

HPLC 法同时测定复方双花片中 10 个成分的含量

尚朝利, 白泽方, 樊轻亚

(信阳职业技术学院, 信阳 464000)

摘要 目的:采用高效液相色谱(HPLC)技术,建立同时测定复方双花片中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷 A、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯 10 个成分含量的方法。**方法:**复方双花片样品用 50% 甲醇水超声提取,采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5μm) 色谱柱分析,流动相为乙腈-0.15% 磷酸水溶液,梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30℃,进样量 10 μL,检测波长 327 nm(检测新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷 A、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸)和 226 nm(检测连翘苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯)。**结果:**新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷 A、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯质量浓度分别在 4.071~40.71 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9)、20.16~201.6 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9)、4.730~47.30 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9)、4.536~45.36 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 8)、1.817~18.17 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9)、2.266~22.66 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 7)、3.321~33.21 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9)、3.462~34.62 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 6)、2.111~21.11 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9)和 2.290~22.90 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 7)与峰面积呈良好的线性关系;平均回收率(RSD)(*n*=6)分别为 101.3%(2.1%)、103.0%(1.5%)、100.9%(2.0%)、101.1%(2.0%)、98.4%(1.6%)、102.2%(2.4%)、98.2%(1.3%)、97.8%(2.0%)、99.0%(2.0%)和 96.4%(1.1%);4 批样品中上述 10 个成分的含量分别为 1.685~2.649 mg·g⁻¹、12.202~13.780 mg·g⁻¹、2.415~2.594 mg·g⁻¹、1.340~1.919 mg·g⁻¹、0.501~0.791 mg·g⁻¹、0.891~1.342 mg·g⁻¹、1.299~2.105 mg·g⁻¹、1.147~1.504 mg·g⁻¹、0.654~0.694 mg·g⁻¹、0.846~1.151 mg·g⁻¹。**结论:**所建立的方法简单准确,可用于复方双花片的质量控制与评价。

关键词:复方双花片;高效液相色谱;化学成分;含量测定;质量控制

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)02-0242-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.02.06

Simultaneous determination of ten constituents in compound Shuanghua tablets by HPLC

SHANG Chao-li, BAI Ze-fang, FAN Qing-ya

(Xinyang Vocational and Technical College, Xinyang 464000, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for simultaneous determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, forsythiaside A, 3,4-O-dicaffeoylquinic acid, 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 4,5-O-dicaffeoylquinic acid, forsythin, andrographalide and dehydroandrographalide in compound Shuanghua tablets. **Methods:** The samples were extracted with 50% methanol solution under ultrasonic

第一作者 Tel:13633812712; E-mail:921283818@qq.com

condition, and were performed on Agilent Zoobax SB - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by gradient elution of acetonitrile - 0.15% phosphoric acid solution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was 30 °C, the injection volume was 10 μL, and the detection wavelength were set at 327 nm (detecting neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, forsythiaside A, 3,4 - O - dicaffeoylquinic acid, 3,5 - O - dicaffeoylquinic acid and 4,5 - O - dicaffeoylquinic acid) and 226 nm (detecting forsythidin, andrographalide and dehydroandrographalide). **Results:** The linear ranges of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, forsythiaside A, 3,4 - O - dicaffeoylquinic acid, 3,5 - O - dicaffeoylquinic acid, 4,5 - O - dicaffeoylquinic acid, forsythidin, andrographalide and dehydroandrographalide were 4.071 - 40.71 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$), 20.16 - 201.6 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$), 4.730 - 47.30 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$), 4.536 - 45.36 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9998$), 1.817 - 18.17 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$), 2.266 - 22.66 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9997$), 3.321 - 33.21 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$), 3.462 - 34.62 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9996$), 2.111 - 21.11 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$) and 2.290 - 22.90 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9997$), respectively. The average recoveries ($n = 6$) were 101.3% (2.1%), 103.0% (1.5%), 100.9% (2.0%), 101.1% (2.0%), 98.4% (1.6%), 102.2% (2.4%), 98.2% (1.3%), 97.8% (2.0%), 99.0% (2.0%) and 96.4% (1.1%), respectively. The contents of the 10 components in 4 batches of Fufang Shuanghua tablets were in the range of 1.685 - 2.649 mg · g⁻¹, 12.202 - 13.780 mg · g⁻¹, 2.415 - 2.594 mg · g⁻¹, 1.340 - 1.919 mg · g⁻¹, 0.501 - 0.791 mg · g⁻¹, 0.891 - 1.342 mg · g⁻¹, 1.299 - 2.105 mg · g⁻¹, 1.147 - 1.504 mg · g⁻¹, 0.654 - 0.694 mg · g⁻¹, 0.846 - 1.151 mg · g⁻¹, respectively. **Conclusion:** This simple accurate reproducible method can be used for the quality control and evaluate of compound Shuanghua tablets.

Keywords: compound Shuanghua tablets; HPLC; chemical constituents; content determination; quality control

复方双花片为国家食品药品监督管理局国家药品标准[WS₃-178(Z-178)-2002(Z)]收录的制剂,由金银花、连翘、穿心莲、板蓝根4味药材加工而成,具有清热解毒、利咽消肿之功效,临床用于风热外感所致的感冒,症见发热、头痛、鼻塞流涕等^[1]。方中金银花、连翘清热解毒、消肿散结,共为君药,金银花主要活性成分有绿原酸、咖啡酰奎宁酸等酚酸类^[2-4],连翘中主要活性成分为连翘苷和连翘酯苷A^[5-7];穿心莲清热解毒、凉血消肿,为臣药,主要活性成分为穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯^[8-10];板蓝根清热解毒、凉血利咽,为佐药,主要活性成分为(R,S)-告依春^[11-13],全方共奏清热解毒、消肿散结、利咽止痛之功效。

中药复方制剂组成复杂,其临床疗效往往是多个成分协同作用的结果。复方双花片现行质量标准仅将绿原酸作为含量测定的指标成分,质控指标单一,相关研究报道较少。杨帅等^[14]采用HPLC法测定复方双花片中穿心莲内酯和脱水穿心内酯含量,任莹等^[15]采用HPLC法测定复方双花片中绿原酸、咖啡酸等5个成分的含量,均不能全面反映该制剂的内在质量。本文采用HPLC法,同时测定该制剂中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、异绿原酸B、异绿原酸A、异

绿原酸C、连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯10个成分的含量,以期为全面评价复方双花片的质量和后期质量标准的提高提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪,配置自动进样器、四元泵、柱温箱和二极阵列检测器(DAD)(Agilent公司),XSE-205十万分之一电子天平(梅特勒公司),Milli-Q超纯水处理系统(Millipore公司),KQ-500DE超声清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品新绿原酸[批号(下同)DSTD001504,含量(下同)98.80%]、隐绿原酸(DSTDY003501,98.85%) and 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸(DSTD003703,99.00%)购自德思特生物科技有限公司,绿原酸(110753-201817,96.8%)、连翘酯苷A(111810-202108,96.2%)、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸(111782-201807,94.3%)、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸(111894-202104,95.1%)、连翘苷(110821-201816,95.1%)、穿心莲内酯(110797-202010,99.6%)、脱水穿心莲内酯(110854-202111,98.9%)

购自中国食品药品检定研究院。色谱纯乙腈和甲醇(Merck公司),分析纯甲酸、冰乙酸和磷酸(国药集团化学试剂有限公司),实验用水为超纯水。复方双花片(批号220702、220405、211201、220301,陕西康惠制药股份有限公司,0.62 g·片⁻¹,有效期2年)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax SB - C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A) - 0.15% 磷酸(B),梯度洗脱(0 ~ 8 min, 9% A; 8 ~ 15 min, 9% A → 15% A; 15 ~ 30 min, 15% A; 30 ~ 40 min, 15% A → 25% A; 40 ~ 50 min, 25% A → 30% A; 50 ~ 60 min, 30% A → 45% A; 60 ~ 65 min, 45% A; 65 ~ 66 min, 45% A → 9% A; 66 ~ 70 min, 9% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 327 nm(0 ~ 45 min, 检测新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷 A、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸)和 226 nm(45 ~ 70 min, 检测连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯),进样体积 10 μL。

2.2 溶液的制备

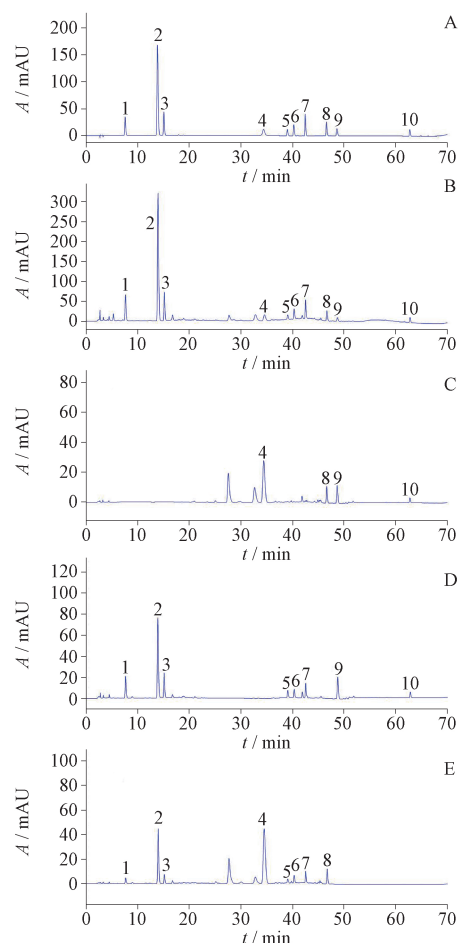
2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取对照品新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷 A、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯 8.24、20.83、9.57、9.43、7.34、9.61、13.97、7.28、8.48、9.26 mg,各置 20 mL 量瓶中,加 50% 甲醇水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成各单一对照品储备液。分别依次量取对照品储备液 1、2、1、1、0.5、0.5、0.5、1、0.5、0.5 mL,置同一 10 mL 量瓶中,振摇,加 50% 甲醇水定容,摇匀,即得质量浓度新绿原酸 40.71 μg·mL⁻¹、绿原酸 201.6 μg·mL⁻¹、隐绿原酸 47.30 μg·mL⁻¹、连翘酯苷 A 45.36 μg·mL⁻¹、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸 18.17 μg·mL⁻¹、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 22.66 μg·mL⁻¹、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 33.21 μg·mL⁻¹、连翘苷 34.62 μg·mL⁻¹、穿心莲内酯 21.11 μg·mL⁻¹和脱水穿心莲内酯 22.90 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取复方双花片适量,除去薄膜衣,研细,精密称取 0.6 g,置锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇水 50 mL,称量,超声处理(功率 500 W,频率 45 kHz)20 min,放冷,再称量,用 50% 甲醇水补足减失的量,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按复方双花片处方比例和制备工艺,分别制成缺金银花、连翘、穿心莲的阴性样品,取适量按“2.2.2”项下方法制成各阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下 3 种溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,10 个目标峰分离效果良好,分离度均 > 1.5,且阴性无干扰,方法专属性良好,见图 1。



1. 新绿原酸(neochlorogenic acid) 2. 绿原酸(chlorogenic acid) 3. 隐绿原酸(cryptochlorogenic acid) 4. 连翘酯苷 A(forsythiaside A) 5. 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸(3,4-O-dicaffeoylquinic acid) 6. 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸(3,5-O-dicaffeoylquinic acid) 7. 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸(4,5-O-dicaffeoylquinic acid) 8. 连翘苷(forsythinin) 9. 穿心莲内酯(andrographalide) 10. 脱水穿心莲内酯(dehydroandrographalide)

A. 混合对照品(mixed reference substances) B. 样品(samples) C. 缺金银花阴性样品(negative sample without Lonicerae Japonicae Flos) D. 缺连翘阴性样品(negative sample without Forsythiae Fructus) E. 缺穿心莲阴性样品(negative sample without Andrographis Herba)

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、4、6、8、10 mL,分别置10 mL量瓶中,加50%甲醇水定容,得6个系列浓度溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录各成分峰面积。以质量浓度($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐

标进行线性回归,得回归方程和线性相关系数(r),结果见表1。另取混合对照品溶液适量,用50%甲醇水逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为3:1时的浓度为检测限(LOD), S/N 为10:1时的浓度为定量限(LOQ),结果见表1。

表1 10个成分的线性关系、检测限和定量限

Tab. 1 Linearity relationship, LODs and LOQs of ten components

成分 (component)	回归方程 (regression)	r	线性范围 (linear range)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
新绿原酸(neochlorogenic acid)	$Y=21.16X+1.669$	0.999 9	4.071~40.71	0.048 1	0.160 4
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y=30.53X-3.299$	0.999 9	20.16~201.6	0.051 1	0.170 4
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	$Y=30.98X-0.833 6$	0.999 9	4.730~47.30	0.044 5	0.148 3
连翘酯苷 A (forsythiaside A)	$Y=18.66X-1.020$	0.999 8	4.536~45.36	0.162 0	0.540 1
3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸(3,4-O-dicaffeoylquinic acid)	$Y=23.64X-0.048 2$	0.999 9	1.817~18.17	0.059 7	0.199 0
3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸(3,5-O-dicaffeoylquinic acid)	$Y=26.42X-0.606 8$	0.999 7	2.266~22.66	0.053 5	0.178 4
4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸(4,5-O-dicaffeoylquinic acid)	$Y=29.18X-1.111$	0.999 9	3.321~33.21	0.040 0	0.133 4
连翘苷(forsythin)	$Y=19.56X-0.269 1$	0.999 6	3.462~34.62	0.070 6	0.235 5
穿心莲内酯(andrographalide)	$Y=19.54X-0.071 2$	0.999 9	2.111~21.11	0.083 3	0.277 6
脱水穿心莲内酯(dehydroandrographalide)	$Y=15.90X+1.536$	0.999 7	2.290~22.90	0.082 0	0.273 4

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,用50%甲醇水稀释2倍,按“2.1”项下色谱条件,连续进样6次,测定各成分的峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯色谱峰峰面积的RSD($n=6$)分别为0.16%、0.17%、0.15%、0.54%、0.20%、0.18%、0.13%、0.24%、0.28%和0.27%,表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性试验

取批号220702样品制备的供试品溶液,分别在0、4、8、16、24、30 h依次进样,按“2.1”项下色谱条件测定各成分峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰面积的RSD分别为0.53%、0.93%、1.2%、1.2%、1.2%、1.2%、0.51%、0.79%、1.7%和0.70%,表明供试品

溶液在30 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取批号220702的样品适量,除去薄膜衣,按“2.2.2”项下的方法制备6份供试品溶液,进样10 μL ,测定峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷A、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量的平均值分别为2.697、13.68、2.645、1.940、0.575 7、1.199、1.556、1.541、0.697 7、0.853 8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD($n=6$)分别为0.84%、1.3%、1.5%、1.5%、1.4%、1.7%、1.3%、2.0%、2.2%、1.4%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取含量已知的同一批次(批号220702)复方双花片样品,除去薄膜衣,研细,精密称取0.3 g,共6份。按1:1的比例精密加入各对照品溶液(0.407 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的新绿原酸2 mL、1.034 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的绿原酸4 mL、0.401 3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的隐绿原酸2 mL、0.392 9 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的连翘酯苷A 1.5 mL、

0.350 0 mg · mL⁻¹的3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸
0.5 mL、0.375 3 mg · mL⁻¹的3,5-二-O-咖啡
酰奎宁酸 1 mL、0.468 6 mg · mL⁻¹的4,5-二-
O-咖啡酰奎宁酸 1 mL、0.456 9 mg · mL⁻¹的连翘
苷 1 mL、0.419 5 mg · mL⁻¹的穿心莲内酯 0.5 mL、

0.249 6 mg · mL⁻¹的脱水穿心莲内酯 1 mL), 加
50% 甲醇水补足至 50 mL, 按“2.2.2”项下方法制备
供试溶液, 再按“2.1”项下方法进样测定, 记录各成
分峰面积。采用外标双点校正法计算各成分含量,
再计算平均回收率, 结果见表 2。

表 2 10 个成分加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery test for ten constituents

成分 (component)	平均回收率 (average recovery) / %	RSD / %
新绿原酸 (neochlorogenic acid)	101.1	2.1
绿原酸 (chlorogenic acid)	103.0	1.5
隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid)	100.9	2.0
连翘酯苷 A (forsythiaside A)	101.1	2.0
3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸 (3,4-O-dicaffeoylquinic acid)	98.4	1.6
3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 (3,5-O-dicaffeoylquinic acid)	102.2	2.4
4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 (4,5-O-dicaffeoylquinic acid)	98.2	1.3
连翘苷 (forsythiin)	97.8	2.0
穿心莲内酯 (andrographalide)	99.0	2.0
脱水穿心莲内酯 (dehydroandrographalide)	96.4	1.1

2.9 样品含量测定

取 4 批复方双花片样品, 除去薄膜衣, 按“2.2.2”
项下方法每批分别制备 2 份供试品溶液, 再按“2.1”项
下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 采用外标双点校正

法计算绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷 A、3,4-
二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、
4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷、穿心莲内酯和
脱水穿心莲内酯的含量, 结果见表 3。

表 3 样品中 10 个成分含量 (n=2)

Tab. 3 The contents of ten constituents in samples

成分 (component)	含量 (content) / (mg · g ⁻¹)			
	批号 (batch)	批号 (batch)	批号 (batch)	批号 (batch)
	220702	220405	211201	220301
新绿原酸 (neochlorogenic acid)	2.649	1.685	2.194	2.124
绿原酸 (chlorogenic acid)	13.591	12.202	13.780	12.814
隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid)	2.594	2.588	2.493	2.415
连翘酯苷 A (forsythiaside A)	1.919	1.430	1.340	1.359
3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸 (3,4-O-dicaffeoylquinic acid)	0.572	0.791	0.501	0.503
3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 (3,5-O-dicaffeoylquinic acid)	1.181	1.342	1.188	0.891
4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 (4,5-O-dicaffeoylquinic acid)	1.538	2.105	1.383	1.299
连翘苷 (forsythiin)	1.504	1.310	1.147	1.211
穿心莲内酯 (andrographalide)	0.694	0.674	0.662	0.654
脱水穿心莲内酯 (dehydroandrographalide)	0.846	1.151	1.139	1.076

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

中药复方制剂所含成分具有不同的最大吸收波长,而采用某一波长时,难以确保所测成分被检测出或获得最大吸收,从而影响定量结果。因此,本实验采用 DAD 检测器对混合对照品在 200~400 nm 波长范围内进行全波长扫描,并采集光谱图。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸最大吸波长为 326 nm,连翘酯苷 A、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸在最大吸收波长为 328 nm,连翘苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯分别在 228、226、252 nm 有最大吸收,而脱水穿心莲内酯在 226 nm 也有较大吸收。所以,本实验选择 327 nm 作为新连翘酯苷 A、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸的检测波长,226 nm 作为连翘苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的检测波长。

考察了以甲醇-水、乙腈-水为流动相体系,发现 10 个成分峰形较差,当添加甲酸、冰乙酸、磷酸时,10 个色谱峰峰形均有改善,以磷酸为最佳,当磷酸浓度为 0.15% 时,再增加磷酸浓度,10 个成分色谱峰峰形无明显改善。考察了色谱柱 I [Waters symmetry-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)]、色谱柱 II [phenomenex Luna-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)] 和色谱柱 III [Agilent Zorbax-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)] 对 10 个待测成分分离的影响,以各成分与相邻色谱峰的分离度和峰形为判定指标,连翘酯苷 A 在其他色谱柱中与相邻色谱峰有重叠或分离较差现象,在色谱柱 III 中分离效果为最好。

3.2 提取方法和提取溶剂的选择

预试验首先考察了不同提取溶剂(乙醇、70%乙醇水、50%乙醇水、甲醇、70%甲醇水、50%甲醇水)对各成分提取的影响,发现以 50% 甲醇水为溶剂,各成分提取率为最高,且峰形为最佳。考察超声提取(考察时间 10、20、30、40 min)和回流提取(30、40、50、60 min)2 种提取方式,发现超声提取用时较少,且在 20 min 内各成分基本上提取完全,故确定为供试品溶液制备方法。

3.3 含量结果分析

预试验还考察了复方双花片中佐药板蓝根活性成分(R,S)-告依春作为含量测定的指标性成分,发现其含量较低,故未纳入本次试验含量测定中。从

表 3 可知,4 批样品中各成分比较稳定,色谱图中以 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸色的峰面积适中,可以在今后研究中,以此峰为参考峰,计算其他各峰相对校正因子,采用一侧多评法测定复方双花片中 10 个成分含量,可以减少标准物质的使用和提高工作效率。本次研究因缺少验证仪器设备,故未开展相关研究,在今后工作中,将加强和院校合作,开展相关领域研究。

3.4 小结

本实验建立了 HPLC 法同时测定复方双花片中 10 个成分的含量,能较全面地反映该制剂的质量。结果显示各成分含量范围波动较小,质量较为稳定,但只收集了 4 批样品,样本量偏少,尚不能制定含量控制限度,后续将继续收集样本,以期制定各成分的限量值。

参考文献

- [1] WS₃-178(Z-178)-2002(Z) 国家药品标准. 国家食品药品监督管理局药品标准[S]. 2016
WS₃-178(Z-178)-2002(Z) National Drug Standards. Standards of the State Food and Drug Administration[S]. 2016
- [2] 胡杨,李先芝,钱全全,等. HPLC 法同时测定金银花配方颗粒中 6 种成分[J]. 中成药,2021,43(7): 1717
HU Y, LI XZ, QIAN QQ, et al. Simultaneous determination of six constituents in Jinyinhua Formula granules by HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(7):1717
- [3] 缪艳燕,徐帮会,徐剑,等. 金银花的 HPLC 指纹图谱建立及其抗炎作用谱-效关系研究[J]. 中国药房,2020,31(20): 2497
MIAO YY, XU BH, XU J, et al. Establishment of HPLC fingerprint of *Lonicera japonica* and study on its anti-inflammatory spectrumeffect relationship[J]. China Pharm, 2020, 31(20): 2497
- [4] 肖美凤,刘文龙,周晋,等. 金银花和山银花的研究现状及质量控制的关键问题[J]. 中草药,2018,49(20): 4905
XIAO MF, LIU WL, ZHOU J, et al. Research status of *Lonicera Japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos and its key issues for quality control[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(20):4905
- [5] 景奉堂,冯帅,王静,等. 基于指纹图谱和网络药理学的连翘质量标志物预测分析[J]. 中国药房,2022,33(3): 293
JING FT, FENG S, WANG J, et al. Predictive analysis of quality markers of *Forsythia suspensa* based on fingerprint and network pharmacology[J]. China Pharm, 2022, 33(3):293
- [6] 陈璐,郑晓丹. HPLC 测定复方鱼腥草合剂中 8 个成分含量及化学模式分析[J]. 中国药师,2022,25(8): 1481
CHEN L, ZHENG XD. Simultaneous determination of 8 components in compound Yuxingcao mixture by HPLC combined with chemical pattern recognition[J]. China Pharm, 2022, 25(8): 1481

- [7] 遆安航,李思思,陈瑾,等. 一测多评法同时测定连翘归尾颗粒中3种成分[J]. 中成药,2022,44(9):2779
TI AH, LI SS, CHEN J, *et al.* Simultaneous determination of three constituents in Lianqiao Guiwei granules by QAMS [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(9):2779
- [8] 王震. 不同生长期穿心莲药材 HPLC 指纹图谱及化学模式识别异[J]. 药物分析杂志,2021,41(3):410
WANG Z. HPLC Fingerprint and chemical pattern recognition of *Andrographis Herba* with different growth period [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(3):410
- [9] 张峻崧,曾令杰,崔丹丹,等. 穿心莲饮片的特征图谱及主要内酯成分的含量测定[J]. 中国药业,2020,29(19):19
ZHANG JS, ZENG LJ, CUI DD, *et al.* Specific chromatogram and determination of main lactones in *Andrographis Herba* decoction pieces [J]. *China Pharm*, 2020, 29(19):19
- [10] 郭海姣,覃洁萍,刘雯,等. 一测多评法同时测定穿黄片、穿黄胶囊中10种成分[J]. 中成药,2020,42(7):1702
GUO HJ, QIN JP, LIU W, *et al.* Simultaneous determination of three constituents in Lianqiao Guiwei granules by QAMS [J]. *Chin Tradit Pat Med*,2020,42(7):1702
- [11] 韩文凯,曹帅,李丽敏,等. 复方板蓝根颗粒中(R,S)-告依春稳定性的研究[J]. 时珍国医国药,2022,33(6):1369
HAN WK, CHAO S, LI LM, *et al.* Study on the stability of (R, S)-citron in compound Banlangen granules[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(6):1369
- [12] 黄远,董福越,李楚源,等. 一测多评法测定板蓝根中6种化学成分的含量[J]. 中草药,2021,52(3):845
HUANG Y, DONG FY, LI CY, *et al.* Simultaneous quantitative determination of 10 chemical constituents in *Radix Isatidis* by QAMS method [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(3):845
- [13] 胡英婕,王磊,朱冬冬. HPLC 同时测定小儿肺热咳喘口服液10个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2022,42(2):243
HU YJ, WANG L, ZHU DD. Simultaneous determination of ten ingredients in Xiaoe Feire Kechuan oral solution by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(2):243
- [14] 杨帅,杨海燕,郭耀武. HPLC 法测定复方双花片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J]. 陕西中医学院学报,2013,36(3):111
YANG S, YANG HY, GUO YW. Determination of andrographolide and dehydroandrographolide in compound Shuanghua tablets by HPLC[J]. *J Shaanxi Univ Chin Med*, 2013, 36(3):111
- [15] 任莹,范姣姣,张鑫. 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[J]. 现代药物与临床,2017,32(7):1192
REN Y, F AN JJ, ZHANG X. Determination of chlorogenic acid, caffeic acid, forsythin, andrographalide, and luteolin in compound Shuanghua tablets by HPLC[J]. *Drugs Clin*, 2017, 32(7):1192

(本文于2023年4月11日修改回)