

## RP-HPLC 法同时测定不同产地连翘中的 7 种成分

付云飞, 李 清, 毕开顺\*

沈阳药科大学药学院 中药质量控制技术国家地方联合工程实验室, 辽宁 沈阳 110016

**摘要:** 目的 建立同时测定连翘中咖啡酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、芦丁、金丝桃苷、连翘苷、牛蒡子苷元 7 种化学成分的 HPLC 方法。方法 采用反相高效液相色谱法, 以 Inertsil ODS-3 C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱; 流动相为乙腈-0.2%磷酸水, 梯度洗脱, 检测波长为 275 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C。结果 在上述色谱条件下, 咖啡酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、芦丁、金丝桃苷、连翘苷、牛蒡子苷元获良好分离, 分别在 18.24~91.20、5.88~29.40、132.60~663.00、8.34~41.70、1.96~9.80、7.60~38.00、11.34~56.70 μg/mL 内线性关系良好, 平均回收率分别为 97.7%、96.7%、102.6%、101.3%、93.2%、91.8%、96.7%, RSD 分别为 2.3%、1.4%、2.4%、2.2%、1.0%、1.0%、1.3%。结论 该方法分离度好, 简便快速, 可用于同时检测连翘中 7 种成分的量, 为连翘的质量评价提供依据。

**关键词:** 高效液相色谱法; 连翘; 连翘酯苷; 咖啡酸; 金丝桃苷; 连翘苷; 牛蒡子苷元; 芦丁

**中图分类号:** R286.022 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)08-1043-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.024

## Determination of seven components in *Forsythia suspensa* by RP-HPLC

FU Yun-fei, LI Qing, BI Kai-shun

National and Local Joint Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines, School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of caffeic acid, forsythoside A, forsythoside B, rutin, hyperoside, forsythin, and arctigenin in *Forsythia suspensa*. **Methods** The analysis was carried out on an Inertsil ODS-3 C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of acetonitrile and 0.2% phosphoric acid aqueous with gradient elution. The detection wavelength was set at 275 nm. The flow rate was 1.0 mL/min at column temperature of 30 °C. **Results** Caffeic acid, forsythoside A, forsythoside B, rutin, hyperoside, forsythin, and arctigenin were well separated by this method, and showed a good linearity in the ranges of 18.24—91.20, 5.88—29.40, 132.60—663.00, 8.34—41.70, 1.96—9.80, 7.60—38.00, and 11.34—56.70 μg/mL, respectively. The average recoveries of the seven components were 97.7%, 96.7%, 102.6%, 101.3%, 93.2%, 91.8%, and 96.7% and the RSD values were 2.3%, 1.4%, 2.4%, 2.2%, 1.0%, 1.0%, and 1.3%, respectively. **Conclusion** The established method is accurate, reliable, and could be used for the simultaneous determination of the seven components in *F. suspense*, which provides a scientific basis for the quality evaluation of *F. suspense*.

**Key words:** HPLC; *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl; forsythoside; caffeic acid; hyperin; forsythin; arctigenin; rutin

连翘为木犀科连翘属植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 按采收时期不同, 分青翘和老翘 2 种<sup>[1]</sup>。连翘具有清热解毒、消肿散结的功效, 主治温热、丹毒、斑疹、痈疡肿毒、瘰疬、小便淋闭等症, 现代临床上多用于治疗呼吸道感染, 急性肾炎、肝炎、脑膜炎等疾病<sup>[2]</sup>。现代药理研究表明连翘具有抗菌、抗炎、解热等作用<sup>[3]</sup>,

咖啡酸为 5-脂氧化酶抑制剂, 具有止血、镇咳、祛痰、抗肿瘤、抗氧化等功效<sup>[4]</sup>; 连翘酯苷具有显著的抗氧化、抗微生物感染和清除自由基、减轻过氧化损伤的作用<sup>[5]</sup>; 芦丁具有抗氧化、降低毛细血管脆性与通透性等多种活性<sup>[6-7]</sup>; 金丝桃苷具有抗炎、解痉、利尿、止咳、降压、降低胆固醇的功效; 连翘苷具有清热、解毒、散结排脓等功效, 常用于风

收稿日期: 2012-12-11

基金项目: 2012 年辽宁省高等学校中药质量控制关键技术创新团队项目 (LT2012018)

作者简介: 付云飞, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制和中药现代化。

\*通信作者 毕开顺, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药现代化研究, Tel: (024)23986012 E-mail: bikaishun@yahoo.cn

热感冒；牛蒡子苷元具有显著的抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗 PAF 受体及钙拮抗活性<sup>[5,8]</sup>。《中国药典》2010 年版中规定以连翘酯苷 A 和连翘苷为连翘药材的测定指标，而文献报道的连翘药材质量控制最多为 3~4 个指标成分<sup>[9-11]</sup>，很难全面反映连翘药材质量。本实验建立了同时测定连翘中 7 种化学成分 HPLC 法，可以较为全面地反映连翘的品质，为其质量控制提供依据。

## 1 仪器与试药

Agilent 1260 高效液相色谱仪；Mettler AB135-S 十万分之一电子分析天平；KQ5200E 型超声波清洗器。咖啡酸对照品（批号 MUST-10112201）、连翘酯苷 B 对照品（批号 MUST-11072503）、连翘酯苷 A 对照品（批号 MUST-12071101）牛蒡子苷元对照品（批号 MUST-11053001）均购自成都曼思特生物科技有限公司，质量分数为 98%；芦丁对照品（批号 100080-200707）、金丝桃苷对照品（批号 111521-200303）、连翘苷对照品（批号 110821-200610）购自中国食品药品检定研究院。样品分别收集于陕西、福建、湖南、河南、山西、山东，编号为 1~6，经沈阳药科大学贾英副教授鉴定为连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl。甲醇、乙腈（山东禹王化学试剂有限公司，色谱纯），磷酸（天津凯信化学试剂有限公司，色谱纯），实验用水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

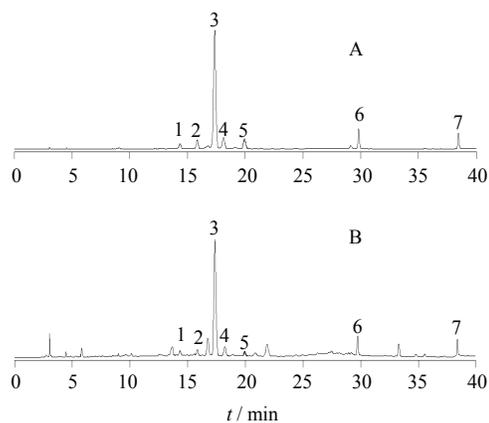
### 2.1 色谱条件

色谱柱 Inertsil ODS-3 C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，流动相乙腈 (A) -0.2%磷酸水溶液 (B)，梯度洗脱，0~5 min, 5%~15%A；5~10 min, 15%~20%A；10~20 min, 20%~22%A；20~35 min, 22%~50%A；36~46 min, 95%A。检测波长 275 nm，柱温 30 °C，体积流量 1.0 mL/min，进样量 20 μL。对照品及供试品溶液色谱图见图 1。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品储备液的制备** 精密称取咖啡酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、芦丁、金丝桃苷、连翘苷、牛蒡子苷元对照品适量，分别用甲醇配制成质量浓度为 0.608、0.378、2.200、2.667、0.214、0.541、0.774 mg/mL 的对照品储备液。

**2.2.2 混合对照品溶液的制备** 取上述咖啡酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、芦丁、金丝桃苷、连翘苷、牛蒡子苷元对照品储备液适量，用 70%甲醇配制成



1-咖啡酸 2-连翘酯苷 B 3-连翘酯苷 A 4-芦丁  
5-金丝桃苷 6-连翘苷 7-牛蒡子苷元  
1-caffeic acid 2-forsythoside B 3-forsythoside A  
4-rutin 5-hyperin 6-forsythin 7-arctigenin

图 1 对照品 (A) 与样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

质量浓度分别为 91.20、29.40、663.0、41.70、9.80、38.00、56.70 μg/mL 的混合对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液制备** 取连翘粉末（过 40 目筛）约 0.4 g，精密称定，置 100 mL 具塞锥形瓶中，加 70%甲醇 50 mL，超声提取（功率 250 W，频率 33 kHz）20 min，加 70%甲醇补足损失量，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液作为供试品溶液。

### 2.3 标准曲线的绘制

分别精密量取混合对照品溶液 1.0、2.0、3.0、3.5、4.0、5.0 mL，置 5 mL 量瓶中，加 70%甲醇定容至刻度，摇匀，分别取 20 μL 进样，在上述色谱条件下进行分析。以对照品溶液质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，计算回归方程，结果见表 1。

### 2.4 精密度试验

精密量取混合对照品溶液 2.5 mL，置 5 mL 量瓶中，加 70%甲醇定容至刻度，摇匀，在上述色谱条件下，连续进样 5 次，计算 7 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.1%、1.7%、1.3%、1.5%、0.9%、1.2%、0.7%，表明仪器精密度良好。

### 2.5 重复性试验

精密称定同一样品 6 份，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下分析测定。咖啡酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、芦丁、金丝桃苷、连翘苷、牛蒡子苷元质量分数的 RSD 分别为 1.4%、1.5%、0.7%、1.6%、1.8%、1.0%、0.8%。

表 1 回归方程和线性范围  
Table 1 Regression equations and linear ranges

成分	回归方程	r	线性范围 / (μg·mL <sup>-1</sup> )
咖啡酸	$Y=4.450 X+0.945$	0.999 5	18.24~91.20
连翘酯苷 B	$Y=11.81 X+27.23$	0.999 7	5.88~29.40
连翘酯苷 A	$Y=9.00 X+486.80$	0.999 7	132.60~663.00
芦丁	$Y=19.30 X+10.87$	0.999 6	8.34~41.70
金丝桃苷	$Y=29.03 X-3.691$	0.999 6	1.96~9.80
连翘苷	$Y=13.05 X+41.14$	0.999 8	7.60~38.00
牛蒡子苷元	$Y=14.51 X+40.52$	0.999 7	11.34~56.70

2.6 稳定性试验

取供试品溶液分别于 0、2、4、8、12、24、48 h 进样分析，咖啡酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、芦丁、金丝桃苷、连翘苷、牛蒡子苷元质量分数的 RSD 分别为 1.8%、2.5%、1.7%、2.3%、2.2%、1.4%、2.6%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验

精密称取连翘药材 6 份，分别精密加入一定量对照品，按“2.2.3”项下方法，制备供试品溶液，

在上述色谱条件下分析测定，咖啡酸、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、芦丁、金丝桃苷、连翘苷、牛蒡子苷元质量分数的平均回收率分别为 97.7%、96.7%、102.6%、101.3%、93.2%、91.8%、96.7%，RSD 分别为 2.3%、1.4%、2.4%、2.2%、1.0%、1.0%、1.3%。

2.8 定量测定

取 6 批连翘药材，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下分析测定，每批样品测定 3 份，以平均值为测定结果，结果见表 2。

表 2 供试品中 7 种成分的测定结果 (n=3)  
Table 2 Determination of seven components in samples (n=3)

编号	产地	质量分数 / (mg·g <sup>-1</sup> )						
		咖啡酸	连翘酯苷 B	连翘酯苷 A	芦丁	金丝桃苷	连翘苷	牛蒡子苷元
1	陕西	5.171	2.367	73.75	3.147 0	0.700 8	5.226	3.672 0
2	福建	3.968	1.599	14.06	0.741 8	0.568 5	3.684	1.529 0
3	湖南	5.323	1.325	40.52	0.268 2	0.410 9	2.128	2.565 0
4	河南	5.492	3.196	84.10	0.905 0	0.599 2	3.399	1.500 0
5	山西	3.377	2.847	88.00	0.627 9	0.626 4	3.303	0.743 7
6	山东	7.457	2.704	72.80	1.578 0	0.648 3	4.580	2.932 0

3 讨论

本实验同时测定连翘中 7 种成分的量，能快速、有效地控制其药材质量，较现有的其他方法更准确、更全面。测定结果表明，连翘药材中连翘酯苷 A、连翘酯苷 B、连翘苷的量均较高，它们都具有清热解毒、抗菌抗炎等功效，是连翘的主要药理活性成分。本实验所测 6 个产地的药材中，山西所产连翘中的连翘酯苷 A 的量最高，福建所产连翘中的连翘酯苷 A 量最低，而其他几种化学成分的量差异不明显。不同产地的药材中连翘酯苷 A 量差异较大，这可能与连翘的产地、采收期、用药部位、炮制方法等条件有关。因连翘酯苷 A 为连翘主要药效成分之

一，在临床使用过程中，化学成分量的波动可能导致药理活性的差异，也可能导致与其他药效成分相互作用不同，从而影响临床用药效果，所以有必要制定一种质量可控、安全有效的测定方法。

试验考察了回流提取、超声提取、索氏提取等提取方式，结果表明超声提取测定的质量分数高、方法简便、省时，因此选用了超声提取方法；另对其提取条件中的提取溶剂、提取溶剂的浓度、溶剂用量、提取时间等因素进行了考察，最终确定采用 70% 甲醇 125 倍量超声提取 20 min。

试验考察了流动相甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 磷酸水梯度洗脱，乙腈-0.2% 磷酸水分离效果好、峰

形佳,故选择为流动相;另外还分别优化了柱温(20、30、40 ℃)和体积流量(0.8、1.0、1.2 mL/min),结果表明在柱温30 ℃,体积流量1.0 mL/min时基线稳定,色谱图分离效果较好。

本方法简便、准确、结果灵敏度高、重现性好,可作为连翘药材的质量控制方法。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 靖会, 李教社, 杨银京, 等. 不同部位、不同产地及不同采集时间连翘中连翘酯苷A的含量测定 [J]. 陕西中医, 2010, 31(10): 1406-1407.
- [3] 张海燕. 连翘化学成分及药理活性的研究进展 [J]. 中草药, 2001, 23(10): 657-660.
- [4] 黄砚, 杨俊卿, 谢灵瑶. 咖啡酸对大鼠海马神经元铝盐损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(12): 1605.
- [5] 刘文博, 李德朋, 张桂林, 等. 连翘酯苷药理活性研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 236.
- [6] Menz H. Differential *in vitro* anti-HIV activity of natural lignans [J]. *J Biosci*, 1990, 45(11/12): 1215.
- [7] 王丽, 张丽, 康文艺, 等. 芦丁清除 DPPH 自由基分光光度法与微量法抗氧化活性研究 [J]. 中成药, 2009, 31(11): 1785-1787.
- [8] 张昊, 李发荣, 段飞. 不同采收期连翘叶中连翘苷、连翘酯苷和芦丁的含量测定 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 790-794.
- [9] 裴香萍, 张淑蓉, 闫艳, 等. 不同采收期青翘中连翘苷、连翘酯苷和芦丁的含量测定 [J]. 中国药事, 2011, 25(5): 438-440.
- [10] 崔洋, 王巧, 张兰桐, 等. 河北道地药材连翘的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 297-299.
- [11] 刘瑞, 张振秋, 李伟铭, 等. 连翘不同产地与不同炮制品中4种成分的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 83-86.