

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)09-0081-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.09.016



二极管阵列检测 - 高效液相色谱法同时测定小儿肺热咳喘颗粒中 5 种成分含量

刘会艳

(河南省鹤壁市药品检验检测中心, 河南 鹤壁 458030)

摘要:目的 建立同时测定小儿肺热咳喘颗粒中绿原酸、黄芩苷、连翘酯苷 A、连翘苷和甘草酸含量的二极管阵列检测 - 高效液相色谱(DAD-HPLC)法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长分别为 325 nm(绿原酸、黄芩苷、连翘酯苷 A)、203 nm(连翘苷)、250 nm(甘草酸), 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。结果 绿原酸、黄芩苷、连翘酯苷 A、连翘苷、甘草酸的质量浓度分别在 2.87~28.72 μg/mL、9.14~91.36 μg/mL、7.77~77.74 μg/mL、1.92~19.18 μg/mL、0.11~1.12 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 = 0.999 2, n = 6$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0% ($n = 6$); 平均加样回收率分别为 102.01%, 105.40%, 105.40%, 94.24%, 92.50%, RSD 分别为 1.65%, 0.82%, 1.70%, 0.94%, 1.08% ($n = 6$)。3 批样品中上述 5 种成分的平均含量分别为 0.826 2, 2.674 2, 2.046 9, 0.516 7, 0.044 1 mg/g ($n = 2$)。结论 该方法操作简便、结果准确、专属性和重复性均良好, 可用于同时测定小儿肺热咳喘颗粒中 5 种成分的含量。

关键词: 二极管阵列检测 - 高效液相色谱法; 小儿肺热咳喘颗粒; 绿原酸; 黄芩苷; 连翘酯苷 A; 连翘苷; 甘草酸; 含量测定

Simultaneous Determination of Five Components in Xiao'er Feire Kechuan Granules by DAD - HPLC

LIU Huiyan

(Hebi Drug Inspection and Testing Center, Hebi, Henan 458030, China)

Abstract: Objective To establish a diode array detector - high performance liquid chromatography (DAD - HPLC) method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin, forsythoside A, phillyrin, and glycyrrhizic acid in Xiao'er Feire Kechuan Granules. **Methods** The chromatographic column was Agilent Zorbax SB - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 325 nm for chlorogenic acid, baicalin, and forsythoside A, 203 nm for phillyrin, and 250 nm for glycyrrhizic acid, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of chlorogenic acid, baicalin, forsythoside A, phillyrin, and glycyrrhizic acid were 2.87 - 28.72 μg/mL, 9.14 - 91.36 μg/mL, 7.77 - 77.74 μg/mL, 1.92 - 19.18 μg/mL, and 0.11 - 1.12 μg/mL ($R^2 = 0.999 2, n = 6$), respectively. The RSDs of the precision, stability, and repeatability tests were all lower than 2.0% ($n = 6$). The average recoveries of chlorogenic acid, baicalin, forsythoside A, phillyrin, and glycyrrhizic acid were 102.01%, 105.40%, 105.40%, 94.24%, and 92.50%, with RSDs of 1.65%, 0.82%, 1.70%, 0.94%, and 1.08% ($n = 6$), respectively. The average contents of the above five components in the three batches of samples were 0.826 2,

第一作者: 刘会艳, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药品检验检测, (电子信箱)249431659@qq.com。

Journal of Chromatographic Science, 2018, 56(7): 619 - 635.

[16] TANG L, ZHAO HQ, YANG H, et al. Spectrum - effect relationship combined with bioactivity evaluation to discover the main anxiolytic active components of Baihe Dihuang decoction [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 319(Pt 1): 117090.

[17] JIA XM, SUN SL, ZHANG Q, et al. Screening and Capability Assessment of Tyrosinase Inhibitors in Isodon excisoides by Ultrafiltration Coupled with UHPLC - Q - TOF - MS and Molecular Docking Technology [J]. Chemistry & Biodiversity, 2022, 19(12): e202200748.

[18] CHEN Y, SONG SS, WANG YF, et al. Potential mechanism of oral baicalin treating psoriasis via suppressing Wnt signaling pathway and inhibiting Th17/IL - 17 axis by activating PPARγ [J]. Phytotherapy Research, 2022, 36(10): 3969 - 3987.

[19] SABRY K, JAMSHIDI Z, EMAMI SA, et al. Potential therapeutic effects of baicalin and baicalein [J]. Avicenna Journal of Phytomedicine, 2024, 14(1): 23 - 49.

[20] MISHRA KK, KAUR CD, SINGH S, et al. Assessing the Efficacy of Berberine Hydrochloride - loaded Transethosomal Gel System in Treating Dermatophytosis Caused by *Trichophyton rubrum* in *ex - vivo*, *in - vitro* and *in - vivo* Models [J]. Current Drug Research Reviews, 2024, 16(3): 412 - 422.

[21] ZHENG Q, LI S, LI XJY, et al. Advances in the study of emodin: an update on pharmacological properties and mechanistic basis [J]. Chinese Medicine, 2021, 16(1): 102.

[22] YUN Z, ZOU ZY, SUN SF, et al. Chlorogenic acid improves food allergy through the AMPK/ACC/CPT - 1 pathway [J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(12): e14505.

(收稿日期: 2025 - 07 - 02; 修回日期: 2025 - 12 - 30)

2.674 2, 2.046 9, 0.516 7, and 0.044 1 mg / g ($n = 2$), respectively. **Conclusion** This method is simple, accurate, specific, and reproducible, which can be used for the simultaneous determination of five components in Xiao'er Feire Kechuan Granules.

Key words: DAD - HPLC; Xiao'er Feire Kechuan Granules; chlorogenic acid; baicalin; forsythoside A; phyllirin; glycyrrhizic acid; content determination

小二肺热咳喘颗粒由经典名方麻杏石甘汤、白虎汤、银翘散加减组成,由麻黄、黄芩、连翘、金银花、鱼腥草、甘草等11味中药材组方,具有清热解毒、宣肺止咳、化痰平喘功效,现行质量标准为《中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂(第十八册)》(WS₃-B-3361-98)^[1]。该制剂中所含药味较多,工艺烦琐,各种成分相互作用,但现行质量标准仅有性状、鉴别及检查项,无含量测定项^[1]。其中,绿原酸是金银花和鱼腥草的有效活性成分^[2-3],黄芩苷是黄芩的有效活性成分^{[4]323-324, [5-6]},连翘酯苷A和连翘苷是连翘的有效活性成分^{[4]183-184, [7-9]},甘草酸是甘草的有效活性成分^{[4]91-92, [10]}。故本研究中建立了同时测定小儿肺热咳喘颗粒中绿原酸、黄芩苷、连翘酯苷A、连翘苷和甘草酸含量的二极管阵列检测-高效液相色谱(DAD-HPLC)法,为小儿肺热咳喘颗粒的质量控制和质量标准提高提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,配有在线脱气机、DAD仪等(日本Shimadzu公司);AE240型电子天平(瑞士Mettler Toled公司,精度为万分之一);SK2510HP型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司,功率为250 W,频率为53 kHz)。

1.2 试剂

小儿肺热咳喘颗粒(黑龙江葵花药业股份有限公司,批号分别为23060173, 23090693, 22111233);绿原酸对照品(批号为110753-202119,含量为96.3%),黄芩苷对照品(批号为110715-202122,含量为94.2%),连翘酯苷A对照品(批号为111810-202209,含量为96.4%),连翘苷对照品(批号为110821-202318,含量为95.8%),甘草酸铵对照品(批号为110731-202122,含量为94.4%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇(色谱纯,德国Merck公司);实验用水为娃哈哈纯净水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:为乙腈-0.1%磷酸水溶液^[11-13],梯度洗脱(0~15 min时5%A, 15~20 min时5%A→15%A, 20~35 min时15%A, 35~40 min时15%A→25%A,

40~55 min时25%A, 55~60 min时25%A→37%A, 60~70 min时37%A, 70~75 min时37%A→5%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:325 nm(绿原酸、黄芩苷、连翘酯苷A)^[14], 203 nm(连翘苷), 250 nm(甘草酸)^[15];柱温:25℃^[16];进样量:10 μL。各检测成分均达到基线分离,分离度均大于1.5。

2.2 溶液制备

取绿原酸、黄芩苷、连翘酯苷A、连翘苷和甘草酸铵对照品各适量,精密称定,加70%甲醇制成绿原酸、黄芩苷、连翘酯苷A、连翘苷和甘草酸质量浓度分别为14.36, 45.68, 38.87, 9.59, 0.56 μg/mL的混合对照品溶液。

取样品1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再称定质量,加70%甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

按样品制备工艺和药材比例,分别制备缺金银花和鱼腥草、黄芩、连翘、甘草的阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

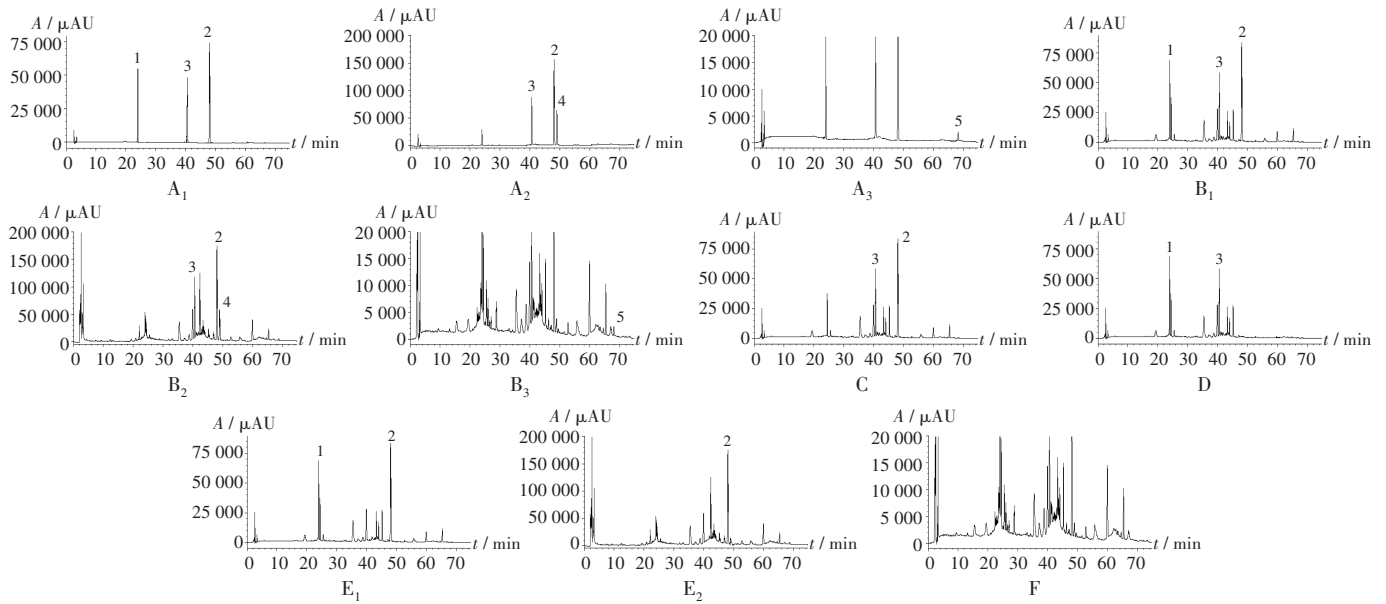
专属性试验:分别取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2项下混合对照品溶液2, 4, 6, 8, 10, 20 μL,按2.1项下色谱条件下进样测定,以峰面积为纵坐标(Y)、待测成分质量浓度为横坐标(X, μg/mL)进行线性回归。结果见表1,表明各待测成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果见表1,表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批样品(批号为23060173)适量,精密称定,平行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,并按外标法计算含量。结果见表1,表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批样品(批号为23060173)适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于



1. 绿原酸 2. 黄芩苷 3. 连翘酯苷A 4. 连翘苷 5. 甘草酸

A₁ - A₃, 混合对照品溶液(325,203,250 nm) B₁ - B₃, 供试品溶液(325,203,250 nm) C. 缺金银花和鱼腥草阴性对照品溶液(325 nm)
D. 缺黄芩阴性对照品溶液(325 nm) E₁ - E₂, 缺连翘阴性对照品溶液(325,203 nm) F. 缺甘草阴性对照品溶液(250 nm)

图1 高效液相色谱图

1. Chlorogenic acid 2. Baicalin 3. Forsythoside A 4. Phillyrin 5. Glycyrrhizic acid

A₁ - A₃, Mixed reference solution (325,203,250 nm) B₁ - B₃, Test solution (325,203,250 nm) C. Negative reference solution lacking Lonicerae Japonicae Flos and Houttuyniae Herba (325 nm) D. Negative reference solution lacking Scutellariae Radix (325 nm) E₁ - E₂, Negative reference solution lacking Forsythiae Fructus (325,203 nm) F. Negative reference solution lacking Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (250 nm)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 方法学考察结果(n=6)

Tab. 1 Results of the methodological investigation (n=6)

成分	回归方程	R ²	线性范围 (μg/mL)	RSD(%)		
				精密度 试验	重复性 试验	稳定性 试验
绿原酸	$Y = 24.955X + 71.865.00$	0.999 2	2.87~28.72	1.21	1.05	1.16
黄芩苷	$Y = 91.741X - 1.589.70$	0.999 9	9.14~91.36	0.80	0.62	0.86
连翘酯苷A	$Y = 35.443X + 106.670.00$	0.999 2	7.77~77.74	1.12	1.45	1.65
连翘苷	$Y = 88.340X - 7.429.00$	0.999 9	1.92~19.18	0.76	0.89	0.94
甘草酸	$Y = 2.069.5X - 365.31$	0.999 2	0.11~1.12	1.35	1.63	1.82

室温放置0, 6, 12, 24, 36, 48 h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果见表1, 表明供试品溶液室温放置48 h内稳定性良好。

加样回收试验: 取已知5种成分含量的样品(批号为23060173)0.5 g, 精密称定, 平行6份, 分别按100%比例加入混合对照品溶液适量, 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, 并计算回收率。结果见表2, 表明方法准确度良好。

2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为23060173, 23090693, 22111233)样品各适量, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 各平行2份, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 按外

标法计算含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 提取条件优化

为考察不同提取条件对提取效果的影响, 前期试验中曾考察了不同提取溶剂(甲醇、乙醇、70%甲醇、70%乙醇)的提取效果, 结果提取溶剂为70%甲醇时的提取效果最好, 故提取溶剂选择70%甲醇; 不同提取方法(加热回流提取、超声提取)中, 超声提取操作更简便, 成分损耗更少, 故提取方法选择超声提取; 不同超声处理时间(20, 30, 45, 60 min)中, 超声处理30 min后, 测得结果相差较小, 故选择超声处理30 min。

3.2 流动相体系选择

HPLC法常用流动相有甲醇体系和乙腈体系, 本研究中分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相体系的效果。结果显示, 有机溶剂选择甲醇时基线不稳, 色谱峰较宽且峰形不好; 选择乙腈时基线平稳, 色谱峰窄且峰形好, 分离度高。故选择乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相。由于供试品溶液中所含成分较多, 故流动相洗脱方式选择梯度洗脱。预试验中供试品溶液色谱峰多且堆叠严重, 待测成分色谱峰分离度欠佳, 经过不断调整, 乙腈体积分数由5%分段逐渐过渡到

表2 加样回收试验结果 (n = 6)
Tab. 2 Results of the recovery test (n = 6)

成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
绿原酸	0.501 2	0.430 00	0.359 0	0.802 90	103.87	102.01	1.65
	0.500 7	0.429 60	0.359 0	0.803 00	104.01		
	0.501 5	0.430 30	0.359 0	0.790 60	100.36		
	0.502 1	0.430 80	0.359 0	0.797 20	102.06		
	0.500 2	0.429 20	0.359 0	0.788 30	100.03		
	0.501 3	0.430 10	0.359 0	0.795 40	101.75		
黄芩苷	0.501 2	1.258 00	1.142 0	2.479 00	106.92	105.40	0.82
	0.500 7	1.257 00	1.142 0	2.451 00	104.55		
	0.501 5	1.259 00	1.142 0	2.468 00	105.87		
	0.502 1	1.260 00	1.142 0	2.458 00	104.90		
	0.500 2	1.255 00	1.142 0	2.456 00	105.17		
	0.501 3	1.258 00	1.142 0	2.457 00	104.99		
连翘酯苷A	0.501 2	1.023 00	0.972 0	2.063 00	107.00	105.40	1.70
	0.500 7	1.022 00	0.972 0	2.041 00	104.84		
	0.501 5	1.023 00	0.972 0	2.070 00	107.72		
	0.502 1	1.025 00	0.972 0	2.023 00	102.67		
	0.500 2	1.021 00	0.972 0	2.039 00	104.73		
	0.501 3	1.023 00	0.972 0	2.048 00	105.45		
连翘苷	0.501 2	0.257 10	0.240 0	0.481 90	93.67	94.24	0.94
	0.500 7	0.256 90	0.240 0	0.482 50	94.00		
	0.501 5	0.257 30	0.240 0	0.481 60	93.46		
	0.502 1	0.257 60	0.240 0	0.486 20	95.25		
	0.500 2	0.256 60	0.240 0	0.485 70	95.46		
	0.501 3	0.257 20	0.240 0	0.481 80	93.58		
甘草酸	0.501 2	0.015 29	0.014 0	0.028 42	93.79	92.50	1.08
	0.500 7	0.015 27	0.014 0	0.028 17	92.14		
	0.501 5	0.015 30	0.014 0	0.028 40	93.57		
	0.502 1	0.015 31	0.014 0	0.028 22	92.21		
	0.500 2	0.015 26	0.014 0	0.028 16	92.14		
	0.501 3	0.015 29	0.014 0	0.028 05	91.14		

表3 3批样品中5种成分含量测定结果(mg/g, n = 2)

Tab. 3 Results of the content determination of five components in three batches of samples (mg/g, n = 2)

批号	绿原酸	黄芩苷	连翘酯苷A	连翘苷	甘草酸
23060173	0.858 0	2.510 0	2.040 0	0.513 0	0.029 9
23090693	0.758 1	2.658 4	1.965 8	0.503 4	0.055 0
22111233	0.862 4	2.854 3	2.135 0	0.533 6	0.047 3
\bar{X}	0.826 2	2.674 2	2.046 9	0.516 7	0.044 1

37%，洗脱时间由最初的20 min延长至75 min，虽所需时间较长，但各成分的出峰顺序较均匀、无堆叠，待测成分分离度好。因此，最终确定2.1项下梯度洗脱条件。

3.3 检测波长选择

通过紫外光谱扫描发现，绿原酸、连翘酯苷A、黄芩

苷在325 nm波长处均有较大吸收，故选择325 nm为这3种成分的检测波长；考虑黄芩苷和连翘苷的出峰时间接近且相互干扰，203 nm波长处黄芩苷的吸收少，连翘苷的吸收较大，且两者分离度更好，故选择203 nm为连翘苷的检测波长；甘草酸在250 nm波长处的吸收较大，且受杂质干扰较小，故选择250 nm为甘草酸的检测波长。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、结果准确、专属性和重复性均良好，可用于同时测定小儿肺热咳喘颗粒中5种成分的含量。

参考文献

- [1] WS₃-B-3361-98, 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂(第十八册)[S].
- [2] 刘晓龙, 李春燕, 薛金涛. 金银花主要活性成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2021, 38(10): 992-995.
- [3] 李阳昱, 李庆蓉, 陈孝红, 等. 绿原酸抗菌作用及机制的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2024, 49(2): 141-150.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025.
- [5] 王志国, 钟宛澎, 许传杰. 黄芩苷抗流感病毒的作用机制研究进展[J]. 现代药物与临床, 2024, 39(11): 2983-2987.
- [6] 刘晓龙, 李春燕, 陈奇剑, 等. 黄芩主要活性成分和药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2023, 40(10): 979-985.
- [7] 张淑蓉, 裴香萍, 闫艳, 等. 不同采收期青翘和连翘叶中活性成分的含量比较[J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2940-2942.
- [8] 张学人. 中药提取物连翘酯苷A对内毒素血症小鼠的免疫调节作用及相关机制研究[J]. 中医药导报, 2016, 22(21): 57-60.
- [9] 胡秋芳, 李凡敏. 连翘苷对呼吸道合胞病毒感染小鼠的治疗作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(15): 2202-2206.
- [10] 蔺世会, 顾华丽, 赵唐敏, 等. 甘草酸对卒中相关性肺炎小鼠肺组织炎性损伤的作用[J]. 青岛大学学报(医学版), 2024, 60(6): 879-882.
- [11] 倪文琳, 汤瑜晨, 韩玉涛, 等. 基于液相指纹图谱结合多成分含量测定的小儿肺热咳喘颗粒质量评价[J]. 中南药学, 2023, 21(1): 203-207.
- [12] 胡英婕, 王磊, 朱冬冬. HPLC同时测定小儿肺热咳喘口服液液中10个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(2): 243-252.
- [13] 华杰, 刘洋, 吴建明, 等. 温经汤物质基准高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业, 2024, 33(22): 99-102.
- [14] 张朋, 李怀伟, 王素香, 等. HPLC同时测定小儿肺热咳喘颗粒中3种成分的含量[J]. 中国标准化, 2023(24): 164-168.
- [15] 俞永梅, 牟娜, 张平. HPLC-DAD法同时测定小儿肺热咳喘口服液液中9个成分[J]. 中成药, 2013, 35(4): 709-713.
- [16] 崔俊凤, 崔帅, 梁秀坤, 等. 小儿热速清口服液 HPLC 指纹图谱的建立及多指标成分的含量测定[J]. 中国药房, 2024, 35(7): 801-806.

(收稿日期: 2024-11-21; 修回日期: 2025-12-19)