

药 学 进 展 及 其 引 发 的 思 索 [J]. 中 草 药 , 2003 , 34 (2) : 185-188.

[8] 国 家 药 典 委 员 会 . 中 华 人 民 共 和 国 药 典 : 2010 年 版 一 部 [S]. 北 京 : 中 国 医 药 科 技 出 版 社 , 2010 : 214.

[9] Mengs U. Acute toxicity of aristolochic acid in rodents [J]. *Arch Toxicol* , 1987 , 59 (5) : 328-331.

[10] 郭永超,林哲绚,李 慧,等. 三种马兜铃酸类化合物对 HK_2 细胞的毒性比较 [J]. 癌变·畸变·突变, 2006 , 2 (6) : 88-92.

[11] Wu T S, Damu A, Su C R, *et al.* Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochi* species [J]. *Studies in Nat Prod Chem* , 2005 , 32 : 855-1018.

银黄口服液近红外光谱测定和相关性模型建立

张叶霞¹, 潘金火¹, 蔡宝昌^{2,3}, 秦昆明³, 刘 晓^{1,2}, 王 旻润¹, 严国俊^{1*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学, 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023; 3. 南京海昌中药集团有限公司, 江苏 南京 210061)

摘要: **目的** 近红外光谱法测定银黄口服液(金银花、黄芩)中绿原酸和黄芩苷的含有量,并建立相关性模型用于定量分析。**方法** 采集30批银黄口服液的近红外光谱数据,HPLC和偏最小二乘法建立绿原酸和黄芩苷的相关性模型。**结果** 绿原酸和黄芩苷的最佳波段均为9 401.6~7 826 cm⁻¹, R²分别为0.985 2和0.988 1,交叉验证均方差(RMSECV)分别为0.002 96和0.018,相对分析误差(RPD)分别为8.23和9.27。将该模型应用于检测两者的含有量时,其预测值的马氏距离(Mash distance)均小于1,相对误差分别为2.12%和1.67%。**结论** 该模型预测性良好,可用于银黄口服液的实时监测和质量控制。

关键词: 银黄口服液; 绿原酸; 黄芩苷; 相关性模型; 近红外光谱; HPLC; 偏最小二乘

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)03-0565-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.03.018

Determination of Yinhuang Oral Liquid by near-infrared spectroscopy and establishment of dependency model

ZHANG Ye-xia¹, PAN Jin-huo¹, CAI Bao-chang^{2,3}, QIN Kun-ming³, LIU Xiao^{1,2}, WANG Ye-run¹, YAN Guo-jun^{1*}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Engineering Research Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Materia Medica Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Nanjing Haichang Chinese Medicine Co., Ltd., Nanjing 210061, China)

ABSTRACT: **AIM** To determine the contents of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang Oral Liquid (*Lonicera japonica* and *Scutellaria baicalensis*) by near-infrared spectroscopy and to establish a dependency model for quantitative analysis. **METHODS** Based on the near-infrared spectroscopy data of thirty batches of Yinhuang Oral Liquid, the dependency model for chlorogenic acid and baiclin was established by HPLC and partial least squares. **RESULTS** 9 401.6–7 826 cm⁻¹ served the best waveband for the detection of both chlorogenic acid and baicalin, 0.985 2 and 0.988 1 were for R², 0.002 96 and 0.018 were for root-mean-squares error of cross-validation (RMSECV), and 8.23 and 9.27 were for regression point displacement (RPD), respectively. When this model was used for the determination of these two constituents, the predicted Mash distance values of both constituents

收稿日期: 2015-05-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81202922); 江苏省科技支撑计划工业项目(BE2012011); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK2012089)

作者简介: 张叶霞(1991—),女,硕士生,研究方向为新药剂型与开发。Tel: 15805171380, E-mail: 15805171380@163.com

* 通信作者: 严国俊(1980—),男,副教授,研究方向为中药新型给药系统及评价。Tel: 13770598093, E-mail: joun.yan@163.com

were less than 1, whose relative errors were 2.12% and 1.67%, respectively. **CONCLUSION** With good predictability, this model can be applied to the real time monitoring and quality control of Yinhuang Oral Liquid.

KEY WORDS: Yinhuang Oral Liquid; chlorogenic acid; baicalin; dependency model; near-infrared spectroscopy; HPLC; partial least squares

银黄口服液由金银花和黄芩提取物加工制成, 收载于《中国药典》2010 版一部, 具有清热解毒, 疏风利咽功效, 临床作用显著。其作为液体制剂, 是许多中成药的中间体, 如双黄连口服液, 清开灵注射液^[1-2]等, 故优选其含有量测定方法对工业化生产具有重大意义。

近红外光谱分析技术是光谱测量技术和化学计量学的结合, 因其简单可靠、快捷、无损, 并可同时测定多组分, 故可用于非破坏测定、在线分析等, 迄今已应用于食品、药品、农业^[3-9]等多个领域, 具有巨大的发展空间和经济效应, 可实现质量源于控制的理念。过程分析技术^[10-14]是目前制药行业关注的热点, 该方法旨在设计、分析和控制药品生产过程, 通过及时测量原药材生产时物料和工艺过程的关键质量和性能指标, 以确保终端产品的质量。由于近红外光谱技术无需对样品进行复杂的前处理, 分析时间短, 故为过程分析技术的常用工具之一。

本实验采用近红外光谱法, 对银黄口服液进行定量分析, 结合 HPLC 和偏最小二乘法, 建立其主成分绿原酸和黄芩苷的相关性模型, 从而为实现该药物工业化生产的全程实时质量监控提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 Waters 2000 高效液相色谱仪, 包括 Waters 2996 DAD 检测器、Epower 2.0 色谱工作站 (美国 Waters 公司)。Bruker-Tensor37 傅里叶变换中、近红外光谱仪, 包括 OPUS 5.0 光谱采集和处理软件、Pbs 检测器 (德国 Bruker 公司); 梅特勒 MS-105DU 电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

乙腈、甲醇为色谱纯; 95% 乙醇为化学纯; 甲酸、磷酸、盐酸、乙酸、氢氧化钠为分析纯; 娃哈哈纯净水。

1.2 实验材料 绿原酸 (批号 110735-200212)、黄芩苷 (批号 110715-200212) 对照品 (中国食品药品检定研究院)。金银花、黄芩 (江苏海昇药业有限公司)。共收集 2 个厂家不同批次的银黄口服液, 见表 1。

表 1 银黄口服液的来源
Tab. 1 Sources of Yinhuang Oral Liquid

编号	批号	来源	公司
1 ~ 10	131120 ~ 131138	陕西	陕西白鹿制药股份有限公司
11 ~ 20	121201 ~ 121215	湖北	湖北太子药业有限公司
21 ~ 30	140501 ~ 140510	自制	南京中医药大学

1.3 银黄口服液的样品制备

1.3.1 自制银黄口服液 参照《中国药典》2010 版, 按比例分别制得金银花和黄芩提取物, 均符合国家标准。

1.3.2 HPLC 法样品制备 取编号 1 ~ 30 的银黄口服液各 10 mL, 置于离心机中, 20 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液 0.1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 密封冷藏保存。

1.3.3 NIR 法样品制备 取“1.2”项下 30 个样品, 每个 10 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 即得 30 批银黄口服液样品, 密封冷藏保存。

1.4 绿原酸和黄芩苷的 HPLC 测定

1.4.1 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 7 min, 12% ~ 18% A; 7 ~ 9 min, 18% ~ 28% A; 9 ~ 16 min, 28% ~ 62% A; 16 ~ 18 min, 62% ~ 100% A); 全波长扫描, 绿原酸的检测波长为 327 nm, 黄芩苷的检测波长为 280 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL; 体积流量 1.0 mL/min。色谱图见图 1。

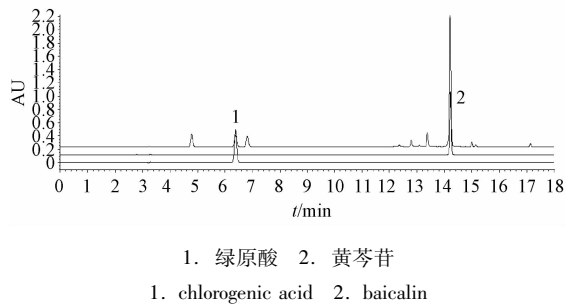


图 1 银黄口服液的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of Yinhuang Oral Liquid

1.4.2 标准曲线的制备 精密称取绿原酸对照品 6.26 mg, 甲醇定容至 10 mL, 再取 1 mL, 甲醇定

容至 10 mL，得质量浓度为 0.062 6 mg/mL 的储备液。再精密称取黄芩苷对照品 5.11 mg，甲醇定容至 10 mL，得质量浓度为 0.511 0 mg/mL 的储备液。

精密吸取上述对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μL 进样，在“1.4.1”项色谱条件下测定。以各对照品进样量 (μg) 为横坐标 (X)，相应的峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，得回归方程分别为绿原酸 $Y=923\,757X-22\,822$ ($r=0.999\,9$)，黄芩苷 $Y=3\,069\,553X-628\,015$ ($r=0.999\,9$)。

结果表明，绿原酸和黄芩苷分别在 0.125 2 ~ 1.252 μg 、1.022 ~ 10.22 μg 范围内线性关系良好。

1.4.3 精密度试验 分别精密吸取每 1 mL 含绿原酸 0.062 6 mg、黄芩苷 0.511 0 mg 的对照品溶液 10 μL ，进样测定，连续 6 次。结果，两者 RSD 分别为 0.78% 和 0.92%，表明仪器精密度良好。

1.4.4 稳定性试验 取同一样品溶液（批号 131138）6 份，按“1.3.2”项下方法制备样品溶液，于 0、2、4、8、16、24 h 进样 10 μL ，测定绿原酸和黄芩苷的含有量。结果，两者 RSD 分别为 2.0% 和 2.2%，表明样品溶液在 24 h 内稳定。

1.4.5 重复性试验 取同一样品溶液（批号 131138）6 份，按“1.3.2”项下方法制备样品溶液，进样测定。结果，绿原酸和黄芩苷的平均含有量分别为 7.38 mg/mL (RSD = 1.8%) 和 28.55 mg/mL (RSD=0.89%)，表明该方法重复性良好。

1.4.6 加样回收率试验（表 2） 精密称取绿原酸、黄芩苷适量，用甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 0.121 mg 和黄芩苷 0.309 mg 的混合对照品溶液。精密量取“1.3.2”项下批号为 131138 的银黄口服液 1 mL，共 6 份，分别置于 2 mL 量瓶中，精密

表 2 加样回收率试验结果

	Tab. 2 Results of recovery tests					
	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
绿原酸	0.074 6	0.121 0	0.192 1	97.05	96.1	1.1
	0.074 6	0.121 0	0.196 4	100.65		
	0.074 6	0.121 0	0.171 2	79.81		
	0.074 6	0.121 0	0.198 8	102.60		
	0.074 6	0.121 0	0.189 0	94.52		
	0.074 6	0.121 0	0.197 6	101.67		
黄芩苷	0.267 5	0.309 0	0.588 9	103.19	97.4	1.7
	0.267 5	0.309 0	0.548 1	89.99		
	0.267 5	0.309 0	0.568 9	96.72		
	0.267 5	0.309 0	0.586 8	102.53		
	0.267 5	0.309 0	0.577 2	99.41		
	0.267 5	0.309 0	0.556 3	92.66		

加入混合对照品溶液 1 mL，甲醇定容至刻度，摇匀，静置 30 min，进样测定。结果，两者平均加样回收率分别为 96.1% (RSD = 1.1%) 和 97.4% (RSD = 1.7%)，表明该方法加样回收率良好。

1.5 银黄口服液近红外光谱测定 扫描范围 14 000 ~ 3 900 cm^{-1} ，分辨率 4 cm^{-1} ，扫描 16 次，光程 1 mm。平行 3 次，每次扫描 30 个样品，共 90 次，见图 2。

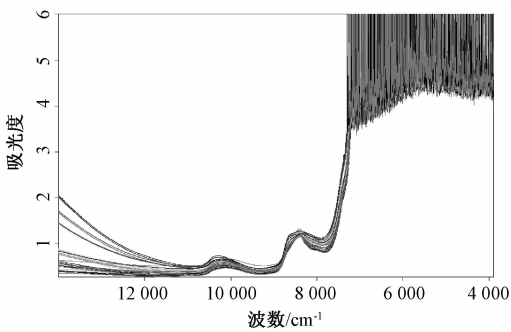


图 2 银黄口服液的近红外图谱

Fig. 2 Near-infrared image of Yinhuang Oral Liquid

2 结果与讨论

2.1 HPLC 测定 取“1.3.2”项下溶液，共 30 批，分别精密吸取 10 μL 进样，测定各批次银黄口服液中绿原酸和黄芩苷的含有量范围。结果见表 3。

表 3 绿原酸和黄芩苷的含有量范围

Tab. 3 Content ranges of chlorogenic acid and baicalin

批次	绿原酸/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	黄芩苷/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1 ~ 10	7.25 ~ 7.47	26.75 ~ 28.64
11 ~ 20	6.84 ~ 6.94	29.86 ~ 32.87
21 ~ 30	5.99 ~ 6.30	55.32 ~ 58.25

2.2 模型的建立与优化 将已扫描的样品光谱分成校正集和检验集两组。由于预测样品的浓度范围必须在所建模型内，故检验集样品从不同厂家和自制的银黄口服液中随机取样，用以检验所建模型的效果。余下的样品作为校正集样品，用以建立不同成分的近红外分析数学模型。

应用 OPUS 5.0 软件，对原始光谱进行平滑处理，优化用于建模的波段、光谱预处理方法，剔除预测值异常样品，偏最小二乘法对校正集进行交叉检验，再采用留一法进行内部交叉验证，确定模型主成分数，并对检验集样品进行模型外部预测。评价指标采用决定系数 (R^2)、交叉验证均方差 (RMSECV) 和相对分析误差 (RPD)，获得最佳

光谱数据预处理方法、谱区范围和优化阶，见表4。

表4 优化模型参数

Tab. 4 Parameters for optimized model		
参数	绿原酸	黄芩苷
Preprocessing	First derivative + Straight line subtraction	Constant offset eliminative
Regions/cm ⁻¹	9 401.6 ~ 7 826	9 401.6 ~ 7 826
Rank	2	5
R ²	0.985 2	0.988 1
RMSECV	0.002 96	0.018 1
RPD	8.23	9.27

模型预测值与真实值的相关系数图见图3和图4。

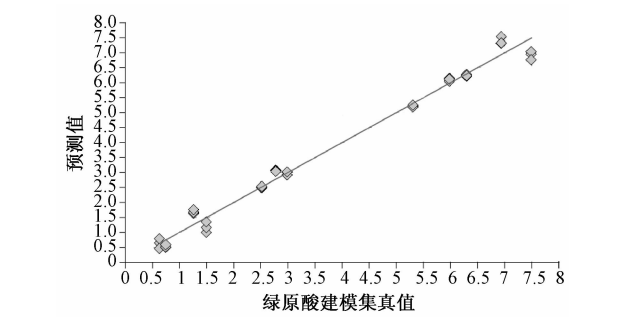


图3 绿原酸预测值和真实值的相关系数图谱

Fig. 3 Correlation coefficient image of predicted values and true values of chlorogenic acid

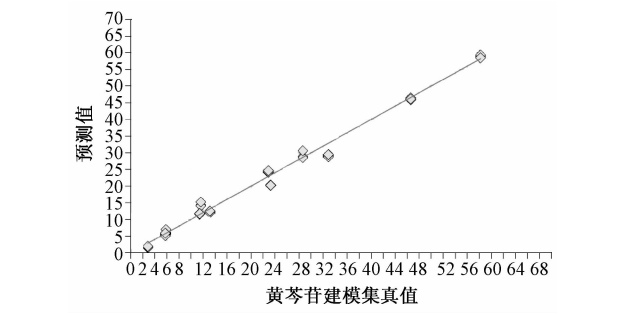


图4 黄芩苷预测值和真实值的相关系数图谱

Fig. 4 Correlation coefficient image of predicted values and true values of baicalin

由图可知，预测值和真实值之间的线性相关十分显著，表明该模型可有效表征银黄口服液中绿原酸和黄芩苷含有量的模型预测值与真实值。

2.3 模型稳定性与预测效果评价

2.3.1 重复性试验 取同一样品溶液（批号131138）6份，在“1.5”项条件下测定，得到近红外扫描图，用模型预测其中绿原酸和黄芩苷的含有量。结果，两者平均含有量分别为7.476 mg/mL

568

（RSD = 0.96%）和29.03 mg/mL（RSD = 2.0%），表明该模型重复性良好。

2.3.2 日间精密密度试验 取同一样品溶液（批号131138）1份，在“1.5”项条件下，于0、24、48、72、96、120 h测定，得到近红外扫描图，用模型预测其中绿原酸和黄芩苷的含有量。结果，两者平均含有量分别为7.453 mg/mL（RSD = 1.9%）和28.87 mg/mL（RSD = 1.3%），表明在120 h内日间精密密度良好。

2.3.3 模型预测效果的评价 为验证上述模型的预测效果，将相关性模型用于预测余下样本中绿原酸和黄芩苷的含有量。结果见表5和表6。

表5 绿原酸的预测值

Tab. 5 Predicted values of chlorogenic acid					
批号	真值/ (mg·mL ⁻¹)	预测值/ (mg·mL ⁻¹)	马氏距离	F值	RSD/ %
8	5.662	5.849	0.056	0.909	0.085 9 -3.37
16	1.428	1.447	0.024	0.582	0.068 8 -1.35
24	0.653	0.649	0.050	0.561	0.067 5 1.65

表6 黄芩苷的预测值

Tab. 6 Predicted values of baicalin					
批号	真值/ (mg·mL ⁻¹)	预测值/ (mg·mL ⁻¹)	马氏距离	F值	RSD/ %
8	24.300	23.890	0.120	1.679	0.030 8 1.65
16	6.174	6.098	0.077	1.341	0.027 2 1.24
24	2.797	2.738	0.120	1.242	0.026 2 2.11

其中，马氏距离是指预测光谱与建模光谱平均主成分特征向量之间的距离，与所有建模光谱平均主成分特征向量之间的距离的比值，值越小，说明预测的可靠性越好。以上两表中各样品的马氏距离均小于1，绿原酸和黄芩苷的RSD分别为2.1%和1.7%，说明预测结果十分可靠，所建立的银黄口服液相关性模型预测性能良好，可用于在线监测该药物工业化大生产的实时含有量。

3 讨论

本实验采用近红外光谱法测定银黄口服液中绿原酸和黄芩苷的含有量，并结合HPLC和偏最小二乘法建立其相关性模型。结果显示，该模型准确可靠，比HPLC法更快速、简便、环保、准确，可为中药制剂生产实时监测提供可靠方法。

参考文献：

[1] 程伟, 史新元, 乔延江. 双黄连口服液中黄芩苷含量近红外测定方法的建立与验证[J]. 世界科学技术: 中医药

现代化, 2012, 14(4): 1872-1876.

[2] 吴志生, 史新元, 隋丞琳, 等. 清开灵注射液中间体银黄液中黄芩苷含量近红外测定方法的建立和验证[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 1021-1024.

[3] 刘德力, 周衍华, 赵文星, 等. 赣南脐橙叶片含水量和叶绿素的检测[J]. 安徽农业科学, 2015, 43 (12): 210-213.

[4] 宋 涛, 张凤桦, 刘耀敏, 等. 透反射近红外光谱法快速测定大豆油中的脂肪酸[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(8): 2100-2104.

[5] 杨复森, 武卫红, 王 宁, 等. 基于 AOTF-近红外光谱技术的川贝母药材即时快速鉴别研究[J]. 中成药, 2013, 35 (1): 135-141.

[6] 陈 杨, 范 琦, 王以武, 等. 近红外光谱法高通量分析黄连上清丸的总体质量差异[J]. 中成药, 2014, 36(5): 973-981.

[7] 刘 桦, 叶晓岚, 杨 光, 等. 近红外光谱技术在线监测积雪草药材活性成分的大孔树脂分离纯化过程[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(1): 98-101.

[8] Ute H, Manfred S, Antje P. Non-destructive determination of cellulose functional groups and molecular weight in pulp hand sheets and historic papers by NIR-PLS-R [J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 76(3): 374-380.

[9] Wu Y W, Sun S Q, Zhou Q, *et al*. Fourier transform mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid quality assessment of Chinese medicine preparation Honghua Oil [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(3): 498-504.

[10] 陈 晨, 李文龙, 瞿海滨. 近红外透反射光谱法用于复方苦参注射液渗漉过程在线检测[J]. 中草药, 2013, 44 (1): 47-51.

[11] 史新珍, 王志国, 杜 文, 等. 近红外光谱结合新型模型传递方法用于糖料的在线质量监控[J]. 分析化学, 2014, 42(11): 1673-1678.

[12] 丁海樱, 金 叶, 刘雪松. 中药粉末混合过程近红外在线检测研究 [J]. 中国药 学 杂 志, 2013, 48 (14): 1151-1156.

[13] 徐 冰, 罗 赣, 林兆洲. 基于过程分析技术和设计空间的金银花醇沉加醇过程终点检测[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(10): 2284-2289.

[14] 郭正飞, 戴连奎. 基于近红外谱形分析的中药提取过程终点判断[J]. 光谱实验室, 2013, 30(5): 2418-2422.

10 种含栀子中药制剂中栀子苷与西红花苷- I 的同时测定

张小琴, 汤晟凌*, 吕伟旗
(温州医科大学附属第六医院, 丽水市人民医院药剂科, 浙江 丽水 323000)

摘要: **目的** 采用 HPLC 法与一测多评法, 同时测定 10 种含栀子中药制剂中栀子苷与西红花苷- I 的含有量。 **方法** 制剂分析采用 Aglient 1200 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱; 检测波长 238 nm (0 ~ 20 min)、440 nm (20 ~ 30 min); 柱温 30 ℃。 **结果** HPLC 图谱的峰形及分离度良好。以栀子苷为内标物, 西红花苷- I 的相对校正因子为 1.085 (RSD = 0.73%), 其重现性不受色谱柱影响。 **结论** 除清火栀麦片与小儿清热片外, 其余 8 种含栀子中药制剂中栀子苷的含有量均符合药典标准。

关键词: 中药制剂; 栀子; 栀子苷; 西红花苷- I; HPLC; 一测多评

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)03-0569-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.03.019

Simultaneous determination of geniposide and crocin-I in ten traditional Chinese medicinal preparations containing *Gardenia jasminoides*

ZHANG Xiao-qin, TANG Cheng-ling*, LV Wei-qi
(The Sixth Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University; Department of Pharmacy, Lishui People's Hospital, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: **AIM** To simultaneously determine the contents of geniposide and crocin-I in ten traditional Chi-

收稿日期: 2015-09-08
作者简介: 张小琴, 女, 主管药师, 从事医院制剂与中成药活性成分研究。E-mail: lstracy1027@163.com
* 通信作者: 汤晟凌 (1977—), 女, 副主任药师, 从事中药新药开发与临床药学研究。E-mail: aurora0119@163.com