

# RP-HPLC 同时测定金银花、连翘药对 提取物中 6 个成分的含量

封美慧, 邱欣, 王鑫, 刘有平\*  
(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

**[摘要]** **目的:**建立 RP-HPLC 同时测定金银花、连翘药对提取物中绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、木犀草苷、连翘苷和槲皮素 6 种成分含量的方法。**方法:**Thermo Scientific ODS-2 HYPERSIL 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-0.2% 甲酸溶液 (B) 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 280 nm, 柱温 30 ℃。**结果:**绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、木犀草苷、连翘苷和槲皮素质量浓度在 40.40 ~ 404.0 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9995$ ), 0.2032 ~ 2.032 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ), 30.20 ~ 302.0 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9998$ ), 1.012 ~ 10.12 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ), 6.980 ~ 69.80 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ), 1.980 ~ 19.80 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ) 与峰面积呈良好的线性关系; 加样回收率分别为 102.6%, 99.6%, 100.4%, 98.3%, 100.8%, 99.7%, 其 RSD 分别为 0.9%, 2.0%, 1.1%, 0.4%, 2.1%, 0.9%。**结论:**该方法简便、准确, 可用于金银花、连翘药对提取物的质量控制。

**[关键词]** 金银花、连翘药对提取物; 绿原酸; 咖啡酸; 木犀草苷; 连翘酯苷 A; 连翘苷; 槲皮素

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0075-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160075

## Simultaneous Determination of Six Ingredients in Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus Extracts by RP-HPLC

FENG Mei-hui, QIU Xin, WANG Xin, LIU You-ping\*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**[Abstract]** **Objective:** The purpose of this study was to develop a RP-HPLC method for simultaneous determination of six ingredients (chlorogenic acid, caffeic acid, galuteolin, forsythoside A, forsythoside B and quercetin) in Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus extracts. **Method:** The chromatographic separation was achieved on a Thermo Scientific ODS-2 HYPERSIL (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) column with gradient elution of acetonitrile and 0.2% (v/v) formic acid aqueous solution at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 280 nm, and the column temperature was set at 30 ℃. **Result:** The ranges for linear correlation of chlorogenic acid, caffeic acid, forsythoside A, galuteolin forsythoside B and quercetin were 40.40 - 404.0 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9995$ ), 0.2032 - 2.032 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ), 30.20 - 302.0 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9998$ ), 1.012 - 10.12 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ), 6.980 - 69.80 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ), and 1.980 - 19.80 mg·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ), respectively. The recoveries of the injection samples were 102.6%, 99.6%, 100.4%, 98.3%, 100.8% and 99.7% with RSD of 0.9%, 2.0%, 1.1%, 0.4%, 2.1% and 0.9%, respectively. **Conclusion:** The method is simple and accurate. It can be applied for the quality control of the Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus extracts.

**[Key words]** Lonicerae Japonicae Flos Forsythiae Fructus extracts; chlorogenic acid; caffeic acid; galuteolin, forsythoside A; forsythoside B; quercetin

**[收稿日期]** 20131220(004)

**[基金项目]** 辽宁省教育厅项目(L2013396)

**[第一作者]** 封美慧, 硕士生, 从事药物分析研究, Tel:13704023634, E-mail:fengmeihui0522@163.com

**[通讯作者]** \* 刘有平, 博士, 副教授, 从事药物代谢及药物动力学研究, Tel:024-23986342, E-mail:yp-liu@163.com

金银花、连翘为抗菌消炎中药配伍中最常用的药对。二者伍用最早出自清代吴鞠通《温病条辨》银翘散。现代制剂中,有很多口服制剂中应用了金银花、连翘的药对配伍。现有中成药中金银花和连翘的常用比例为 3:1~1:2,而其发挥解热和抗自由基损伤作用的配伍比例是 1:1<sup>[1-2]</sup>。两味药材作为单味药进行化学成分研究<sup>[3-4]</sup>和药理毒理研究<sup>[5]</sup>较多,而配伍后的物质基础研究则相对薄弱,尤其是建立药对的质量控制方法显得尤为重要。有报道采用 HPLC 测定金银花、连翘提取物中绿原酸、咖啡酸的含量<sup>[6]</sup>和 HPLC 测定金银花、连翘提取物(注射用)中连翘苷的含量<sup>[7]</sup>,孙艳涛<sup>[8]</sup>等人采用梯度洗脱法同时测定不同配比金银花连翘药对中绿原酸、连翘脂素的含量,邢学锋<sup>[9]</sup>等采用 GC-MS 对金银花、连翘和金银花连翘药对挥发油成分进行了分析,但是同时测定该药对中多组分含量的方法未见报道。本试验建立了同时测定金银花、连翘药对(1:1)提取物中绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、木犀草苷、连翘苷和槲皮素 6 个成分的 RP-HPLC 方法,为金银花、连翘药对提取物及含有金银花、连翘药对的现代制剂的质量控制方法提供参考。

## 1 材料

**1.1 仪器** 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,配有在线脱气机、四元泵、紫外-可见检测器、自动进样器、ChemStation 色谱工作站),BT25S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

**1.2 试药** 绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷对照品(批号分别为 MUST-12031401, MUST-12042403, MUST-13050601, MUST-12100804, MUST-12080301,成都曼思特生物科技有限公司),槲皮素对照品(批号 0081-9304,中国食品药品检定研究院),乙腈和甲醇(色谱纯),二次蒸馏水(自制),其他试剂均为分析纯。

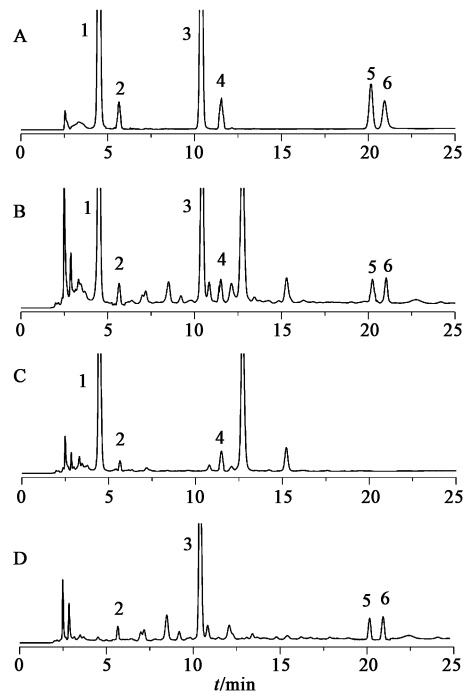
药材(金银花产地山东,连翘产地河南),经沈阳药科大学潘英妮副教授鉴定,金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花,连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。

**1.3 药对提取物的制备** 取金银花粗粉适量,加 10 倍量的 50% 甲醇,超声提取 3 次,每次 30 min,滤过,合并滤液,减压干燥得金银花提取物;取连翘粗粉适量,加 10 倍量的 50% 甲醇,超声提取 3 次,每次 30 min,滤过,合并滤液,减压干燥得连翘提取物;取金银花-连翘(1:1)粗粉适量,加 10 倍量的 50%

甲醇,超声提取 3 次,每次 30 min,滤过,合并滤液,减压干燥得金银花、连翘药对提取物。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Thermo scientific ODS-2 HYPERSIL 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~7 min, 13%~18% A, 7~22 min, 18%~26% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 280 nm,柱温 30 °C,进样量 20 μL。在上述色谱条件下,对照品色谱峰的理论塔板数均不低于 8 000,分离度均 > 1.5。混合对照品溶液、供试品溶液、阴性液的色谱见图 1。



1. 绿原酸;2. 咖啡酸;3. 连翘酯苷 A;  
4. 木犀草苷;5. 连翘苷;6. 槲皮素

A. 混合对照品;B. 供试品;C. 连翘阴性对照;D. 金银花阴性对照

图 1 金银花、连翘药对 HPLC

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 取绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、木犀草苷、连翘苷、槲皮素对照品适量,精密称定,分别置不同量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 4.040, 50.80, 3.020, 202.4, 698.0, 990.0 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液。分别精密量取上述对照品储备液适量,置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇定容至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 404.0, 2.032, 302.0, 10.12, 69.80, 19.80 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液,置于 4 °C 冰箱中储存待用。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取金银花、连翘药对提

取物0.5 g,精密称定,加50%甲醇50 mL,称重,超声提取45 min,放冷,用50%甲醇补足失重,摇匀,滤过,即得。

**2.2.3 阴性对照溶液的制备** 分别取金银花、连翘提取物0.5 g,精密称定,加50%甲醇50 mL,称重,超声提取45 min,放冷,用50%甲醇补足失重,摇匀,滤过,即得。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 线性关系的考察** 分别精密量取混合对照品储备液1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 mL至10 mL量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列混合对照品溶液。精密吸取上述溶液各20  $\mu$ L,进样测定,记录峰面积。以对照品的质量浓度( $X$ )为横坐标,峰面积( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线并进行回归计算。结果见表1。

表1 6个成分的标准曲线方程、相关系数和线性范围

化合物	标准曲线方程	$r$	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
绿原酸	$Y=25.262X+176.34$	0.999 5	40.40~404.0
咖啡酸	$Y=61.325X+0.5145$	0.999 9	0.203 2~2.032
连翘酯苷 A	$Y=17.091X+37.775$	0.999 8	30.20~302.0
木犀草苷	$Y=24.341X+1.070$	0.999 9	1.012~10.12
连翘苷	$Y=12.214X+4.981$	0.999 9	6.980~69.80
槲皮素	$Y=31.696X-0.921$	0.999 9	1.980~19.80

**2.3.2 精密度试验** 取同一混合对照品溶液,重复进样6次。测得绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、木犀草苷、连翘苷和槲皮素峰面积的RSD分别为0.31%,0.43%,0.21%,0.31%,0.29%和0.40%。结果表明仪器精密度良好。

**2.3.3 重复性试验** 取同一批药材制备的金银花、连翘药对提取物,精密称定,按2.2.2项方法平行制备6份供试品溶液,进样,测得绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、木犀草苷、连翘苷、槲皮素的峰面积的RSD分别为0.59%,0.32%,0.55%,0.84%,0.47%,0.55%。结果表明方法重复性良好。

**2.3.4 稳定性试验** 取同一供试品溶液,室温放置0,4,6,8,12 h,测得绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、木犀草苷、连翘苷、槲皮素峰面积的RSD分别为0.94%,1.74%,0.74%,1.64%,1.44%,1.16%。结果表明,供试品溶液中上述6个成分在12 h内稳定性良好。

**2.3.5 加样回收率试验** 称取已知含量的金银花、连翘药对提取物6份,每份约0.25 g,精密称定。分别精密加入绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、木犀草苷、

连翘苷和槲皮素对照品溶液适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,进样分析。计算绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、木犀草苷、连翘苷和槲皮素的平均加样回收率。结果见表2。

**2.4 样品含量测定** 取4批金银花-连翘药对提取物0.5 g各3份,精密称定,按2.2.2项下方法操作,在2.1项色谱条件下进样分析,记录色谱峰面积,用峰面积以外标法计算绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、木犀草苷、连翘苷和槲皮素的含量,结果见表3。

### 3 讨论

对6个组分采用二极管阵列检测器在200~600 nm进行扫描,结果发现绿原酸的特征吸收波长分别为217,240,327 nm;咖啡酸的特征吸收波长分别为254,320 nm;连翘苷的特征吸收波长为280 nm;连翘酯苷 A的特征吸收波长为330 nm;木犀草苷的特征吸收波长为253,350 nm;槲皮素的特征吸收波长分别为254,368 nm。对上述多个波长测定结果进行综合分析,虽然采用280,320 nm波长大多数峰的丰度均较高,但320 nm下检测不到连翘苷峰。因此,最终选280 nm作为检测波长。

分别采用了甲醇-水、乙腈-水作为流动相。结果发现,甲醇-水作为流动相出峰慢且分离度不好,乙腈-水作为流动相虽然能全部分离,但是组分峰有拖尾现象,故分别在水相中加入甲酸、磷酸和磷酸缓冲盐作为改性剂,通过比较发现加入甲酸后峰形较好,并进一步考察甲酸的用量,结果发现,乙腈-水(0.2%甲酸)作为流动相时,不但能把6个组分完全分离,且峰形好,出峰快。由于中药药对成分复杂,且6个成分的极性相差较大,因此试验中采用梯度洗脱。

本试验比较了超声和回流提取法制备供试品溶液的差别,结果显示二者提取结果差别不大,但超声提取简单方便,故采用超声提取法;在提取溶剂的选择方面,分别比较了甲醇、乙醇和水3种溶剂,结果表明甲醇提取效果较理想,采用乙醇或水作为提取溶剂时,色谱峰峰形均不好,且有干扰,因此本试验选用甲醇作为提取溶剂,并考察了甲醇浓度对试验的影响,结果显示50%甲醇超声提取效果最好;在超声时间的选择上,分别考察了30,45,60 min对试验的影响,结果表明45,60 min提取率没有差异,并且还比较了超声次数对试验的影响,结果显示超声3次以上时,提取率不再增大。综上所述,本试验选择50%甲醇,每次提取时间为45 min,共提取3次作为超声提取条件,对供试品溶液进行制备。

表 2 金银花、连翘药对提取物中 6 个成分加样回收率

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
绿原酸	0.249 8	9.00	9.05	18.23	102.0	102.6	0.9
	0.250 5	9.06	9.05	18.44	103.6		
	0.250 8	9.16	9.05	18.55	103.8		
	0.250 1	9.05	9.05	18.25	101.7		
	0.250 3	9.03	9.05	18.27	102.1		
	0.250 4	9.08	9.05	18.37	102.7		
咖啡酸	0.249 8	0.054 9	0.055 9	0.112	102.1	99.6	2.0
	0.250 5	0.055 0	0.055 9	0.112	102.0		
	0.250 8	0.055 2	0.055 9	0.110	98.0		
	0.250 1	0.055 1	0.055 9	0.110	98.2		
	0.250 3	0.055 2	0.055 9	0.110	98.0		
	0.250 4	0.055 4	0.055 9	0.111	99.5		
连翘酯苷 A	0.249 8	8.01	8.00	16.09	101.0	100.4	1.1
	0.250 5	7.99	8.00	16.15	102.0		
	0.250 8	8.12	8.00	16.04	99.0		
	0.250 1	8.05	8.00	16.01	99.5		
	0.250 3	8.02	8.00	16.04	100.3		
	0.250 4	8.06	8.00	16.09	100.4		
木犀草苷	0.249 8	0.271	0.271	0.538	98.5	98.3	0.4
	0.250 5	0.269	0.271	0.535	98.2		
	0.250 8	0.271	0.271	0.539	98.9		
	0.250 1	0.272	0.271	0.539	98.5		
	0.250 3	0.268	0.271	0.533	97.8		
	0.250 4	0.266	0.271	0.532	98.2		
连翘苷	0.249 8	0.918	0.921	1.845	100.7	100.8	2.1
	0.250 5	0.917	0.921	1.853	101.6		
	0.250 8	0.924	0.921	1.867	102.4		
	0.250 1	0.922	0.921	1.840	99.7		
	0.250 3	0.927	0.921	1.823	97.3		
	0.250 4	0.917	0.921	1.868	103.2		
槲皮素	0.249 8	0.417	0.416	0.829	99.0	99.7	0.9
	0.250 5	0.419	0.416	0.837	100.5		
	0.250 8	0.419	0.416	0.832	99.3		
	0.250 1	0.414	0.416	0.825	98.8		
	0.250 3	0.419	0.416	0.839	101.0		
	0.250 4	0.419	0.416	0.834	99.8		

表3 金银花、连翘药对提取物中6个成分的测定  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 

No.	绿原酸	咖啡酸	连翘 酯苷 A	木犀 草苷	连翘苷	槲皮素
1	40.69	0.255	35.75	1.170	3.716	1.544
2	35.71	0.140	31.02	1.113	2.629	0.962
3	37.69	0.199	32.36	1.231	4.345	1.723
4	36.28	0.221	32.20	1.081	3.685	1.670

采用 RP-HPLC 方法分别测定了金银花、连翘单味提取物和混合提取物的含量。结果显示,混合提取物中的各成分含量均比单味提取物的高,说明药对配伍可促进有关成分的溶出,推测是由于药对配伍后混合提取时皂苷等成分具有助溶作用,增加了各成分的溶出;药对混合提取的主要色谱峰与单独提取金银花或连翘的色谱峰保留时间和峰数一致,显示在混合提取过程中没有造成色谱峰的缺失。

#### [参考文献]

- [1] 段红妍,马成. 金银花与连翘配伍退热机制的实验研究[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(11):1214.
- [2] 林丽美,王智民,王金华,等. 金银花、连翘及银翘药对水煎剂的抗炎、解热作用研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(4):473.

- [3] 郑荣,郑征伟,王柯,等. 金银花提取物中6种有机酸类成分的测定[J]. 中成药,2013,35(3):560.
- [4] Qian Zheng Ming, Li Hui Jun, Li Ping, et al. Simultaneous quantification of seven bioactive components in *Culis lonicerae Japonicae* by high performance liquid chromatography [J]. Biomed Chromatogr, 2007,21(6):649.
- [5] Kang Hyo Sook, Lee Ji Yun, Kim Chang Jong. Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae Fructus*[J]. J ethnopharmacol, 2008, 116 (2):305.
- [6] 金智利,袁文婧. 高效液相色谱法测定金银花连翘提取物中绿原酸、咖啡酸的含量[J]. 黑龙江医药,2011,24(1):19.
- [7] 仇晶,金智利. 高效液相色谱法测定金银花连翘提取物(注射用)中连翘苷的含量[J]. 黑龙江医药,2011,24(1):17.
- [8] 孙艳涛,王冰,李莉. 梯度洗脱法同时测定不同配比金银花连翘药对中绿原酸、连翘脂素[J]. 中成药,2011,33(5):821.
- [9] 邢学锋,陈飞龙,罗佳波. 金银花、连翘药对配伍挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(4):358.

[责任编辑 顾雪竹]

## 《中国中药杂志》2015 年征订启事

《中国中药杂志》创刊于1955年7月,是由中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊,在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”,以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline, Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015 年本刊每期定价为 50 元,208 页,全年定价 1200 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅,邮发代号 2-45。本刊地址:北京东直门内南小街 16 号;邮政编码 100700;电子信箱 cjcmm2006@188.com;联系方式详见中国中药杂志网站 www.cjcmm.com.cn