

连翘有效成分的 HPLC 法测定

崔燕岩 冯少勇* 赵光** 王慕邹

(中国医学科学院药物研究所,北京100050)

摘要 报道了反相 HPLC 梯度洗脱法对连翘中的咖啡酸、连翘酯甙、芦丁、连翘甙及连翘脂素五种有效成分的测定。优化了连翘酯甙的分离提取方法。确定了生药经甲醇冷浸后超声提取的方法,并用所建立的提取分析法比较了不同产地连翘壳及用作珠茶的连翘叶中有效成分的含量。

关键词 连翘;连翘酯甙;高效液相色谱法

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb) Vahl 为木犀科连翘属落叶灌木,其果实去心后的连翘壳为入药部分,具有清热解毒散结消肿功能^(1,2),为传统常用中药。

由于连翘中成分复杂,有效成分理化性质相差较大,目前仅有检测单一成分的薄层色谱测定法^(3~7)。本文采用反相 HPLC 梯度洗脱法,同时分离测定了连翘中有紫外吸收的咖啡酸、连翘酯甙、连翘甙、连翘脂素及芦丁等五种有效成分。确定了冷浸后超声提取的方法,并用所建立的方法分析了不同产地的连翘壳及用作珠茶的连翘叶,以期对连翘的资源利用提供科学依据。

实验部分

仪器及试剂

仪器 Waters 510 高效液相色谱仪(美国), Rheodyne 7125 进样阀(美国),岛津 R-112 记录仪,岛津 SPD-1 可调紫外可见检测器(日本), Waters 810 色谱工作站(美国), HP 1090M 高效液相色谱仪带二极管阵列检测器(美国), H66025T 超声清洗机(无锡超声电子设备厂), EYELA 旋转薄膜蒸发仪(日本 Tokyo Rikakikai Co. Ltd.)

试剂 层析用聚酰胺片(浙江黄岩化学实验厂);柱层析用聚酰胺粉(中国人民解放军 83305 部队 701 厂)研磨后过 140 目筛;Sephadex G-10 葡聚糖凝胶(40~120 μm) (Pharmacia 进口分装);四氢呋喃,加适量氢化锂铝回流 2 h 后蒸馏,收集 65~66℃ 馏分。甲醇、磷酸及磷酸盐均为分析纯。

连翘壳由本所植物室提供。芦丁、连翘甙、连翘脂素、咖啡酸对照品、连翘酯甙粗品及制成珠茶的连翘叶由中国药品生物制品检定所梁文藻教授提供。

连翘酯甙对照品的制备

本文于 1991 年 10 月 21 日收到。

* 山东省计划生育科研究所; ** 首都医学院

按文献⁽⁶⁾法,连翘叶的甲醇提取液,加水离心后,上清液经氯仿萃取,醋酸铅沉淀,稀硫酸脱铅及碳酸钙调节 pH 之后,用适量水饱和正丁醇提取三次。合并提取液,减压蒸除溶剂,加少量甲醇溶解连翘酯甙粗品,加到聚酰胺柱(5×40 cm)上。加压 0.5 ± 0.1 kg,乙醇-水作流动相,乙醇从30%逐渐增至60%进行梯度洗脱。并用聚酰胺片薄层层析,以乙醇-水(1:1)展开,检测流出液中的组分。连翘酯甙在紫外灯下显强荧光。收集含连翘酯甙的部分,用旋转薄膜蒸发仪减压浓缩至适量体积后,加到 Sephadex G-10 葡聚糖凝胶柱上,甲醇洗脱。收集含连翘酯甙的部分,减压蒸除甲醇,得连翘酯甙纯品。mp:127~130℃。紫外光谱 $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm(log ϵ):290(3.71),332(3.81)。

色谱条件

分析条件的选择

使用250×4.6 mm 不锈钢柱,固定相为7 μm Nucleosil C₁₈(自装,塔板数为 $3 \times 10^4/\text{m}$),甲醇(含1%四氢呋喃)-水(含0.01 mol/L 磷酸二氢钾,pH 为3.2)为流动相进行梯度洗脱。经实验,控制温度在 $22 \pm 1^\circ\text{C}$,流速1 ml/min 时,按表1中的梯度条件,可使生药中各所测组分得到充分的分离且峰形亦较好。如图1。

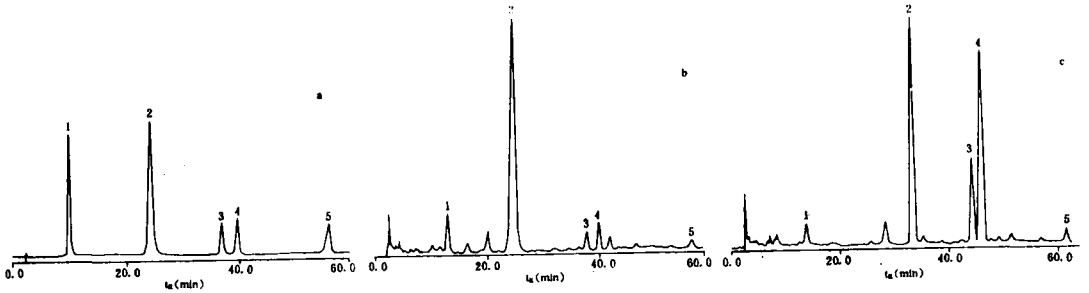


Fig 1 HPLC separation of *Forsythia suspensa*. a. Standards; b. Shell extract; c. Leaf extract.

1. Caffeic acid; 2. Forsythoside A; 3. Rutin; 4. Forsythiin; 5. Forsythigenin.

Tab 1 The mobile phase gradient of HPLC analysis

Time (min)	MeOH(1% tetrahydrofuran) (%)	H ₂ O(0.01mol/L KH ₂ PO ₄ , pH 3.2) (%)
0	32	68
20	34	66
30	40	60
40	45	55
45	50	50
55	55	45
65	60	40

采用 HP1090M 高效液相色谱仪带二极管阵列检测器,固定相及流动相条件同上,测定各相应峰的纯度。比较紫外光谱图与相应对照品咖啡酸、连翘酯甙、芦丁、连翘甙及连翘脂素的图谱一致。据此,采用灵敏度更高的 SPD-1 紫外-可见检测器,以280 nm 为检测波长进行监测分析。

线性考察

精密称取各对照品置量瓶中,以甲醇溶解并稀释至刻度,配制成对照溶液。其中含咖啡酸、芦丁、连翘甙及连翘脂素各1.0 mg/ml,连翘脂甙5.0 mg/ml。

按上述分析条件,依次进样0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 μ l,所得各组分色谱峰的面积与进样量呈良好的线性关系。结果如表2。

Tab 2 Standard calibrations for active ingredients of *Forsythia suspensa*

Compound	Retention time (min)	Regression equation	Correlation coefficient
Caffeic acid	12.8	$Y = 135.2 + 3.959 \times 10^{-3} X$	0.9999
Forsythoside A	24.6	$Y = 616.0 + 1.797 \times 10^{-2} X$	0.9999
Rutin	37.6	$Y = 116.1 + 1.546 \times 10^{-2} X$	0.9999
Forsythinn	39.9	$Y = 125.1 + 2.035 \times 10^{-2} X$	0.9999
Forsythigenin	56.7	$Y = 53.48 + 1.305 \times 10^{-2} X$	0.9997

$$Y = \text{Concentration (mg/ml)} \times \text{Inj. vol (ml)}, X = \text{peak area.}$$

定量分析

提取

超声冷浸提取 取同一批连翘壳(市售)样品,研磨成粉末,过40目筛,精密称定12份,每份约1.0 g。各加入甲醇10.0 ml,振摇,冷浸过夜。分别超声振荡提取(弱档,0.5A)10,15,20,25 min。过滤,取4.0 ml 滤液,加水1.0 ml 振摇后,4000 \times g 离心10 min,过滤,制备成A,B,C,D 4组样品。

热回流提取 取2份连翘壳粉,每份7 g,精密称定,置 Soxhlet 提取器中,加入甲醇70 ml,回流提取4 h。取4.0 ml 提取液,加水1.0 ml,振摇后4000 \times g 离心5 min,过滤,制备成样品 H 组。按上述 HPLC 法进行分析,测定结果如图2。

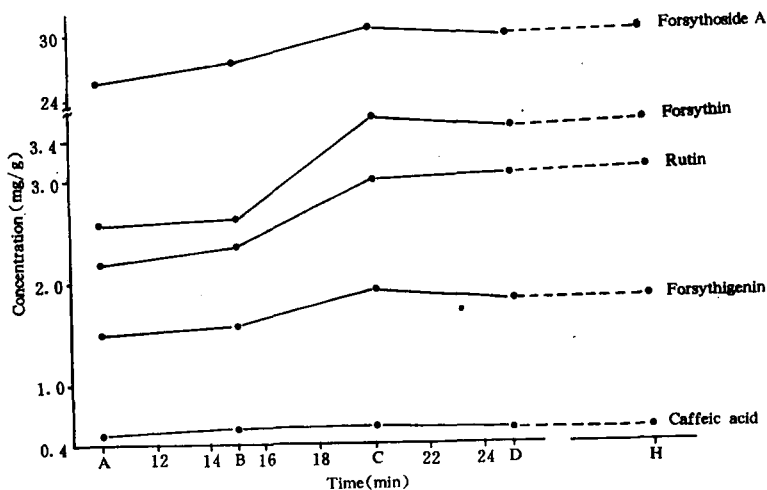


Fig 2 Comparison of the extraction test. A, B, C, D; Supersonic vibration extraction; H; Heat reflux extraction (4 h).

结果表明样品以甲醇为溶媒,冷浸后超声振荡20 min,与热回流提取4 h 结果相近,说明已提取完全。

回收率测定

对已知含量的连翘壳样品,研成粉末,过40目筛,精密称取9份,每份0.5 g.分别加入一定量的各种对照品,测定含量,计算回收率,结果如表3。

Tab 3 Recovery test (n=3)

Compound	Added (%)	Found (mg)	Recovery (%)	Average recovery (%)
Caffeic	0.452	0.418	98.3	98.3
	0.340	0.328	96.6	
	0.226	0.226	100.1	
Forsythoside A	5.71	5.664	99.2	100.0
	4.29	4.320	100.7	
	2.86	2.823	98.7	
Rutin	0.997	0.969	97.2	98.9
	0.748	0.729	97.4	
	0.498	0.509	102.2	
Forsythin	1.13	1.157	102.4	99.4
	0.845	0.839	99.3	
	0.563	0.543	96.4	
Forsythigenin	0.771	0.761	98.7	99.8
	0.578	0.585	101.2	
	0.386	0.384	99.6	

精密度实验

取同一批大同产连翘壳研成粉末,过40目筛,精密称取6份,每份约1.0 g,各加甲醇10.0 ml 振摇,冷浸过夜后,超声提取20 min.按上述方法处理后,进行 HPLC 分析,结果表明五种所测成分的 RSD% 值均小于3.0%。

样品分析

精密称取连翘壳粉末(40目筛)5份,每份约1.0 g.各加甲醇10.0 ml,按上法提取后,进行 HPLC 分析.连翘叶称样量减半,其它步骤同前.分析结果如表4。

Tab 4 Contents of samples from various sources (n=5)

Source	Caffeic acid	Content (mg/g)			
		Forsythoside A	Rutin	Forsythin	Forsythigenin
Shell					
Datong	1.46	57.76	2.74	4.63	1.36
Linfen	1.13	4.36	0.862	0.854	0.218
Yuxian	0.298	4.58	1.02	0.890	0.229
Leave					
Henan	1.15	35.25	12.36	31.43	1.62

由 HPLC 分析结果可知,不同产地连翘壳的有效成分含量相差很大.大同的连翘壳含量很

高。

讨 论

1 连翘酯甙很不稳定,提取过程中,条件偏碱或偏酸以及温度过高,都易引起分解。在制备连翘酯甙粗品时,采用水饱和正丁醇代替乙酸乙酯,使萃取效率大大提高。随后采用聚酰胺柱加压层析法先进行初步分离,可有效地与其它组分分开,又避免酸或碱的影响,连翘酯甙不被破坏。然后再一步用 Sephadex G-10葡聚糖凝胶柱纯化,用甲醇洗脱。甲醇很易挥发,可直接得到良好晶形的连翘酯甙。处理过程中,吸附损失亦较少。

2 在 HPLC 分析中,甲醇及四氢呋喃的量、pH 值及温度均可明显影响所测组分的保留时间。芦丁受温度影响较大,温度升高,保留时间明显缩短。温度控制在 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 时,可与生药中的其它组分分开。加入四氢呋喃后,各组分的峰形均得到改善,连翘甙与连翘脂素的色谱峰随四氢呋喃量的增加而显著前移。当甲醇中含1%四氢呋喃时,可使连翘甙与连翘壳中的未知组分分开,而连翘脂素不过分前移,不致混入杂质峰中,pH 对各组分峰形及保留时间均有影响,对连翘酯甙的影响更大。实验表明,pH 在4.0以下可得较好峰形,而低于3.0,柱效损失过快。

3 所测的几种成分在叶中的含量比壳中高很多,但壳中含有许多其它组分,组成比叶复杂得多(图1)。

致谢 本实验所用对照品,咖啡酸、芦丁、连翘甙、连翘脂素及连翘酯甙粗品均由梁文藻先生提供。

参 考 文 献

- 1 匡海学,等.青连翘抗菌活性成分的研究.中药通报 1988;13:416.
- 2 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典.一九八五年版.一部.北京:人民卫生出版社,1985:141.
- 3 梁文藻,等.连翘成分分析 I.连翘甙和连翘脂素的分离、鉴定和测定.药物分析杂志. 1985;5:1.
- 4 陈发奎,等.沈阳红药中人参皂苷 Rg1与感冒退热冲剂中连翘酯的含量测定.中草药 1988;19:63.
- 5 梁文藻,等.连翘成分分析 IV.连翘酯甙的分离、鉴定和测定.药物分析杂志 1986;6:263.
- 6 梁文藻,等.连翘成分分析 II.芦丁的分离、鉴定和测定. 1985;5:79.
- 7 都恒青,等.连翘叶的化学成分.中草药 1986;17:55.

HPLC ANALYSIS OF THE ACTIVE INGREDIENTS OF *FORSYTHIA SUSPENS*A

YY Cui, SY Feng, G Zhao and MZ Wang

(*Department of Analytical Chemistry, Institute of Materia Medica,
Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

ABSTRACT *Forsythia suspensa* is a widely used traditional Chinese herb. Because of the need to evaluate its quality, a HPLC method was developed to analyze the active ingredients in its fruits and leaves.

One g of powdered plant material was cold macerated over-night with 10 ml of methanol added then supersonic extracted for 20 min. Four ml of the extract were mixed with 1 ml of water, centrifuged ($400 \times g$, 15 min), and then analyzed by HPLC with a Nucleosil C-18 column. The mobile phase for gradient elution consisted of MeOH (containing 1% tetrahydrofuran) and H₂O (containing 0.01 mol/L KH₂PO₄, pH 3.2) and monitored by UV absorption at 280 nm. The identity and purity of the peaks were checked by photodiode array detector and in comparison with standards. By this procedure, the active constituents caffeic acid, rutin, forsythoside A, forsythin, and forsythigenin were separated successfully, and the quantity of each compound was determined by peak area.

Some fruit samples obtained from various sources and the leaf sample made as tea were analyzed by this method.

Key words *Forsythia suspensa*; HPLC; Forsythoside A