

# 连翘不同产地与不同炮制品中 4 种成分的含量测定

刘瑞, 张振秋\*, 李伟铭, 周翠

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的:建立了不同产地及不同炮制品连翘中咖啡酸、连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷元四种成分的 HPLC 测定方法。方法:采用反相高效液相色谱法, Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相乙腈-0.4% 醋酸水梯度洗脱;检测波长 0~20 min, 323 nm; 20~30 min, 330 nm; 30~50 min, 277 nm; 50~55 min, 280 nm;柱温 30 ℃;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量 20 μL。结果:不同产地及不同炮制品连翘中 4 种成分含量差异显著。结论:此方法可用于检测连翘中四种成分的含量,为连翘的质量评价提供依据。

**[关键词]** 高效液相色谱;连翘;咖啡酸;连翘酯苷 A;连翘苷;牛蒡苷元;含量;炮制品

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0083-04

## Determination of Four Components in *Forsythia suspensa* from Different Habitats and Different Processed Products by HPLC

LIU Rui, ZHANG Zhen-qiu\*, LI Wei-ming, ZHOU Cui

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** The HPLC method was developed to determine Caffeic acid, Forsythoside A, Forsythin, Arctigenin in *Forsythia suspensa* from different habitats and different processed products. **Method:** Using RP-HPLC, Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) columns, mobile phase acetonitrile-0.4% aqueous acetic acid solution by HPLC linear gradient elution method. The detection wavelength 0-20 min, 323 nm, 20-30 min, 330 nm, 30-50 min, 277 nm, 50-55 min, 280 nm, column temperature 30 ℃, velocity 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the injection volume 20 μL. **Result:** The level of four components in *F. suspensa* from different habitats and different processed products is significantly different. **Conclusion:** The method can be used for the simultaneous determination of four components in *F. suspensa*, which provides a scientific basis for quality assessment to *F. suspensa*.

**[Key words]** HPLC; *Forsythia suspensa*; caffeic acid; forsythoside A; forsythin; arctigenin; determination; processed products.

连翘为木犀科连翘属植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,具清热解毒、消肿散结的功效,按采收期的不同,分为青翘和老翘<sup>[1]</sup>。主产于陕西、山西、河南、山东等地。主要含苯乙醇苷类、木脂素及其苷类、五环三萜类、挥发油类等化合物。在

《中国药典》一部中规定以连翘苷和连翘酯苷 A 为连翘药材的含量测定指标。现代药理研究表明连翘具有抗菌、抗炎、解热等作用<sup>[2]</sup>,咖啡酸为 5-L-O 抑制剂,具有止血、镇咳、祛痰、抗肿瘤、抗氧化等功效<sup>[3]</sup>。牛蒡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>[4-5]</sup>。故对连翘进行质量评价时,以咖啡酸、连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷元等多指标成分含量作为指标更客观、科学。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(仪器编号

**[收稿日期]** 20110308(007)

**[第一作者]** 刘瑞,硕士研究生,研究方向药物分析, Tel : 0411-87586110, E-mail: npl725@126.com

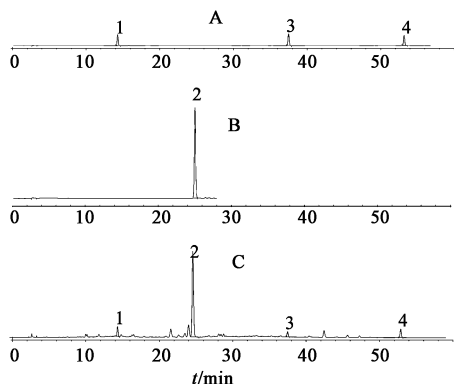
**[通讯作者]** \*张振秋,教授,博士生导师, Tel : 0411-87586058, E-mail: zhangzhenqiu@sina.com

20041191 DE43607375);配置四元梯度泵,在线脱气机,VWD 检测器;Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm,5 μm)色谱柱;METTLER AB135-S 1/10 万电子分析天平(瑞士);AR2140 电子分析天平(上海奥豪斯公司);XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司);876-1 型真空干燥箱(上海阳光实验仪器有限公司);AS3120A 超声提取器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

咖啡酸对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号 110885-200102)、连翘酯苷 A 对照品(购自成都曼斯特生物制品有限公司,购买日期 20100928)、连翘苷对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号 0821-200104)、牛蒡苷元对照品(辽宁中医药大学窦德强教授提供)。连翘药材分别收集于湖南、广西、山东、福建、江西、浙江、四川、陕西、河南、吉林、广东、江苏、辽宁、河北,经辽宁中医药大学李峰教授鉴定均为正品药材。甲醇、乙腈(山东禹王化学试剂有限公司,色谱纯),水为娃哈哈纯净水,冰醋酸(天津市凯信化学试剂有限公司,分析纯)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.4% 醋酸水(B)溶液梯度洗脱,0 ~ 10 min,5% ~ 15% A,10 ~ 20 min,15% ~ 17% A,20 ~ 40 min,17% ~ 30% A,40 ~ 50 min,30% ~ 40% A,50 ~ 55 min,40% ~ 50% A。检测波长 0 ~ 20 min,323 nm,20 ~ 30 min,330 nm,30 ~ 50 min,277 nm,50 ~ 55 min,280 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 20 μL。



1. 咖啡酸;2. 连翘酯苷 A;3. 连翘苷;4. 牛蒡苷元  
图 1 对照品(A)、连翘(B)供试品(C)的 HPLC 图

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品储备液的制备** 分别精密称取咖啡酸、连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷元对照品适量,分别

用甲醇配制成浓度为 0.183 2, 0.800 0, 0.457 0, 0.555 0 g·L<sup>-1</sup>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、连翘苷、牛蒡苷元对照品储备液适量,加甲醇,制成每 1 mL 含咖啡酸、连翘苷、牛蒡苷元分别为 9.160, 85.00, 55.50 μg 的混合对照品溶液。

**2.2.3 连翘酯苷 A 对照品溶液的制备** 取上述连翘酯苷 A 对照品储备液适量,加甲醇,制成每 1 mL 含 400.0 μg 的对照品溶液。

**2.2.4 供试品溶液的制备** 分别取不同商品地的连翘粉末(过 40 目筛)约 0.3 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇 60 mL,超声提取 3 次,每次 20 min,滤过,滤液浓缩至干,加 50% 甲醇溶解至 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

**2.3 线性关系考察** 分别精密量取混合对照品溶液和连翘酯苷 A 对照品溶液 2, 4, 8, 10, 12, 15 μL 进样,以峰面积 Y 为纵坐标,进样量 X(μg)为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表 1。

表 1 各对照品的线性关系

对照品	回归方程	r	线性范围/μg
咖啡酸	Y = 42.25X + 20.19	0.999 4	0.018 32 ~ 0.137 4
连翘苷	Y = 41.99X - 17.2	0.999 1	0.170 0 ~ 1.700
牛蒡苷元	Y = 45.40X + 29.59	0.999 4	0.111 0 ~ 0.832 5
连翘酯苷 A	Y = 167.39X + 149.72	0.999 9	0.400 0 ~ 4.000

**2.4 精密度试验** 精密量取 6 号供试品溶液在上述色谱条件下连续进样 6 次,每次 20 μL,计算咖啡酸、连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷元峰面积的 RSD 分别为 2.6%, 2.7%, 2.1%, 2.0%, 表明该仪器精密度良好。

**2.5 稳定性试验** 取 6 号供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 各进样 20 μL,结果咖啡酸、连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷元峰面积的 RSD 分别为 2.5%, 2.8%, 2.2%, 2.3%、表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.6 重复性试验** 取 6 份同一批次(6 号)样品每份约 0.3 g,按 2.2.3 项下方法制备,在上述色谱条件下分别进样 20 μL,测定峰面积并计算各组分含量和 RSD,结果咖啡酸、连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷元的平均含量(n = 6)分别为 0.078 4, 4.79, 0.424, 0.420 mg·g<sup>-1</sup>;RSD 分别为 2.70%, 1.10%, 1.20%, 2.80%, 表明重复性良好。

**2.7 加样回收率试验** 取6号连翘药材粉末(其中咖啡酸、连翘酯苷A、连翘苷、牛蒡苷元的含量分别为0.078 4, 4.79, 0.424, 0.420 mg·g<sup>-1</sup>),精密称定6份分别为0.150 9, 0.151 2, 0.151 4, 0.151 0, 0.152 1, 0.151 7 g,分别精密加入咖啡酸、连翘酯苷A、连翘苷、牛蒡苷元、对照品储备液分别为0.065 0, 0.900, 0.140, 0.114 mL,按2.2.3项下方法处理,平行6份。分别吸取20 μL进样,根据测得量与加入量计算回收率,结果咖啡酸、连翘酯苷A、连翘苷、牛蒡苷元的加样回收率分别为100.6%, 100.1%, 101.8%, 97.5%;RSD分别为1.8%, 1.1%, 2.9%, 2.0%。结果见表2~5。

表2 咖啡酸加样回收率试验的测定(n=6)

No.	样品中含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.011 83	0.023 90	101.3		
2	0.011 85	0.023 53	98.1		
3	0.011 87	0.023 62	98.7		
4	0.011 84	0.023 84	100.8	100.6	1.8
5	0.011 92	0.024 15	102.9		
6	0.011 89	0.024 01	101.8		

注:加入量均为0.011 91 mg。

表3 连翘酯苷A加样回收率试验的测定(n=6)

No.	样品中含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.722 8	1.449	100.9		
2	0.724 2	1.447	100.4		
3	0.725 2	1.453	101.1		
4	0.723 3	1.446	100.4	100.1	1.1
5	0.728 6	1.437	98.4		
6	0.726 6	1.441	99.2		

注:加入量均为0.720 0 mg。

表4 连翘苷加样回收率试验的测定(n=6)

No.	样品中含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.064 0	0.129 6	102.5		
2	0.064 1	0.128 0	99.8		
3	0.064 2	0.129 9	102.7		
4	0.064 0	0.132 4	106.9	101.8	2.9
5	0.064 5	0.127 9	99.1		
6	0.064 3	0.128 2	99.8		

注:加入量均为0.064 0 mg。

**2.8 含量测定** 分别取不同商品地连翘药材粉末,按2.2.4项下方法制备,在上述色谱条件下测定各商品地连翘中咖啡酸、连翘酯苷A、连翘苷、牛蒡苷

元的含量,结果见表6。

表5 牛蒡苷元加样回收率试验的测定(n=6)

No.	样品中含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.063 4	0.125 6	98.7		
2	0.063 5	0.123 9	100.7		
3	0.063 6	0.124 9	97.3		
4	0.063 4	0.124 5	97.0	97.5	2.0
5	0.063 9	0.123 9	95.2		
6	0.063 7	0.124 2	96.0		

注:加入量均为0.063 0 mg。

表6 各商品地连翘中指标性成分的含量 mg·g<sup>-1</sup>

No.	商品地	收集时间	咖啡酸	连翘酯苷A	连翘苷	牛蒡苷元
1	湖南长沙	2010-5	0.019 6	0.913	0.817	0.324
2	广西北海	2010-7	0.008 9	0.276	1.25	0.445
3	山东新泰	2010-8	0.086	3.31	1.11	0.313
4	福建福州	2010-3	0.125	0.584	1.02	0.202
5	江西上饶	2010-5	0.042 5	3.97	0.679	0.248
6	浙江杭州	2010-8	0.078 4	4.79	0.424	0.42
7	四川成都	2010-4	0.097 9	0.853	3.44	0.279
8	陕西西安	2010-5	0.012 9	0.162	0.896	0.327
9	河南开封	2010-5	0.008 7	0.066	0.737	0.216
10	吉林四平	2010-9	0	0	0.6	0.49
11	广东东莞	2010-6	0.086 8	0.935	0.442	0.245
12	江苏连云港	2010-4	0.004 6	0.065	1.11	0.322
13	辽宁大连	2010-6	0.093 4	0.091	1.15	0.228
14	河北安国	2010-4	0.233	5.17	1.23	0.55

### 3 讨论

选择回流、超声、索氏等提取方式和甲醇、乙醇、水等提取溶剂进行考察,确定连翘采用甲醇超声提取<sup>[6]</sup>。对其提取条件以甲醇浓度、甲醇用量、提取时间、提取次数4因素进行正交试验,确定提取连翘中4种成分测定采用50%甲醇200倍量超声提取3次,每次提取20 min。

流动相分别考察了甲醇-水,乙腈-水,乙腈-水(0.4%醋酸),乙腈-磷酸三乙胺溶液梯度洗脱,结果乙腈-水(0.4%醋酸)分离效果较好,故选择为流动相,梯度洗脱。曾分别考察柱温(20, 25, 30, 35 ℃),流速(0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL·min<sup>-1</sup>),结果表明在柱温30 ℃,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>时基线稳定,色谱图较好。

不同商品地的连翘药材中 4 种成分含量差异较大,可能与各商品地连翘的来源有关。连翘苷含量最高的生品商品地为四川;连翘酯苷 A、咖啡酸、牛蒡苷元含量最高的商品地为河北安国;商品地为吉林的连翘药材中未检测出咖啡酸和连翘酯苷 A。2010 年版《中国药典》规定按干燥品计算,含连翘酯苷 A 不得少于 0.25%,含连翘苷不得少于 0.15%,从表 6 可以看出各商品地连翘中连翘苷和连翘酯苷 A 含量普遍低于药典规定,山东、江西、浙江、河北商品地的连翘酯苷 A 含量较高,可能与连翘的生长环境及采收时间有关。综合而看,商品地为河北安国的连翘质量最好。

连翘酯苷 A 对照品与其他 3 种对照品混合后经 HPLC 法检测出现杂质峰,说明连翘酯苷 A 可能与其他 3 种对照品有反应,因此单独配制。

连翘的主要炮制方法有炒黄、炒焦、炒炭、朱砂拌品<sup>[7]</sup>。连翘炮制的主要目的是降低其苦寒之性。取商品地为河北安国的连翘药材 4 份,分别炒黄、炒焦、炒炭、朱砂拌。不同炮制品中连翘酯苷 A 的含量变化为生品( $5.17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 炒黄品( $3.27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 朱砂拌品( $1.74 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 炒焦品( $1.68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ),炒炭品中未检测到连翘酯苷 A。连翘苷的含量变化为生品( $1.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 朱砂拌品( $1.19 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 炒黄品( $1.07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 炒焦品( $1.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 炒炭品( $0.906 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )。咖啡酸的含量变化为生品

( $0.233 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 炒黄品、朱砂拌品( $0.200 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 炒焦品( $0.133 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ),炒炭品中未发现咖啡酸。牛蒡苷元的含量变化为炒焦品( $1.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 炒炭品( $1.09 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 炒黄品、朱砂拌品( $0.869 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) > 生品( $0.550 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )。温度过高会使连翘的主要成分连翘苷和连翘酯苷 A 分解,有关连翘的炮制品还有待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:159.
- [2] 张海燕.连翘化学成分及药理活性的研究进展[J].中药材,2001,23(10):657.
- [3] 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.
- [4] Menz H. Differential in vitro anti-HIV activity of natural lignans [J]. Journal of bioscience, 1990, 45 (11-12):1215.
- [5] Sato A. Abstracts of Papers, R The 106th Annual Meeting of The pharmaceutical society of Japan. April 1986:222.
- [6] 张涛,陈学松.连翘不同炮制品中连翘苷的 HPLC 测定[J].中草药,2005,36(9):1399.
- [7] 中国中医研究院中药研究所,北京药品生物制品检定所.中药炮制经验集成[M].北京:人民卫生出版社,1963.

[责任编辑 蔡仲德]

## 简 讯

据中国高等学校自然科学学报研究会、中国科学技术期刊编辑学会 2009 年统计结果报道,2008 年《中国实验方剂学杂志》登载的学术论文中,有 224 篇被美国化学文摘(CA)收录,标志着《中国实验方剂学杂志》已成为 CA 在国内的主要统计源期刊之一,也标志着该杂志的学术水平又迈上了一个新台阶。

在此,谨向热心于《中国实验方剂学杂志》审稿、组稿工作的人员表示衷心感谢,向各学术论文作者对《中国实验方剂学杂志》工作支持表示诚挚谢意!