

HPLC同时测定连翘花及叶中绿原酸等活性成分的含量

张飞¹, 田粟², 吕明霞¹, 何童森¹, 李媛¹, 丁月新², 崔同^{1*}

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000;

2. 河北医科大学公共卫生学院, 石家庄 050017)

[摘要] 目的: 建立同时测定绿原酸、连翘酯苷、芦丁、连翘苷含量的高效液相色谱测定方法; 比较连翘花、不同生长时期连翘叶、连翘药材中的含量差异。方法: 采用高效液相色谱(HPLC)法, 以 Supelcosil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)为色谱柱, 甲醇-0.8% 醋酸水溶液为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm, 柱温 25 °C。结果: 绿原酸在 0.125 ~ 12.500 μg、连翘酯苷在 0.125 ~ 12.500 μg、芦丁在 0.175 ~ 17.500 μg、连翘苷在 0.125 ~ 12.500 μg 线性关系良好, 平均加样回收率为 98.43% ~ 99.97%, RSD < 5% (n = 6)。结论: 该方法准确可靠, 结果稳定, 可用于连翘样品中绿原酸、连翘酯苷、芦丁和连翘苷的同时测定, 且各活性成分在连翘花、不同生长时期连翘叶及连翘药材的含量存在差异。

[关键词] 连翘; 绿原酸; 连翘酯苷; 芦丁; 连翘苷; 高效液相色谱法;

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0103-04

HPLC Determination of Chlorogenic Acid, Forsythoside, Rutin and Phillyrin in *Forsythia suspense* Flowers and Leaves

ZHANG Fei¹, TIAN Su², LV Ming-xia¹, HE Tong-sen¹, LI Yuan¹, DING Yue-xin², CUI Tong^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. Hebei Medical University of Public Health, Shijiazhuang 050017, China)

[Abstract] **Objective:** The HPLC method was established for determination of chlorogenic acid, forsythoside, rutin and phillyrin in *Forsythia suspense* flowers and leaves. **Method:** The separation was performed on

[收稿日期] 20101215(009)

[基金项目] 河北省科技支撑计划项目(09276433); 河北医科大学科研基金项目(2006013)

[第一作者] 张飞, 在读研究生, 研究方向: 食品分析, Tel: 0312-7528427, E-mail: zhangfei0821@hotmail.com

[通讯作者] * 崔同, 教授, 博士, 研究方向: 食品天然产物化学, Tel: 0312-7528427, E-mail: cuitong98@yahoo.com.cn

[参考文献]

- [1] 《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 300.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 262.
- [3] Shi Y P, Guo W, Jia Z J. Germacranolides from *Carpesium lipskyi*[J]. Planta Med, 1999, 65: 94.
- [4] 巨勇, 贾忠建, 朱子清. 九节菖蒲化学成分研究[J]. 中草药, 1986, 17(9): 4.
- [5] 高晓忠, 周长新, 张水利, 等. 毛茛科植物石龙芮的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 124.
- [6] 从蒲珠. 质谱学在天然有机中的应用[M]. 北京: 科学技术出版社, 1987: 294.
- [7] 任风芝, 栾新慧, 赵毅民, 等. 紫珠叶黄酮类化合物的研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(12): 840.
- [8] 冯世秀, 刘梅芳, 魏孝义, 等. 布渣叶中三萜和黄酮类成分的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(1): 51.

[责任编辑 邹晓翠]

Supelcosil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 25 °C using methanol-0.8% aqueous acetic acid as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 280 nm. **Result:** The standard curve was linear within the concentration range of 0.125-12.500 μg for chlorogenic acid, 0.125-12.500 μg for forsythoside, 0.175-17.500 μg for rutin and 0.125-12.500 μg for phillyrin. The average recovery was 99.43% - 99.97%, respectively. The RSD was less than 5%. **Conclusion:** The method is sensitive and accurate. It can be used for determination of chlorogenic acid, forsythoside, rutin and phillyrin in *Forsythia suspense*.

[**Key words**] *Forsythia suspense*; chlorogenic acid; forsythoside; rutin; phillyrin; HPLC

连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 是我国临床常用传统中药之一,通常是以果实入药,具有清热解毒、消肿散结之功效^[1]。近些年,作为资源更为丰富的连翘叶,其茶制品的抗氧化、抗衰老作用也越来越备受注目^[2-3]。对连翘属植物的研究结果显示,同属植物的叶子与果实的化学成分有很好的的一致性,连翘苷、连翘苷元、连翘酯苷、连翘酚、芦丁被报道是连翘及连翘叶中的主要活性成分^[4]。绿原酸是植物在有氧呼吸过程中产生的一种苯丙素类化合物^[5],作为植物的植保素,而广泛存在于天然植物中。但到目前为止,有关连翘中绿原酸的检测方法及其含量分析的研究尚未见报道。

本研究前期通过抗氧化实验和高效液相-质谱法,了解到连翘花、连翘叶主要的活性成分是绿原酸、连翘酯苷、芦丁。故本实验对连翘植物中的绿原酸、连翘酯苷、芦丁、连翘苷的含量进行了测定,并比较了其在连翘花、不同时期连翘叶、连翘药材中的含量差异。

1 仪器和试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津); KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9140 型电热恒温鼓风干燥器(上海一恒科技有限公司); 4041 型电动咖啡研磨机(德国博朗); CP124S 电子分析天平(德国赛多利斯); TD5A-WS 低速离心机(湖北湘鹰仪器制造有限公司)。

连翘叶于 2008 年 3~10 月采摘自河北医科大学校园内,经河北医科大学药学院生药教研室赵丁教授鉴定为木犀科植物连翘 *F. suspense* 的新鲜叶子;连翘花于 2008 年 3 月采摘自河北医科大学校园内;连翘药材购自石家庄市乐仁堂大药房。

绿原酸购自 Sigma 公司;芦丁(批号 F20060526)购于 SCRC 国药集团化学试剂有限公司,纯度 ≥ 95%;连翘苷(批号 LQ001-20100305)和连翘酯苷(批号 LQ002-20100305)购于天津马克生

物科技有限公司,纯度 ≥ 98%;水为超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Supelcosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.8% 醋酸水溶液梯度洗脱(0~6 min, 25%~30% 甲醇; 6~24 min, 30%~35% 甲醇; 24~29 min, 35%~39% 甲醇; 29~39 min, 39%~45% 甲醇; 39~50 min, 45%~60% 甲醇),检测波长 280 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 5 μL。在此条件下,供试品中的绿原酸、连翘酯苷、芦丁、连翘苷成分与其他成分达到较好的分离。见图 1。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精确称取 0.125 g 绿原酸、0.125 g 连翘酯苷、0.175 g 芦丁、0.125 g 连翘苷置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,混匀,制成对照品混合储备溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别精密称取 34 °C 干燥并粉碎后过 40 目筛的连翘花和连翘叶粉末 0.5 g、连翘药材粉末 1.0 g,置于 15 mL 离心管中。经石油醚充分脱脂脱色处理后,加入 10 mL 60% 甲醇溶液,称定质量,超声提取 1 h,冷却,用 60% 甲醇溶液补充质量。3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,收集上清液,经 0.45 μm 滤膜滤过,得样品原液,置于 -18 °C 冰箱保存备用。

2.3 线性关系考察 精确量取上述对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.0, 5.0 mL, 分别置于 7 个 10 mL 量瓶中,用适量的甲醇和超纯水定容,配制成 60% 甲醇的对照品溶液。分别在 2.1 色谱条件下进行测定,以峰面积(Y)为纵坐标,相应对照品的量(X, μg)为横坐标得回归方程,结果见表 1。

2.4 检测限的测定 在该色谱条件下,以信噪比为 3 计,绿原酸、连翘酯苷、芦丁和连翘苷的最低检测限分别为 0.45, 0.35, 0.613, 0.75 ng。

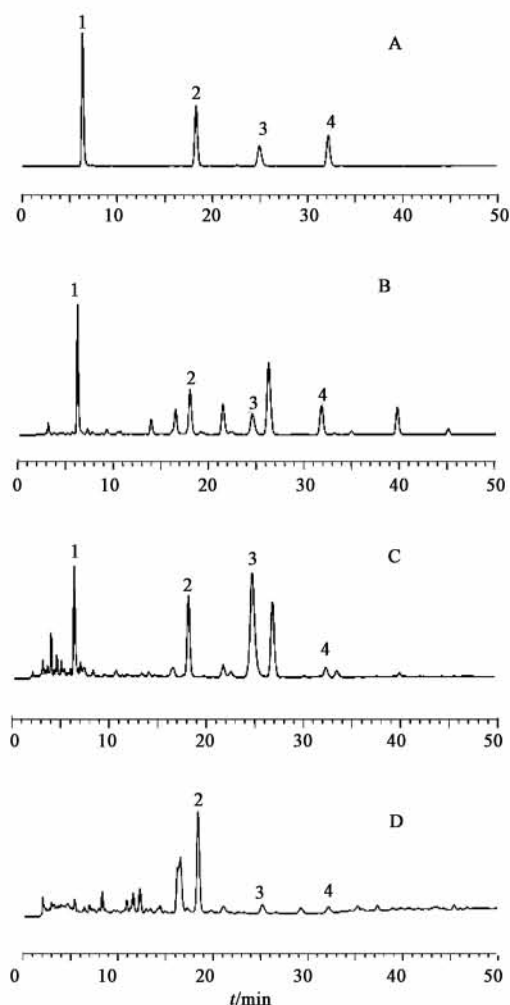


图1 对照品和连翘样品的HPLC

A 对照品;B 连翘叶样品;C 连翘花样品;D 连翘样品;
1. 绿原酸;2. 连翘酯苷;3. 芦丁;4. 连翘苷

表1 回归方程、相关系数、线性范围

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
绿原酸	$Y = 700\ 490\ 0X - 733\ 82$	0.999 7	0.125 ~ 12.500
连翘酯苷	$Y = 470\ 830\ 0X - 978\ 21$	0.999 8	0.125 ~ 12.500
芦丁	$Y = 379\ 520\ 0X - 146\ 67$	0.999 8	0.175 ~ 17.500
连翘苷	$Y = 282\ 690\ 0X - 398\ 74$	0.999 8	0.125 ~ 12.500

2.5 精密度试验 取 $0.500\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 绿原酸、 $0.500\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 连翘酯苷、 $0.280\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 芦丁、 $0.500\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 连翘苷对照品混合溶液,进样量 $5\ \mu\text{L}$,重复进样5次,测定峰面积。计算RSD,分别为绿原酸1.55%、连翘酯苷0.71%、芦丁1.90%、连翘苷1.50%。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(3月份连翘叶),分别在1,2,3,4,5 d,2.1项色谱条件下进行测

定。计算RSD,分别为绿原酸2.45%、连翘酯苷2.40%、芦丁3.58%、连翘苷2.55%。

2.7 重复性试验 分别称取连翘花粉末(0.5 g)、6月份连翘叶粉末(0.5 g)、连翘药材粉末(1.0 g)各6份,按照2.2.2项的方法制备样品溶液,在2.1项色谱条件下进行测定。连翘花中绿原酸、连翘酯苷、芦丁和连翘苷的RSD分别为2.66%、3.35%、3.16%、2.00%;6月份连翘叶中绿原酸、连翘酯苷、芦丁和连翘苷的RSD分别为2.37%、1.81%、2.47%、1.75%;连翘药材中连翘酯苷、芦丁和连翘苷的RSD分别为1.28%、1.36%、0.79%。

2.8 加样回收试验 分别称取连翘花粉末(0.5 g)、6月份连翘叶粉末(0.5 g)、连翘药材粉末(1.0 g)各6份,分别加入一定量的绿原酸、连翘酯苷、芦丁和连翘苷对照品,按2.2.2供试品溶液的制备方法制备溶液,2.1项色谱条件下进行测定,结果见表2。

表2 样品中4种成分的加样回收率 %

成分	连翘花		6月份连翘叶		连翘药材	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
绿原酸	99.27	1.03	99.43	0.61	99.07	0.66
连翘酯苷	99.75	2.67	99.96	1.19	99.61	0.98
芦丁	98.92	0.98	99.97	0.60	99.67	1.70
连翘苷	98.43	1.67	99.56	0.86	98.91	1.48

2.9 样品含量测定 精密吸取供试品溶液各 $5\ \mu\text{L}$,在上述方法进行测定,并计算连翘花、连翘叶、连翘药材中绿原酸、连翘酯苷、芦丁、连翘苷的含量,结果见表3。

结果显示,连翘不同生长时期的4种被测活性成分的含量存在差异。3月采集的幼叶中绿原酸的含量最高,达 $28.89\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,是连翘花的大约4倍,此后,伴随着叶子的生长含量呈下降趋势。与连翘叶中绿原酸的趋势相似,芦丁在3月连翘叶中的含量较高,其他月份相对较低,但是连翘花中芦丁含量可达 $49.65\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,是3月连翘叶的大约2.5倍。对于连翘属植物的代表性成分——连翘酯苷和连翘苷在连翘叶中的含量都明显高于连翘花,其中连翘酯苷以生长中期的连翘叶(5~8月)的含量较高,连翘苷在3月幼叶中的含量显著优于其他生长月份。而购买于药店的连翘药材中这4种活性成分的含量都明显低于采摘的连翘叶,甚至绿原酸未被检出。

表 3 连翘样品绿原酸、连翘酯苷、芦丁及连翘苷质量分数 (n=3)

mg·g⁻¹

No.	测定部位	采集时间	绿原酸	连翘酯苷	芦丁	连翘苷
1	花	2008-03-21	7.38 ± 0.20	4.55 ± 0.15	49.65 ± 1.57	4.10 ± 0.08
2	叶	2008-03-21	28.89 ± 0.67	26.82 ± 0.40	20.14 ± 0.36	28.16 ± 0.90
3	叶	2008-04-21	8.76 ± 0.31	19.41 ± 0.40	11.32 ± 0.28	15.83 ± 0.26
4	叶	2008-05-21	7.66 ± 0.16	33.98 ± 0.38	10.77 ± 0.16	15.52 ± 0.18
5	叶	2008-06-21	5.63 ± 0.13	35.64 ± 0.65	10.84 ± 0.27	19.19 ± 0.34
6	叶	2008-07-21	4.77 ± 0.10	30.87 ± 0.07	10.59 ± 0.21	13.43 ± 0.42
7	叶	2008-08-21	4.40 ± 0.07	29.76 ± 0.23	11.16 ± 0.13	23.39 ± 0.35
8	叶	2008-09-21	3.58 ± 0.06	21.82 ± 0.04	8.40 ± 0.10	14.58 ± 0.23
9	叶	2008-10-21	3.68 ± 0.04	21.33 ± 0.29	9.15 ± 0.09	16.64 ± 0.28
10	果实	药店购买	未检出	6.68 ± 0.09	1.54 ± 0.02	1.77 ± 0.02

3 讨论

综合近些年对连翘植物活性成分的相关文献发现,诸研究多集中于连翘植物中连翘苷、连翘酯苷、芦丁的含量测定方面,尚未见连翘药材中绿原酸的相关报道。故本研究在 Guo Hui 等^[6]人建立的同时测定连翘中 12 种活性成分的高效液相色谱分析方法的基础上,针对连翘植物中更具代表性的活性成分进行了改进。结果显示,采用此改进的方法,被检测的这 4 种活性成分能与其他成分达到较好的分离,RSD 在 0.60% ~ 2.67%,且回收率均在 95% 以上,表明此方法重复性好、准确可靠。对连翘花、叶和连翘药材分析结果表明,连翘叶和花中连翘酯苷、芦丁和连翘苷的含量大多高于连翘药材中的含量,尤其是绿原酸在连翘药材中并未被检出。

绿原酸作为植物化学物的一种,其在植物中的产生和存在会受到降雨、温度、光照等生长条件的影响^[7]。本研究结果显示,不同生长时期的连翘叶中绿原酸的含量是呈动态变化的,春季叶子萌芽时含量最高,此后随着生长逐渐下降。此结果与杜仲叶中绿原酸含量的变化趋势相似^[8]。考虑具有抗氧化作用的绿原酸在植物的幼芽时期的大量产生,将起到清除自由基、防止紫外线伤害以及抵抗病菌侵袭的重要作用^[9]。芦丁作为一种黄酮类成分,在不同生长时期连翘叶中的含量变化与绿原酸相似,但是在连翘花中的含量表现得更突出。此外,本研究得出的不同生长时期连翘叶中连翘酯苷和连翘苷含量的变化趋势与张果等^[10]的研究结果有所不同。

许多研究已经证明绿原酸、连翘酯苷^[11]、和芦丁都具有很强的抗氧化作用。结果显示 3 月连翘嫩叶中绿原酸、连翘酯苷和芦丁不仅是主要的活性成

分,且含量很高,提示 3 月的嫩叶可能具有较高的抗氧化作用,这为民间采集幼嫩的连翘叶作为保健茶原料提供了科学依据,也为解明连翘叶的抗氧化作用提供了理论依据,且对连翘叶、连翘花资源的进一步利用和开发提供参考。

[参考文献]

- [1] 中国药典,一部[S]. 2005:117.
- [2] 杨建雄,李发荣,朱淑云. 连翘叶茶的体外抗氧化活性[J]. 食品科学,2002,23(12):120.
- [3] 侯改霞,李发荣,刘静,等. 连翘叶茶抗氧化抗衰老作用的实验研究[J]. 营养学报,2004,26(1):65.
- [4] 《中华本草》编辑委员会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:159.
- [5] 姚新生. 天然药物化学[M]. 北京:人民卫生出版社,1988.
- [6] Hui Guo, Ai-Hua Liu, Lie Li, et al. Simultaneous determination of 12 major constituents in *Forsythia suspensa* by high performance liquid chromatography-DAD method[J]. J Pharm Biomed Anal,2007,43:1000.
- [7] Sánchez-Moreno C, Larrauri J A, Saura-calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols[J]. J Sci Food Agric,1998,76:270.
- [8] 钱骅,赵伯涛,张卫明. 不同因素对杜仲叶绿原酸含量的影响[J]. 中国野生植物资源,1999,18(3):45.
- [9] Harbowy M E, Balentine D A. Tea chemistry[J]. Crit Rev Plant Sci,1997,16:415.
- [10] 张果,李发荣,段飞,等. 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.
- [11] 张立伟,赵春贵,杨频,等. 连翘酯苷抗氧化活性及构效关系研究[J]. 中国药学杂志,2003,38(5):334.

[责任编辑 邹晓翠]