

一种新的连翘中连翘苷的 HPLC 含量测定方法

李刚¹, 魏庆红^{1*}, 段伟伟¹

亳州市中药材进出口检测中心, 亳州 236800

摘要: 本研究为验证一种简便高效的连翘样品中连翘苷含量测定方法, 以便更简洁的控制连翘药材的质量。实验过程中采用高效液相色谱法测定超声法所制得连翘样品中连翘苷的含量, 并采用 SPSS16.0 统计软件对制得样品中连翘苷含量与中国药典法所得结果做统计学分析。超声法所制得连翘样品中连翘苷含量均符合《中国药典》所规定的药品质量标准分析方法验证指导原则, 且与中国药典法所得结果无显著性差异。超声法简化了样品前处理过程, 所测结果准确高效, 具有较大的推广价值。

关键词: 连翘; 高效液相色谱法; 连翘苷; 超声法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.025

A New Method for the Content Determination of Forsythin in *Forsythia suspensa*LI Gang¹, WEI Qing-hong^{1*}, DUAN Wei-wei¹

Import and Export of Chinese medicinal materials testing center of Bozhou, Bozhou 236800, China

Abstract: In order to control the quality of *Forsythia suspensa*, a simple and effective method for determining the content of *Forsythia suspensa* was studied. The content of forsythrin in the samples of *Forsythia suspensa* was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The content of *Forsythia suspensin* in the samples was analyzed by SPSS 16.0 software and the results obtained by Chinese pharmacopoeia method were analyzed statistically. The contents of *Forsythia suspensa* in the samples prepared by ultrasonic method were in accordance with the guidelines for the analysis of drug quality standards stipulated in the Chinese Pharmacopoeia, and there was no significant difference between the results obtained by the Chinese Pharmacopoeia method and the results obtained by the Chinese Pharmacopoeia method. Ultrasonic method simplifies sample pretreatment process. The measured results are accurate and efficient, and have great value of popularization.

Key words: *Forsythia suspensa*; HPLC; forsythrin; ultrasonic method

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 为木犀科 (Oleaceae) 连翘属 (*Forsythia*) 植物的干燥果实^[1]。连翘味苦、无毒、性微寒, 具有清热解毒, 消肿散结, 疏散风热等作用, 其药用价值一直受到人们的重视, 是多种中成药和中药制剂的主要成分。连翘苷是连翘的主要有效成分, 通常作为评价连翘品质的重要指标之一^[2-7]。连翘苷的含量测定方法通常采用高效液相色谱法, 2015 版《中国药典》规定连翘中连翘苷的含量测定方法操作繁琐复杂, 操作时间长, 虽然有较多文献探讨了连翘中连翘苷含量测定的样品前处理方法, 但均与 2015 版《中国药典》分析方法类似^[1]。本公司在从事连翘样品出口到台湾业务中,

依据《台湾中药典》对连翘中连翘苷含量进行测定, 但其前处理方法仍然较为复杂^[8]。本课题组在二者基础之上, 开发了一种新的连翘中连翘苷的含量测定方法, 采用统计方法探讨新方法所测结果的准确性, 以简化连翘中连翘苷的含量测定方法, 确定一种简便高效的连翘苷含量测定方法, 进而完善对连翘的质量进行控制方法。

1 仪器与试剂

Agilent1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); ATY224 型十万分之一电子天平 (日本岛津公司); MCM36 型百万分之一电子天平 (赛多利斯公司); JK-600CDE 型数控超声波清洗器 (合肥金尼克机械制造有限公司); WL-100 型打粉机; 连翘苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号为 110821—201213); 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 甲醇为分析

纯;连翘药材购于康美(亳州)华佗国际中药城,经安徽中医药大学药学院周建理教授鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。

2 实验方法

2.1 色谱条件与系统适用性试验

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈-水(25:75)为流动相;检测波长为 277 nm。理论板数按连翘苷峰计算应不低于 3000。

2.2 对照品溶液的制备

取连翘苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过五号筛)约 0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察

精密量取 2.2 项下的连翘苷对照品贮备溶液适量,分别精密吸取连翘苷对照品溶液 2、5、10、15、20 μL 注入液相色谱仪,并记录色谱图。依法测定,以

峰面积为纵坐标,连翘苷的质量为横坐标绘制标准曲线,得吴茱萸碱回归方程: $Y = 153.09x + 2.1463$, $R^2 = 0.9999$ ($n = 5$),表明连翘苷在 0.412 ~ 4.125 μg 的质量范围内峰面积与质量间具有良好的线性关系。

2.4.2 精密度验证

吸取同一连翘苷对照品溶液,在上述色谱条件下,重复进样 6 次,测定峰面积值, RSD 为 0.85% ($n = 6$),结果表明此实验仪器条件下测定连翘苷含量的精密度良好。

2.4.3 重复性验证

取同一样品 6 份,分别按含量测定项下的方法,测定连翘苷的含量,测定峰面积值, RSD 为 1.15% ($n = 6$),结果表明测定本品连翘苷含量的重复性良好。

3 实验结果

3.1 准确度(加样回收率试验)验证

精密称取适量已知连翘苷含量的药材粉末 6 份,分别添加低、中、高 3 个质量浓度的连翘苷对照品粉末,按供试品溶液制备方法提取处理,按照上述色谱条件进行测定,连翘苷的平均回收率为 98.62%, RSD 为 1.32%。结果见表 1,结果表明本方法的加样回收率以连翘苷加入量计符合要求。

表 1 加样回收试验结果

Table 1 Results of recovery test for forsythin

| 样品含量 Sample content (mg) | 加入量 Addition (mg) | 测得量 Measured quantity (mg) | 回收率 percent recovery (%) | X (%) | RSD (%) |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------|------------|
| 1.42 | 0.71 | 2.11 | 97.18 | | |
| 1.43 | 0.72 | 2.13 | 97.22 | | |
| 1.42 | 0.71 | 2.14 | 101.41 | | |
| 1.44 | 1.42 | 2.84 | 98.59 | | |
| 1.42 | 1.41 | 2.81 | 98.58 | 98.62 | 1.32 |
| 1.42 | 1.42 | 2.81 | 97.89 | | |
| 1.41 | 2.13 | 3.50 | 98.12 | | |
| 1.43 | 2.12 | 3.53 | 99.06 | | |
| 1.42 | 2.13 | 3.54 | 99.53 | | |

3.2 专属性(系统适用性试验)验证

按照该色谱条件注入连翘苷的对照品溶液及样品液进行测定,结果表明,在该色谱条件下,按照连翘苷的色谱峰计算,理论板数较高、分离度和拖尾因

子均符合规定,结果见图 1。其理论塔板数按连翘苷峰计算为 9628,符合《中国药典》中不低于 3000 的要求^[1]。

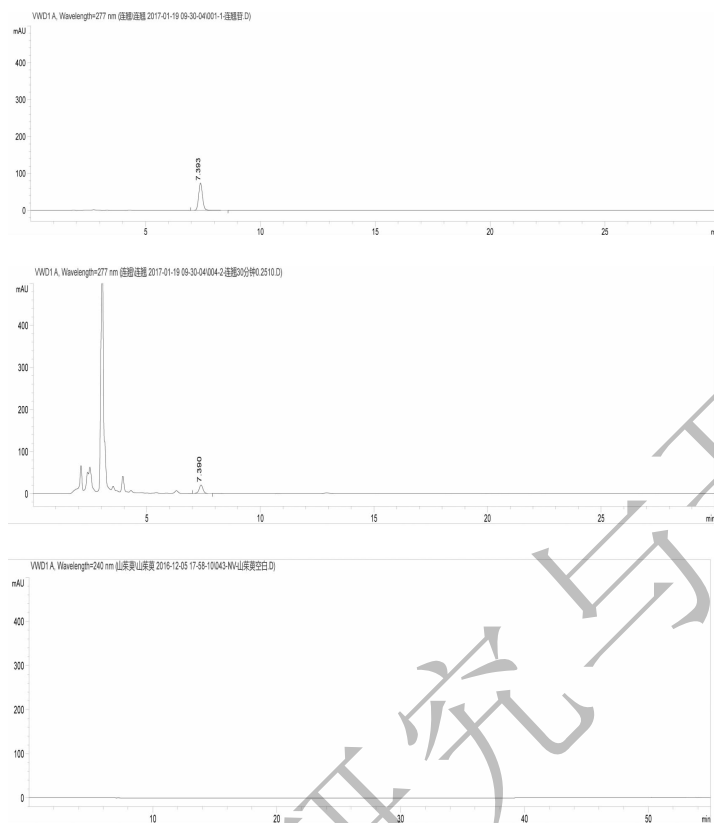


图 1 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

注:1 连翘苷对照品图谱,2 连翘药材供试品图谱,3 空白对照(甲醇溶液)图谱

Note:1 Forsythione reference substance chromatogram,2 The chromatogram of Forsythia suspensa,3 Blank control (methanol solution) atlas

3.3 耐用性验证

取样品溶液,分别连接 Agilent Eclipse XDB-C18 和 Agilent Eclipse SB-C18 色谱柱,对同一连翘样品进行检测,测定每一次峰面积值,连翘苷的 *RSD* 分别 1.03% 和 0.85%,结果表明不同型号的色谱柱检测样品含量的稳定性良好。

3.4 超声法测定结果与中国药典法所得结果的比较

采用超声法和中国药典法对 6 批购买于康美(亳州)华佗国际中药城所得的连翘样品进行连翘苷含量测定,结果见表 2。采用 SPSS16.0 软件对两种测定方法所得的结果进行独立样品的 *t* 测验,统计结果显示在置信区间内,超声法与中国药典法所测得样品中连翘苷含量无显著性差异。

4 讨论

《中国药典》规定的连翘中连翘苷的含量测定前处理中需要通过中性氧化铝柱洗脱,70% 乙醇

表 2 两种制样方法所得连翘苷含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 2 Results of the content of forsythine by the two sample preparation methods($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 编号 No. | 中国药典法 Chinese pharmacopoeia method | 超声法 Ultrasonic method |
|-----------|---------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 0.67 ± 0.015 | 0.69 ± 0.006 |
| 2 | 0.78 ± 0.010 | 0.79 ± 0.006 |
| 3 | 1.02 ± 0.006 | 1.02 ± 0.006 |
| 4 | 1.14 ± 0.006 | 1.16 ± 0.006 |
| 5 | 0.56 ± 0.015 | 0.58 ± 0.006 |
| 6 | 0.47 ± 0.006 | 0.48 ± 0.006 |

洗脱后,除去杂质,洗脱液中主要为皂苷类^[1]。但对比超声法和中国药典法的图谱发现,中性氧化铝柱的除杂效果不明显,两种方法所得图谱中,连翘苷峰附近均无杂峰,证明超声法和中国药典法的纯化效果无明显差异。

结合两种方法所测连翘中连翘苷含量的方差分析可知,新方法改进了连翘苷的前处理方法,省略了

甲醇浸渍过夜和中性氧化铝柱洗脱纯化的过程,大大简化了样品前处理过程,减少操作误差发生的可能性。所得色谱峰峰型较好,对称因子、分离度和理论塔板数均满足要求,而且与中国药典法所得结果无显著性差异。

在方法研究中发现,紫外分光光度计检测结果显示检测波长为 202 nm 附近时,连翘苷吸光度最大,所得色谱峰峰面积较 277 nm 时更大,中国药典法可能为了排除乙腈的干扰,但所得色谱峰附近无明显杂峰,这一点有待进一步研究。

本研究所得结果均符合《中国药典》所规定的药品质量标准分析方法验证指导原则^[1],所得结果与中国药典法所得结果无显著性差异,且大大简化实验步骤,有利于快速检测连翘中连翘苷的含量,具有较大的推广价值。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the people's republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- 2 Li SY (李书渊), Shi YX (施玉旋), Luo T (罗婷). Determination of forsythhin content in the seed, green and grown

Forsytia suspen[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2006, 9: 1720.

- 3 Fu JF (付金凤), Zhao F (赵芳). Determination of forsythhin in Shuanghuanglian tablets by HPLC [J]. *Heilongjiang Med* (黑龙江医药), 2009, 3: 248-249.
- 4 Wei JB (魏晋宝), Yang GY (杨光义), et al. Recent advances in extraction methods, pharmacology, toxicology and pharmacokinetics studies of phillyrin [J]. *China Pharma* (中国药师), 2015, 12: 2144-2148.
- 5 Wu GT (武果桃), Niu GQ (牛国庆), et al. Effects of different extracting methods on the contents of forsythhin from *Forsythia suspensa* (Thumb.) Vahl [J]. *J Trad Chin Veter Med* (中兽医医药杂志), 2009, 6.
- 6 Wang YL (王娅丽), Yang JX (杨建雄), Chai WL (柴渭莉). Investigation on glycosides extracted from *Forsythia suspensa* leaves [J]. *Northwest Pharm* (西北药学杂志), 2006, 1: 9-10.
- 7 Zhao YM (赵咏梅), Wang L (王雷). Study on the extraction and stability of Forsythia [J]. *Shanxi Agric Sci* (陕西农业科学), 2016, 5: 21-23.
- 8 Yu YT (余依婷). Historical research on traditional Chinese medicine scientification in Taiwan [D]. Guangzhou: Traditional Chinese Medicine University Of Guangzhou (广州中医药大学), 2011.

(上接第 197 页)

- 51 Yan LJ (阎力君), et al. Effect of astragal radix polysaccharides on proliferation and apoptosis of human colon cancer cell line SW620 [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 22: 97-101.
- 52 Niu GC (牛广财), et al. Antitumor and immunoenhancing effects of polysaccharides POP II and POP III from *Portulaca oleracea* L. [J]. *Food Sci* (食品科学), 2017, 38: 201-205.
- 53 Xu XJ (徐小娟), et al. Summary of plant polysaccharide fall blood sugar function [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2015, 3: 142-145.
- 54 Zhang Y (张勇). Effect of lycium barbarum polysaccharides on reducing blood glucose and preventing the occurrence of the diabetes nephropathy [D]. Nanjing: Southeast University (东南大学), 2014.
- 55 Zhu ZY (朱振元), et al. Hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Smallanthus sonchifolius* (Yacon) Polysaccharides [J]. *Modern Food Sci Technol* (现代食品科技), 2017, 5: 39-46.
- 56 Liu YJ (刘延吉), et al. Polysaccharide of actinidia arguta and activity of blood glucose and lipid of decline [J]. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2012, 31(1): 86-89.

- 57 Liu B (刘蓓), et al. Proliferation of spleen lymphocytes stimulated by honeysuckle [J]. *Chin Prac Med* (中国实用医药), 2013, 8: 244-245.
- 58 Liu HQ (刘海青), et al. A study on water soluble polysaccharide SJ₁ in leaves of *Hippophae rhamnoides* L. [J]. *Sci Technol Food In* (食品工业科技), 2006, 10: 61-63.
- 59 Zhao Y, et al. Study on fundamental process of *Codonopsis pilosula*, desulfurization and *in vitro*, antibacterial activity of its polysaccharide extract on *Escherichia coli* [J]. *Pharm Chem J*, 2016, 49: 782-787.
- 60 Sun XG, et al. Proteomic analysis of protective effects of polysaccharides from *Salvia miltiorrhiza* against immunological liver injury in mice [J]. *Phytother Res*, 2011, 25: 1087 - 1094.
- 61 Liu AP (刘爱萍), et al. Network meta-analysis of angelica polysaccharides for radioactivity protection [J]. *Chin J Drug Evaluation* (中国药物评价), 2014, 2: 107-112.
- 62 Nie SP (聂少平), et al. Effect of natural product polysaccharide on gastrointestinal function [J]. *J Chin Inst Food Sci Tech* (中国食品学报), 2015, 15(5): 11-19.
- 63 Cong Q, et al. Structural characterization and effect on anti-angiogenic activity of a fucoidan from *Sargassum fusiforme* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 136: 899.