UPLC-QAMS法同时测定连翘花中5种成分的含量Δ

倪素丽[1*]，董岳峰[2]［1.山西省药品审评中心（山西省医药与生命科学研究院），太原 030006；2.山西省药品检查中心，太原 030006］

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2023）15-1826-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.15.07

摘 要 目的 建立同时测定连翘花中芦丁、连翘酯苷A、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素5种成分的方法。**方法** 采用超高效液相色谱（UPLC）法进行检测。色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18}；流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液（梯度洗脱）；流速为0.3 mL/min；检测波长为275 nm（0～8 min）、330 nm（8～10.5 min）、275 nm（10.5～32 min）；柱温为25 ℃；进样量为1 μL。以芦丁为参照物，采用一测多评（QAMS）法计算各成分含量，并与外标法进行比较。**结果** QAMS法所得连翘花中连翘酯苷A、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素的含量分别为7.472～7.671、2.919～2.986、1.439～1.486、1.523～1.566 mg/g，外标法测定结果为7.454～7.664、2.913～2.996、1.444～1.484、1.519～1.562 mg/g，两种方法测定结果无明显差异，相对偏差＜1.0%。**结论** 本研究成功建立了UPLC-QAMS法同时测定连翘花中5种成分的含量，且该方法与外标法所得结果无明显差异，可用于连翘花的质量控制。

关键词 超高效液相色谱；一测多评法；连翘花；芦丁；连翘酯苷A；连翘苷；连翘脂素；（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷

Simultaneous determination of five components in *Forsythia suspensa* flower with UPLC-QAMS

NI Suli[1], DONG Yuefeng[2]［1. Shanxi Provincial Center for Drug Evaluation (Shanxi Academy of Medicine and Life Sciences), Taiyuan 030006, China; 2. Shanxi Provincial Center for Drug Inspection, Taiyuan 030006, China］

ABSTRACT OBJECTIVE To establish the methods for simultaneous determination of rutin, forsythiaside A, (+)-pinoresinol-4-*O*-*β*-D-glucopyranoside, forsythin and forsythigenin in *Forsythia suspensa* flower. **METHODS** UPLC method was adopted. The determination was performed on ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18} column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The detection wavelengths were set at 275 nm (0-8 min), 330 nm (8-10.5 min), 275 nm (10.5-32 min), respectively. The column temperature was 25 ℃, and sample size was 1 μL. Taking rutin as reference, the content of each component was determined by quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method, and then compared with external standard method. **RESULTS** The contents of forsythiaside A, (+)-pinoresinol-4-*O*-*β*-D-glucopyranoside, forsythin and forsythigenin by QAMS were 7.472-7.671, 2.919-2.986, 1.439-1.486, 1.523-1.566 mg/g; the results obtained by the external standard method were 7.454-7.664, 2.913-2.996, 1.444-1.484, 1.519-1.562 mg/g, respectively. There was no significant difference in the measurement results between the two methods, with a relative deviation less than 1.0%. **CONCLUSIONS** This study successfully establishes the UPLC-QAMS method for simultaneous determination of five components in *F. suspensa* flower, and the results obtained by this method are not significantly different from those obtained by the external standard method. It can be used for quality control of *F. suspensa* flower.

KEYWORDS UPLC; quantitative analysis of multi-components by single-marker method; *Forsythia suspensa* flower; rutin; forsythiaside A; forsythin; forsythigenin; (+)-pinoresinol-4-*O*-*β*-D-glucopyranoside

连翘花为木犀科植物连翘*Forsythia suspensa*（Thunb.）Vahl的干燥花[1]，具有清热解毒、消肿止痛的功效。山西是连翘的道地产地，在晋南及晋东南地区已形成了规模化种植，先后有安泽连翘、绛县连翘、平顺连翘、沁源连翘、陵川连翘等具有地理标志的道地药材。连翘于每年3－4月先长叶，后再开花，由于花期长、花量大，在其生长期需进行疏花以增加坐果率，但也因此导致大量的连翘花被舍弃，造成资源浪费。根据文献报道，连翘花具有保护线粒体、抗氧化、抗衰老、清除自由基等药理活性，主要含有芦丁、连翘酯苷A、连翘苷、齐墩果酸、熊果酸、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-葡萄吡喃糖苷、连

Δ**基金项目** 山西省重点研发计划项目（No.201903D221045）

＊**第一作者** 高级工程师，硕士。研究方向：中药学。E-mail：394483162@qq.com

翘脂素等成分[2－6]。为了提高连翘的综合利用价值，进一步开发连翘花的相关产品，有必要建立连翘花中主要化学成分的含量测定方法，以控制其质量。基于此，本研究采用超高效液相色谱（ultra-performance liquid chromatography，UPLC）-一测多评（quantitative analysis of multi-components by single marker，QAMS）法[7－9]测定连翘花中芦丁、连翘酯苷A、(+)-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素5种成分的含量，以期为连翘花的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

Acquity H-CLASS型超高效液相色谱仪、QSM四元泵、eλ光电二极管阵列检测器、EMPOWER3型色谱工作站均购自美国Waters公司；XS105型十万分之一分析天平购自瑞士Mettler Toledo公司。

1.2 主要药品与试剂

芦丁、连翘酯苷A、连翘苷对照品（批号分别为100080-202012、111810-202108、110821-202117）均购自中国食品药品检定研究院；连翘脂素对照品（批号200813）购自上海融禾医药科技发展有限公司；(+)-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷对照品（批号210103）购自上海羽朵生物科技有限公司；上述对照品纯度均不低于99.0%。甲醇、乙腈均为色谱纯，购自美国Thermo Fisher Scientific公司；其余试剂均为分析纯。连翘花采自山西省长治市屯留区、临汾市汾西县（共6批，编号S1～S6），经山西省药品审评中心（山西省医药与生命科学研究院）秦金山高级工程师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），以乙腈（A）-0.1%磷酸溶液（B）为流动相，进行梯度洗脱（0～5 min，15%A；5～15 min，15%A→30%A；15～25 min，30%A→50%A；25～30 min，50%A→60%A；30～32 min，60%A→15%A）；流速为0.3 mL/min；检测波长为275 nm（0～8 min）、330 nm（8～10.5 min）、275 nm（10.5～32 min）；柱温为25 ℃；进样量为1 μL。

2.2 供试品溶液的制备

取连翘花药材，粉碎成细粉，精密称取0.2 g，置于25 mL容量瓶中；精密加入70%甲醇20 mL，密塞，称定质量；超声（功率250 W，频率40 kHz）处理40 min，放冷，加甲醇至刻度，摇匀，用0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.3 对照品溶液的制备

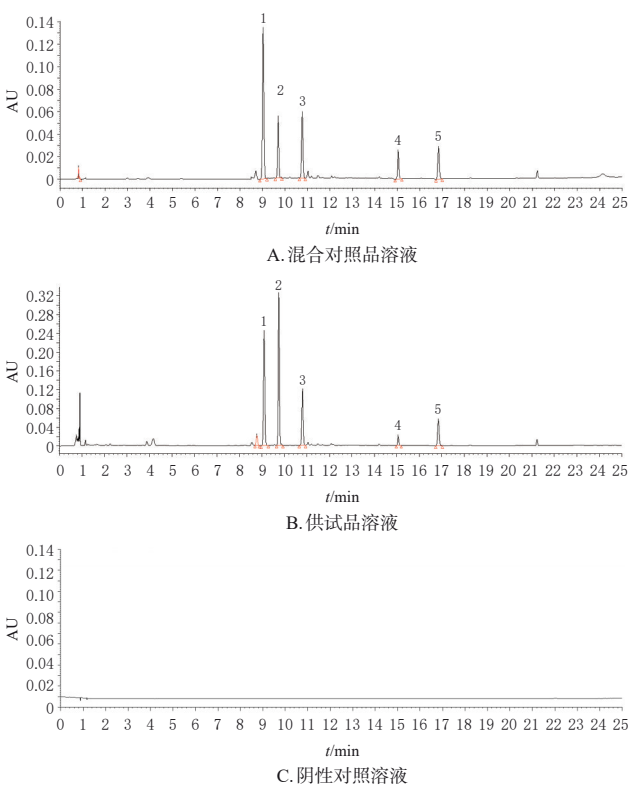
分别称取芦丁、连翘酯苷A、(+)-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素对照品适量，加80%甲醇制成上述成分质量浓度分别为0.950、1.050、1.180、1.822、1.270 mg/mL的单一对照品储备液。分别精密量取上述单一对照品储备液适量，置于同一10 mL量瓶中，加80%甲醇至刻度，即得上述成分质量浓度分别为95.0、105.0、118.0、182.2、63.5 μg/mL的混合对照品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备

按“2.2”项下方法制备缺连翘花的阴性对照溶液。

2.5 专属性试验

分别精密吸取“2.2～2.4”项下供试品溶液、混合对照品溶液及阴性对照溶液适量，按“2.1”项下色谱条件进样测定，结果显示，芦丁、连翘酯苷A、(+)-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素的保留时间分别为9.03、9.70、10.77、15.04、16.83 min，阴性对照溶液在相应位置无干扰，结果见图1。



A.混合对照品溶液　B.供试品溶液　C.阴性对照溶液

1：芦丁；2：连翘酯苷A；3：(+)-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷；4：连翘苷；5：连翘脂素。

图1 连翘花供试品溶液、混合对照品溶液及阴性对照溶液的色谱图

2.6 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液，加甲醇稀释成不同浓度的系列对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，以

峰面积为纵坐标（Y）、各成分质量浓度的进样量（μg）为横坐标（X），绘制标准曲线，得回归方程，具体见表1。

表1　各成分线性关系考察结果

成分	回归方程	线性范围/μg	r
芦丁	Y=619 169X+106.55	0.019～0.475	0.999 9
连翘酯苷A	Y=193 361X−48.637	0.021～0.525	0.999 9
（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷	Y=208 386X+75.509	0.023 6～0.590 0	0.999 9
连翘苷	Y=108 431X−129.51	0.018 2～0.455 0	0.999 9
连翘脂素	Y=215 386X+86.502	0.012 7～0.317 5	0.999 9

2.7　精密度试验

精密吸取混合对照品溶液适量，按“2.1”项下色谱条件连续进样6次，记录峰面积。结果显示，芦丁、连翘酯苷A、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素峰面积的RSD分别为0.53%、0.71%、0.67%、0.51%、0.62%（n=6），表明仪器精密度良好。

2.8　稳定性试验

取同一批连翘花，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，于室温放置0、2、4、6、8、10、12 h时，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果显示，芦丁、连翘酯苷A、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素峰面积的RSD分别为0.80%、0.92%、1.01%、0.91%、0.97%（n=7），表明供试品溶液在室温放置12 h内稳定性良好。

2.9　重复性试验

取同一批连翘花6份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法计算芦丁、连翘酯苷A、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素的含量。结果显示，上述5种成分的平均含量分别为2.060、7.595、2.969、1.471、1.548 mg/g，RSD分别为1.26%、1.14%、1.13%、1.25%、1.19%（n=6），表明该方法重复性良好。

2.10　加样回收率试验

取同一批连翘花6份，每份约0.1 g，分别精密加入“2.3”项下各成分对照品储备液0.2、0.6、0.2、0.1、0.1 mL，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算加样回收率。结果显示，各成分平均加样回收率分别为98.2%、97.3%、97.4%、96.8%、97.4%，RSD分别为1.50%、1.62%、1.82%、1.66%、1.96%（n=6）。

2.11　QAMS法的建立及应用

2.11.1　相对校正因子的计算

采用多点校正法[8]进行计算。精密吸取“2.3”项下混合对照品溶液，加甲醇稀释成不同质量浓度的系列对照品溶液，其中，芦丁质量浓度分别为21.0、52.5、105.0、157.5、210.0、420.0、525.0 μg/mL。以芦丁为参照物，分别计算连翘酯苷A、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素的相对校正因子（$f_{k/s}$）。具体计算公式为$f_{k/s}=C_sA_k/C_kA_s$，其中C_s为参照物质量浓度，A_s为参照物峰面积，C_k为待测成分质量浓度，A_k为待测成分峰面积。结果显示，连翘酯苷A、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素的平均相对校正因子为0.311、0.338、0.174、0.350，RSD分别为2.03%、1.99%、2.55%、2.36%（n=7）。

2.11.2　相对校正因子的重现性考察

以芦丁为参照物，按“2.11.1”项下方法，考察不同色谱柱条件对相对校正因子重现性的影响。结果显示，以ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）、ACQUITY UPLC BEH C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）、Zorbax SB-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱为条件，所得连翘酯苷A、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素的平均相对校正因子为0.313、0.343、0.176、0.352，RSD值分别为2.00%、2.07%、2.80%、2.39%（n=3），表明不同色谱柱对相对校正因子的影响较小。

2.11.3　待测成分色谱峰的定位

采用相对保留时间法[9－10]，以芦丁为基准峰，以各待测成分色谱峰与芦丁色谱峰的保留时间比值来确定，考察不同色谱柱ACQUITY UPLC BEH C_{18}、ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18}、Zorbax SB-C_{18}色谱柱，流动相A相比例变化±5%、B相比例变化±0.05%，柱温变化±5 ℃、检测波长变化±5 nm、流速变化±20%对相对保留时间的影响。结果显示，连翘酯苷A、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素的相对保留时间分别为1.073 0±0.012 9、1.110 0±0.013 4、1.395 0±0.013 9、1.118 0±0.013 1，RSD值分别1.20%、1.21%、0.10%、1.16%（n=13），表明该方法可对上述4种成分进行定位。

2.11.4　QAMS法与外标法测定结果的比较

分别精密吸取芦丁对照品溶液和连翘花供试品溶液适量，按“2.1”项下方法进样测定，记录芦丁、连翘酯苷A、（+）-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素峰面积，分别采用外标法和QAMS法计算5种成分的含量，并采用相对偏差（相对偏差＝|QAMS法含量－外标法含量|/外标法含量×100%）考察2种方法所得结果，具体见表2。由表2可知，两种方法计算所得各成分的含量无明显差异（相对偏差＜1.0%），表明外标法和QAMS法计算结果一致。

表2　两种方法测定结果比较

编号	芦丁		连翘酯苷A			(+)-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷			连翘苷			连翘脂素		
	QAMS法/(mg/g)	外标法/(mg/g)	QAMS法/(mg/g)	外标法/(mg/g)	相对偏差/%	QAMS法/(mg/g)	外标法/(mg/g)	相对偏差/%	QAMS法/(mg/g)	外标法/(mg/g)	相对偏差/%	QAMS法/(mg/g)	外标法/(mg/g)	相对偏差/%
S1	2.073	2.073	7.635	7.641	0.079	2.986	2.987	0.033	1.483	1.480	0.203	1.561	1.557	0.257
S2	2.052	2.052	7.534	7.521	0.173	2.945	2.940	0.170	1.461	1.457	0.275	1.530	1.533	0.196
S3	2.079	2.079	7.653	7.652	0.013	2.981	2.991	0.334	1.479	1.482	0.202	1.562	1.559	0.192
S4	2.066	2.066	7.643	7.638	0.065	2.979	2.986	0.234	1.481	1.479	0.135	1.550	1.557	0.450
S5	2.051	2.051	7.671	7.664	0.091	2.981	2.996	0.501	1.486	1.484	0.135	1.566	1.562	0.256
S6	2.071	2.071	7.472	7.454	0.241	2.919	2.913	0.206	1.439	1.444	0.346	1.523	1.519	0.263

3　讨论

芦丁、连翘酯苷A、(+)-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷、连翘苷、连翘脂素5个成分为连翘花的主要活性成分，均具有良好的抗炎、抗氧化、抑菌、保肝、抗肿瘤等药理活性[11—13]。因此，笔者将这5种成分作为连翘花的质量控制指标进行考察。另外笔者根据相关报道[7]，也拟将连翘花中绿原酸、咖啡酸、牛蒡苷、金丝桃苷等成分作为质量控制指标，但是结果发现，这几种成分在本研究色谱条件下未检出，故本研究最终选择芦丁、连翘酯苷A、(+)-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷等5种成分进行含量测定。

本研究前期也比较了相对保留时间和保留时间差值两种方法对待测成分色谱峰定位的影响，结果发现，保留时间差值法对保留时间较长的成分的定位有优势，而相对保留时间法对与芦丁保留时间较为接近的成分定位更好，因此本研究选择相对保留时间法进行定位。本研究进一步采用QAMS法和外标法计算连翘酯苷A、(+)-松脂素-4-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷等成分的含量发现，两种方法所得含量结果无明显差异，相对偏差＜1.0%。

综上所述，本研究成功建立了UPLC-QAMS法同时测定连翘花中5种成分的含量，且该方法与外标法所得结果无明显差异，可用于连翘花的质量控制。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：177.

[2] 白美美，李丹凤，李石飞，等. 连翘花中抑制酪氨酸酶活性成分研究[J]. 天然产物研究与开发，2017，29(10)：1688-1694.

[3] 樊雪艳，李丹凤，李石飞，等. 连翘花美白活性有效部位的筛选及其成分分析[J]. 化学研究与应用，2018，30(6)：887-892.

[4] 葛莉，姚园园，康天兰，等. 不同收获期贯叶连翘花中抗氧化能力、主要活性物质变化及挥发性组分分离鉴定[J]. 草业学报，2017，26(9)：66-74.

[5] 李兴泰，李洪成，刘泽. 连翘花醇提物保护线粒体及抗氧化研究[J]. 中成药，2009，31(6)：839-843.

[6] 原江锋，胡金婉，王大红，等. 不同产地连翘叶花中主要活性成分的含量分析[J]. 天然产物研究与开发，2020，32(3)：389-397.

[7] 何兵，杨世艳，张燕. 一测多评中待测成分校正和定位的新方法研究[J]. 药学学报，2012，47(12)：1653-1659.

[8] 仝立国，牛艳艳，王若瑜，等. 一测多评法同时测定扶正固本颗粒中6种成分的含量[J]. 中国药房，2021，32(2)：225-230.

[9] 李洪彬，赵兴奎，王静. HPLC一测多评法同时测定金蓝清瘟合剂中8种成分含量[J]. 药学与临床研究，2020，28(2)：105-109.

[10] 杨梦婷，王相，王倩，等. 不同干燥方式对连翘花主要成分的影响[J]. 中国药房，2021，32(8)：921-926.

[11] 付鹏亮，王东强，李志军. 连翘酯苷药理作用研究进展[J]. 长春中医药大学学报，2011，27(6)：1062-1063.

[12] 郭健敏，富力，秦丽莉，等. 连翘苷体内外抗病毒及解热作用机制[J]. 中国药理学通报，2022，38(8)：1170-1175.

[13] 王柏方. 连翘脂素制备工艺及抗氧化活性研究[D]. 太原：山西大学，2020.

（收稿日期：2023-02-21　修回日期：2023-06-29）

（编辑：唐晓莲）