

青翘炮制方法的研究

张淑蓉^{*}, 裴香萍, 梁学伟, 黄轩, 黄灿林
(山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] 目的: 确定青翘的最佳炮制方法。方法: 采用 HPLC 直接测定, Alltima C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-水梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 室温, 流速 0.8 mL·min⁻¹。结果: 连翘酯苷的回归方程为 $Y = 959\ 631.703\ 1X + 250\ 467.648\ 4$, $r = 0.999\ 4$, 线性范围 1.5 ~ 15 μg; 连翘苷的回归方程为 $Y = 883\ 203.205\ 8X - 9\ 047.738\ 3$, $r = 0.999\ 4$, 线性范围 0.145 ~ 1.45 μg; 连翘酯苷和连翘苷的加样回收率分别为 97.9%, 99.2%, RSD 分别为 2.30%, 2.27% ($n = 6$)。青翘药材蒸制 20 ~ 30 min, 连翘酯苷和连翘苷的含量最高。结论: 该测定方法准确、可靠, 重复性好, 可用于连翘中连翘酯苷和连翘苷的含量测定; 青翘的炮制以蒸制 20 ~ 30 min 为宜。

[关键词] 青翘; 炮制方法; 连翘酯苷; 连翘苷

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0033-04

Study on Processing Methods of Fructus Forsythiae

ZHANG Shu-rong^{*}, PEI Xiang-ping, LIANG Xue-wei, HUANG Xuan, HUANG Can-lin
(Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the optimal processing method for Fructus Forsythiae. **Method:** HPLC was applied on the determination with Alltima C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and methanol - water as mobile phase by a gradient elution program at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The detection wavelength was at 280 nm and column temperature was at room temperature. **Result:** The regression equation of Forsythiaside was $Y = 959\ 631.703\ 1X + 250\ 467.648\ 4$, $r = 0.999\ 4$, Linear range was 1.5-15 μg, The regression equation of phillyrin was $Y = 883\ 203.205\ 8X - 9\ 047.738\ 3$, $r = 0.999\ 4$, Linear range was 0.145-1.45 μg. The average recovery of Forsythiaside and Phillyrin was 97.9% with RSD 2.30% and 99.2% with RSD 2.27% ($n = 6$) respectively. Content of the Forsythiaside and Phillyrin was in the maximum yield with the processing methods of steaming for 20-30 min steaming. **Conclusion:** The method was accurate and repeatable, can be applied to the quality control of Fructus Forsythiae. The optimal processing method of Fructus Forsythiae was steaming for 20-30 min.

[Key words] Fructus Forsythiae; processing Methods; forsythiaside; phillyrin

连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia Suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 秋季果实初熟尚带绿色时采收, 除去杂质, 蒸熟, 晒干, 习称“青翘”, 果实熟透时采收, 晒干, 除去杂质, 习称“老翘”。连翘味苦, 微寒, 归肺、心、胆经。有清热解毒, 消痈散结, 疏

散风热之功效^[1]。连翘中主要含有连翘苷和连翘酯苷等有效成分, 具有抗菌、消炎、抗感染、解热作用、抗病毒及强心、抑制毛细血管通透性, 抗肝损伤等作用^[2]。目前, 在青翘产地常用的炮制方法主要有水蒸、汽蒸、水煮(晾晒或烘干)等不同的炮制方法, 为了考察炮制方法对青翘中主要有效成分含量变化的影响, 本试验采用高效液相色谱法分别测定了水蒸晾晒法, 水蒸烘干法、汽蒸晾晒法、汽蒸烘干法、水煮晾晒法和水煮烘干法等不同方法炮制的青翘中连翘苷和连翘酯苷的含量变化, 以探讨其合理的炮制方

[收稿日期] 20100813(001)

[基金项目] 山西省科技厅科技攻关计划项目(2006031083-1)

[通讯作者] * 张淑蓉, Tel: 0351-2272284, E-mail: zhangsr62@163.com

法,为科学合理加工炮制连翘提供参考依据。

1 仪器与试剂

Waters2695 二元液相色谱泵, Waters2998 光电二极管阵列检测器, KQ5200V 型超声波清洗机, FA/JA1004 型 1/万天平。试验用水为双蒸水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。连翘苷对照品购自中国药品生物制品鉴定所(含量测定用, 批号 110821-200610), 连翘酯苷对照品购自辽宁省生物医药研究所(含量测定用, 纯度大于 98.0%)。连翘药材采自山西太原、山西安泽、山西长治和山西左权, 经山西中医学院牛燕珍讲师鉴定均为 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及检测方法 Alltima C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-水梯度洗脱(0~8 min 甲醇 30%~33%, 8~24 min 甲醇 33%~40%, 24~39 min 甲醇 40%~48%, 39~55 min 甲醇 48%~64%, 55~65 min 甲醇 64%~30%, 65~75 min 甲醇 30%); 检测波长 280 nm; 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温室温。此条件下对照品和样品 HPLC 色谱图见图 1。

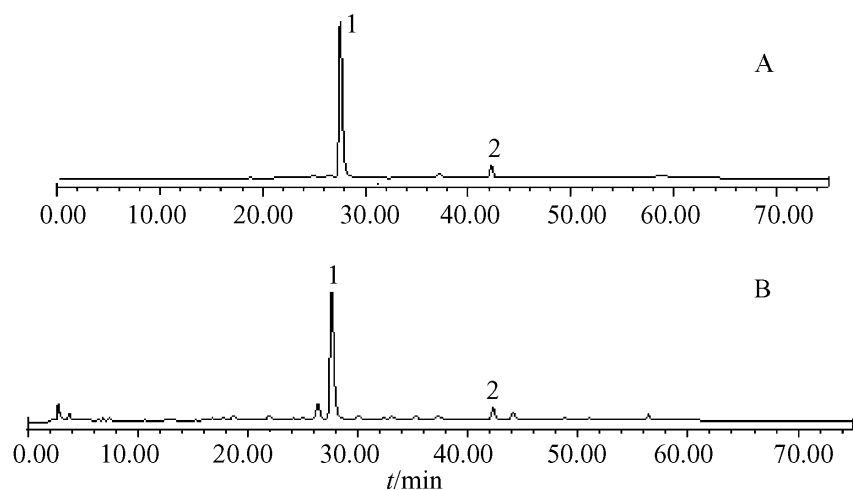


图 1 青翘含量测定 HPLC

A. 对照品; B. 样品; 1. 连翘酯苷; 2. 连翘苷

2.2 对照品溶液的制备 精密称取连翘苷对照品适量置 25 mL 量瓶中, 加甲醇制成 0.145 g·L⁻¹ 的对照品储备液, 再精密称取连翘酯苷对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加上上述储备液至刻度, 摇匀, 制成含连翘苷和连翘酯苷分别为 0.145 g·L⁻¹ 和 1.5 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 分别取不同青翘炮制品粉末(过 40 目筛) 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称重, 浸渍过夜, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 称重, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mL, 分别置 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得不同质量浓度的系列对照品溶液, 分别精密吸取上述对照品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 分别按照 2.1 项下方法测定各个峰面积值, 以进样量(μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得连翘酯苷回归方程为 $Y = 959\,631.703\,1X + 250\,467.648\,4$, $r = 0.999\,4$, 线性范围 1.5~15 μg; 连翘苷的回归方程为 $Y = 883\,203.205\,8X - 9\,047.738\,3$, $r = 0.999\,4$, 线性范围 0.145~1.45 μg。

2.5 精密度试验 分别精密吸取连翘酯苷(0.6 g·L⁻¹) 和连翘苷(0.058 g·L⁻¹) 混合对照品溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 测定其峰面积, 结果连翘酯苷和连翘苷的 RSD 分别为 1.17% 和 1.34% ($n = 6$), 说明该方法精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL, 按照 2.1 项下方法分别进样测定, 在 0, 3, 6, 9, 12 h 分别进样, 记录相应保留时间的峰面积, 结果连翘酯苷和连翘苷的 RSD 分别为 1.85% 和 1.45%, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一青翘药材(山西太原 8 月中旬) 6 份, 依照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 进样 10 μL, 依法测定, 计算样品中连翘酯苷平均质量分数 4.92%, 连翘苷平均质量分数 0.20%, RSD 分别为 2.13%, 2.63% ($n = 6$), 说明该方法重复性良好。

2.8 回收率试验 取已知含量的青翘药材(山西太原 8 月中旬) 粉末 0.25 g, 精密称取 6 份, 分别精密加入连翘酯苷对照品溶液(1.22 g·L⁻¹) 10 mL, 连翘苷对照品溶液(0.48 g·L⁻¹) 1 mL, 依照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 进样 10 μL 测定并计算回收率, 结果见表 1。

2.8 样品含量测定 取不同青翘炮制品 0.5 g, 精密称定, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.1 项下的色谱条件测定, 计算样品中连翘酯苷、连翘苷的含量, 结果见表 2, 3。

3 讨论

试验结果表明, 蒸制青翘中连翘酯苷和连翘苷的含量明显高于水煮的青翘, 蒸制中又以水蒸烘干含量最高, 所以青翘的炮制方法以水蒸烘干为好。在进一步蒸制时间的考察发现, 随着蒸制时间延长

表 1 连翘苷、连翘酯苷回收率测定结果 (n=6)

对照品	No.	取样量 /g	含有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
连翘酯苷	1	0.243 2	11.965 4	12.2	23.653 0	95.8	97.9	2.30
	2	0.246 9	12.147 5	12.2	24.018 1	97.3		
	3	0.239 8	11.798 2	12.2	23.428 0	95.3		
	4	0.254 1	12.501 7	12.2	24.628 5	99.4		
	5	0.247 3	12.167 2	12.2	24.147 6	98.2		
	6	0.255 6	12.575 5	12.2	24.934 1	101.3		
连翘苷	1	0.243 2	0.486 4	0.48	0.953 4	97.3	99.2	2.27
	2	0.246 9	0.493 8	0.48	0.965 2	98.2		
	3	0.239 8	0.479 6	0.48	0.943 8	96.7		
	4	0.254 1	0.508 2	0.48	0.994 9	101.4		
	5	0.247 3	0.494 6	0.48	0.970 8	99.2		
	6	0.255 6	0.511 2	0.48	1.002 2	102.3		

表 2 不同青翘炮制品中连翘酯苷及连翘苷含量测定结果

炮制方法*	连翘酯苷 /%	连翘苷 /%	炮制方法	连翘酯苷 /%	连翘苷 /%
汽蒸烘干	6.35	0.39	汽蒸晾晒	6.09	0.32
汽蒸烘干	6.26	0.36	汽蒸晾晒	6.13	0.30
水蒸烘干	7.35	0.51	水蒸晾晒	6.58	0.42
水蒸烘干	7.42	0.48	水蒸晾晒	6.31	0.37
水煮烘干	3.54	0.11	水煮晾晒	2.48	0.10
水煮烘干	3.79	0.14	水煮晾晒	2.16	0.08

* 1. 样品均为山西太原 7 月中旬采收, 炮制时间均为 30 min, 烘干温度均为 60 以下。

2. 水蒸即通常所说的蒸制。

3. 汽蒸指将流通蒸汽直接通入药材中进行炮制的方法。

青翘中连翘酯苷和连翘苷的含量逐渐降低, 说明蒸制的时间长短对其有效成分的含量变化有很大的影响。分析其原因可能是连翘酯苷和连翘苷分子中苷键和酯键随加热时间延长水解加剧造成, 试验结果显示青翘以蒸制 20 ~30 min 为宜。

本试验曾考察了以甲醇提取-中性氧化铝柱净化-70%乙醇洗脱、水超声提取-水饱和的正丁醇萃取、50%甲醇超声提取-滤过和甲醇超声提取-滤过等 4 种方法, 测定结果显示 50% 甲醇超声提取-滤过的方法连翘酯苷和连翘苷的含量最高, 因此选用了 50% 甲醇超声提取-滤过的方法制备供试品溶液。

试验还曾先后考察了文献资料^[3-7] 中的流动相条件, 试验发现等度洗脱分离效果不理想; 又考察了甲醇-3% 甲酸梯度洗脱和甲醇-水梯度洗脱的不同

表 3 不同蒸制时间青翘中连翘酯苷及连翘苷含量测定结果

产地和采收期	蒸制时间 /min	连翘酯苷含量 /%	连翘苷含量 /%
山西太原 七月中旬	20	7.53	0.54
	30	7.51	0.58
	40	7.18	0.49
	50	6.82	0.41
	60	6.38	0.35
	山西太原 八月中旬	20	4.94
30		4.91	0.22
40		4.53	0.17
50		4.24	0.14
60		3.95	0.10
山西长治 七月中旬		20	9.06
	30	9.68	0.83
	40	9.33	0.75
	50	8.38	0.72
	60	8.35	0.72
	山西安泽 七月中旬	20	9.29
30		9.42	0.65
40		8.14	0.64
50		8.39	0.77
60		7.69	0.71
山西左权 七月中旬		20	8.68
	30	8.92	0.85
	40	8.13	0.79
	50	8.10	0.78
	60	6.95	0.74

条件, 最后通过多次试验摸索, 确定了本试验中甲醇-水的梯度洗脱条件, 色谱峰分离效果好, 灵敏度高, 可为此类成分的测定提供一定参考。

(下转第 38 页)

本一致, 包合前后主成分含量基本无变化。

表 4 青皮挥发油包合前后主成分含量变化

No.	t_R /min	青皮油主成分	主成分含量/%	
			包合前	包合后
1	4.12	7-甲基-3-次甲基-1,6-辛二烯	3.02	2.94
2	4.76	<i>O</i> -伞花烃	16.06	10.86
3	4.86	1-甲基-4-(1-异丙烯基)-, (R)-环己烯	64.80	65.09
4	5.31	-松油烯	2.84	9.19
5	6.03	-芳樟醇	3.28	3.25
6	7.87	对-薄荷-1-烯-4-醇	2.77	2.36
7	8.18	对-薄荷-1-烯-8-醇	5.23	5.04
8	12.83	2,4-二异烯基-1-甲基-1-乙炔基-, (1S, 2R, 4R)-(-)-环己烷	2.00	1.28

4 小结与讨论

本文通过用正交设计法优选青皮挥发油 β -CD 包合工艺的最佳条件, 采用饱和水溶液-超声法, 结果说明, 影响包合效果的主要因素是油与 β -CD 的比例。油与 β -CD 比例为 1:8 (即 1 mL 青皮油: 8 g β -CD) 时包合效果最好, 油利用率达 72% 左右。其次乙醇浓度为 90%, 超声时间为 30 min, 水温 40 ~ 45 $^{\circ}\text{C}$, 工艺流程短, 适合工业化生产。

经气相色谱-质谱联用技术分析验证, 青皮挥发油包合前后成分组成一致, 主成分 [1-甲基-4-(1-异丙烯基)-, (R)-环己烯、*O*-伞花烃、对-薄荷-1-烯-8-醇、-芳樟醇] 含量基本一致, 包合前后主成分含量

基本无变化。证明包合物既能保持天然青皮挥发油的质量, 又能掩盖青皮挥发油的臭味, 减少刺激性, 增加其稳定性。

由于中药挥发油是由多种成分组成, 各单味中药挥发油的成分组成各不相同, 所用 β -CD 的比例不同, 包合效果也不一样。如青皮与细辛挥发油^[3] 其主要成分不同, 所用 β -CD 的比例为 1:8 (即 1 mL 青皮油: 8 g β -CD), 而细辛油与 β -CD 的比例为 1:4 (即 1 mL 细辛油: 4 g β -CD)。用最佳优选工艺中试 3 批, 油利用率青皮为 72%, 而细辛油为 79%, 说明青皮与细辛包合程度也不相同。

青皮油利用率为 72%, 损失了 28%, 这其中包含了挥发油含量测定方法本身损失了 8% (经青皮油回收率实验油利用率为 92%)。实际青皮油利用率要比 72% 高。

[参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上册. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1666.
- [2] 颜正华. 中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 397.
- [3] 李树珍, 赵红霞, 白卫国. 正交设计法优选细辛挥发油-环糊精包合工艺的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(2): 63, 69.

[责任编辑 顾雪竹]

(上接第 35 页)

[参考文献]

- [1] 中华本草编辑委员会. 中华本草[M]. Vol 16. 上海: 上海科技出版社, 1999: 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, 2000, 23(10): 657.
- [3] 张杲, 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.
- [4] 侯莉, 王强, 任晋斌. RP-HPLC 法测定不同来源连翘药

材中连翘苷的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(1): 48.

- [5] 王栋, 周媛媛. 青连翘药材的质量标准研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2004, 20(6): 642.
- [6] 徐秀珍, 栗晓黎. 高效液相色谱法测定连翘中连翘苷的含量[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(3): 203.
- [7] 周改莲, 辛宁, 张守平. 连翘不同部位及不同炮制方法的活性成分比较[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(增刊): 30.

[责任编辑 仝燕]