

HPLC-一测多评法测定莲花清瘟胶囊中绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷和大黄酸

陈燕军¹, 吴有根^{2*}, 魏惠珍³, 金浩鑫³

1. 江西师范大学医院, 江西 南昌 330027

2. 江西应用科技学院, 江西 南昌 330100

3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-一测多评法测定莲花清瘟胶囊中绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸的方法。**方法** 使用 Inertsil ODS-3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.4%磷酸水, 梯度洗脱; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25 ℃; 检测波长: 280 nm。以连翘苷为内参物, 建立其他 5 种成分的相对校正因子, 一测多评法计算各成分。**结果** 绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸分别在 0.243~4.861、0.112~2.248、0.087~1.732、0.247~4.949、0.370~7.402、0.095~0.952 μg/mL 线性关系良好 ($r \geq 0.9995$), 平均回收率分别为 99.40%、101.0%、104.5%、98.17%、99.70%、99.58%, RSD 值分别为 1.12%、2.53%、3.15%、2.94%、1.41%、2.84% ($n=6$)。**结论** 该法回收率高、重复性良好, 为莲花清瘟胶囊建立更全面的质量控制提供了新方法。

关键词: 莲花清瘟胶囊; 绿原酸; 甘草苷; 木犀草苷; 连翘酯苷 A; 连翘苷; 大黄酸; 高效液相色谱; 一测多评法

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)03-0609-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.03.010

Determination of chlorogenic acid, glycyrrhizin, luteolin, forsythiaside A, forsythin, and rhein in Lianhua Qingwen Capsules by HPLC-quantitative analysis of multi-components by single marker

CHEN Yanjun¹, WU Yougen², WEI Huizhen³, JIN Haoxin³

1. The Hospital of Jiangxi Normal University, Nanchang 330027, China

2. Jiangxi Institute of Applied Science and Technology, Nanchang 330100, China

3. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) to determine contents of chlorogenic acid, glycyrrhizin, luteolin, forsythiaside A, forsythin, and rhein in Lianhua Qingwen Capsules. **Methods** Analysis was performed on an Inertsil ODS-3 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile - 0.4% phosphoric acid aqueous in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was maintained at 25 ℃, and the detection wavelength was set at 280 nm. Using forsythin as the internal reference substance, the relative correction factor of the other five components was established, and the contents of each component were calculated by QAMS method. **Results** Chlorogenic acid, glycyrrhizin, luteolin, forsythiaside A, forsythin, and rhein all showed good linear relationship within the ranges of 0.243 — 4.861, 0.112 — 2.248, 0.087 — 1.732, 0.247 — 4.949, 0.370 — 7.402, and 0.095 — 0.952 μg/mL ($r \geq 0.9995$), and their average recovery rates were 99.40%, 101.0%, 104.5%, 98.17%, 99.70%, and 99.58%, with the RSD of 1.12%, 2.53%, 3.15%, 2.94%, 1.41%, and 2.84% ($n=6$). **Conclusion** This method has a high recovery rate and good repeatability, providing a new method for establishing a more comprehensive quality control of Lianhua Qingwen Capsules.

Key words: Lianhua Qingwen Capsules; chlorogenic acid; glycyrrhizin; luteolin; forsythiaside A; forsythin; rhein; HPLC; quantitative analysis of multi-components by single marker method

收稿日期: 2023-12-07

基金项目: 江西省中医药管理局科技计划项目 (2022A381); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ2203312)

作者简介: 陈燕军, 女, 福建福州人, 副主任药师, 硕士, 研究方向为药物质量控制。E-mail: chemyj@126.com

*通信作者: 吴有根, 男, 江西进贤人, 副教授, 硕士, 从事中药质量控制研究。E-mail: 403058973@qq.com

连花清瘟胶囊是由 13 味中药组成的复方制剂,《中国药典》2020 年版仅测定连翘苷^[1],难以全面控制连花清瘟胶囊质量。有关连花清瘟制剂中多指标成分测定已有报道^[2-9]。一测多评法是仅测定 1 个成分来实现多个成分的同步监控^[10-12]。孙云波等^[13]以绿原酸为内参物,采用超高效液相色谱法同时测定连花清瘟胶囊中 7 个成分。本实验采用高效液相色谱法,以连翘苷为内参物,通过建立绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、大黄酸的相对校正因子测定了连花清瘟胶囊中绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸 6 种成分,为进一步提高连花清瘟胶囊质量评价水平提供参考。

1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪; LC-20AT 高效液相色谱系统(岛津公司); Agilent 1260 高效液相色谱系统(Agilent 公司); Millipore-Q 纯水器(美国 Millipore 公司); AUW-220D 型十万分之一电子分析天平(日本岛津公司); AB-104N 型万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ3200 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

绿原酸(批号 110753-202119, 质量分数 96.3%)、甘草苷(批号 111610-201908, 质量分数 95.0%)、木犀草苷(批号 111720-202111, 质量分数 96.6%)、连翘酯苷 A(批号 111810-202209, 质量分数 96.4%)、连翘苷(批号 110821-202117, 质量分数 94.9%)、大黄酸(批号 110757-201607, 质量分数 99.3%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇(色谱纯, Fisher 公司), 磷酸(色谱纯,

上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 乙醇(分析纯, 西陇科学股份有限公司), 水为 Milli-Q 超纯水。连花清瘟胶囊由石家庄以岭药业股份有限公司生产, 批号分别为 A2203128、A2204040、B2211257、B2203209、B2204254。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

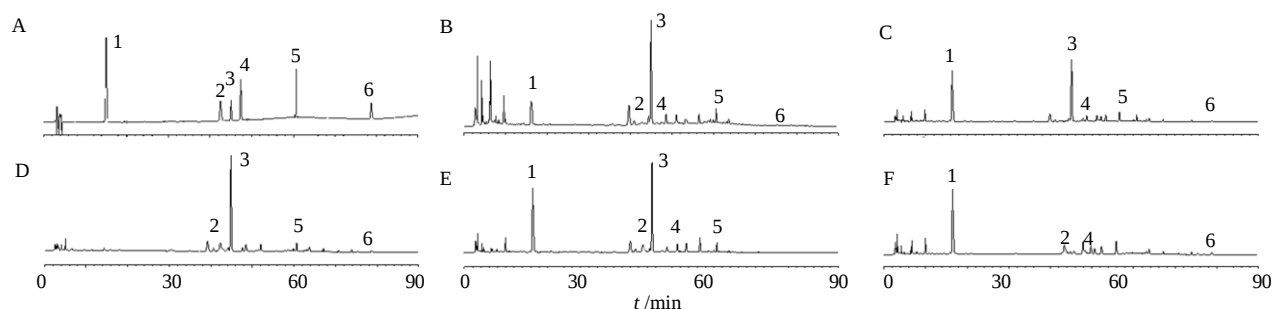
2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸对照品适量, 加 50% 甲醇溶解, 配制成质量浓度分别为 121.52、56.20、43.30、123.72、185.04、4.76 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取连花清瘟胶囊内容物, 研细, 取约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 按连花清瘟胶囊处方比例和生产工艺分别制备缺甘草、连翘、金银花、大黄的阴性样品, 分别按 2.1.2 项方法制备, 即得。

2.2 色谱条件

Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.4% 磷酸水(B), 梯度洗脱(0~5 min, 8%A; 5~20 min, 8%A $\rightarrow$ 15%A; 20~30 min, 15%A; 30~50 min, 15%A $\rightarrow$ 30%A; 50~65 min, 30%A $\rightarrow$ 45%A; 65~90 min, 45%A); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 280 nm。按以上色谱条件进样, 色谱图见图 1。



1-绿原酸; 2-甘草苷; 3-连翘酯苷 A; 4-木犀草苷; 5-连翘苷; 6-大黄酸。
1- chlorogenic acid; 2- glycyrrhizin; 3- forsythiaside A; 4- luteolin; 5- forsythin; 6- rhein.

图 1 混合对照品(A)、连花清瘟胶囊(B)、缺甘草阴性样品(C)、缺金银花阴性样品(D)、缺大黄阴性样品(E)、缺连翘阴性样品(F)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), Lianhua Qingwen Capsules (B), negative samples without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (C), negative samples without *Lonicerae Japonicae Flos* (D), and negative samples without *Rhei Radix et Rhizoma* (E), negative samples without *Forsythiae Fructus* (F)

2.3 线性关系考察

取混合对照品溶液，分别进样 2、5、10、20、30、40 μL ，记录色谱图。以绿原酸、甘草苷、木犀

草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸峰面积为纵坐标，进样质量为横坐标，绘制标准曲线，计算回归方程，结果见表 1。

表 1 各成分线性方程和线性范围
Table 1 Linearity equations and linear range of various components

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
绿原酸	$Y=15\,278\,338.91\,X-6\,506.62$	0.999 5	0.243~4.861
甘草苷	$Y=5\,546\,853.66\,X-7\,677.04$	0.999 5	0.112~2.248
木犀草苷	$Y=12\,692\,192.93\,X-9\,026.24$	0.999 5	0.087~1.732
连翘酯苷 A	$Y=10\,505\,669.78\,X-10\,859.00$	0.999 8	0.247~4.949
连翘苷	$Y=7\,440\,386.18\,X-11\,567.71$	0.999 7	0.370~7.402
大黄酸	$Y=33\,675\,950.70\,X-12\,107.79$	0.999 6	0.095~0.952

2.4 精密度试验

精密吸取同一批号 B2204254 连花清瘟胶囊样品制备的供试品溶液 10 μL ，连续进样 6 次，测定绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸的峰面积值，计算得绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸峰面积的 RSD 值分别为 1.3%、1.9%、1.6%、1.4%、1.3%、2.2%。

2.5 重复性试验

取批号 B2204254 连花清瘟胶囊粉末适量，平行制备供试品溶液 6 份，测定绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸的峰面积，并计算质量分数，结果绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸质量分数的 RSD 值分别为 1.5%、3.1%、3.0%、2.8%、2.7%、3.0%。

2.6 稳定性试验

取批号 B2204254 连花清瘟胶囊供试品溶液，室温下分别在配制后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸的峰面积值，计算得绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸峰面积的 RSD 值分别为 1.5%、2.8%、2.1%、1.3%、1.9%、2.4%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 回收率试验

取批号 B2204254 连花清瘟胶囊内容物 6 份，每份约 1.0 g，精密称定，加入含绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸质量浓度分别为 166.00、5.71、5.14、24.60、16.60、3.71 $\mu\text{g/mL}$ 混合对照品溶液 50 mL，制备供试品溶液，进样测定，计算回收率，结果绿原酸、甘草苷、木犀草苷、

连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸的平均回收率分别为 99.40%、101.0%、104.5%、98.17%、99.70%、99.58%，RSD 值分别为 1.12%、2.53%、3.15%、2.94%、1.41%、2.84%。

2.8 校正因子的测定

精密吸取混合对照品溶液 2、5、8、10、15、20 μL ，进样测定，以连翘苷为内参物，根据公式 $f_{s/i} = f_s/f_i = (A_s/C_s)/(A_i/C_i)$ （式中 f_s 为内参物的绝对校正因子， f_i 为待测物的绝对校正因子， A_s 为内参物峰面积， A_i 为待测物峰面积， C_s 为内参物质量浓度， C_i 为待测物质量浓度）计算绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、大黄酸的相对校正因子，结果见表 2。

2.9 校正因子耐用性考察

精密吸取混合对照品溶液，进样测定，对连花清瘟胶囊中绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、大黄酸校正因子进行耐用性考察，分别考察色谱柱、色谱仪器、柱温对校正因子的影响，结果见表 3~5。上述考察因素对连花清瘟胶囊中绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、大黄酸的校正因子无显著影响，校正因子是相对稳定的数值，可用于定量分析。

2.10 样品测定

取 5 批连花清瘟胶囊，制备供试品溶液，进样测定，分别按外标法、一测多评法计算绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸的质量分数和相对误差[以 RSD 表示， $\text{RSD} = (\text{一测多评法计算值} - \text{外标法实测值}) / \text{外标法实测值}$]，结果见表 6。

表 2 连花清瘟胶囊中各成分的校正因子

Table 2 RCF for different components in Lianhua Qingwen Capsules

进样量/ μL	$f_{\text{绿原酸}}$	$f_{\text{甘草苷}}$	$f_{\text{木犀草苷}}$	$f_{\text{连翘脂苷 A}}$	$f_{\text{大黄酸}}$
2	2.081 4	0.735 6	1.667 6	1.421 3	4.324 5
5	2.093 4	0.723 5	1.659 4	1.418 9	4.321 1
8	2.083 4	0.718 3	1.643 5	1.441 1	4.324 5
10	2.083 3	0.723 7	1.662 4	1.419 7	4.347 7
15	2.079 3	0.722 1	1.670 1	1.423 6	4.323 4
20	2.083 8	0.723 0	1.665 7	1.427 1	4.345 6
平均值	2.084 1	0.724 4	1.661 5	1.425 3	4.331 1
RSD/%	0.21	0.74	0.53	0.53	0.26

表 3 不同色谱柱对校正因子的影响

Table 3 Effects of different chromatographic columns on RCF

色谱柱	$f_{\text{绿原酸}}$	$f_{\text{甘草苷}}$	$f_{\text{木犀草苷}}$	$f_{\text{连翘脂苷 A}}$	$f_{\text{大黄酸}}$
Hypersil ODS	2.082 2	0.733 4	1.656 6	1.418 3	4.335 7
Thermo Hypersil-Keystone C ₁₈	2.075 6	0.738 9	1.649 8	1.421 5	4.356 1
Inertil ODS-3	2.083 4	0.726 8	1.653 4	1.419 9	4.278 9
平均值	2.080 4	0.733 0	1.653 3	1.419 9	4.323 6
RSD/%	0.16	0.67	0.17	0.09	0.76

表 4 不同色谱仪对校正因子的影响

Table 4 Effects of different liquid chromatographic instruments on RCF

色谱仪类型	$f_{\text{绿原酸}}$	$f_{\text{甘草苷}}$	$f_{\text{木犀草苷}}$	$f_{\text{连翘脂苷 A}}$	$f_{\text{大黄酸}}$
Waters	2.071 4	0.735 6	1.667 6	1.421 3	4.324 5
LC-20AT	2.084 4	0.737 7	1.662 4	1.428 6	4.325 4
Agilent1260	2.084 6	0.731 5	1.657 4	1.418 7	4.310 8
平均值	2.080 1	0.734 9	1.662 5	1.422 9	4.320 2
RSD/%	0.30	0.35	0.25	0.29	0.15

表 5 不同柱温对校正因子的影响

Table 5 Effects of different column temperature on RCF

柱温/ $^{\circ}\text{C}$	$f_{\text{绿原酸}}$	$f_{\text{甘草苷}}$	$f_{\text{木犀草苷}}$	$f_{\text{连翘脂苷 A}}$	$f_{\text{大黄酸}}$
20	2.073 4	0.729 6	1.676 6	1.422 3	4.323 5
25	2.081 1	0.732 5	1.664 5	1.423 6	4.325 4
30	2.079 8	0.728 4	1.664 3	1.428 7	4.375 8
平均值	2.078 1	0.730 2	1.668 5	1.424 9	4.341 6
RSD/%	0.16	0.24	0.34	0.19	0.56

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备和色谱条件的选择

以提取率为考察指标,分别考察了供试品溶液制备时的提取方式(超声提取、加热回流提取)、提取溶剂(50%甲醇、80%甲醇、甲醇)、提取时间(20、30、40 min),结果用 50%甲醇超声处理 30 min 可

有效提取 6 种成分。以各待测成分色谱峰的分离度、拖尾因子为主要指标,考察了检测波长(330、280、250 nm)、流动相(乙腈-0.4%磷酸水溶液、甲醇-乙腈-0.4%磷酸水溶液),并优化了洗脱梯度,最终确定检测波长 280 nm,流动相以乙腈-0.4%磷酸水溶液为佳。

表 6 连花清瘟胶囊中绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷和大黄酸的测定结果 (n=3)
Table 6 Determination of chlorogenic acid, glycyrrhizin, luteolin, forsythiaside A, forsythin, and rhein in Lianhua Qingwen Capsules (n=3)

批号	绿原酸/(mg·g ⁻¹)			连翘酯苷 A/(mg·g ⁻¹)			甘草苷/(mg·g ⁻¹)		
	外标法	一测多评法	RSD/%	外标法	一测多评法	RSD/%	外标法	一测多评法	RSD/%
A2203128	8.21	8.27	0.69	1.24	1.21	-2.27	0.31	0.32	2.73
A2204040	8.83	8.81	-0.32	1.13	1.10	-2.50	0.25	0.27	4.44
B2211257	7.25	7.23	-0.39	1.07	1.10	2.63	0.31	0.32	1.82
B2203209	8.24	8.16	-1.03	1.04	1.02	-2.70	0.34	0.33	-1.67
B2204254	9.96	9.99	0.28	1.19	1.21	2.38	0.25	0.26	1.11

批号	连翘苷/(mg·g ⁻¹)	大黄酸/(mg·g ⁻¹)			木犀草苷/(mg·g ⁻¹)		
		外标法	一测多评法	RSD/%	外标法	一测多评法	RSD/%
A2203128	0.87	0.18	0.18	1.56	0.28	0.28	-2.00
A2204040	0.71	0.14	0.14	2.08	0.34	0.33	-2.50
B2211257	0.73	0.16	0.16	1.79	0.25	0.26	2.22
B2203209	0.71	0.23	0.23	-2.41	0.34	0.33	-1.67
B2204254	0.82	0.16	0.17	3.51	0.25	0.26	3.33

3.2 内标成分和指标成分的选择

连翘苷是《中国药典》2020 年版中连花清瘟胶囊的质控成分^[1]。本实验条件下,连翘苷与其他成分分离良好,对照品易获得,在样品中含量变化差异不大,比较稳定,RSD 值较小,因此被选择为内参物。而其他 5 个成分也是连花清瘟胶囊中主要特征性成分^[14-17],选择它们作为评价指标对确保连花清瘟胶囊的疗效具有重要的意义。

本研究采用 HPLC-一测多评法同时测定连花清瘟胶囊中绿原酸、甘草苷、木犀草苷、连翘酯苷 A、连翘苷、大黄酸等 6 个成分,并与外标法实测值进行比较,结果表明两者无显著差异。本研究建立的一测多评法,选用连翘苷为“内标”参照成分,在进行法定标准检测时,同时测定其他 5 个成分,可以节约对照品,降低分析检测成本。该法回收率高、重复性良好,为连花清瘟胶囊建立更全面的质量控制提供了新方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1014-1016.
[2] 黄如玉,唐瑞欣,厉言,等. UPLC-MS/MS 法同时测定连花清瘟胶囊中 11 种成分 [J]. 中成药, 2023, 45(1): 24-28.
[3] 李应才,黄合琤,杨野. UPLC-QTRAP-MS/MS 法同时测定连花清瘟胶囊(颗粒)中 18 种成分及山银花中灰

毡毛忍冬皂苷乙 [J]. 中成药, 2023, 45(7): 2131-2137.
[4] 李翔,刘皈阳,马建丽,等. HPLC 法测定连花清瘟颗粒和连花清瘟胶囊中绿原酸的含量 [J]. 解放军药学报, 2014, 30(3): 231-233.
[5] 谢秉湘,李志梅,陈善超. 连花清瘟胶囊中连翘苷和盐酸麻黄碱的 HPLC 法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(9): 690-713.
[6] 鲁善传,赵素君,吴爱祥,等. 应用高效液相色谱法测定连花清瘟颗粒中连翘酯苷 A、大黄酸、绿原酸和大黄素的含量研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(4): 96-98.
[7] 郭璐瑶,邓晶晶. 采用 HPLC 同时进行连花清瘟颗粒多成分含量测定及其指纹图谱研究 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(1): 287-290.
[8] 秦庆芳. HPLC 同时测定连花清瘟胶囊中绿原酸、连翘苷、大黄酸、大黄素和大黄酚的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(2): 210-213.
[9] 刘敏彦,赵韶华,张利康,等. UPLC 法同时测定连花清瘟胶囊中 5 种活性成分的含量 [J]. 中国药房, 2013, 24(44): 4201-4203.
[10] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925.
[11] 杨雯,张永州,杨本霞. 高效液相色谱-一测多评法测定肝爽颗粒中虎杖苷、白藜芦醇、氧化芍药苷、芍药苷和柴胡皂苷 a、b1、d [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(2): 285-290.
[12] 申琳,许桂玲,郝福,等. 一测多评法测定丹酚酸 A 原

- 料药中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 C [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(1): 32-36.
- [13] 孙云波, 陈育鹏, 张创峰, 等. 一测多评法同时测定连花清瘟胶囊中 7 个成分 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(7): 1128-1136.
- [14] 钱桂英, 钱云英, 吴晓明, 等. 超高效液相色谱-串联质谱结合化学计量学分析金银花中多组分含量 [J]. 山东科学, 2023, 36(5): 1-8.
- [15] 邓桃妹, 彭灿, 彭代银, 等. 甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2660-2676.
- [16] 景奉堂, 李峰, 张天屹, 等. 连翘的化学成分与生物活性的最新研究进展 [J]. 中药材, 2023, 46(1): 242-251.
- [17] 韩思琪, 哈伟, 师彦平, 等. 大黄及其有效成分抗炎作用的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 303-316.

[责任编辑 解学星]