 4 Results of extraction time selection

序号	取样量/g	提取时间/min	含量/%					总量/%
			灰毡毛忍冬皂苷甲	灰毡毛忍冬皂苷乙	川续断皂苷乙	灰毡毛忍冬次皂苷甲	灰毡毛忍冬次皂苷乙	
1	0.5076	30	1.977	0.295	0.302	0.084	0	2.658
2	0.5011	40	2.005	0.327	0.334	0.103	0	2.769
3	0.5005	50	1.989	0.291	0.310	0.092	0	2.682

故提取条件最终选择以70%甲醇为提取溶剂,超声处理40 min。优化后的方法本法简便、可靠、准确,适合用于山银花提取物的质量控制。

### 3.3 精密度实验

取混合对照品储备液10 μL,依次进样6次,灰毡毛忍冬皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬次皂苷乙和灰毡毛忍冬次皂苷甲峰面积对数的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为0.9%、1.0%、1.1%、1.2%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 3.4 稳定性实验

取同一供试品(编号:T1)溶液,分别于0、2、5、10、15、20和24 h测定灰毡毛忍冬皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬次皂苷乙和灰毡毛忍冬次皂苷甲的峰面积,灰毡毛忍冬皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬次皂苷乙的RSD分别为0.9%、1.5%、1.6%和1.8%;灰毡毛忍冬次皂苷甲未检出,表明供试品溶液在24 h内稳定。

### 3.5 重复性实验

取同一供试品(编号:T1),加入一定量的对照溶液,依法制备6份供试品溶液,测定并计算,灰毡毛忍冬皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬次皂苷乙和灰毡毛忍冬次皂苷甲平均值的RSD分别为0.5%、0.4%、0.8%、0.8%、1.4%( $n=6$ )。结果表明,本方法重复性较好。

### 3.6 回收率实验

取同一供试品(编号:T1),加入一定量的对照溶液,依法制备6份供试品溶液,测定并计算,结果见表5。5种皂苷的加标回收率在95.74%~97.02%之间,RSD小于3%,表明本法回收率较好。

### 3.7 样品含量测定

按拟定的含量测定方法测定了7批市售和3批自制山银花提取物中5种皂苷的含量,含量测定结果(按干燥品计)见表6。

表5 加样回收实验结果( $n=6$ )  
Table 5 Results of recoveries( $n=6$ )

成分	取样量/g	样品中含量/(μg/mL)	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
灰毡毛忍冬皂苷乙	0.2518	5071.252		9572.7	96.33		
	0.2509	5053.126		9584.3	96.97		
	0.2531	5097.434		9580.4	95.94	97.02	1.3
	0.2545	5125.630	4672.80	9611.4	96.00		
	0.2515	5065.210		9682.7	98.82		
	0.2527	5089.378		9671.3	98.06		
灰毡毛忍冬皂苷甲	0.2518	835.976		1645.2	95.35		
	0.2509	832.988		1647.1	95.92		
	0.2531	840.292		1655.2	96.02		
	0.2545	844.940	848.7	1646.8	94.48	95.74	0.9
	0.2515	834.980		1647.3	95.71		
	0.2527	838.964		1661.9	96.96		

续表 5

成分	取样量/g	样品中含量/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
川续断皂苷乙	0.2518	878.782	1488.1	2307.8	96.03	96.19	1.2
	0.2509	875.641		2285.4	94.74		
	0.2531	883.319		2306.5	95.64		
	0.2545	888.205		2323.9	96.48		
	0.2515	877.735		2336.5	98.03		
	0.2527	881.923		2314.3	96.26		
	0.2518	276.980		1975.3	95.33		
灰毡毛忍冬 次皂苷乙	0.2509	275.990	1781.6	2008.9	97.27	95.84	0.9
	0.2531	278.410		1991.2	96.14		
	0.2545	279.950		1976.3	95.21		
	0.2515	276.650		1989.4	96.14		
	0.2527	277.970		1969.5	94.94		
	0.2518	0		2020.5	95.28		
	0.2509	0		2023.9	95.44		
灰毡毛忍冬 次皂苷甲	0.2531	0	2120.7	2040.3	96.21	96.38	1.4
	0.2545	0		2087.2	98.42		
	0.2515	0		2069.4	97.58		
	0.2527	0		2022.2	95.36		

表 6 山银花提取物中 5 种皂苷类成分的含量  
Table 6 Content of 5 kinds of saponins in *Lonicera hypoglauca* extract

生产企业	编号	规格	灰毡毛忍冬皂苷乙 皂苷乙	灰毡毛忍冬皂苷甲 皂苷乙	川续断皂苷乙	灰毡毛忍冬次皂苷乙	灰毡毛忍冬次皂苷甲	总量/%
企业 A	T1	10%绿原酸	2.014	0.332	0.349	0.110	--	2.805
	T2	5%绿原酸	7.215	1.353	1.057	--	--	9.625
企业 B	T3	10%绿原酸	1.606	0.240	0.320	0.106	--	2.272
	T4	5%绿原酸	6.268	0.637	0.686	--	--	7.591
企业 C	T5	10%绿原酸	1.554	0.289	0.366	--	--	2.209
	T6	5%绿原酸	3.928	1.301	0.532	--	--	5.761
企业 D	T7	10%绿原酸	--	--	--	--	--	--
	T8	/	14.07	1.221	1.62	0.431	--	17.342
中试	T9	/	12.68	2.181	1.25	0.544	--	16.655
	T10	/	10.58	1.117	0.97	0.432	--	13.099

注: “--”为未检出。

### 3.7.1 5 种皂苷测定结果分析

从表中皂苷总量来看, 市售山银花提取物中皂苷类成分参差不齐, 5 种皂苷的总量从 2.209%~9.625%。从单体皂苷的含量测定结果来看, 市售山银花提取物中, 5 种皂苷中含量最高的均为灰毡毛忍冬皂苷乙, 含量从 1.554%~7.215%, 而其余 4 种皂苷含量均属于微量成分, 甚至无法检出。因此, 从简便有效的角度对山银花提取物进行皂苷类成分含量的质量评价时, 建议采用灰毡毛忍冬皂苷乙一种测定和评价指标。此外, 尚有一批来自企业 D 的

样品由于未能检测出山银花中的特征性皂苷成分, 无法确认其提取物原料是否来源于山银花。

### 3.7.2 皂苷含量与绿原酸含量相关性分析

从检测结果还发现, 市售山银花提取物中皂苷类成分的含量与规格中绿原酸的含量呈负相关, 即绿原酸含量高, 则皂苷类含量低。分析原因是生产工艺中一般有精制步骤, 而对绿原酸的精制过程必然是皂苷类含量或多或少降低的过程。这一点从中试自制提取物中的皂苷含量也可以得到体现, 自制的 3 批提取物由于没有精制步骤, 总皂

苷含量明显高于市售山银花提取物。

#### 4 结论与讨论

绿原酸类和皂苷类化合物同为山银花提取物的重要药效物质基础<sup>[11-13]</sup>, 而市售的山银花提取物仅以绿原酸含量作为唯一的质量衡量指标, 导致部分企业一味追求绿原酸含量而过度精制, 山银花提取物中的特征性成分(如灰毡毛忍冬皂苷乙)却无法检出, 从而无法有效地将山银花提取物与其他含绿原酸类成分的提取物相区别。因此, 建立山银花提取物中皂苷类成分的含量测定方法是十分必要的。建议在后续的研究中进一步收集样本, 将绿原酸和灰毡毛忍冬皂苷乙同时作为山银花提取物的质量评价指标。

目前由于我国植物提取物的质量控制标准体系很不完善, 标准项目不够健全, 而日益成为制约植物提取物生存和发展的瓶颈<sup>[14,15]</sup>。为了促进其健康发展, 建议进一步加大力度, 制定统一的植物提取物制备流程, 并在此基础上对植物提取物的质量标准进一步研究、制定和优化。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 张英锋, 张立艳, 马子川, 等. 植物绿原酸的研究进展[J]. 化学教育, 2011, 32(4): 1-6.
- [3] 席利莎, 木泰华, 孙红男, 等. 绿原酸类物质的国内外研究进展[J]. 核农学报, 2014, 28(2): 292-301.
- [4] 王丽萍, 郭栋, 王果, 等. 中药绿原酸的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011, 4(22): 961-963.
- [5] 孙玲, 樊晓兰, 郭琦, 等. 一测多评法同时测定山银花药材中5种皂苷类成分的含量[J]. 中国药房, 2017, 28(18): 2546-2549.
- [6] 陈雨, 王奇志, 冯煦. 忍冬属植物三萜皂苷类化学成分研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(12): 1679-1686.
- [7] 张璐, 曾文雪. 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[J]. 江西中医药学院学报, 2011, 23(4): 40-42.
- [8] 刘青芝, 王立国, 崔伟亮, 等. HPLC-ELSD 法检查抗感颗粒中山银花皂苷类成分[J]. 药学研究, 2016, 35(4): 205-208.
- [9] Liu QZ, Wang LG, Cui WL, et al. Inspection of saponins from *Lonicera hypoglauca* in Kangan Granules by HPLC-ELSD [J]. J Pharm Res, 2016, 35(4): 205-208.
- [10] 张艳, 周旭美, 姚晓东, 等. HPLC-ELSD 测定绥阳山银花中绿原酸和灰毡毛忍冬皂苷乙的含量[J]. 遵义医学院学报, 2013, 36(6): 575-577, 583.
- [11] Zhang Y, Zhou XM, Yao XD, et al. Determination of chlorogenic acid and macranthoidin B in *Lonicera hypoglauca* from Suiyang by HPLC-ELSD method [J]. Acta Academ Med Zunyi, 2013, 36(6): 575-577, 583.
- [12] 黄佳, 虢小翊, 彭国平, 等. 山银花皂苷提取条件优化研究[J]. 湖南农业科学, 2012, (5): 85-87.
- [13] Huang J, Guo XY, Peng GP, et al. Optimization of conditions for extracting saponins from wild honeysuckle flower [J]. Hunan Agric Sci, 2012, (5): 85-87.
- [14] 刘婧慧. 金银花与山银花质量评价及安全性对比研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [15] Liu JH. Comparative study on quality evaluation and safety of *Lonicera japonica* and *Lonicera macranthoides* [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2014.
- [16] 杨斌, 丘岳, 王柳萍, 等. 广西山银花绿原酸体外抗炎作用及分子机制研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(4): 542-545.
- [17] Yang B, Qiu Y, Wang LP, et al. Studies on the anti-inflammatory molecular mechanism of chlorogenic acid extracted from *Lonicera confusa* DC *in vitro* [J]. Chin Pharm Bull, 2009, 25(4): 542-545.
- [18] 李泮霖, 贺利利, 李楚源, 等. 金银花和山银花抗急性口腔炎症作用比较[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2016, 55(4): 118-122.
- [19] Li BL, He LL, Li CY, et al. Comparison of anti-inflammatory effects between *Lonicerae japonicae flos* and *Lonicera hypoglauca* using an acute stomatitis model [J]. Acta Sci Nat Univ Suny, 2016, 55(4): 118-122.
- [20] 刘鸿燕. 中药提取物标准管理的问题及对策[J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(13): 188.
- [21] Liu HY. Problems and countermeasures of standard management of Chinese herbal extracts [J]. Clin Med Res Pract, 2016, 1(13): 188.
- [22] 任琰, 钟根秀, 于婧怡. 出口植物提取物质量安全现状及监管对策[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(12): 1956-1959, 1967.
- [23] Ren Y, Zhong GX, Yu JY. Quality and safety status of export plant extracts and supervisory measures [J]. J Zhejiang Agric Sci, 2016, 57(12): 1956-1959, 1967.

(责任编辑: 陈雨薇)

#### 作者简介

罗 艳, 副主任药师, 主要研究方向为中药及保健食品检验与研究。

E-mail: 31732070@qq.com



赵 薇, 工程师, 主要研究方向为保健食品及化妆品检验。

E-mail: 1228158190@qq.com