

UPLC同时测定不同产地连翘中8种成分

梁军, 郭信东, 夏永刚, 杨炳友, 王秋红, 匡海学*

(黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物
药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**建立不同产地连翘(青翘、老翘)中8种成分的UPLC含量测定方法。**方法:**采用超高效液相色谱法, BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相甲醇(A)-水(B)(各含0.1%甲酸)梯度洗脱(0~2 min, 10%~20% A; 2~3 min, 20%~30% A; 3~6 min, 30%~60% A; 6~6.01 min, 60%~10% A; 6.01~9 min, 10% A); 柱温40℃, 流速0.4 mL·min⁻¹, 检测波长235 nm, 进样量2 μL。**结果:**该方法在6 min内实现对连翘中芦丁, 连翘酯苷A, (+)松脂素-4-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷, vlaolinol, (-)-落叶松树脂醇, 连翘苷, (+)松脂素, 连翘脂素8种成分的完全基线分离, 精密度、稳定性和重复性RSD均<3%, 各成分的回收率在98.8%~101.4%, RSD 1.0%~1.9%。**结论:**该方法简便、快捷、准确且灵敏度高, 可为连翘的质量评价提供依据。主成分分析结果提示不同产地、采收、加工方法都是影响药材质量的关键因素。

[关键词] 连翘; 青翘; 老翘; 芦丁; 连翘酯苷A

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0068-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110068

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1347.060.html>

[网络出版时间] 2016-12-28 13:47

Simultaneous Determination of Eight Components in Forsythiae Fructus from Different Habitats by UPLC

LIANG Jun, GUO Xin-dong, XIA Yong-gang, YANG Bing-you,
WANG Qiu-hong, KUANG Hai-xue*

(Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Pharmacodynamic Material Bases, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a UPLC method for the simultaneous determination of eight compounds in Forsythiae Fructus from different habitats. **Method:** Eight compounds in Forsythiae Fructus were simultaneously determined by UPLC with BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), with methanol (A) - water (B) (consisting of 0.1% formic acid) as the mobile phase for gradient elution (0-2 min, 10%-20% A; 2-3 min, 20%-30% A; 3-6 min, 30%-60% A; 6-6.01 min, 60%-10% A; 6.01-9 min, 10% A); at the flow rate of 0.4 mL·min⁻¹; the determination wavelength was 235 nm; and the injection volume was 2 μL. **Result:** Eight components were separated clearly within 6 min. The RSD values of precision, stability and reproducibility were all less than 3.0%. The average recoveries were 98.8%-101.4% with RSD of 1.0%-1.9%. **Conclusion:** The

[收稿日期] 20170302(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09304005004); 黑龙江省杰出青年科学基金项目(JC2016020); 黑龙江省博士后基金项目(LBH-Q13158)

[第一作者] 梁军, 博士, 副研究员, 黑龙江中医药大学中医学博士后科研流动站在站科研人员, 从事中药、天然药物药效物质基础及其质量评价研究工作, Tel:0451-82195301, E-mail: lliangjun@163.com

[通讯作者] *匡海学, 博士, 教授, 从事中药及复方药效物质基础研究, 中药性味理论研究, Tel:0451-82767188, E-mail: hxkuang56@163.com

method is simple, rapid, accurate and highly sensitive, providing a scientific basis for quality assessment of Forsythiae Fructus. PCA results showed that different production place, harvesting seasons and processing method played an important role in quality of Forsythiae Fructus.

[Key words] Forsythiae Fructus; Qingqiao; Laoqiao; rutin; forsythoside A

连翘味苦,性微寒,具有清热解毒、消肿散结、疏散风热的功效,主治温热、丹毒、斑疹、痈疡肿毒、瘰疬、小便淋闭等^[1]。按采收期的不同,分为青翘和老翘,主要含有咖啡酸苯乙醇苷和木脂素类化合物。目前,青翘和老翘临床用药不做区分,但青翘和老翘中有效成分的含量存在明显差异。《中国药典》2010 年和 2015 年版均以代表性的咖啡酸苯乙醇苷(连翘酯苷 A)和木脂素类化合物(连翘苷)为指标成分,进行连翘药材及饮片的质量控制。虽然在指标性成分的选择上迈入了新台阶,然而根据中药具有多成分、多靶点的特点,采用多个指标性成分进行中药质量评价已毋庸置疑,更具有科学性和全面性。虽然已有文献报道通过多个指标成分进行连翘药材及饮片的质量评价^[2-6],但是分析时间均较长,有的分析时间甚至达到了 60 min。本研究采用 UPLC-UV 法在 6 min 内实现了 8 种成分的完全基线分离,为科学评价连翘药材、饮片及其制剂的质量提供参考依据,亦为今后指导临床准确合理使用连翘药材提供理论依据。这种多成分质量评价方法,在思路更加符合作为多成分、多靶点的复杂体系的中药所具有的特点,从而也能更加符合中医药理论和实践的要求,有一定的示范作用。

1 材料

Acquity 型 UPLC 系统(美国 Waters 公司),KQ-500DB 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);甲醇色谱纯(美国 Dikama 公司),去离子水(美国 Millipore 公司),其他试剂均为分析纯。

咖啡酸(1),芦丁(2),连翘酯苷 A(3),异落叶松脂素(4),(+)松脂素-4-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷(5),vladinol D(6),(-)-落叶松树脂醇(7),连翘苷(8),(+)松脂素(9),连翘脂素(10),所有对照品均为实验室自制,通过 HPLC-UV 检测,按归一化法计算其纯度均 >98%。

连翘药材分别采购于山西、河南及四川等地,包括老翘和青翘,经黑龙江中医药大学药学院王振月教授鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* 的干燥果实。标本存放于本实验室,见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

通过考察不同的色谱柱(BEH C₁₈

表 1 连翘样品来源信息

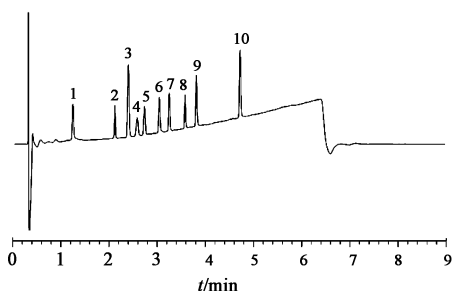
Table 1 Information of Forsythiae Fructus

No.	产地	分类
S1	四川	青翘
S2	四川	青翘
S3	四川	青翘
S4	四川	老翘
S5	山西	青翘
S6	陕西	老翘
S7	山西	老翘
S8	山西	青翘
S9	山西	老翘
S10	山西	老翘
S11	河南	青翘
S12	河南	青翘
S13	河南	青翘
S14	山西	青翘
S15	山西	老翘
S16	山西	老翘
S17	河南	老翘
S18	河南	青翘
S19	河南	青翘

和 HSS-T3),不同的流速(0.2,0.3,0.4 mL·min⁻¹),不同的柱温(25,30,35,40,45 ℃),确定最佳的色谱条件为: BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流动相甲醇(A)-水(B)各含 0.1% 甲酸,梯度洗脱(0 ~ 2 min, 10% ~ 20% A; 2 ~ 3 min, 20% ~ 30% A; 3 ~ 6 min, 30% ~ 60% A; 6 ~ 6.01 min, 60% ~ 10% A),流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,检测波长 235 nm,进样量 2 μL。对照品 UPLC 见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品 1 ~ 10 各适量,分别加甲醇制成质量浓度为 111.60, 172.80, 558.00, 144.00, 140.40, 115.20, 133.20, 126.00, 168.20, 144.00 mg·L⁻¹ 的混合溶液,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称定干燥的连翘粉末(100 目筛)0.1 g,置 25 mL 量瓶中,精密加入 50% 甲醇定容至 25 mL,超声提取 60 min(70 kHz),



1. 咖啡酸; 2. 芦丁; 3. 连翘酯苷 A; 4. 异落叶松脂素; 5. (+) 松脂素-4-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷; 6. vladinol D; 7. (-)-落叶松树脂醇; 8. 连翘苷; 9. (+) 松脂素; 10. 连翘脂素(图 2 同)

图 1 混合对照品 UPLC

Fig. 1 UPLC of mixed standards

放冷,再用 50% 甲醇补足减失体积至 25 mL,过滤,续滤液 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密吸取上述 2.2 项下制备的对照品储备液稀释成不同质量浓度的对照品溶液,按照 2.1 项下色谱条件测定,进样体积 2 μL。以每个对照品质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标(X),对应峰面积积分值为纵坐标(Y)进行线性回归,得到化合物 1~10 的线性回归方程。以 S/N 为 3 和 10,作为本方法的 LOD 和 LOQ。结果见表 2。

表 2 10 种成分的线性回归方程

Table 2 Calibration curves of 10 standards

成分	线性回归方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹	LOQ /mg·L ⁻¹	LOD /mg·L ⁻¹
1	Y=21 100X-39 463	0.999 9	1.24~111.60	1.12	0.32
2	Y=5 123.8X-2 183.5	0.999 8	1.92~172.80	1.73	0.49
3	Y=5 892.4X-49 714	1.000 0	5.58~558.00	1.16	0.33
4	Y=6 868.4X-14 788	0.999 9	1.60~144.00	1.44	0.41
5	Y=9 105.8X-21 449	0.999 8	1.56~140.40	1.40	0.40
6	Y=13 212X-27 268	0.999 9	1.28~115.20	1.15	0.33
7	Y=11 264X-25 624	0.999 9	1.48~133.20	1.33	0.38
8	Y=8 993.7X-20 269	0.999 8	1.40~126.00	1.26	0.36
9	Y=11 401X-28 615	0.999 9	1.87~168.20	1.68	0.32
10	Y=19 321X-46 725	0.999 9	1.60~144.00	1.44	0.49

2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 2 μL,按照 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,分别记录化合物 1~10 的保留时间和峰面积,保留时间 RSD 在 0.01%~0.1%,峰面积 RSD 在 0.5%~2.7%。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 2 μL,每隔 2 h 进样测定 1 次,记录 24 h 内保留时间和峰面积,保留时间 RSD 在 0.1%~0.5%,峰面积 RSD 在

0.8%~3.1%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一来源的连翘药材粉末 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,进行测定,计算含量;结果芦丁,连翘酯苷 A,(+) 松脂素-4-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷, vladinol D, (-)-落叶松树脂醇,连翘苷,(+) 松脂素和连翘脂素 8 种成分平均质量分数分别为 4.15,24.16,3.14,0.55,0.62,2.31,1.57,0.86 mg·g⁻¹。其 RSD 在 0.5%~2.1%,表明该方法稳定可行。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的连翘粉末样品,分别加入 8 种对照品,按供试品溶液的制备方法平行制备 6 份,按色谱条件进样测定,采用外标法计算上述 8 种成分的平均回收率及 RSD,结果见表 3。

2.9 样品测定 取 19 批连翘药材按照 2.3 项下方法制备及 2.1 项下色谱条件进行测定,计算 19 批样品中 8 种成分的含量,结果见表 4。色谱图见图 2。

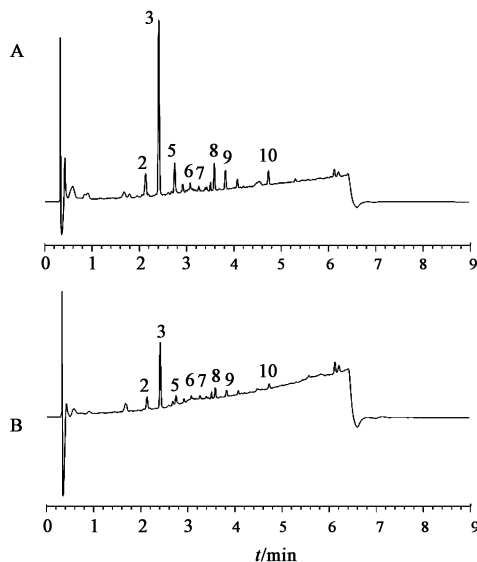


图 2 河南产青翘(A)和老翘(B)特征 HPLC

Fig. 2 Typical HPLC chromatograms of Qingqiao (A) and Laoqiao (B)

采用 SPSS 16.0 软件,以这 8 种成分做变量,进行主成分分析,从其二维散点图中可以看出,老翘样品(S4,S6,S7,S9,S10,S15~S17)趋向于存在第三象限(-/-),而青翘样品(S1~S3,S5,S8,S11~S14,S19)趋向于存在第一象限(+ / +)。仅有一个特殊情况即样品 S18,其存在于第二象限(- / +)。通过分析样品 S18 中各成分含量,其各成分含量明显高于其他样本,原因可能归咎于其不同的产地、采收和加工方法。见图 3。

表 3 连翘中 8 种成分的加样回收率

Table 3 Recoveries of 8 constituents in Forsythiae Fructus

成分	称样量	样品中量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD	成分	称样量	样品中量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
	/g	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%		/g	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
芦丁	0.080 0	0.329	0.325	0.655	100.25	99.15	1.3	(-)-落叶松树脂醇	0.080 0	0.047	0.047	0.093	97.87	98.79	1.0
	0.079 7	0.328	0.325	0.644	97.38				0.079 7	0.047	0.047	0.093	97.45		
	0.079 6	0.327	0.325	0.652	100.03				0.079 6	0.048	0.047	0.094	98.94		
	0.079 7	0.328	0.325	0.653	99.97				0.079 7	0.048	0.047	0.094	99.36		
	0.079 8	0.328	0.325	0.652	99.69				0.079 8	0.047	0.047	0.094	100.21		
	0.079 9	0.329	0.325	0.646	97.57				0.079 9	0.047	0.047	0.094	98.94		
连翘酯苷 A	0.080 0	1.931	1.932	3.851	99.36	99.79	1.1	连翘苷	0.080 0	0.187	0.187	0.377	101.77	101.42	1.9
	0.079 7	1.932	1.932	3.835	98.54				0.079 7	0.187	0.187	0.371	99.14		
	0.079 6	1.933	1.932	3.866	100.06				0.079 6	0.186	0.187	0.379	103.06		
	0.079 7	1.932	1.932	3.839	98.68				0.079 7	0.187	0.187	0.379	102.90		
	0.079 8	1.932	1.932	3.890	101.31				0.079 8	0.187	0.187	0.378	102.63		
	0.079 9	1.932	1.932	3.879	100.79				0.079 9	0.186	0.187	0.371	99.03		
(+)松脂素-4-O-β-D-葡萄糖苷	0.080 0	0.243	0.243	0.484	99.63	100.40	1.8	(+)松脂素	0.080 0	0.128	0.129	0.256	99.30	99.69	1.4
	0.079 7	0.242	0.243	0.481	98.68				0.079 7	0.129	0.129	0.255	98.52		
	0.079 6	0.242	0.243	0.492	102.80				0.079 6	0.128	0.129	0.255	98.37		
	0.079 7	0.242	0.243	0.491	102.68				0.079 7	0.129	0.129	0.257	99.38		
	0.079 8	0.242	0.243	0.482	99.22				0.079 8	0.129	0.129	0.258	100.70		
	0.079 9	0.243	0.243	0.484	99.38				0.079 9	0.129	0.129	0.260	101.87		
vladinol D	0.080 0	0.040	0.040	0.080	101.27	100.30	1.7	连翘脂素	0.080 0	0.072	0.072	0.143	99.16	101.00	1.3
	0.079 7	0.039	0.040	0.079	99.75				0.079 7	0.072	0.072	0.144	99.72		
	0.079 6	0.040	0.040	0.079	97.97				0.079 6	0.072	0.072	0.145	101.82		
	0.079 7	0.039	0.040	0.079	101.77				0.079 7	0.072	0.072	0.144	101.12		
	0.079 8	0.040	0.040	0.079	98.73				0.079 8	0.072	0.072	0.145	101.96		
	0.079 9	0.039	0.040	0.080	102.28				0.079 9	0.072	0.072	0.145	102.24		

表 4 19 批连翘药材中 8 种成分质量分数

Table 4 Quantitative analytical results of 8 contents of Forsythiae Fructus

mg·g⁻¹

No.	芦丁	连翘酯苷 A	(+)松脂素-4-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷	vladinol D	(-)-落叶松树脂醇	连翘苷	(+)松脂素	连翘脂素
S1	4.11	24.14	3.03	0.49	0.59	2.33	1.61	0.90
S2	2.37	14.10	2.68	0.60	0.57	2.36	0.92	0.59
S3	6.31	30.64	2.84	0.59	0.60	2.41	1.25	0.75
S4	0.43	1.92	0.44	-	-	0.44	0.50	0.46
S5	2.02	11.20	1.80	0.33	0.46	1.37	0.70	0.54
S6	0.55	2.05	0.69	-	-	0.60	0.56	0.47
S7	1.23	5.94	0.69	0.31	0.41	0.73	0.54	0.41
S8	2.02	10.34	1.60	0.37	0.47	1.16	0.78	0.58
S9	0.99	4.54	0.86	0.37	0.37	0.76	0.66	0.42
S10	0.74	2.68	0.43	-	0.34	0.41	0.79	0.71
S11	3.55	17.70	2.34	0.46	0.52	1.68	0.84	0.58
S12	3.10	19.49	2.82	0.87	0.88	2.94	0.95	0.63
S13	2.62	15.58	1.08	0.66	0.65	1.58	1.01	0.81
S14	2.33	13.23	1.25	0.43	0.57	1.30	1.91	1.22
S15	0.43	1.52	-	-	-	0.36	0.63	0.65
S16	0.87	4.26	0.48	0.30	0.36	0.59	0.55	0.46
S17	0.92	4.78	0.62	0.32	0.43	0.55	0.66	0.40
S18	18.44	63.26	6.04	1.45	0.77	4.21	-	-
S19	3.05	16.26	1.75	0.54	0.56	1.85	1.81	1.40

注：“-”表示未检测到。

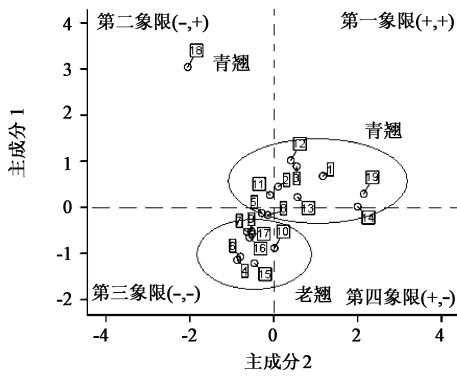


图 3 主成分分析二维散点

Fig. 3 2 D scatter plot of PCA

3 讨论

3.1 提取溶剂的考察 以供试品溶液作为提取对象,分别考察不同体积分数甲醇(30%,50%,70%,100%)超声对其各成分的提取率,以峰面积作为指标,结果表明50%甲醇作为提取溶剂,各成分提取最为充分。

3.2 提取时间的考察 以供试品溶液作为提取对象,采用50%甲醇作为提取溶剂,分别考察超声提取10,20,40,60,80,100 min各成分的提取率,以峰面积作为指标,结果表明超声提取60 min效果最好。

3.3 UPLC与HPLC色谱的对比 根据范迪姆特(VanDeemter)色谱理论,UPLC具有高分离度,高速度,高灵敏度,并且UPLC能提供单位时间内更多的信息量。本文比较了UPLC和HPLC的供试品色谱

图,UPLC实现了6 min内8种成分全部基线分离,而HPLC需要60 min并且还存在着2种成分不能基线分离。可见采用UPLC进行色谱分析是一种高效、节能且环保的方法。

本文以连翘药材为研究对象,采用UPLC的方法实现了6 min内8种成分全部基线分离,同时精确测定了连翘药材中8种主成分含量,避免了单个成分测定带来的繁琐步骤,该方法简便、快捷、准确且灵敏度高,可为连翘质量评价的科学性和全面性提供依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:170.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 付云飞,李清,毕开顺. RP-HPLC法同时测定不同产地连翘中的7种成分[J]. 中草药,2013,44(8):1043-1046.
- [5] 曲欢欢,翟西峰,李白雪,等. 连翘不同部位中连翘醋普和连翘普的含量分析[J]. 药物分析杂志,2008,28(3):382-385.
- [6] 郑晓珂,魏悦,冯卫生. 不同采收期连翘的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(3):1-4.

[责任编辑 顾雪竹]