

高效液相色谱法测定不同产地连翘花中 四种有效成分含量

孙印石, 王延杰, 王建华*

(山东农业大学农学院, 泰安 271018)

摘要: **目的** 建立测定不同产地连翘花中芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、松酯酚含量的高效液相色谱法, 为其有效成分控制提供有效方法。 **方法** 采用 Symmetry C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 230 nm, 柱温 25 ℃。 **结果** 不同产地的连翘花之间各成分的含量差异显著, 其中连翘酯苷 A 在各样品中含量最高, 芦丁含量次之, 连翘苷含量最少; 其中菏泽产的样品连翘酯苷 A 含量高达 119.38±5.78 mg/g, 连翘苷的含量达 4.71±0.09 mg/g; 临沂产的样品芦丁含量最高达 75.64±2.09 mg/g; 日照、青岛和烟台的样品中松酯酚含量较高且相差不大, 分别是 25.41±1.51、24.45±0.98、23.60±1.19 mg/g。 **结论** 12 个产地连翘花中连翘酯苷 A 的含量远远高于药典规定的最低含量要求。但连翘花中连翘苷的含量较低。

关键词: 连翘花; 高效液相色谱法; 芦丁; 连翘酯苷 A; 连翘苷; 松酯酚

Determination of four components in *Forsythia suspensa* flower from different habitats by high performance liquid chromatography

SUN Yin-Shi, WANG Yan-Jie, WANG Jian-Hua*

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of rutin, forsythoside A, forsythin and pinorelinol in different regions of *Forsythia suspensa* flower by high performance liquid chromatography, thus to offer a method for its quality control. **Methods** Symmetry C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm) column was adopted. The mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 230 nm, and the column temperature was 25 ℃. **Results** The contents of rutin, forsythoside A, forsythin and pinorelinol in different regions of *F. suspensa* flower were significantly different, and the contents of forsythoside A in the *F. suspensa* flower was the highest, then followed by rutin and forsythin. Among them, the content of forsythoside A and forsythin of the *F. suspensa* flower in region of Heze were 119.38±5.78 mg/g and 4.71±0.09 mg/g, respectively. The content of rutin of the *F. suspensa* flower in region of Linyi was 75.64±2.09 mg/g, which was the highest. High content of pinorelinol in regions of Rizhao, Qingdao and Yantai are 25.41±1.51, 24.45±0.98 and 23.60±1.19 mg/g, respectively, which showed no significant difference. **Conclusion** Although the content of forsythin of *F. suspensa* flower was low, the

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31200261)

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (31200261)

*通讯作者: 王建华, 教授, 主要研究方向为中药资源与开发。 E-mail: sdauwangjh@163.com

*Corresponding author: WANG Jian-Hua, Professor, College of Agronomy, Shandong Agricultural University, No. 61, Daizong Road, Taishan District, Taian 271018, China. E-mail: sdauwangjh@163.com

content of forsythoside A in 12 regions was significantly higher than that of the Chinese Pharmacopoeia requirement.

KEY WORDS: *Forsythia suspensa* flower; high performance liquid chromatography; rutin; forsythoside A; forsythin; pinoresinol

1 引言

连翘[(*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl)], 别名连壳、黄花条、黄链条花, 是木犀科连翘属植物, 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”。具有清热解毒、消肿散结、疏散风热之功效^[1]。连翘的主要化学成分为以连翘酯苷为代表的苯乙醇苷类物质和以连翘苷为代表的木脂素类物质^[2-8]。连翘为落叶灌木, 在我国分布很广, 是我国典型的药用和绿化树种之一。连翘花颜色鲜黄、花期较长、花量大, 市场上常做为花茶饮用, 气味清新优雅, 用于风热感冒所引发的咽喉肿痛等症^[9]。目前对连翘不同部位的研究主要集中在叶子与果实上, 而对连翘花的研究较少。为更好地开发利用这一丰富的自然资源, 本文用 HPLC 法测定了山东省 12 个地市连翘花中芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、松酯酚等四种化学成分的含量, 拟为连翘花的质量控制以及连翘其他药用部位的合理利用提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

连翘花分别于 2012 年 4 月采自山东省各级地市, 经山东农业大学王建华教授鉴定, 确认为连翘的花。花自然阴干, 粉碎, 过 60 目筛, 待用。

甲醇(分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司); 乙腈(色谱纯, 天津市凯通化学试剂有限公司); 水为二次蒸馏水; 标准品芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、松酯酚均为本实验室自制。

2.2 仪器与设备

Waters 600E 高效液相色谱仪(美国 Waters), 包括 600E 四元梯度泵、2996 二极管阵列检测器、中文 Empower 色谱管理系统、BusLAC/E 数据采集板、集成的 oracle 关系型图文数据库、四通道脱气机; FW177 型中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);

KQ250DE 数控超声波清洗器(250 W, 40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司); BD-25 十万分之一电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 溶液的制备

(1) 标准品储备液分别称取芦丁 2.4 mg、连翘酯苷 A 4.3 mg, 连翘苷 0.6 mg, 松酯酚 0.8 mg, 用甲醇分别定容于 10 mL 容量瓶中, 作为对照品溶液备用。

(2) 供试品溶液称取不同产地连翘花样品 0.10 g, 置于具塞锥形瓶中, 加甲醇 100 mL, 称重, 超声提取 20 min, 放冷加甲醇补足损失重量, 过 0.22 μ m 滤膜, 取其滤液, 作为供试品溶液备用。

2.3.2 色谱条件

采用 Symmetry C₁₈(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相为乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0~30 min: 15%A; 30~50 min: 15%A $\rightarrow$ 60%A)。流速 1.0 mL/min, 检测波长 230 nm, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L。在上述色谱条件下对照品及典型样品色谱图见图 1。

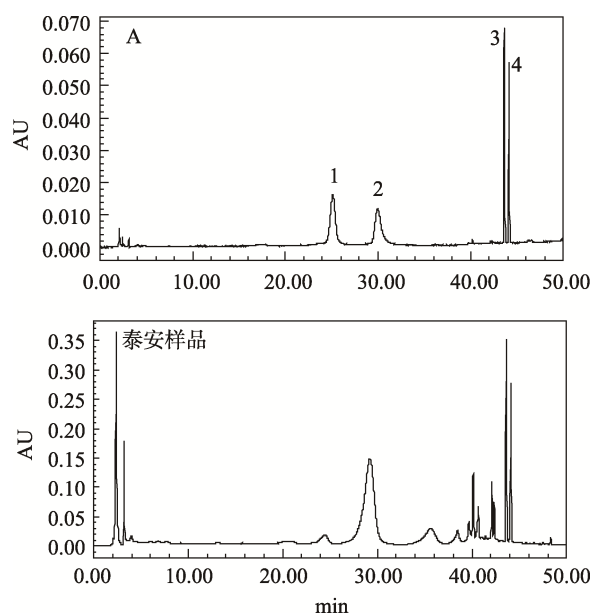


图1 对照品(A)及样品(泰安)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A)

and sample (Taian)
(1. 芦丁; 2. 连翘酯苷 A; 3. 连翘苷; 4. 松酯酚)
(1. rutin; 2. forsythoside A; 3. forsythin; 4. pinoresinol)

3 结果与分析

3.1 线性关系考查

精密吸取“(1)”项下对照品储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 进样。以浓度(X , mg/mL)为横坐标, 以峰面积(Y)为纵坐标建立标准曲线。芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷和松酯酚的线性回归方程, 见表 1。

表 1 芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、松酯酚的线性回归方程、相关系数及其线性范围

Table 1 Linear regression equation, correlation coefficient and linearity of rutin, forsythoside A, forsythin and pinoresinol

化合物 (compound)	线性回归方程 (regression equations)	相关系数 (correlation coefficient)	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$) (linear range)
芦丁(rutin)	$Y=1\text{E}+07X-8113.8$	1.0000	2.4 ~ 76.8
连翘酯苷 A (forsythoside A)	$Y=4\text{E}+06X-17065$	0.9998	4.3 ~ 137.6
连翘苷(forsythin)	$Y=2\text{E}+07X-11461$	0.9998	0.6 ~ 19.2
松酯酚 (pinoresinol)	$Y=2\text{E}+07X+7563.7$	0.9997	0.8 ~ 25.6

3.2 稳定性实验

精密称取济南产连翘花样品 0.20 g, 按“(2)”项下方法制成供试品溶液, 按照“2.3.2”项条件, 分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样测定。测定结果表明芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、松酯酚的峰面积无明显变化, RSD 分别为 0.3%, 0.8%, 0.6%, 0.2%。表明供试品溶液的稳定性好。

3.3 精密度实验

精密取芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、松酯酚的对照品溶液 20 μL , 连续进样 6 次, 测定峰面积。峰面积无明显变化, 芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、松酯酚峰面积的 RSD 分别为 0.2%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 表明仪器精密度好。

3.4 重复性实验

精密称取济南产连翘花样品 6 份各 0.2 g, 按“(2)”项下方法操作, 制备供试品溶液, 精密吸取 20

μL 进样测定。结果样品中芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、松酯酚的峰面积 RSD 分别为 3.8%, 1.1%, 2.8%, 3.3%。表明方法的重复性好。

3.5 回收率实验

精密称取济南产连翘花粉末 0.20 g, 5 份, 分别加入对照品芦丁 2.1 mg, 连翘酯苷 A 3.6 mg, 连翘苷 0.3 mg, 松酯酚 1.4 mg, 按“(2)”项下方法制成供试溶液, 按“2.3.2”项条件测定。芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、松酯酚平均回收率($n=5$)分别为 101.0%, 97.4%, 102.6%, 98.8%; RSD 分别为 2.5%, 3.9%, 2.4%, 3.8%。

3.6 含量测定

取十二个不同产地的连翘花样品, 分别作 3 个平行处理, 按“(2)”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.2”项下色谱条件进样测定。以外标法计算, 按干燥品计各样品中芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷、松酯酚的含量, 结果见表 2, HPLC 色谱图见图 1。

表 2 样品的含量测定结果(mg/g)
Table 2 Results of contents determination of samples

样品 (sample)	芦丁 (rutin)	连翘酯苷 A (forsythoside A)	连翘苷 (forsythin)	松酯酚 (pinoresinol)
潍坊 (Weifang)	19.61 $\pm$ 0.21	84.30 $\pm$ 3.89	0.61 $\pm$ 0.01	1.62 $\pm$ 0.13
淄博(Zibo)	62.36 $\pm$ 2.71	58.13 $\pm$ 1.53	0.90 $\pm$ 0.00	9.84 $\pm$ 2.01
临沂(Linyi)	75.64 $\pm$ 2.09	99.37 $\pm$ 2.43	0.68 $\pm$ 0.01	19.70 $\pm$ 1.23
烟台(Yantai)	39.39 $\pm$ 1.87	71.13 $\pm$ 3.45	1.16 $\pm$ 0.02	23.60 $\pm$ 1.19
泰安(Taian)	48.35 $\pm$ 2.27	105.75 $\pm$ 4.13	1.72 $\pm$ 0.13	15.57 $\pm$ 0.90
济南(Jinan)	20.50 $\pm$ 0.23	30.43 $\pm$ 1.27	0.63 $\pm$ 0.02	12.75 $\pm$ 1.08
济宁(Jining)	20.99 $\pm$ 1.24	30.53 $\pm$ 0.98	0.67 $\pm$ 0.09	13.35 $\pm$ 0.29
德州(Dezhou)	53.17 $\pm$ 2.34	91.55 $\pm$ 2.48	0.84 $\pm$ 0.12	20.84 $\pm$ 0.75
枣庄 (Zaozhuang)	19.53 $\pm$ 0.52	87.81 $\pm$ 1.52	0.63 $\pm$ 0.07	10.74 $\pm$ 1.11
日照(Rizhao)	24.07 $\pm$ 0.81	109.00 $\pm$ 3.09	0.87 $\pm$ 0.08	25.41 $\pm$ 1.51
青岛 (Qingdao)	43.38 $\pm$ 3.05	82.43 $\pm$ 2.15	0.74 $\pm$ 0.03	24.45 $\pm$ 0.98
菏泽(Heze)	22.33 $\pm$ 0.32	119.38 $\pm$ 5.78	4.71 $\pm$ 0.09	1.30 $\pm$ 0.02

3.7 测定波长的选择

使用二极管阵列检测器分析样品和标准品 210~400 nm 下的 UV 光谱图(见图 2), 比较各波长下各组分吸收光谱的差异, 从三维光谱上可以看出 1、2

和 3、4 种化合物的最大吸收波长有很大差异, 芦丁最大吸收波长在 256 和 355 nm, 连翘酯苷 A 在 218 和 328 nm, 而连翘苷和松脂酚, 光谱特性相似, 在

230 和 278 nm 有最大吸收, 在 300~400 nm 处无吸

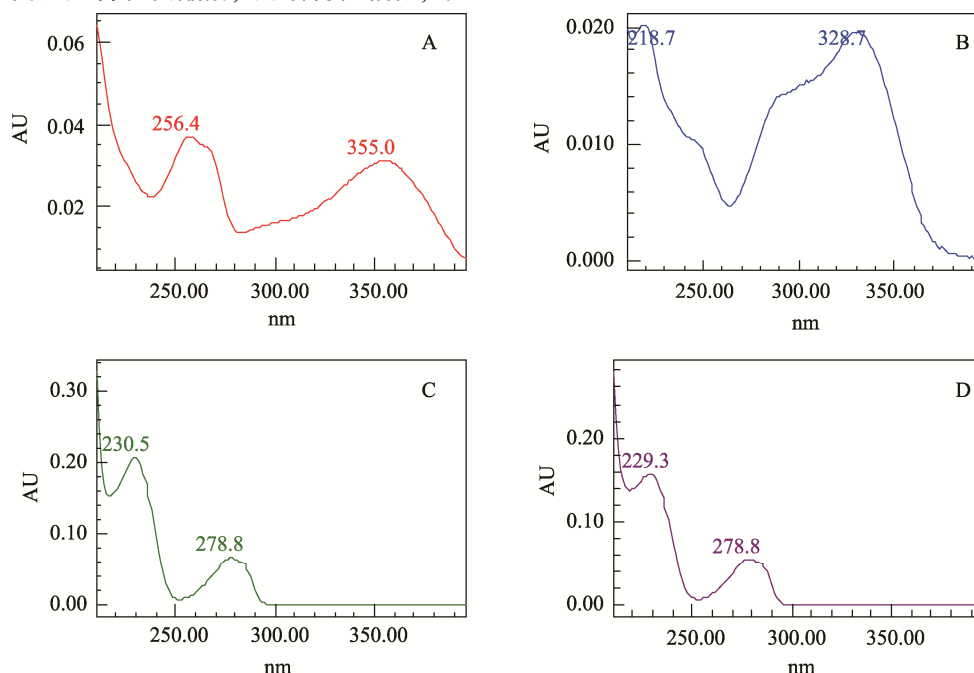


图 2 紫外光谱图

Fig. 2 Photodiode array UV spectra
(A 芦丁; B 连翘酯苷 A; C 连翘苷; D 松脂酚)
(A: rutin; B: forsythoside A; C: forsythin; D: pinoresinol)

收。另外, 虽然四种物质在 210 nm 下都有很强吸收, 但在此波长处, 流动相有较强的末端吸收, 基线不够平稳, 所以综合考虑测定四种化合物时检测波长选择为 230 nm。在此条件下可有效消除背景干扰的同时保证检测的灵敏度。

4 讨 论

(1) 山东地区的连翘通常在三月中下旬至四月初开花, 花量极大, 但通常人们只是作观赏和花茶饮用, 本实验通过测定不同产地连翘花中四种化学成分的含量, 发现在这短短的花期内, 同一产地连翘花的四种化学成分的含量有明显差异, 其中连翘酯苷 A 在各样品中含量最高, 芦丁含量次之, 连翘苷含量最少; 不同产地的连翘花之间各成分的含量也有很明显的差异, 其中菏泽产的样品连翘酯苷 A 含量高达 119.38 ± 5.78 mg/g, 连翘苷的含量达 4.71 ± 0.09 mg/g, 远高于其他地区样品中该成分的含量; 临沂产的样

品芦丁含量最高达 75.64 ± 2.09 mg/g; 日照、青岛和烟台的样品中松脂酚含量较高且相差不大, 分别是 25.41 ± 1.51 、 24.45 ± 0.98 、 23.60 ± 1.19 mg/g。

2010 年版《中国药典》以连翘酯苷 A (不得少于 0.25%) 和连翘苷 (不得少于 0.15%) 为连翘药材的质量评价指标。从本研究的测定结果来看, 所有连翘花中连翘酯苷 A 的含量远远高于药典规定的最低含量要求。但连翘花中连翘苷的含量较低, 仅有菏泽和泰安产符合药典含量要求。这与曲欢欢^[10]的测定结果是一致的。

(2) 本实验建立 HPLC 法测定不同产地连翘花中四种有效成分的含量, 方法简便, 测定结果准确可靠, 为连翘花的质量控制以及连翘其他药用部位的合理利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典, 第一部[M]. 中国医药科技出版社, 2010, 159-160.
Chinese Pharmacopoeia, the First [M]. Chinese Medicine

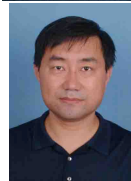
- Science and Technology Press, 2010, 159–160.
- [2] Jiao J, Gai QY, Luo M, *et al.* Comparison of main bioactive compounds in tea infusions with different seasonal *Forsythia suspensa* leaves by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and evaluation of antioxidant activity [J]. Food Res Int, 2013, 53(2): 857–863.
- [3] Xia EQ, Ai XX, Zang SY, *et al.* Ultrasound-assisted extraction of phillyrin from *Forsythia suspensa* [J]. Ultrason Sonochem, 2011, 18(2): 549–552.
- [4] Zhang QM, Wei XY, Wang JW, *et al.* Phillyrin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspensa* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(8): 1500–1505.
- [5] Qu, HH, Zhang YM, Chai XY, *et al.* Isoforsythiaside, an antioxidant and antibacterial phenylethanoid glycoside isolated from *Forsythia suspensa* [J]. Bioorg Chem, 2012, 40: 87–91.
- [6] Guo H, Liu AH, Li L, *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(3): 1000–1006.
- [7] 李卫建, 李先恩. 连翘果实干物质与有效成分积累规律研究[J]. 中草药, 2006, 37(6): 921–924.
- Li WJ, Li XE. Research on accumulation of the dry matter and active ingredient of forsythia fruit [J]. Chin Herbal Med, 2006, 37(6): 921–924.
- [8] 夏伯侯, 朱晶晶, 王智民, 等. 连翘药材新增定量标准研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2110–2112.
- Xia BH, Zhu JJ, Wang ZM, *et al.* Quantitative determination of forsythiaside in *Forsythia suspensa* [J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(16): 2110–2112.
- [9] 姜玉霞, 李振国, 张翠英. HPLC 法测定连翘花中连翘苷的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(9): 1765–1766.
- Lou YX, Li ZG, Zhang CY. Determination of forsythidin in flos forsythiae by HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(9): 1765–1766.
- [10] 曲欢欢, 翟西峰, 李白雪, 等. 连翘不同部位中连翘酯苷和连翘苷的含量分析[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(3): 382–385.
- Qu HH, Zhai XF, LI BX, *et al.* Study of the content of forsythiaside and forsythidin from different parts of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl [J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 28(3): 382–385.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



孙印石, 博士, 讲师, 主要研究方向为天然产物活性成分的研究与开发。
E-mail: sunyinshi2002@163.com



王建华, 博士, 教授, 主要研究方向为中药资源与开发。
E-mail: sdauwangjh@163.com