

## HPLC同时测定复方双花咀嚼片中5个成分

谭高好<sup>1</sup>, 杜莹<sup>2</sup>, 乙引<sup>3</sup>, 田红红<sup>3</sup>, 杨建华<sup>4</sup>, 郭丽<sup>3</sup>, 伍庆<sup>1\*</sup>

(1. 贵州师范大学山地环境重点实验室, 贵阳 550001;

2. 贵州师范大学化学与材料科学学院, 贵阳 550001; 3. 贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550001;

4. 贵州康纳圣方药业有限公司, 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的:建立 RP-HPLC 同时测定复方双花咀嚼片中绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的方法。方法:采用 RP-HPLC 法,依利特 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸(B),梯度洗脱(0~8 min, 4%~13% A; 8~24 min, 13%~14% A; 24~25 min, 14%~26% A; 25~65 min, 26%~33% A; 65~70 min, 33%~50% A),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 240 nm,柱温 30 ℃。结果:绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯分别在 0.282 5~2.825 0 μg ( $r=0.999 5$ ), 0.086 8~0.867 5 μg ( $r=0.999 7$ ), 0.480 0~4.800 0 μg ( $r=0.999 5$ ), 0.158 8~1.587 5 μg ( $r=0.999 5$ ), 0.148 8~1.487 5 μg ( $r=0.999 4$ ) 呈良好的线性关系,平均回收率分别为 97.3%, RSD 1.2%; 97.8%, RSD 1.1%; 98.9%, RSD 1.4%; 97.6%, RSD 1.0%; 99.0%, RSD 1.5%。结论:该方法简洁、可靠、专属性强,可用于复方双花咀嚼片的质量控制。

**[关键词]** 复方双花咀嚼片; 绿原酸; 咖啡酸; 连翘苷; 穿心莲内酯; 脱水穿心莲内酯

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0040-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010040

## Simultaneous Determination of Five Effective Components in Fufang Shuanghua Jujuepian by HPLC

TAN Gao-hao<sup>1</sup>, DU Ying<sup>2</sup>, YI Yin<sup>3</sup>, TIAN Hong-hong<sup>3</sup>, YANG Jian-hua<sup>4</sup>, GUO Li<sup>3</sup>, WU Qing<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Mountain Environment, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;

2. School of Chemistry and Materials Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;

3. School of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;

4. Guizhou Kinglion Senfon Pharmaceutical Co. Ltd., Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a RP-HPLC method for simultaneously determining the contents of chlorogenic acid, caffeic acid, forsythoside, andrographalide and dehydroandrographalide in Fufang Shuanghua Jujuepian. **Method:** RP-HPLC was carried out on a hypersil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was A (acetonitrile) -B (0.2% formic acid) in the gradient elution mode (0-8 min, 4%-13% A; 8-24 min, 13%-14% A; 24-25 min, 14%-26% A; 25-65 min, 26%-33% A; 65-70 min, 33%-50% A). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was set at 240 nm. The column temperature was maintained at 30 ℃. **Result:** The calibration curves of chlorogenic acid, caffeic acid, forsythoside, andrographalide and dehydroandrographalide were in good linearity within the range of 0.282 5-2.825 0 μg ( $r=0.999 5$ ), 0.086 8-0.867 5 μg ( $r=0.999 7$ ), 0.480 0-4.800 0 μg ( $r=0.999 5$ ), 0.158 8-1.587 5 μg ( $r=0.999 5$ ), 0.148 8-1.487 5 μg ( $r=0.999 4$ ) and the average recoveries were 97.3% (RSD of 1.2%), 97.8% (RSD of 1.1%),

**[收稿日期]** 20150329(004)

**[基金项目]** 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2012101]12号,黔教合协同创新字[2014]04)

**[第一作者]** 谭高好,在读硕士,从事中药质量控制工作, Tel:18111890664, E-mail:tangaohao@126.com

**[通讯作者]** \* 伍庆,教授,硕士生导师,从事分析化学方向研究, Tel:13984029735, E-mail:wq0851@126.com

98.9% (RSD of 1.4%), 97.6% (RSD of 1.0%), 99.0% (RSD of 1.5%)。 **Conclusion:** The method is simple, reliable and specific, and can be applied for quality control of Fufang Shuanghua Jujuepian.

[ **Key words** ] Fufang Shuanghua Jujuepian; chlorogenic acid; caffeic acid; forsythoside; andrographolide; dehydroandrographolide

复方双花咀嚼片是由连翘、金银花、穿心莲等药材组成,具有清热解毒、利咽消肿等功效,临床用于治疗风热外感、风热乳蛾等<sup>[1]</sup>。连翘苷具有较强的抗菌、抗炎的活性,是连翘药材的主要成分<sup>[2-4]</sup>。绿原酸和咖啡酸具有抗菌消炎、降血脂、保肝利胆等多种功效,金银花、连翘和穿心莲中均含有<sup>[5-8]</sup>。穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯为穿心莲药材活性成分,药理学证明其具有清热解毒、凉血消肿等功效<sup>[9-12]</sup>。综上所述 5 个成分均与本方主治功能相符,为该制剂有效成分。而现标准中仅收载绿原酸含量测定项<sup>[13]</sup>,该方中成分复杂,为了有效控制制剂的整体质量,保证临床用药的规范和有效性。本实验参考相关文献<sup>[14-16]</sup>,采用 RP-HPLC 同时测定复方双花咀嚼片中连翘苷、绿原酸、咖啡酸、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯,为更好地控制该制剂的质量提供了依据。

## 1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(包括在线脱气机、四元泵、自动进样器和 DAD 检测器,Agilent 色谱工作站,安捷伦科技有限公司),CH-250 型超声波清洗机(北京创新德超声电子研究所),AL-204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多)。

绿原酸(批号 110753-200212),咖啡酸(批号 110885-200102),连翘苷(批号 110821-200406),穿心莲内酯(批号 110797-200307),脱水穿心莲内酯(批号 0854-200204)对照品均购于中国食品药品检定研究院;复方双花咀嚼片样品由贵州康纳圣方药业有限公司提供(批号 20131201, 20140501, 20140502),甲醇、乙腈色谱纯,水为自制超纯水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 依利特 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸(B)梯度洗脱(0 ~ 8 min, 4% ~ 13% A; 8 ~ 24 min, 13% ~ 14% A; 24 ~ 25 min, 14% ~ 26% A; 25 ~ 65 min, 26% ~ 33% A; 65 ~ 70 min, 33% ~ 50% A),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,检测波长 240 nm,进样量 10 μL。

**2.2 对照品溶液** 精密称取绿原酸、咖啡酸、连翘

苷、穿心莲内酯及脱水穿心莲内酯对照品适量,加甲醇溶解制成质量浓度分别为 1.88, 1.98, 1.92, 2.82, 1.70 g·L<sup>-1</sup> 的对照品贮备液。精密移取上述对照品贮备液适量,用甲醇稀释成质量浓度分别为 0.113, 0.034 7, 0.192, 0.063 5, 0.059 5 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

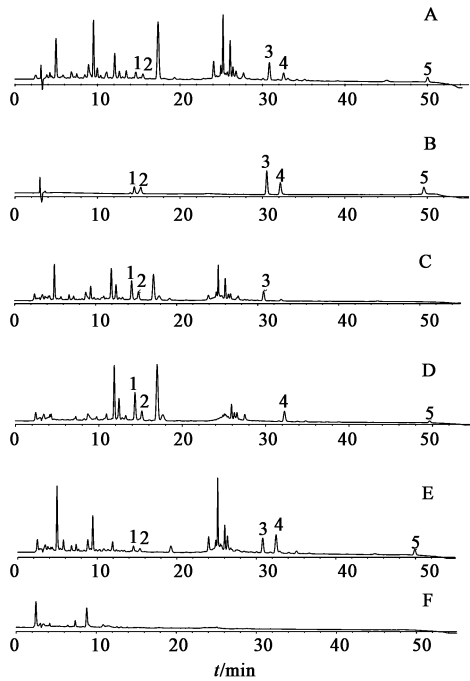
**2.3 供试品溶液** 取本品适量,研细,取约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 50 mL,密塞,称定质量;超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

**2.4 阴性供试品溶液** 参照制剂的工艺流程,按处方比例分别制备缺连翘药材的阴性样品、缺穿心莲药材的阴性样品、缺金银花和缺金银花、连翘、穿心莲的阴性样品,按 2.3 项下方法操作,制备阴性供试品溶液。

**2.5 系统适应性试验** 精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样,记录色谱图,结果绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的理论塔板数均不低于 5 000,各峰分离度均不低于 1.5,且阴性对照无干扰,对照品、样品与阴性样品的色谱图见图 1。

**2.6 线性关系试验** 精密吸取 2.2 项下绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯混合对照品溶液 2.5, 5, 10, 15, 25 μL 进样测定,记录峰面积。以各对照品峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X, μg)为横坐标进行线性回归,得回归方程分别为  $Y_{\text{绿原酸}} = 38.725X + 65.688 (r = 0.999 5)$ ,  $Y_{\text{咖啡酸}} = 38.578X + 63.259 (r = 0.999 7)$ ,  $Y_{\text{连翘苷}} = 115.47X + 189.51 (r = 0.999 5)$ ,  $Y_{\text{穿心莲内酯}} = 69.756X + 112.76 (r = 0.999 5)$ ,  $Y_{\text{脱水穿心莲内酯}} = 45.782X + 85.639 (r = 0.999 4)$ ,结果表明绿原酸在 0.282 5 ~ 2.825 0 μg,咖啡酸在 0.086 8 ~ 0.867 5 μg,连翘苷在 0.480 0 ~ 4.800 0 μg,穿心莲内酯在 0.158 8 ~ 1.587 5 μg,脱水穿心莲内酯在 0.148 8 ~ 1.487 5 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

**2.7 精密度试验** 精密吸取同一混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次测定,结果绿原



A. 样品; B. 对照品; C. 缺穿心莲阴性样品; D. 缺连翘阴性样品; E. 缺金银花阴性样品; F. 缺穿心莲、连翘及金银花阴性样品; 1. 绿原酸; 2. 咖啡酸; 3. 连翘苷; 4. 穿心莲内酯; 5. 脱水穿心莲内酯

图 1 复方双花咀嚼片 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Fufang Shuanghua Jujiaopian

酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰面积的 RSD 分别为 1.9%, 2.6%, 1.3%, 1.1%, 1.8%, 表明仪器精密度良好。

**2.8 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 各进样 10  $\mu$ L 测定, 结果绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.8%, 1.6%, 1.3%, 1.6%, 表明供试品在 10 h 内稳定性良好。

**2.9 重复性试验** 取同一批 (20140501) 复方双花咀嚼片样品, 按 2.3 项下的方法平行制备 6 份供试品溶液, 在 2.1 项色谱条件下进行分析。结果绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯峰面积的 RSD 分别为 1.9%, 2.4%, 0.9%, 1.5%, 1.3%, 表明该方法具有较好重复性。

**2.10 回收率试验** 精密称取已知含量的复方双花咀嚼片 (批号 20140501) 9 份, 每份约 0.15 g, 置 50 mL 量瓶中, 分别精密加入 2.2 项下各对照品贮备液适量, 照 2.3 项下方法制得加样供试品溶液, 在 2.1 项色谱条件下进行测定, 计算各成分的加样回收率和 RSD, 结果见表 1。

表 1 复方双花咀嚼片中 5 种成分的加样回收率试验

Table 1 Result of recovery of Fufang Shuanghua Jujiaopian

成分	称样量	样品中量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
	/g	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
绿原酸	0.151 2	1.091	0.865	1.935	97.6	97.3	1.2
	0.153 2	1.106	0.865	1.954	98.1		
	0.152 8	1.103	0.865	1.949	97.8		
	0.151 6	1.094	1.072	2.157	99.2		
	0.154 4	1.114	1.072	2.146	96.3		
	0.157 6	1.138	1.072	2.185	97.7		
	0.152 3	1.099	1.297	2.365	97.6		
	0.153 7	1.109	1.297	2.355	96.0		
	0.152 7	1.102	1.297	2.338	95.3		
	0.154 4	0.269	0.257	0.524	99.1		
咖啡酸	0.151 2	0.263	0.198	0.455	96.8	97.8	1.1
	0.153 2	0.266	0.198	0.459	97.3		
	0.152 8	0.266	0.198	0.458	97.1		
	0.151 6	0.264	0.257	0.520	99.6		
	0.154 4	0.274	0.257	0.525	97.4		
	0.152 3	0.265	0.317	0.577	98.5		
	0.153 7	0.267	0.317	0.573	96.5		
	0.152 7	0.266	0.317	0.577	98.2		
	0.154 4	1.638	1.594	3.216	99.0		
	0.157 6	1.672	1.5934	3.246	98.8		
连翘苷	0.151 2	1.604	1.267	2.842	97.7	98.9	1.4
	0.153 2	1.625	1.267	2.866	97.9		
	0.152 8	1.621	1.267	2.847	96.8		
	0.151 6	1.608	1.594	3.178	98.5		
	0.154 4	1.638	1.594	3.216	99.0		
	0.157 6	1.672	1.5934	3.246	98.8		
	0.152 3	1.616	1.901	3.535	101.0		
	0.153 7	1.630	1.901	3.522	99.5		
	0.152 7	1.620	1.901	3.536	100.8		
	0.154 4	0.479	0.451	0.919	97.7		
穿心莲内酯	0.151 2	0.469	0.367	0.821	96.2	97.6	1.0
	0.153 2	0.475	0.367	0.836	98.4		
	0.152 8	0.474	0.367	0.829	96.9		
	0.151 6	0.470	0.451	0.909	97.3		
	0.154 4	0.479	0.451	0.919	97.7		
	0.157 6	0.488	0.451	0.931	98.1		
	0.152 3	0.472	0.564	1.024	97.9		
	0.153 7	0.476	0.564	1.036	99.2		
	0.152 7	0.473	0.564	1.017	96.4		
	0.154 4	0.479	0.451	0.919	97.7		
脱水穿心莲内酯	0.151 2	0.571	0.442	1.001	97.2	99.0	1.5
	0.153 2	0.578	0.442	1.013	98.3		
	0.152 8	0.577	0.442	1.008	97.6		

续表 1

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
	0.151 6	0.572	0.561	1.145	102.0		
	0.154 4	0.583	0.561	1.138	98.9		
	0.157 6	0.595	0.561	1.159	100.5		
	0.152 3	0.575	0.680	1.249	99.1		
	0.153 7	0.580	0.680	1.256	99.3		
	0.152 7	0.577	0.680	1.244	98.1		

**2.11 样品测定** 取 3 批复方双花咀嚼片样品,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,计算各成分含量,结果见表 2。

表 2 复方双花咀嚼片样品中 5 种成分含量测定 (n=3) mg/片  
Table 2 The 5 component content determination of Fufang Shuanghua Jujiapian (n=3) mg/pill

批号	绿原酸	咖啡酸	连翘苷	穿心莲内酯	脱水穿心莲内酯
20131201	5.878 2	1.389 8	8.488 9	2.423 1	2.965 8
20140501	5.774 3	1.391 1	8.485 8	2.479 4	3.020 4
20140502	5.853 3	1.378 1	8.806 0	2.472 6	3.121 8

### 3 讨论

**3.1 检测波长的选择** 本实验通过二极管阵列检测器全波段扫描,表明采用 240 nm 同时测定 5 个成分时杂峰较少,分离度和响应值均优于其他波长测定结果。

**3.2 提取溶剂和方法的选择** 比较了不同提取溶剂和不同超声时间的提取效率,结果显示,50% 乙醇的提取效率优于其他溶剂;超声提取 30 min 各组分峰面积已达最大。故本实验选择 50% 乙醇作提取溶剂,超声提取 30 min 制备供试品溶液。

**3.3 流动相的选择** 通过对甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.2% 甲酸体系的考察,确定了乙腈(A)-0.2% 甲酸(B)体系,经梯度洗脱所得各峰分离效果最佳,且配比简单。

#### [参考文献]

[1] 黄婉平. 复方双花片治疗小儿上呼吸道感染疗效观

察[J]. 中国医疗前沿, 2008, 3(13):68.

[2] 吴国友. 连翘药理作用研究进展[J]. 中医学报, 2013, 10(28):1508-1509.

[3] 任雅君, 屈会化, 成金俊, 等. 连翘苷人工抗原的合成及免疫原性鉴定[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2295-2299.

[4] 张颖娟, 韩燕霞, 梁利鹏, 等. 青翘正丁醇部位连翘苷、连翘酯苷 A 的制备及抑菌、抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(21):192-196.

[5] 史秀玲, 高银辉. 绿原酸对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 199-202.

[6] 赵金娟, 林慧杉, 林建强, 等. 绿原酸药效学研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2013, 32(4):1-5.

[7] 雷玲, 李兴平, 白筱璐, 等. 金银花抗内毒素, 解热, 抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 115-117.

[8] 王清, 朱萱萱, 张赤兵, 等. 金银花提取物抗菌作用的实验研究[J]. 中国医药导报, 2008, 10(19): 1428-1430.

[9] 李兴平, 李东晓, 李晓光, 等. 脱水穿心莲内酯、穿心莲内酯的鼠胃肠吸收研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(1):143-145.

[10] 李曙光, 叶再元. 穿心莲内酯的药理活性作用[J]. 中国中医药期刊, 2008, 26(5):985-986.

[11] 王艳辉, 王伽伯, 郝庆秀, 等. 不同产地穿心莲的含量测定、化学指纹图谱及抑菌活性评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9):77-82.

[12] 朱艳玲. 穿心莲化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(14):238-239.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药). 卫生部药品标准新药转正标准中药第三十四册[S]. 1998:191.

[14] 周燕园. UPLC 测定银黄颗粒中绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汗黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 6 种成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10):50-53.

[15] 王雅琪, 伍振峰, 郑琴, 等. 穿心莲药材不同提取方式的合理性评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10):1-3.

[16] 徐崑, 杨秀伟. HPLC 测定穿心莲内酯原料药的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16):2113-2115.

[责任编辑 顾雪竹]