

## 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

孙艳涛, 王 冰, 李 莉

(辽宁中医药大学药学院 辽宁 大连 116600)

**摘要:**目的 采用梯度洗脱法测定不同配比金银花、连翘药对中绿原酸和连翘脂素。方法 采用 Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 200 mm 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.4% 磷酸水溶液为流动相, 体积流量 1.0 mL/min, 进行梯度洗脱, 检测波长 330 nm。

**结果** 不同配比金银花连翘中两种成分的量差异明显。**结论** 金银花连翘的配比对于其中的有效成分量有显著影响。

**关键词:**梯度洗脱; 金银花; 连翘; 药对; 绿原酸; 连翘脂素

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)05-0821-03

## Determination of chlorogenic acid and forsythiaside in different combination of *Lonicerae japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* by gradient elution

SUN Yan-tao, WANG Bing, LI Li

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

**ABSTRACT:** **AIM** To determine chlorogenic acid and forsythiaside in different combination of *Lonicerae japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* by gradient elution. **METHODS** The Diamonsil column was used. The acetonitrile-0.4% phosphoric acid was used as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 330 nm, gradient elution. **RESULTS** The contents of active ingredients in *Lonicerae japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* with different combination were different. **CONCLUSION** The different combinations of *Lonicerae japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* can affect the contents of the active ingredients.

**KEY WORDS:** gradient elution; *Lonicerae japonicae Flos*; *Forsythiae Fructus*; different combination; chlorogenic acid; forsythiaside

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.、红腺忍冬 *L. hypoglauca* Miq.、山银花 *L. confusa* DC. 或毛花柱忍冬 *L. dasystyla* Rehd. 的干燥花蕾或带初开的花, 具有清热解毒、疏散风热的作用, 主要有效成分为木犀草素和绿原酸<sup>[1]</sup>。连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 具有清热解毒、消肿散结、疏散风热的作用, 含有连翘苷、连翘脂素等有效成分<sup>[2]</sup>。中药药对是符合中医理论和组合法度并通过临床应用被证明有实效的相对固定的二味或三味药的配伍形式<sup>[3]</sup>。金银花、连翘配伍使用历史非常悠久, 既可用于外感温热, 能解表, 又能用于泄里热而解毒, 二者配伍用最早出自清代吴鞠通《温病条辨》银翘散<sup>[4]</sup>。当前对金银花、连翘药对的研究主要集中于定量测定和药效学等方面。如林丽美等人<sup>[5]</sup>采用

RP-HPLC 梯度洗脱法对金银花和连翘单煎、单煎后合并及混煎后绿原酸和连翘脂苷 A 进行了测定, 林丽美等<sup>[6]</sup>采用对比法考察了 4 个不同配比金银花连翘药对的抗炎、解热作用, 邢学锋等<sup>[7]</sup>采用 GC-MS 对金银花、连翘和金银花连翘药对的挥发油成分进行了分析。本试验通过 HPLC 法对 7 种不同配比金银花连翘药对的乙醇提取物中绿原酸<sup>[8]</sup>和连翘脂素<sup>[9]</sup>进行测定, 比较不同配比银翘药对指标成分的差异, 为进一步的体内试验做准备。

### 1 仪器与试剂

1.1 仪器 U-3010 型分光光度计; Agilent 1100 高效液相色谱仪 配备四元梯度泵、VWD 检测器、连接在线脱气机; METTLER AB135-S 十万分之一电子天平 (瑞士)。

1.2 试剂 金银花、连翘 (购于大连开发区保健大

收稿日期: 2010-12-06

作者简介: 孙艳涛 (1977—), 男, 博士, 主要从事中药分析研究。Tel: 13478409936, E-mail: sunyt\_ky@163.com

药房)经药学院鉴定教研室王荣祥老师鉴定为正品药材。绿原酸(购于中国药品生物制品检定所,批号:110753-200212);连翘脂素(购于成都思科华生物技术有限公司,批号:487-39-8);乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱纯);水为重蒸馏水;其它试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 200 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.4%磷酸溶液(B);柱温35℃;体积流量1.0 mL/min;梯度洗脱见表1 检测波长330 nm。

表1 流动相洗脱程序  
Tab. 1 Gradient elution

| 时间/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|--------|---------|---------|
| 0 ~ 15 | 20      | 80      |
| 15 ~   | 40      | 60      |

2.2 对照品贮备液的制备 分别精密称取绿原酸和连翘脂素对照品适量,加甲醇溶解并稀释成分别含1.25 mg/mL、1.46 mg/mL的溶液,摇匀,备用。

2.3 供试品溶液的制备 取金银花、连翘药对约5 g精密称定。加入100 mL 60%乙醇回流<sup>[10]</sup> 1.5 h后浓缩至50 mL,摇匀;精密吸取5 mL至10 mL量瓶并用60%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线的制备 精密吸取绿原酸贮备液1 mL,连翘脂素贮备液0.5 mL,置于同一5 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,取续滤液作为混合对照品溶液。再分别精密吸取混合对照品溶液2、3、6、10、15、20 μL注入液相色谱仪测定,以进样量(μg)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),以线性回归法绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表2。

表2 线性关系结果  
Tab. 2 Regression data and linear ranges

| 对照品  | 回归方程                                      | 线性范围/μg      |
|------|-------------------------------------------|--------------|
| 绿原酸  | $Y = 14\ 837X + 994.08$ $r = 0.999\ 7$    | 0.5 ~ 5      |
| 连翘脂素 | $Y = 5\ 506.6X + 1\ 266.3$ $r = 0.999\ 6$ | 0.292 ~ 2.92 |

2.4.2 精密度实验 取1:1配比金银花连翘药对样品,按2.3项下方法制备,连续进样6次,每次进样10 μL,记录各色谱峰的峰面积,计算绿原酸、连翘脂素峰面积的RSD分别为1.3%、1.5%。结果显示,仪器精密度较好。

2.4.3 稳定性实验 取1:1配比金银花连翘药对

样品,按2.3项下方法制备,在0、2、4、8、12 h分别进样,每次进样10 μL,记录色谱峰的峰面积,结果显示绿原酸、连翘脂素峰面积的RSD分别为2.1%、2.3%。结果表明,供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.4.4 重复性实验 取1:1配比金银花连翘药对样品6份,按2.3项下方法制备,进样分析,每次10 μL,记录两种指标成分的色谱峰的峰面积,结果显示绿原酸、连翘脂素含量的RSD分别为1.7%、1.4%。结果表明,本方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率实验 取已知绿原酸(3.302 mg/g)、连翘脂素(1.154 mg/g)量的药对6份,每份约5 g,分别精密加入绿原酸和连翘脂素对照品贮备液适量,按2.3项下方法制备样品溶液并进样分析,结果见表3,绿原酸的平均回收率为99.41%,RSD为1.7%;连翘脂素的平均回收率为99.66%,RSD为1.2%,表明本方法回收率较高。

表3 加样回收率实验结果  
Tab. 3 Results of recovery test

| 样品   | 称质量/g   | 加入量/mg | 测得量/mg   | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|------|---------|--------|----------|-------|---------|-------|
| 绿原酸  | 5.120 4 | 12.5   | 28.957 8 | 96.40 | 99.41   | 1.7   |
|      | 4.985 2 | 12.5   | 29.014 7 | 100.4 |         |       |
|      | 5.238 1 | 12.5   | 29.884 5 | 100.7 |         |       |
|      | 5.187 4 | 12.5   | 29.524 5 | 99.17 |         |       |
|      | 4.885 2 | 12.5   | 29.784 5 | 102.0 |         |       |
| 连翘脂素 | 5.047 8 | 12.5   | 28.884 7 | 97.73 | 99.66   | 1.2   |
|      | 5.120 4 | 5.84   | 11.675 4 | 98.74 |         |       |
|      | 4.985 2 | 5.84   | 11.657 4 | 101.1 |         |       |
|      | 5.238 1 | 5.84   | 11.985 7 | 101.7 |         |       |
|      | 5.187 4 | 5.84   | 11.768 2 | 99.00 |         |       |
|      | 4.885 2 | 5.84   | 11.436 5 | 99.30 |         |       |
|      | 5.047 8 | 5.84   | 11.554 7 | 98.11 |         |       |

2.5 样品测定 分别取不同配比的金银花连翘药对5 g,精密称定,按2.3项下方法制备,精密吸取10 μL注入高效液相色谱仪,按2.1项下色谱条件测定各配比药对中绿原酸、连翘脂素的量,专属性结果见图1。结果见表4。

## 3 小结与讨论

3.1 根据《中国药典》并结合各种含金银花、连翘的用量及配伍关系,确定7个配伍关系,并对不同配伍的药对中绿原酸和连翘脂素的量进行测定。

3.2 本试验在预试验中发现在金银花和连翘中的大部分指标性成分都具有水溶性差的特点,但金银花和银翘药对中量较高的特征有效成分——绿原酸的极性又非常大,故选用梯度洗脱才能对银翘药对

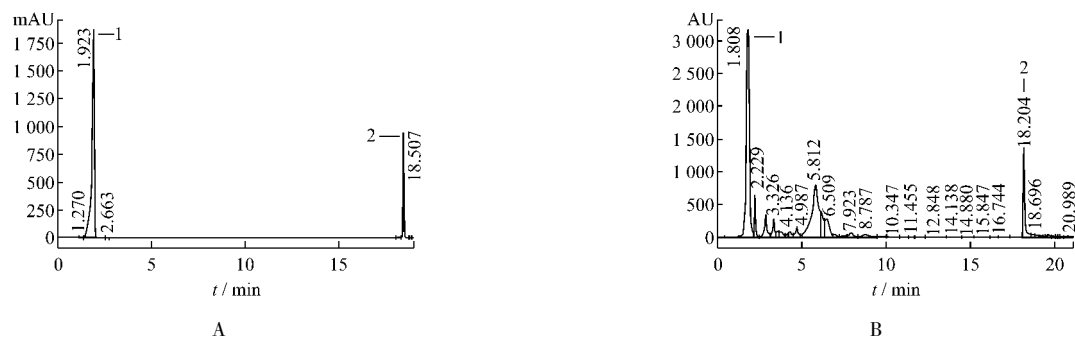


图 1 对照品(A)、样品(B)的 HPLC 图谱

1. 绿原酸 2. 连翘脂素

Fig. 1 HPLC chromatograms of standards(A)、sample(B)

1. chlorogenic acid 2. forsythiaside

表 4 样品测定结果 ( $n=3$ )

Tab. 4 Determination results of samples ( $n=3$ )

| 编号 | 银翘<br>配比 | 绿原酸<br>/(mg/g) | RSD<br>/% | 连翘脂素<br>/(mg/g) | RSD<br>/% |
|----|----------|----------------|-----------|-----------------|-----------|
| 1  | 1:1      | 3.302          | 1.5       | 1.154           | 1.4       |
| 2  | 1:2      | 2.329          | 0.8       | 1.630           | 0.9       |
| 3  | 2:1      | 3.721          | 1.6       | 0.850 3         | 1.5       |
| 4  | 2:3      | 2.567          | 1.3       | 1.278           | 1.3       |
| 5  | 2:5      | 1.919          | 0.9       | 1.664           | 1.0       |
| 6  | 3:2      | 3.810          | 1.8       | 1.216           | 1.7       |
| 7  | 5:2      | 3.893          | 1.8       | 0.725 9         | 1.4       |

的有效成分进行准确测定。通过预试验将检测波长确定为 330 nm。

3.3 经预试验发现经过本试验方法对药对有效成分进行提取后,原金银花中有效成分木犀草素和连翘中有效成分连翘苷经 HPLC 检测均不显著,可能是配制成药对后在提取过程中两种有效成分发生了化学变化,应对其进行深入研究,故本试验未将其作为指标成分加以检测。

3.4 通过对比定量测定结果发现,对于两种有效成分绿原酸和连翘脂素的量均与药对中相应的药材量的增加有增加的趋势。但细致比较可以发现作为金银花中的有效成分绿原酸和作为连翘中有效成分的连翘脂素量的变化与不同配比药对中相应成分金银花以及连翘无显著的比例关系,当每种成分对另一种成分的配比达到 2:1 以上时,其量均无显著增加,这应与药对之间的相互作用有关。药对配比为

1:1 时,两种指标性成分量都比较高,这与各种古方中金银花、连翘比例为 1:1 可能会存在一定的关系,应该进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 高学敏,王永炎,颜正华. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社 2002.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2005 年版一部[S]. 北京:化学工业出版社 2005:117-118.
- [3] 戚其平,杨艳伟,姚孝元,等. 中国城市儿童血铅水平调查[J]. 中华流行病学杂志 2002 23(3):162-166.
- [4] 王天志,李永梅. 金银花的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2000, 15(4):292.
- [5] 林丽美,王智民,王维皓,等. RP-HPLC 对金银花和连翘单煎、单煎后合并及混煎的分析[J]. 中国中药杂志 2007 32(21):2240-2243.
- [6] 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):473-475.
- [7] 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):358-360.
- [8] 唐戈莉,尚树川,胡婉莹. 微量热法研究金银花中绿原酸的抑菌性能[J]. 山东师范大学学报 2008 23(1):84-86.
- [9] 冯淑怡,李先荣,孙建宁. 连翘酯苷抗感染、解热作用研究[J]. 现代生物医学进展 2006 6(10):73-75.
- [10] 李永库,欧小辉,王 芬. 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用法测定金银花中绿原酸和咖啡酸[J]. 分析实验室 2008, 27(7):94-97.