

HPLC 法测定复方双花片中绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素

任 莹¹, 范姣姣², 张 鑫^{1*}

1. 西安市食品药品检验所, 陕西 西安 710054

2. 西安市儿童医院 药剂科, 陕西 西安 710003

摘 要: 目的 建立同时测定复方双花片中绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素的方法。方法 采用 Agilent 5 TC-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.4%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长切换 0~16 min (327 nm)、16~30 min (228 nm); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 ℃, 进样量: 10 μL。结果 绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素在 161.6~1616.0 ng ($r=1.000\ 0$)、12.48~124.80 ng ($r=0.999\ 9$)、14.30~143.04 ng ($r=0.999\ 8$)、13.48~134.80 ng ($r=1.000\ 0$)、8.72~87.20 ng ($r=1.000\ 0$) 线性关系良好; 平均回收率分别为 101.15%、98.72%、101.42%、99.15%、98.76%, RSD 值分别为 1.83%、2.58%、1.69%、1.20%、1.96%。结论 该方法操作简单, 专属性强, 为更好地评价复方双花片质量提供了参考。

关键词: 复方双花片; 绿原酸; 咖啡酸; 连翘苷; 穿心莲内酯; 木犀草素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)07-1192-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.07.006

Determination of chlorogenic acid, caffeic acid, forsythin, andrographalide, and luteolin in Compound Shuanghua Tablets by HPLC

REN Ying¹, FAN Jiao-jiao², ZHANG Xin¹

1. Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710054, China

2. Department of Pharmacy, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710003, China

Abstract: **Objective** To develop a method for determination of chlorogenic acid, caffeic acid, forsythin, andrographalide, and luteolin in Compound Shuanghua Tablets by HPLC. **Methods** The separation was performed on Agilent 5TC-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile - 0.4% phosphoric acid with gradient elution. The detection wavelengths were set at 327 nm in 0 — 16 min and 228 nm in 16 — 30 min. The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 30 ℃, and volume of injection was 10 μL. **Results** The linear range of chlorogenic acid, caffeic acid, forsythin, andrographalide, and luteolin were 161.6 — 1616.0 ng ($r=1.000\ 0$), 12.48 — 124.80 ng ($r=0.999\ 9$), 14.30 — 143.04 ng ($r=0.999\ 8$), 13.48 — 134.80 ng ($r=1.000\ 0$), 8.72 — 87.20 ng ($r=1.000\ 0$), respectively. The average recoveries were 101.15%, 98.72%, 101.42%, 99.15%, and 98.76% with RSD 1.83%, 2.58%, 1.69%, 1.20%, and 1.96%, respectively. **Conclusion** The method is simple and specific, and provides a reference for quality of Compound Shuanghua Tablets.

Key words: Compound Shuanghua Tablets; chlorogenic acid; caffeic acid; forsythin, andrographalide; luteolin; HPLC

复方双花片是由金银花、连翘、穿心莲、板蓝根等中药加辅料制成, 具有清热解毒、利咽消肿的功效, 临床主要用于治疗风热外感、风热乳蛾等^[1]。现行的复方双花片质控标准为国家食品药品监督管理局药品标准^[2], 仅对金银花、连翘、穿心莲采用薄层色谱法鉴别, HPLC 法测定绿原酸。由于该处

方中成分较多, 单一成分的量不能全面反映药品内在质量, 因此本研究参考封美慧等^[3]研究的金银花和连翘提取物中绿原酸, 连翘苷; 许惠英^[4]、何远景等^[5]研究感冒清片、复方双花颗粒中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的测定方法, 建立高效液相色谱法同时测定方中绿原酸、咖啡酸、木犀草素、连翘苷

收稿日期: 2017-02-15

作者简介: 任 莹, 女, 初级药师, 本科, 研究方向: 中药质量标准。Tel: 15109202539 E-mail: renying1018@126.com

*通信作者 张 鑫, 硕士, 初级药师, 主要从事中药检验及质量标准修订工作。E-mail: awoshizx@126.com

以及穿心莲内酯来有效地控制产品质量。

1 仪器与试药

Agilent1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦); 四元洗脱泵, 全自动进样器, UV-2700 紫外可见分光光度计(日本岛津); BT124S 型电子天平(德国赛多利斯), KG-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

复方双花片由陕西康惠制药股份有限公司提供, 规格 0.62 g/片, 批号 160402、151206、151106。绿原酸(批号 110753-201415, 质量分数 96.2%)、咖啡酸(批号 110885-200102)、连翘苷(批号 110821-201514, 质量分数 93.5%)、穿心莲内酯(批号 110797-200307)、木犀草素(批号 111520-200201)对照品均购于中国食品药品检定研究院, 乙腈为色谱纯, 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

Agilent 5 TC-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈(A) - 0.4%磷酸溶液(B), 梯度洗脱 0~5 min (5%~13% A)、5~15 min (13%~14% A)、15~16 min (14%~26% A)、16~30 min (26%~33% A); 检测波长切换 0~16 min (327 nm)、16~30 min (228 nm); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C, 进样量: 10 μL。在此色谱条件下, 理论塔板数以绿原酸峰计算不低于 4 000, 分离度大于 1.5。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 5.05 mg 置 25 mL 量瓶中, 连翘苷 4.47 mg 置 50 mL 量瓶中, 咖啡酸 3.90 mg、穿心莲内酯 4.21 mg 分别置 25 mL 量瓶中, 木犀草素 5.45 mg 置 50 mL 量瓶中, 分别加甲醇稀释至刻度, 作为对照品储备液。分别精密吸取上述绿原酸储备液 10 mL、连翘苷储备液 2 mL、咖啡酸储备液 1 mL、穿心莲内酯储备液 1 mL、木犀草素储备液 1 mL 置同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 作为对照品溶液, 其中含绿原酸 80.8 μg/mL、连翘苷 7.152 μg/mL、咖啡酸 6.24 μg/mL、穿心莲内酯 6.74 μg/mL、木犀草素 4.36 μg/mL。

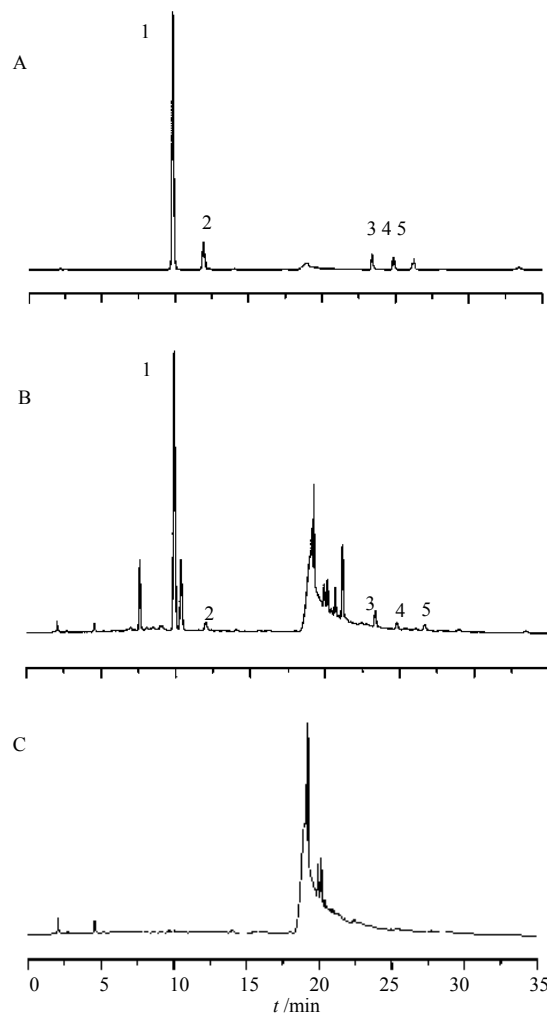
2.2.2 供试品溶液的制备 取复方双花片样品 20 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 精密称取 0.3 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量,

用 50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按照处方工艺和处方量, 取缺金银花、连翘和穿心莲的药材作为阴性样品, 按供试品溶液的制备项下方法同法制成阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验

分别吸取对照品、供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μL, 进样测定, 记录色谱图, 结果表明阴性样品对绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素的测定无干扰, 见图 1。



1-绿原酸 2-咖啡酸 3-连翘苷 4-穿心莲内酯 5-木犀草素
1-chlorogenic acid 2-caffeic acid 3-forsythin 4-andrographolide 5-luteolin

图 1 对照品(A)、复方双花片(B)和阴性样品(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), Compound Shuanghua Tablets (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系的考察

精密吸取混合对照品溶液 2、5、10、15、20 μL 注入液相色谱仪, 进样测定绿原酸、咖啡酸、连翘

苷、穿心莲内酯和木犀草素的峰面积。以进样质量作为横坐标, 相对应的峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 结果见表 1。

表 1 5 种成分的线性方程、相关系数及线性范围

Table 1 Linear relationship, correlation coefficient, and linear range of five components

成分	线性方程	r	线性范围/ ng
绿原酸	$Y=3.097 X+13.411$	1.000 0	161.6~1616.00
咖啡酸	$Y=0.426 X-0.299$	0.999 9	12.48~124.80
连翘苷	$Y=0.177 X+4.066$	0.999 8	14.30~143.04
穿心莲内酯	$Y=0.176 X+0.510$	1.000 0	13.48~134.80
木犀草素	$Y=0.172 X-0.065$	1.000 0	8.72~87.20

2.5 精密度试验

取批号 160402 复方双花片供试品溶液, 连续进样 6 次, 分别测定绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素的峰面积值, 结果其 RSD 值分别为 0.49%、0.89%、2.08%、0.71%、1.77%。

2.6 稳定性试验

取批号 160402 复方双花片供试品溶液, 分别在 0、1、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯、木犀草素峰面积值, 结果其 RSD 值分别为 2.14%、1.76%、1.15%、0.98%、2.01%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取批号 160402 复方双花片样品 6 份, 制备供试品溶液, 分别进行测定绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯、木犀草素峰面积值, 结果其平均质量分数分别为 8.27、0.24、0.77、0.37、0.25 $\text{mg}/\text{片}$,

RSD 值分别为 0.37%、2.33%、1.64%、2.42%、2.24%。

2.8 回收率试验

精密称取批号 160402 复方双花片样品 6 份, 各约 0.15 g, 分别精密加入 31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 咖啡酸、84.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 穿心莲内酯、87.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 木犀草素、2 002.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 绿原酸、201.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 连翘苷对照品溶液各 1 mL, 制备供试品溶液, 进行测定, 分别计算绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯、木犀草素的平均回收率, 结果分别为 101.15%、98.72%、101.42%、99.15%、98.76%, RSD 值分别为 1.83%、2.58%、1.69%、1.20%、1.96%。

2.9 样品测定

取复方双花片样品 3 批, 制备供试品溶液, 每批样品平行制备 2 份, 进行测定, 以外标法分别计算样品中绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素的质量分数, 结果见表 2。

表 2 复方双花片中绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素的测定结果 ($n=2$)

Table 2 Determination of chlorogenic acid, caffeic acid, forsythin, andrographalide, and luteolin in Compound Shuanghua Tablets ($n=2$)

批号	质量分数/ $(\text{mg}\cdot\text{片}^{-1})$				
	绿原酸	咖啡酸	连翘苷	穿心莲内酯	木犀草素
160402	8.292 5	0.233 6	0.766 4	0.385 7	0.249 7
151206	8.310 2	0.229 3	0.789 7	0.377 1	0.252 1
151106	8.297 6	0.231 5	0.810 2	0.379 6	0.247 6

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备

实验中采用正交试验对供试品溶液的制备方法进行考察, 分别对不同时间 (0.5、1.0、2.0 h) 下甲

醇和不同体积分数的甲醇、乙醇 (50%、70%乙醇) 进行提取, 并比较了相同条件下回流与超声提取的区别, 结果发现两种提取方法的差异并无显著性, 0.5 h 时 50% 甲醇提取效果最佳。由于超声提取方法

操作简单且稳定,故实验采用 50%甲醇超声 0.5 h 提取进行供试品溶液的制备。

3.2 色谱条件的选择

本实验参考徐梅^[6]、陈勇等^[7]研究的复方双花口服液活性成分的测定条件以及《中国药典》2015 年版一部连翘,穿心莲项下含量测定的条件,并考察了以甲醇-水,甲醇-0.2%甲酸,乙腈-水和乙腈-0.4%磷酸为流动相,结果发现乙腈-0.4%磷酸为流动相时,供试品溶液色谱图基线平稳,理论塔板数高,峰分离度较好,结果满意。

3.3 波长的选择

实验采用 UV2700 紫外分光光度计把绿原酸、连翘苷和穿心莲内酯对照品溶液分别在 200~380 nm 进行扫描的各波长色谱峰进行比较,并参考佟若菲^[8]和于和等^[9]测定中成药中多组分波长的选择以及《中国药典》2015 年版一部中绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素的测定条件^[10],结果发现绿原酸在 327 nm 波长下具有较好的吸收且峰形尖锐,干扰较小,连翘苷、穿心莲内酯在 228 nm 波长下有较好的吸收且峰型相对尖锐,干扰较小,故确定实验中绿原酸、咖啡酸检测波长为 327 nm,连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素检测波长为 228 nm。

多组分的同时测定能更好地反映中成药的整体质量,因此本实验通过同时测定复方双花片中绿原酸、咖啡酸、连翘苷、穿心莲内酯和木犀草素的量

来控制该药品的质量,比标准中单一测定金银花中绿原酸更有效,该方法操作简单,专属性强,为更好地评价复方双花片质量提供了参考。

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]. 中国医疗前沿月刊, 2008, 3(13): 68.
- [2] 国家食品药品监督管理局国家药品标准 WS₃-178(Z-178)-2002(Z) [S]. 2002.
- [3] 封美慧, 邸欣, 王鑫, 等. RP-HPLC 同时测定金银花、连翘药对提取物中 6 个成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 75-79.
- [4] 许惠英, 许百虹, 陈浩桢, 等. HPLC 法同时测定感冒清片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量 [J]. 中国药房, 2016, 27(12): 1699-1701.
- [5] 何远景, 廖雪青. HPLC 法测定复方双花颗粒中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量 [J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(9): 30.
- [6] 徐梅. RP-HPLC 法同时测定复方双花口服液中 6 种活性成分 [J]. 中成药, 2015, 37(7): 1482-1486.
- [7] 陈勇, 蔡敏, 韩凤梅. HPLC 测定复方双花口服液中绿原酸和连翘苷的含量 [J]. 分析科学学报, 2001, 17(5): 440.
- [8] 佟若菲, 张囡, 林宏. HPLC 法测定病毒合剂中黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 259-261.
- [9] 于和, 陈双璐. HPLC 法测定苍耳丸中连翘酯苷 A 和绿原酸 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 341-343.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 170, 268.