

基于 HPLC 波长切换联合梯度洗脱技术的茵栀黄口服液中 15 种成分定量研究

张楠, 许苗苗, 王舒懿, 谢志民

西安市食品药品检验所, 陕西 西安 710054

摘要: **目的** 建立 HPLC 波长切换联合梯度洗脱法 (HPLC-DVD 法) 同时测定茵栀黄口服液中 14 种活性成分新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、栀子苷、对羟基苯乙酮、野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 及一种辅料成分苯甲酸的含量。 **方法** 采用 HPLC-DVD 法, Welch Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 进行梯度洗脱, 体积流量前 30 min 为 0.8 mL/min, 后续为 1.0 mL/min; 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸检测波长为 325 nm, 栀子苷检测波长为 238 nm, 对羟基苯乙酮检测波长为 275 nm, 苯甲酸检测波长为 228 nm, 野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 检测波长为 325 nm, 千层纸素 A 苷、汉黄芩苷检测波长为 203 nm, 黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 检测波长为 274 nm; 进样量为 10 μL。 **结果** 15 种指标成分新绿原酸在 74.46~1 574.42 ng ($r=0.999\ 8$)、绿原酸在 34.58~741.10 ng ($r=0.999\ 6$)、隐绿原酸在 34.65~742.62 ng ($r=0.999\ 7$)、栀子苷在 234.42~5 024.45 ng ($r=0.999\ 9$)、对羟基苯乙酮在 74.46~1 574.42 ng ($r=0.999\ 9$)、苯甲酸在 321.79~6 897.10 ng ($r=0.999\ 8$)、野黄芩苷在 44.70~958.08 ng ($r=0.999\ 7$)、异绿原酸 B 在 32.53~697.22 ng ($r=0.999\ 5$)、异绿原酸 A 在 8.60~184.38 ng ($r=0.999\ 6$)、异绿原酸 C 在 31.93~684.30 ng ($r=0.999\ 7$)、千层纸素 A 苷在 254.82~5 461.66 ng ($r=0.999\ 5$)、汉黄芩苷在 10.18~218.12 ng ($r=0.999\ 9$)、黄芩素在 92.81~1 989.33 ng ($r=0.999\ 6$)、汉黄芩素在 31.17~668.00 ng ($r=0.999\ 5$)、千层纸素 A 在 11.74~251.73 ng ($r=0.999\ 8$) 与峰面积具有较好的线性关系; 精密度良好, $RSD\leq 0.75\%$; 重复性良好, $RSD\leq 1.95\%$; 供试品溶液在室温条件下 8 h 内稳定, $RSD\leq 1.77\%$; 平均加样回收率和相应的 RSD 分别为 100.69% (0.55%)、101.99% (1.78%)、99.20% (0.72%)、100.13% (0.48%)、100.96% (1.74%)、100.02% (0.46%)、101.14% (0.27%)、99.87% (0.59%)、100.21% (1.56%)、102.18% (0.33%)、99.00% (1.02%)、98.82% (0.65%)、98.31% (0.58%)、96.01% (0.44%)、100.56 (0.71%)。10 批次供试品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、栀子苷、对羟基苯乙酮、苯甲酸、野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 的含量分别为 0.246~0.322、0.213~0.290、0.203~0.267、1.786~2.047、0.035~0.046、2.393~2.541、0.263~0.392、0.139~0.216、0.032~0.067、0.208~0.250、2.120~2.648、0.063~0.102、0.081~1.429、0.164~0.246、0.079~0.110 mg/mL。 **结论** 建立的 HPLC-DVD 法同时测定茵栀黄口服液中的 15 种成分, 方法简便、快速、准确, 可为茵栀黄口服液质量控制提供科学依据。

关键词: HPLC-DVD 法; 茵栀黄口服液; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 栀子苷; 对羟基苯乙酮; 苯甲酸; 野黄芩苷; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C; 千层纸素 A 苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; 千层纸素 A

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)18-4338-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.012

Quantitative study of fifteen components in Yinzhihuang Oral Solution by HPLC coupled with wavelength switching and gradient elution method

ZHANG Nan, XU Miao-miao, WANG Shu-yi, XIE Zhi-min

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

Abstract: Objective To establish HPLC coupled with wavelength switching and gradient elution method (HPLC-DVD) for simultaneous determination of 14 active components (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, geniposide, 4-hydroxyacetophenone, scutellarin, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, oroxylin A 7-*O*-glucuronide, wogonoside, baicalein, wogonin and oroxylin A and one auxiliary material (benzoic acid) in Yinzhihuang Oral Solution (YOS).

收稿日期: 2019-04-26

基金项目: 2019 年国家药品评价性抽检中央补助地方经费项目 (157)

作者简介: 张楠 (1983—), 男, 陕西西安人, 硕士, 副主任药师, 从事药品检验及标准研究工作。Tel: (029)85534542 E-mail: lansha617@163.com

Methods The chromatographic separation was achieved on Welch Ultimate XB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as mobile phases for gradient elution, at the flow rate of 0.8 mL/min in the first 30 min and 1.0 mL/min in the follow-up; The detection wavelength was set at 325 nm for neochlorogenic acid, chlorogenic acid and cryptochlorogenic acid, 238 nm for geniposide, 275 nm for 4-hydroxyacetophenone, 228 nm for benzoic acid, 325 nm for scutellarin, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C, 203 nm for oroxylin A 7-*O*-glucuronide and wogonoside, and 274 nm for baicalein, wogonin and oroxylin A. The volume of sample injection was 10 μL. **Results** The fifteen active components were well separated and showed good linearity, such as neochlorogenic acid 74.46—1 574.42 ng ($r = 0.999\ 8$), chlorogenic acid 34.58—741.1 ng ($r = 0.999\ 6$), cryptochlorogenic acid 34.65—742.62 ng ($r = 0.999\ 7$), geniposide 234.42—5 024.45 ng ($r = 0.999\ 9$), 4-hydroxyacetophenone 74.46—1 574.42 ng ($r = 0.999\ 9$), benzoic acid 321.79—6 897.1 ng ($r = 0.999\ 8$), scutellarin 44.7—958.08 ng ($r = 0.999\ 7$), isochlorogenic acid B 32.53—697.22 ng ($r = 0.999\ 5$), isochlorogenic acid A 8.6—184.38 ng ($r = 0.999\ 6$), isochlorogenic acid C 31.93—684.3 ng ($r = 0.999\ 7$), Oroxylin A 7-*O*-glucuronide 254.82—5 461.66 ng ($r = 0.999\ 5$), wogonoside 10.18—218.12 ng ($r = 0.999\ 9$), baicalein 92.81—1 989.33 ng ($r = 0.999\ 6$), wogonin 31.17—668 ng ($r = 0.999\ 5$), and oroxylin A 11.74—251.73 ng ($r = 0.999\ 8$). The precision was good, and RSD was not more than 0.75%. The repeatability was good, and the RSD was not more than 1.95%. The stability was good in 8 h, and RSD was not more than 1.77%. The average recoveries and corresponding RSD values were 100.69% (0.55%), 101.99% (1.78%), 99.20% (0.72%), 100.13% (0.48%), 100.96% (1.74%), 100.02% (0.46%), 101.14% (0.27%), 99.87% (0.59%), 100.21% (1.56%), 102.18% (0.33%), 99.00% (1.02%), 98.82% (0.65%), 98.31% (0.58%), 96.01% (0.44%), and 100.56 (0.71%), respectively. The content of 10 batches of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, geniposide, 4-hydroxyacetophenone, benzoic acid, scutellarin, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, oroxylin A 7-*O*-glucuronide, wogonoside, baicalein, wogonin and oroxylin A were 0.246—0.322, 0.213—0.290, 0.203—0.267, 1.786—2.047, 0.035—0.046, 2.393—2.541, 0.263—0.392, 0.139—0.216, 0.032—0.067, 0.208—0.250, 2.120—2.648, 0.063—0.102, 0.081—1.429, 0.164—0.246, and 0.079—0.110 mg/mL. **Conclusion** HPLC coupled with wavelength switching and gradient elution method has been established for simultaneous determination of 15 components in YOS. The method is simple, quick, accurate, and it can be used for content determination and quality control of YOS.

Key words: HPLC-DVD; Yinzhihuang Oral Solution; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; geniposide; 4-hydroxyacetophenone; benzoic acid; scutellarin; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; oroxylin A 7-*O*-glucuronide; wogonoside; baicalein; wogonin; oroxylin A

茵栀黄口服液 (Yinzhihuang Oral Solution, YOS) 是由茵陈蒿、栀子、黄芩、金银花等中药组成, 是根据茵陈蒿汤结合茵栀黄注射液的有效成分改剂型而成的中成药制剂^[1], 具有清热解毒、利湿退黄的功效, 多用于肝胆湿热所致的黄疸 (症见面目悉黄、胸胁胀痛、恶心呕吐、小便黄赤及急慢性肝炎), 临床上在治疗新生儿黄疸、妊娠肝内胆汁淤积症 (ICP) 以及脂肪肝等方面有着很好的效果^[2-3]。方中茵陈为菊科蒿属植物茵陈蒿 *Artemisia capillaries* Thunb. 的干燥地上部分 (绵茵陈), 性微寒, 味苦、辛, 具有清热利湿、利胆退黄的作用^[4], 为君药; 栀子为茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 性寒, 味苦, 具有清热利湿、泻火除烦的功效^[5], 为臣药; 黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 性苦寒, 具有清热燥湿、泻火解毒的作用^[6], 为臣药; 金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 性寒, 味甘, 清热解毒、凉散风热^[7], 为

佐药, 诸药共奏, 共达清热、解毒、利湿、退黄的作用。

YOS 现行质量标准 (《中国药典》2015 年版一部) 收载了茵陈和栀子的薄层鉴别及黄芩苷和栀子苷的含量测定^[8], 标准中没有对金银花进行质量控制, 相关文献也有对其他成分的研究^[2,9], 但都不够全面, 基于现代中药的研究理念及中药质量标志物的概念^[10-12], 有必要对其进行多指标成分控制。方中茵陈 (绵茵陈) 主含绿原酸、香豆精、咖啡酸等, 其为治肝、胆疾患的主要成分^[4,13-14]; 栀子的有效成分主要为环烯醚萜苷类、栀子黄色素、有机酸类等^[15-16]; 黄芩主要有效成分为黄酮类化合物, 主要为黄芩苷和黄芩素、汉黄芩苷和汉黄芩素、千层纸素 A 苷和千层纸素 A 等, 活性明确, 其量的高低是黄芩质量优劣的主要指标^[17-18]; 金银花主要有效成分为有机酸类、黄酮类、皂苷类及鞣质等化学成分^[14,19]。本实验对 4 种药材含有的 14 种活性成分进行定量控制, 包括金银花、茵陈蒿及栀子中共有的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿

原酸 B、异绿原酸 C，茵陈蒿中的对羟基苯乙酮、槲子中的槲子苷、黄芩中的野黄芩苷、千层纸素 A 苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A。

近年来对药用辅料的关注越来越多，其给药物带来的影响得到了广泛和深入的研究，长期过量的摄入一些药品辅料成分会对人体造成较大的损伤^[20]，例如常见辅料苯甲酸钠，一般情况少量摄入苯甲酸，对人体并无毒害。然而研究表明，长期大量摄入苯甲酸或苯甲酸钠，会使体内细胞膜发生功能性紊乱，并破坏细胞平衡机制，从而引起腹泻、腹痛、流涎和心跳加快等症状；亦可与体内氢氧自由基结合生成有害物苯，能引起癌变，并有轻度蓄积毒性^[21]。在 YOS 的制备过程中就加入了枸橼酸、苯甲酸钠、阿司帕坦等辅料，本实验同时测定了制剂中苯甲酸钠（以苯甲酸计）的含量。

中药的品种真伪、质量优劣均能影响临床疗效，有的甚至危害人民的生命安全。由于各地用药习惯，自然条件等不同，使中药一药多源、同名异物、同物异名的现象十分常见^[10]。在 YOS 的配方中存在着金银花与山银花^[22]，槲子与水槲子^[23]，黄芩与甘肃黄芩、粘毛黄芩等混用的可能^[24]。本实验采用了山银花的特征成分灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙为鉴别点，以这 2 个成分的色谱峰的有无有效区别了金银花与山银花。

本实验建立了同时控制了 YOS 中 14 种活性成分的含量，1 种辅料成分的含量及 2 种金银花伪品成分的液相色谱鉴别方法，该方法高效、准确，为全面保证了 YOS 的安全性和有效性提供了依据。

1 仪器与材料

Milli-Q Academic 超纯水系统，美国默克密理博公司；Agilent1260 四元泵高效液相色谱仪，UV 检测器，OpenLAB 工作站，美国安捷伦公司；BT25S 型电子天平，0.01 mg，德国赛多利斯公司。

对照品新绿原酸（批号 1017116-11180003，质量分数 99.9%）、绿原酸（批号 110753-201817，质量分数 96.8%）、隐绿原酸（批号 1016946-34770005，质量分数 99.6%）、槲子苷（批号 110749-201718，质量分数 97.6%）、对羟基苯乙酮（批号 111897-201001，质量分数 99.9%）、苯甲酸（批号 100419-201703，质量分数 99.9%）、野黄芩苷（批号 110842-201709，质量分数 91.7%）、异绿原酸 B（批号 1016990-S0990006，质量分数 98.7%）、异绿原酸 A（批号 111782-201807，质量分数 94.3%）、异绿原酸

C（批号 111894-201102，质量分数 98.7%）、千层纸素 A 苷（批号 18113021，质量分数 98.8%）、汉黄芩苷（批号 112002-201702，质量分数 98.5%）、黄芩素（批号 111595-201808，质量分数 97.9%）、汉黄芩素（批号 111514-201706，质量分数 100%）、千层纸素 A（批号 480-11-5-6180，质量分数 97.6%）、灰毡毛忍冬皂苷乙（批号 111814-201604，质量分数 94.4%）、川续断皂苷乙（批号 111813-201202，质量分数 93.4%），其中异绿原酸 B、新绿原酸、隐绿原酸购于上海安谱实验科技有限公司，千层纸素 A 苷购于上海同田生物技术股份有限公司，千层纸素 A 购于上海诗丹德标准技术服务有限公司，其余对照品均购于中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯，水为一级水，其他试剂为分析纯。10 批 YOS，规格为 10 mL/瓶，批号分别为 181206、272588、181102、181110、181113、181001、272508、272538、272678、181209，茵陈提取物（批号 T181104）、槲子提取物（批号 T181004）、金银花提取物（批号 T181201）及黄芩提取物（批号 A35190111004）均来源于北京华润高科天然药物有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Welch Ultimate XB-C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~30 min，5%~11%乙腈；30~50 min，11%乙腈；50~65 min，11%~16%乙腈；65~97 min，16%~30%乙腈；97~120 min，30%~50%乙腈；120~130 min，50%~70%乙腈；0~35 min 在 325 nm 下测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸，35~40 min 下在 238 nm 下测定槲子苷，40~45 min 在 275 nm 下测定对羟基苯乙酮，60~65 min 在 228 nm 下测定苯甲酸，65~85 min 在 325 nm 下测定野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C，95~105 min 在 203 nm 下测定千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙，105~130 min 在 274 nm 下测定黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A；体积流量前 30 min 为 0.8 mL/min，其后为 1.0 mL/min；进样量为 10 μL。理论塔板数按所测各成分色谱峰计算均不得低于 4 000。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 C 对照品适量，置同一量瓶中，加 50%甲醇溶解并定容，作为混合对照品溶液，质量浓度分

别为绿原酸 0.957 mg/mL、隐绿原酸 0.932 mg/mL、异绿原酸 B 0.883 mg/mL、异绿原酸 C 0.909 mg/mL。另精密称取新绿原酸、异绿原酸 A、对羟基苯乙酮、黄芩素、野黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、千层纸素 A 对照品各适量，分别加 50% 甲醇溶解并定容，制成质量浓度分别为新绿原酸 0.788 mg/mL、异绿原酸 A 0.244 mg/mL、对羟基苯乙酮 0.147 mg/mL、黄芩素 2.540 mg/mL、野黄芩苷 1.306 mg/mL、汉黄芩素 0.835 mg/mL、汉黄芩苷 0.277 mg/mL、千层纸素 A 0.322 mg/mL 的单一成分的对照品储备液。再精密称取栀子苷、千层纸素 A 苷、苯甲酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙对照品适量，置同一 25 mL 量瓶中，加适量 50% 甲醇溶解，再分别吸取上述混合对照品溶液 2.0 mL，其余对照品储备液 5.0、2.0、2.0、2.0、2.0、2.0、2.0、2.0 mL，用 50% 甲醇定容，制成质量浓度分别为新绿原酸 157.6 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 76.6 $\mu\text{g/mL}$ 、隐绿原酸 74.6 $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 B 70.6 $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 A 19.6 $\mu\text{g/mL}$ 、异绿原酸 C 72.7 $\mu\text{g/mL}$ 、对羟基苯乙酮 11.8 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩素 203.2 $\mu\text{g/mL}$ 、野黄芩苷 104.5 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩素 66.8 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩苷 22.2 $\mu\text{g/mL}$ 、千层纸素 A 25.8 $\mu\text{g/mL}$ 、栀子苷 514.8 $\mu\text{g/mL}$ 、千层纸素 A 苷 552.8

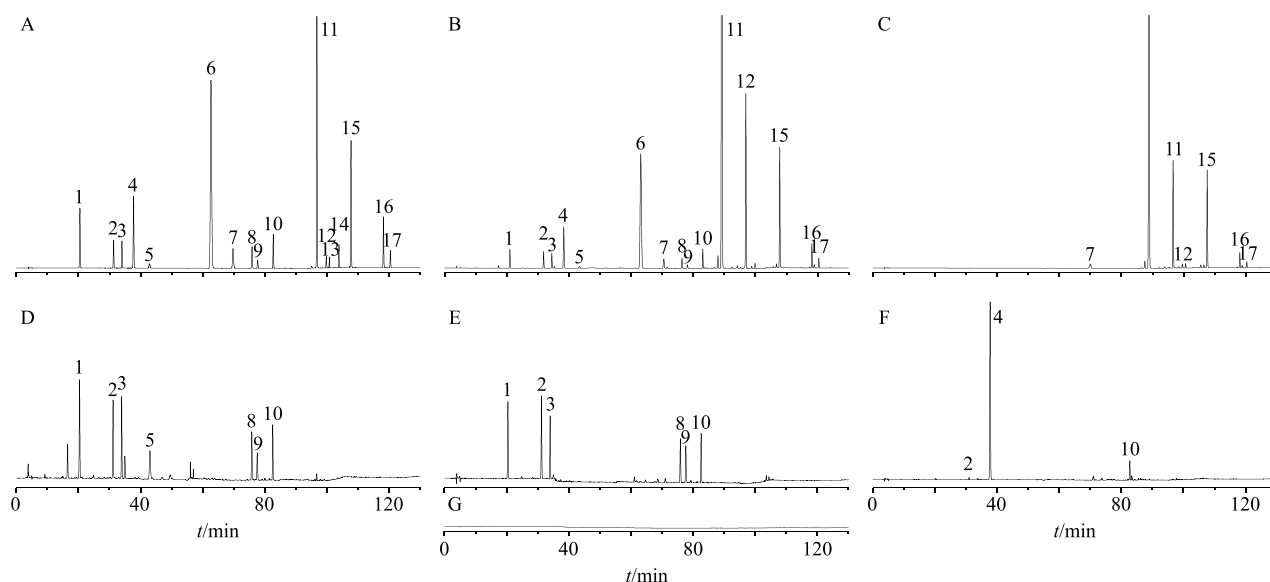
$\mu\text{g/mL}$ 、苯甲酸 690.4 $\mu\text{g/mL}$ 、灰毡毛忍冬皂苷乙 120.9 $\mu\text{g/mL}$ 、川续断皂苷乙 135.4 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密吸取 YOS 3 mL，置 50 mL 量瓶中，加 50% 甲醇至刻度，摇匀，滤过，制得 YOS 供试品溶液。

2.4 专属性试验

精密称取金银花提取物、栀子提取物、茵陈提取物、黄芩提取物适量，按照茵陈栀黄制备工艺分别制成单含金银花提取物、栀子提取物、茵陈提取物、黄芩提取物的样品，再分别按照“2.3”项下样品制备方法操作，制成样品溶液，再取“2.2~2.3”项下各溶液适量，依法进样测定，结果如图 1 所示，供试品溶液中所测成分新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 C、异绿原酸 A、对羟基苯乙酮、黄芩素、野黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、千层纸素 A、千层纸素 A 苷、苯甲酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙与其他峰分离度良好，均符合《中国药典》2015 年版规定，茵陈、栀子、金银花中除新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 等共有成分之外，其余成分及空白溶剂均没有相互干扰，结果见图 1。



1-新绿原酸 2-绿原酸 3-隐绿原酸 4-栀子苷 5-对羟基苯乙酮 6-苯甲酸 7-野黄芩苷 8-异绿原酸 B 9-异绿原酸 A 10-异绿原酸 C 11-千层纸素 A 12-汉黄芩苷 13-灰毡毛忍冬皂苷乙 14-川续断皂苷乙 15-黄芩素 16-汉黄芩素 17-千层纸素 A
1-neochlorogenic acid 2-chlorogenic acid 3-cryptochlorogenic acid 4-geniposide 5-4-hydroxyacetophenone 6-benzoic acid 7-scutellarin 8-isochlorogenic acid B 9-isochlorogenic acid A 10-isochlorogenic acid C 11-oroxylin A 7-O-glucuronide 12-wogonoside 13-macranthoidin B 14-dipsacoside B 15-baicalin 16-wogonin 17-oroxylin A

图 1 混合对照品 (A)、YOS 样品 (B)、黄芩提取物 (C)、茵陈提取物 (D)、金银花提取物 (E)、栀子提取物 (F)、空白 (G)
Fig. 1 HPLC of mixed reference substance (A), YOS sample (B), *Scutellariae Radix* extractum (C), *Artemisiae Scopariae Herba* extractum (D), *Lonicerae Japonicae Flos* extractum (E), *Gardeniae Fructus* extractum (F), and blank (G)

2.5 线性关系考察

取“2.2”项下的混合对照品溶液作为线性关系考察混合对照品溶液 VI, 再取该溶液适量, 用 50% 甲醇稀释至 60%、40%、20%、10%、5% 依次得到线性关系考察对照品溶液 V、IV、III、II、I。按照上述测定方法进行测定, 以进样量作为横坐标 (X), 测得的峰面积作为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算得线性回归方程、相关系数 (r)、线性范围及定量限和检测限, 结果见表 1。

2.6 精密度试验

取“2.2”项下混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 依法测定各成分的峰面积, 结果显示新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、栀子苷、对羟基苯乙酮、苯甲酸、野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 峰面积的 RSD 分别为 0.19%、0.36%、0.22%、0.08%、0.22%、0.16%、0.27%、0.33%、0.15%、0.17%、0.15%、0.26%、0.75%、0.18%、0.24%。

表 1 15 种指标成分的线性关系考察结果

Table 1 Results of linear relationship among 15 index components

化合物	t_R/min	检测波长/nm	回归方程	r	线性范围/ng	定量限/ng	检测限/ng
新绿原酸	20.46	325	$Y=3.567\ 0\ X+28.799$	0.999 8	74.46~1 574.42	1.25	0.38
绿原酸	31.26	325	$Y=3.379\ 8\ X+9.763\ 9$	0.999 6	34.58~741.10	0.79	0.24
隐绿原酸	34.06	325	$Y=3.121\ 1\ X+6.825\ 9$	0.999 7	34.65~742.62	1.22	0.37
栀子苷	37.77	238	$Y=1.486\ 6\ X+24.282$	0.999 9	234.42~5 024.45	1.72	0.52
对羟基苯乙酮	42.95	275	$Y=6.217\ 1\ X+2.302\ 3$	0.999 9	5.47~117.16	0.69	0.21
苯甲酸	63.05	228	$Y=5.219\ 9\ X+140.91$	0.999 8	321.79~6 897.10	1.62	0.49
野黄芩苷	69.78	325	$Y=3.239\ 1\ X+4.369\ 9$	0.999 7	44.70~958.08	1.45	0.44
异绿原酸 B	75.88	325	$Y=2.359\ 9\ X+5.589\ 3$	0.999 5	32.53~697.22	0.79	0.24
异绿原酸 A	77.67	325	$Y=4.493\ 4\ X+1.713\ 2$	0.999 6	8.60~184.38	0.86	0.26
异绿原酸 C	82.64	325	$Y=4.172\ 5\ X+7.026\ 6$	0.999 7	31.93~684.30	1.02	0.31
千层纸素 A 苷	96.65	203	$Y=3.989\ 6\ X+77.785$	0.999 5	254.82~5 461.66	1.58	0.48
汉黄芩苷	99.67	203	$Y=4.644\ 0\ X+3.872\ 4$	0.999 9	10.18~218.12	0.89	0.27
黄芩素	107.63	274	$Y=5.765\ 9\ X-4.770\ 7$	0.999 6	92.81~1 989.33	1.82	0.55
汉黄芩素	118.10	274	$Y=6.677\ 4\ X+12.605$	0.999 5	31.17~668.00	1.48	0.45
千层纸素 A	120.35	274	$Y=6.023\ 1\ X+3.211\ 7$	0.999 8	11.74~251.73	1.98	0.60

2.7 重复性试验

取同一批 YOS (批号 181206) 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 结果显示新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、栀子苷、对羟基苯乙酮、苯甲酸、野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 质量浓度的 RSD 分别为 0.54%、0.92%、0.36%、0.52%、1.11%、0.19%、0.42%、1.23%、0.99%、0.41%、1.15%、1.81%、1.95%、1.13%、0.90%。

2.8 稳定性试验

取 YOS (批号 181206) 1 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在室温下于 0、2.5、5、8、12、16、20、24 h 依法测定, 结果显示供试品溶液 8 h 内稳定, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、栀子苷、

对羟基苯乙酮、苯甲酸、野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 峰面积的 RSD 分别为 0.55%、0.97%、0.92%、0.51%、1.39%、0.33%、0.80%、1.29%、1.63%、0.44%、1.40%、1.77%、2.05%、0.77%、1.09%。考虑到绿原酸类和黄芩素等化合物均不太稳定, 其在样品长时间储存过程中可能存在分解情况, 本实验同时按“2.1”项色谱条件及“2.3”项样品制备方法分析了不同储存时间这 2 类化合物的含量变化情况 (相同储存时间选 3 批, 每批 2 份, 结果以均值计算), 结果见“2.11”项数据分析。

2.9 加样回收率试验

取已测定各成分质量浓度 (新绿原酸 0.300 mg/mL、绿原酸 0.266 mg/mL、隐绿原酸 0.248 mg/mL、栀子苷 1.820 mg/mL、对羟基苯乙酮 0.035

mg/mL、苯甲酸 2.534 mg/mL、野黄芩苷 0.268 mg/mL、异绿原酸 B 0.193 mg/mL、异绿原酸 C 0.051 mg/mL、异绿原酸 A 0.233 mg/mL、千层纸素 A 苷 2.304 mg/mL、汉黄芩苷 0.077 mg/mL、黄芩素 1.151 mg/mL、汉黄芩素 0.196 mg/mL、千层纸素 A 0.092 mg/mL) 批号为 181206 的 YOS 6 份, 每份 1.5 mL, 精密加入 0.226 mg/mL 新绿原酸对照品溶液 2 mL、0.196 mg/mL 绿原酸对照品溶液 2 mL、0.183 mg/mL 隐绿原酸对照品溶液 2 mL、0.145 mg/mL 异绿原酸 B 对照品溶液 2 mL、0.172 mg/mL 异绿原酸 C 对照品溶液 2 mL、0.201 mg/mL 野黄芩苷对照品溶液 2 mL、0.151 mg/mL 汉黄芩素对照品溶液 2 mL、0.038 mg/mL 异绿原酸 A 对照品溶液 2 mL、0.026 mg/mL 对羟基苯乙酮对照品溶液 2 mL、0.060 mg/mL 汉黄芩苷对照品溶液 2 mL、0.068 mg/mL 千层纸素 A 对照品溶液 2 mL、0.863 mg/mL 黄芩素对照品溶液 2 mL、0.939 mg/mL 梔子苷对照品溶液 3 mL、1.276 mg/mL 苯甲酸对照品溶液 3 mL、1.134 mg/mL 千层纸素 A 苷对照品溶液 3 mL, 再加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 制成加样回收率样品溶液。

依法进样测定各成分量, 结果所测 15 个成分的平均加样回收率(RSD 值)分别为 100.69%(0.55%)、101.99% (1.78%)、99.20% (0.72%)、100.13% (0.48%)、100.96% (1.74%)、100.02% (0.46%)、101.14% (0.27%)、99.87% (0.59%)、100.21% (1.56%)、102.18%(0.33%)、99.00%(1.02%)、98.82% (0.65%)、98.31% (0.58%)、96.01% (0.44%)、100.56 (0.71%)。

2.10 样品定量测定

取 10 批次 YOS 样品, 每批 3 份, 按照“2.3”项方法制备 YOS 供试品溶液, 依法进样测定, 采用外标法计算样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、梔子苷、对羟基苯乙酮、苯甲酸、野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 含量, 结果见表 2。

10 批次供试品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、梔子苷、对羟基苯乙酮、苯甲酸、野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 量分别为 0.246~0.322、0.213~0.290、0.203~0.267、1.786~2.017、0.034~0.046、2.393~2.543、0.263~0.392、0.139~0.216、0.032~0.067、0.208~0.250、2.120~2.648、0.063~0.102、0.175~1.429、0.164~0.246、0.079~0.110 mg/mL。

2.11 数据分析

用 Excel 2003 对“2.8”项下储存时间和含量变化结果进行数据整理, 用 SPSS 22.0 对整理后的数据进行统计分析, 结果(表 3) 15 种成分中除新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、黄芩素存在显著性差异外 ($P < 0.05$), 其余成分批次间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。通过对比含量测定结果 RSD 发现, 野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 共 7 种成分的 RSD 值均较大 ($> 10\%$), 其余成分均在 10% 以内。分析差异主要原因来自于活性

表 2 10 批 YOS 样品中 15 种成分的定量测定结果 ($n = 3$)

Table 2 Quantitative determination results of 15 components in ten batches of YOS samples ($n = 3$)

批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)														
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	栀子苷	对羟基苯乙酮	苯甲酸	野黄芩苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	千层纸素 A 苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	千层纸素 A
181206	0.300	0.266	0.248	1.820	0.035	2.534	0.268	0.193	0.051	0.233	2.304	0.077	1.151	0.196	0.092
272588	0.246	0.213	0.248	1.952	0.046	2.536	0.339	0.139	0.033	0.208	2.599	0.082	0.175	0.140	0.084
181102	0.322	0.290	0.267	1.801	0.040	2.531	0.263	0.219	0.067	0.250	2.521	0.090	1.227	0.238	0.107
181110	0.279	0.255	0.235	1.837	0.037	2.521	0.293	0.205	0.067	0.223	2.231	0.069	1.385	0.190	0.088
181113	0.285	0.251	0.239	1.820	0.042	2.497	0.293	0.199	0.063	0.228	2.285	0.064	1.413	0.190	0.088
181001	0.319	0.279	0.264	1.896	0.040	2.541	0.268	0.205	0.061	0.247	2.583	0.094	1.218	0.246	0.110
272508	0.266	0.235	0.218	1.902	0.042	2.501	0.338	0.161	0.038	0.224	2.648	0.100	0.193	0.172	0.082
272538	0.261	0.228	0.212	1.942	0.045	2.502	0.344	0.161	0.037	0.221	2.613	0.102	0.176	0.169	0.083
181112	0.295	0.259	0.249	1.786	0.041	2.506	0.293	0.216	0.065	0.234	2.219	0.063	1.429	0.190	0.088
272858	0.256	0.224	0.211	2.017	0.034	2.543	0.326	0.156	0.037	0.224	2.573	0.092	0.205	0.235	0.100

表 3 YOS 样品中绿原酸类成分和黄芩素质量浓度随储存时间变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 3 Changes of chlorogenic acids and baicalin quality concentration in YOS samples with storage time ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

储存时间/月	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)					
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	黄芩素
4	0.318 0±0.002 0 ^a	0.281 0±0.003 9 ^a	0.262 0±0.000 9 ^a	0.215 0±0.001 0 ^a	0.068 0±0.000 3 ^a	1.411 0±0.023 0 ^a
5	0.297 0±0.002 4 ^a	0.271 0±0.000 9 ^a	0.255 0±0.001 0 ^a	0.208 0±0.001 8 ^a	0.066 0±0.001 2 ^a	1.227 0±0.018 1 ^a
6	0.301 0±0.002 1 ^a	0.279 0±0.000 9 ^a	0.248 0±0.000 9 ^a	0.205 0±0.000 3 ^a	0.061 0±0.000 1 ^a	1.118 0±0.035 6 ^a
10	0.246 0±0.005 8 ^b	0.227 0±0.001 9 ^b	0.217 0±0.002 1 ^b	0.143 0±0.000 8 ^b	0.038 0±0.001 7 ^b	0.189 0±0.002 1 ^b
12	0.238 0±0.001 0 ^b	0.213 0±0.002 8 ^b	0.203 0±0.001 5 ^b	0.138 0±0.004 5 ^b	0.033 0±0.000 3 ^b	0.178 0±0.002 7 ^b

不同字母表示数据间差异显著 ($P < 0.05$)Different letters represent significant differences in date ($P < 0.05$)

成分的分解,其次为不同批次原料的差异,综合结果表明该药生产过程控制基本良好。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

在流动相选择时,首先考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液流动相体系,对比结果显示乙腈-0.1%磷酸水溶液流动相体系在峰形及分离度方面均好于其他体系,因此采用了乙腈-0.1%磷酸水溶液流动相体系,并且优化了流速条件及梯度洗脱条件,各待测成分均达到了良好的分离。检测波长是根据对照品溶液及供试品溶液在 DAD 检测器上紫外吸收中显示的最大吸收波长来确定,新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 及野黄芩苷的检测波长为 325 nm, 槲子苷检测波长为 238 nm, 对羟基苯乙酮检测波长为 275 nm, 苯甲酸检测波长为 228 nm, 千层纸素 A 苷和汉黄芩苷的最大紫外吸收显示为 272 nm, 但是考虑到在此处要同时测定灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙, 因此采用了 203 nm, 通过对比发现, 千层纸素 A 苷和汉黄芩苷在 203 nm 下峰面积比 270 nm 更大且峰形良好, 样品此处也没有杂质干扰, 因此千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙检测波长为 203 nm, 黄芩素、汉黄芩素及千层纸素 A 检测波长为 274 nm。

3.2 实验结果分析

实验结果表明,在本实验建立的色谱条件下,采用 HPLC-DVD 法同时测定 YOS 中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、槲子苷、对羟基苯乙酮、苯甲酸、野黄芩苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 及定性鉴别灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂

苷乙,所测成分色谱峰与其他成分分离良好,阴性无干扰,各项方法学验证符合要求,测定结果准确,为保证 YOS 的安全性和有效性提供了一个有效的评价标准,且为进一步阐明 YOS 的药效机制奠定了一定的基础^[25]。通过对样品稳定性考察及测定结果发现,绿原酸类和黄芩素等成分不稳定,样品储存 10 个月后显著降低,野黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 含量测定结果 RSD 偏大,提示该药在有效期的制定及运输销售过程中的储存条件等方面需要注意,其次对原料药材的控制也需要进一步加强,实验结果为确保样品的安全性和有效性提供了参考。本实验中由于供试品中黄芩苷的质量浓度较高而未能对其进行定量控制,但在拟定色谱条件下也能达到较好分离,通过本课题组按法定标准检验黄芩苷含量也均在限定的范围内且较为一致。所测样品中均未检出灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙,表明该生产企业在投料中控制严格,没有采用金银花的伪品山银花进行投料。所测样品中苯甲酸的含量较为稳定,折算成苯甲酸酸钠后略低于理论的使用量,未发现过量使用的现象,以上结果表明企业生产过程基本控制良好。

参考文献

- [1] 马印图,李莉华,李玉秋,等.茵栀黄口服液临床应用研究进展[J].解放军医药杂志,2014,26(6):88-91.
- [2] 张炜文.一测多评法同时测定茵栀黄口服液中 5 种指标性成分的含量[J].中国药师,2017,20(10):1764-1767.
- [3] 严晶晶,夏晓萍,邵娜.茵栀黄口服液辅助治疗妊娠肝内胆汁淤积的 Meta 分析[J].中国中药杂志,2016,41(23):4428-4435.
- [4] 曹锦花.茵陈的化学成分和药理作用研究进展[J].沈阳药科大学学报,2013,30(6):489-494.
- [5] 李兆星,申洁,毕武,等.中国槲子属植物资源及

- 利用研究进展 [J]. 中药材, 2017, 40(2): 498-503.
- [6] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.
- [7] 柯昌虎, 严 慧, 李 鹏, 等. 中药金银花指纹图谱的研究进展 [J]. 中南药学, 2017, 15(9): 1257-1262.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [9] 张先林. UPLC-MS/MS 法测定茵栀黄口服液液中栀子苷与绿原酸的含量 [J]. 药学与临床研究, 2018, 26(3): 193-195.
- [10] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [11] 姜红宇, 刘焱林, 蒋荣娜, 等. 基于 HPLC 波长切换联合梯度洗脱技术的越鞠片中 9 种主要成分定量研究 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3092-3097.
- [12] 张 毅, 周 慧. 基于 HPLC 波长切换联合梯度洗脱技术的双参龙胶囊中 10 种主要成分定量研究 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1081-1086.
- [13] 王 韵, 赵 亮, 柴逸峰, 等. RP-HPLC 法同时测定茵陈蒿汤中 14 个成分 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(3): 393-401.
- [14] Shi H Y, Dong L, Bai Y H, *et al.* Chlorogenic acid against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 623(1/3): 119-124.
- [15] Wang J, Zhang Y Y, Liu R X, *et al.* Geniposide protects against acute alcohol-induced liver injury in mice via up-regulating the expression of the main antioxidant enzymes [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2015, 93(4): 1-7.
- [16] 左月明, 严 欢, 张忠立, 等. 栀子化学成分研究 (VI) [J]. 中药材, 2017, 40(3): 596-599.
- [17] 刘金欣, 孟繁蕴, 张胜海, 等. UPLC 同时测定黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层质素 A [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1477-1480.
- [18] Lu Y J, Joerger R, Wu C Q. Study of the chemical composition and antimicrobial activities of ethanolic extracts from roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(20): 10934-10942.
- [19] 王春秋, 李雯霞. RP-HPLC 法同时测定金银花中 10 种化学成分 [J]. 中成药, 2015, 37(9): 1973-1977.
- [20] 吕秋军, 曹 萍. 药用辅料的不良反应及其安全管理 [J]. 药物不良反应杂志, 2010, 12(6): 410-414.
- [21] 肖 慧, 李 雪, 洪建文. HPLC 法测定注射用头孢匹胺钠中苯甲酸含量方法研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(3): 360-363.
- [22] 王浩兵, 邓 力, 马元春, 等. 基于 UHPLC 的金银花和山银花的鉴别及测定研究 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2516-2521.
- [23] 刘知远, 吴 安. 浅析栀子与水栀子的异同点 [J]. 海峡药学, 2012, 24(9): 31-33.
- [24] 乔 民, 白 鸥, 张丽明. 中药黄芩及其伪品的快速鉴定 [J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(11): 696-697.
- [25] 谭 桢, 刘爱明, 罗 敏, 等. 茵栀黄注射液抗胆汁淤积药效成分的筛选及其作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6): 1113-1118.