

高效液相色谱法测定连翘中连翘苷、芦丁和槲皮素的含量

杨立功¹, 郑晓珂², 张艳丽¹, 朱波¹, 冯卫生^{1*} (1. 河南中医学院药学院, 郑州 450008; 2. 河南中医学院基础医学院, 郑州 450008)

摘要:目的 建立 HPLC 同时测定连翘中连翘苷、芦丁和槲皮素的含量。方法 采用 ZORBAX SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以甲醇-0.2% 磷酸水溶液为流动相 梯度洗脱 (0~40 min 40%~50% 甲醇); 连翘苷检测波长为 280 nm, 芦丁和槲皮素检测波长为 370 nm; 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 柱温为 25 °C。结果 3 个成分均达到良好分离, 连翘苷、芦丁和槲皮素平均加样回收率分别为 98.2%、99.7%、100.9%。结论 本检测方法简便、准确性和重现性良好, 可以作为同时测定连翘中连翘苷、芦丁和槲皮素含量的方法。

关键词:连翘; 连翘苷; 芦丁; 槲皮素; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)22-1756-03

Determination of Forsythin, Rutin and Quercetin in *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl by HPLC

YANG Li-gong¹, ZHENG Xiao-ke², ZHANG Yan-li¹, ZHU Bo¹, FENG Wei-sheng^{1*} (1. School of Pharmacy, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Basic Medicine College, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a HPLC method for the determination of forsythin, rutin and quercetin in *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl. **METHODS** These three constituents were determined by HPLC on ZORBAX SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with the mixture of CH₃OH-0.2% H₃PO₄ as the mobile phase. Forsythin was detected at 280 nm, and rutin and quercetin were detected at 370 nm. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the column temperature was 25 °C. **RESULTS** The recoveries were 98.2% with RSD of 2.8% for forsythin, 99.7% with RSD of 3.2% for rutin, and 100.9% with RSD of 2.7% for quercetin. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reproducible. The established method can be used for the determination of forsythin, rutin and quercetin in *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl.

KEY WORDS: *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl; forsythin; rutin; quercetin; HPLC

连翘为木犀科连翘属植物连翘的果实, 主要分布于我国的山西、河南、陕西、山东等地。性微寒、味苦。有清热解毒、散结消肿之效; 用于治疗温热、丹毒、斑疹、痈疡肿毒、瘰疬、小便淋闭、清心火。现代药理研究认为, 连翘抗菌、抗炎、解热、镇吐、利尿强心、抗肝损、镇痛、抑制 cAMP 磷酸二酯酶、抗内毒素等作用^[1]。连翘中化学成分主要为木脂素类、黄酮类、苯乙醇苷类、C₆-C₂ 天然醇类等^[2-3]。中药中化学成分复杂, 发挥治病作用的有效成分较多, 检测单一成分对药材的质量控制、评价不够充分, 因此选用高效液相色谱法对连翘主要成分中的连翘苷、芦丁和槲皮素同时进行含量测定。

1 实验材料

Waters-e2695 高效液相色谱仪 (Waters 公司),

Waters-2998 二极管阵列检测器 (Waters 公司), AB135-S 十万分之一分析天平 (METTLER TOLEDO 公司), SK6002H 超声波清洗仪 (上海科导超声仪器有限公司), arium611VF 超纯水仪 (Sartorius 公司)。

连翘苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110821-200711), 芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 100080-200707), 槲皮素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 100081-200907), 甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 连翘药材 (河南禹州中药材市场, 经河南中医学院董诚明教授鉴定为连翘药材)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5

基金项目: 教育部科学技术研究重点资助项目 (DF2003078)

作者简介: 杨立功, 男, 硕士, 研究方向: 中草药活性成分研究及新药开发 * 通讯作者: 冯卫生, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中草药活性成分研究及新药开发 Tel/Fax: (0371) 65680011 E-mail: fwsh@hactcm.edu.cn

μm); 流动相 A 为 0.2% 磷酸水溶液, B 为甲醇, 梯度洗脱, 洗脱程序: 0 ~ 40 min 40% B ~ 50% B; 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为 25°C ; 进样量为 $10 \mu\text{L}$; 连翘苷检测波长为 280 nm , 芦丁和槲皮素检测波长为 370 nm 。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取连翘苷对照品 4.00 mg , 芦丁对照品 1.82 mg , 槲皮素对照品 2.12 mg , 分别置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 得到连翘苷对照品溶液、芦丁对照品溶液, 分别为 0.0800 、 $0.0364 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取所得槲皮素溶液 5 mL 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 得到槲皮素对照品溶液, 为 $0.00424 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 供试品溶液的制备

将不同产地的连翘分别粉碎, 过 40 目筛, 置于真空干燥箱中 45°C 真空干燥 4 h, 得连翘药材粗粉, 取约 1 g 连翘药材粗粉, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理 (功率 280 W , 频率 50 kHz) 40 min , 冷却至室温后加甲醇至刻度, 摇匀, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 系统适用性实验

取供试品溶液, 在“2.1”项下色谱条件进样分析, 理论塔板数按芦丁计算不低于 4 500, 按连翘苷计算不低于 10 000, 按槲皮素计算不低于 19 000, 3 种成分与相邻峰之间的分离度均大于 1.5。色谱图见图 2。

2.5 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下所得连翘对照品溶液 1.0 、 5.0 、 10.0 、 15.0 、 $20.0 \mu\text{L}$, 芦丁对照品溶液 1.0 、 5.0 、 10.0 、 15.0 、 $20.0 \mu\text{L}$, 槲皮素对照品溶液 0.5 、 1.0 、

5.0 、 10.0 、 15.0 、 $20.0 \mu\text{L}$, 分别按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。以测得的峰面积为纵坐标, 以对照品质量为横坐标, 绘制标准曲线, 得到连翘苷回归方程: $Y = 657538\rho - 20894$, $r = 0.9999$, 线性范围为 $0.0800 \sim 1.600 \mu\text{g}$; 芦丁回归方程: $Y = 1260770\rho - 18015$, $r = 1.0000$, 线性范围为 $0.0364 \sim 0.748 \mu\text{g}$; 槲皮素回归方程为 $Y = 3833516\rho - 5218$, $r = 0.9999$, 线性范围为 $0.00212 \sim 0.0848 \mu\text{g}$ 。

2.6 精密度实验

分别取连翘苷对照品溶液、芦丁对照品溶液以及槲皮素对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 每个对照品进样 5 次, 计算峰面积相对标准偏差, RSD 值分别为 1.2%、0.5%、0.5%。

2.7 稳定性实验

取同一药材样品按“2.3”项下方法制备一份供试品溶液, 分别在制备后 1、6、11、16、21、24 h, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 分别记录峰面积, 计算相对标准偏差, 结果连翘苷、芦丁、槲皮素峰面积 RSD 值分别为 1.7%、1.0%、4.1%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性实验

取同一药材样品, 按“2.3”项下方法制备 5 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 并计算连翘苷的含量 RSD 为 4.2%, 芦丁的含量 RSD 值为 2.9%, 槲皮素的含量 RSD 为 3.3%。

2.9 回收率实验

取同一连翘药材约 0.5 g , 精密称定, 加连翘苷对照品溶液、芦丁对照品溶液、槲皮素对照品溶液适量, 按“2.3”项下方法制备 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 每个样品进样 3 次, 计算回收率, 取平均值, 连翘苷平均加样回收率为 98.2%, RSD 为

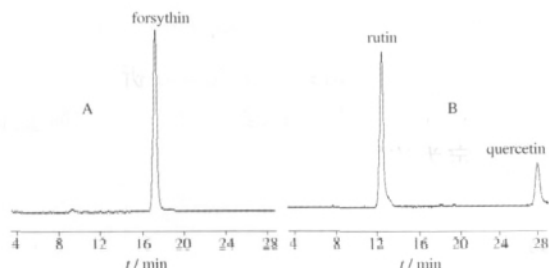


图1 连翘苷对照品 HPLC 色谱图 (A)、芦丁对照品和槲皮素对照品 HPLC 色谱图 (B)

Fig.1 HPLC Chromatograms of forsythoside (A), rutin and quercetin (B)

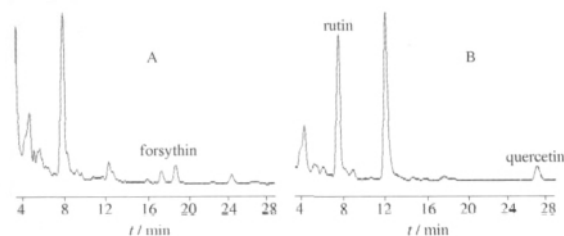


图2 连翘供试品 HPLC 280 nm 通道色谱图 (A)、连翘供试品 HPLC 370 nm (B) 通道色谱图

Fig.2 HPLC Chromatograms of *Forsythia suspense* determined at 280 nm (A), and *Forsythia suspense* determined at 370 nm (B)

2.8%; 芦丁平均加样回收率为 99.7%, RSD 为 3.2%; 槲皮素平均加样回收率为 100.9%, RSD 为 2.7%。

2.10 样品测定

分别取河南 6 个产地的青翘和老翘样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, “2.1”项下色谱条件进样分析, 每个样品平行测定 3 次, 取平均值, 得结果见表 1 2。

3 讨论

3.1 提取方法的选择

经查阅文献^[4-6] 本实验采用快速、简便、可行的超声提取方法, 易于实际工作中的含量测定; 连翘药材常用提取溶剂有甲醇、75% 乙醇、95% 乙醇, 经实验考察 75% 乙醇、95% 乙醇对本实验中 3 种待测化合物的总体提取率较低, 且若所得滤液直接进样所得图谱峰形较差, 因此选用提取方法为甲醇超声提取 40 min。

表 1 河南 6 产地青翘中连翘苷、芦丁、槲皮素的含量测定结果. $n = 3 \bar{x} \pm s, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

Tab.1 Determination results of green Fructus Forsythiae from 6 different production places in Henan. $n = 3 \bar{x} \pm s, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

Samples	Forsythoside	Rutin	Quercetin
Jiaozuo	1.656 ± 0.125	1.432 ± 0.112	0.034 2 ± 0.009
Sanmenxia	1.476 ± 0.106	1.138 ± 0.108	0.023 3 ± 0.008
Xixia	0.924 ± 0.095	1.041 ± 0.107	0.047 4 ± 0.008
Luoyang	2.357 ± 0.201	1.273 ± 0.134	0.033 0 ± 0.005
Nanzhao	0.480 ± 0.025	0.745 ± 0.051	0.019 5 ± 0.007
Gongyi	0.709 ± 0.048	0.830 ± 0.058	0.021 2 ± 0.003

表 2 河南 6 产地老翘中连翘苷、芦丁、槲皮素的含量测定结果. $n = 3 \bar{x} \pm s, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

Tab.2 Determination results of grown Fructus Forsythiae from 6 different production places in Henan. $n = 3 \bar{x} \pm s, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

Samples	Forsythoside	Rutin	Quercetin
Jiaozuo	0.320 ± 0.025	0.438 ± 0.025	0.016 9 ± 0.002
Sanmenxia	0.837 ± 0.091	1.140 ± 0.102	0.048 7 ± 0.004
Xixia	0.479 ± 0.032	0.620 ± 0.035	0.019 3 ± 0.001
Luoyang	0.613 ± 0.051	0.705 ± 0.043	0.022 9 ± 0.002
Nanzhao	0.448 ± 0.041	0.747 ± 0.026	0.021 0 ± 0.003
Gongyi	0.219 ± 0.038	0.669 ± 0.053	0.017 2 ± 0.001

3.2 色谱条件考察

本实验比较了乙腈-水和甲醇-水系统, 经实验发现在本仪器条件下乙腈-水系统中芦丁、槲皮素出峰时间差别较大, 不易于同时测定, 因此选用甲醇-水系统, 并用 0.2% 磷酸水溶液以改善芦丁、槲皮素峰形。

3.3 其他

连翘中有效成分的含量测定已有较多报道^[7-9], 认为连翘中连翘苷和芦丁的含量受采收时间影响较大, 青翘中的连翘苷和芦丁的含量高于老翘, 本实验建立了利用高效液相色谱法同时对连翘中的连翘苷、芦丁和槲皮素进行含量测定, 实验结果显示, 青翘中的连翘苷和芦丁含量均高于老翘, 与文献报道一致, 并对青翘和老翘中的槲皮素比较, 结果显示, 连翘中槲皮素的含量高于老翘。

REFERENCES

[1] LIU M. The research situation on pharmacological action of fructus forsythiae[J]. *Mod Med Health* (现代医药卫生), 2007, 23 (16): 2438-2439.

[2] LI Q, FENG W S. Recent development of chemical components of studies Fructus Forsythiae[J]. *J Henan Univ Chin Med* (河南中医学院学报), 2005, 20(2): 78-80.

[3] FENG W S, LI K K, ZHENG X K. Studies on chemical constituents in *Forsythia suspense* (Thumb.) Vahl[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2009, 44(7): 490-492.

[4] CHEN S Q, FENG W S, DONG C M, et al. Quality evaluation on fructus forsythiae of different place in henan province[J]. *Drug Evaluation* (药品评价), 2005, 2(3): 198-200.

[5] LI Y L, GAO M H. Determination of phillyrin and forsythoside A in *Forsythia suspense* from different localities by HPLC[J]. *China Meical Engineering* (中国医学工程), 2010, 18(2): 46-48.

[6] SUN J J, GE H, HOU T T, et al. Determination of rutin and quercetin in anti-hypertension herbal plants by RP-HPLC simultaneously[J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2009, 1(1): 11-15.

[7] PEI X P, ZHANG S P, YAN Y, et al. Determination of phillyrin, forsythoside and rutin in Fructus Forsythiae gathered in different periods[J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2011, 25(5): 438-440.

[8] ZHANG G, LI F R, DUAN F, et al. Determination of phillyrin, forsythoside and rutin in Folium Forsythiae gathered in different periods[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17(6): 790-793.

[9] WU Y F, WANG X S, SHANG X J. Determination of phillyrin in green and grown *Fructus Forsythiae* from Funiushan[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19(4): 855-856.

(收稿日期: 2011-06-11)