中图分类号：R917；R927　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2025)14－0078－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.14.017

高效液相色谱法同时测定尿石清合剂中3种成分含量*

胡玉良，曾聪彦，杨素红

（广东省中山市中医院，广东 中山 528401）

摘要：目的 建立同时测定尿石清合剂中3种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。**方法** 色谱柱为DIKMA Luster C_{18}柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相为乙腈－0.1%磷酸溶液(梯度洗脱)，流速为1.0 mL/min，检测波长为326 nm(绿原酸)、226 nm(栀子苷、夏佛塔苷)，柱温为30℃，进样量为10 μL。**结果** 绿原酸、栀子苷、夏佛塔苷进样量分别在0.085～1.356 μg、0.419～6.708 μg、0.083～1.332 μg范围内与峰面积线性关系良好(r=0.999 3，1.000 0，1.000 0，n=6)；精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于2.0%；平均加样回收率为98.89%，100.30%，97.53%，*RSD*为1.63%，1.11%，1.49%(n=6)。**结论** 该方法操作简便，结果准确可靠，可用于尿石清合剂的质量控制。

关键词：高效液相色谱法；尿石清合剂；绿原酸；栀子苷；夏佛塔苷；含量测定；质量控制

Simultaneous Determination of Three Components in Niaoshiqing Mixture by HPLC

HU Yuliang, ZENG Congyan, YANG Suhong

(Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan, Guangdong, China 528401)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatograph method for the simultaneous determination of three components in Niaoshiqing Mixture. **Methods** The chromatographic column was DIKMA Luster C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile－0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength were 326 nm (chlorogenic acid) and 226 nm (geniposide, schaftoside), the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of chlorogenic acid, geniposide, schaftoside were 0.085－1.356 μg, 0.419－6.708 μg, 0.083－1.332 μg (r = 0.999 3, 1.000 0, 1.000 0, n = 6), respectively. The *RSD*s of precision, stability, repeatability test results were all lower than 2.0% (n = 6). The average recoveries of chlorogenic acid, geniposide, schaftoside were 98.89%, 100.30%, 97.53%, with *RSD*s of 1.63%, 1.11%, 1.49% (n = 6), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, reliable and reproduciable, and can be used for the quality control of Niaoshiqing Mixture.

Key words: HPLC; Niaoshiqing Mixture; chlorogenic acid; geniposide; schaftoside; content determination; quality control

尿石清合剂为我院医院制剂，由广金钱草、栀子、石韦、滑石等9味中药组方，有清热利湿解毒、通淋排石功效，用于治疗湿热下注所致膀胱结石、肾结石、输尿管结石，以及泌尿系统感染。该方现行质量标准仅有栀子和甘草的薄层色谱鉴别，2019年中山市卫生健康局项目“尿石清合剂制备工艺及质量标准研究”前期已对方中各药味进行过薄层色谱鉴别研究，并分别建立方中广金钱草和栀子有效成分的含量测定方法[1－2]。考虑到方中石韦具有利尿通淋、抗泌尿系统结石作用[3－5]，而绿原酸是2020年版《中国药典(一部)》收载的石韦含量测定指标成分[6]，为进一步控制制剂质量，本研究中在前述研究基础上建立了同时测定夏佛塔苷(广金钱草)、栀子苷(栀子)和绿原酸(石韦)含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)；SQP型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司，精度为0.01 mg)；JJ200型电子分析天平(常熟双杰测试仪器厂，精度为0.01 g)；800型实验室离心机(上海手术器械厂)。

1.2 试药

绿原酸对照品(批号为110753－201817)、栀子苷对照品(批号为110749－201316)，均购自中国食品药品检定研究院(含量测定用)；夏佛塔苷对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司，批号为X－029－180412，含量99.54%)；尿石清合剂(医院制剂室，批号分别为20200714、20200806、20200924、20201126、20210106、20210317，规格为100 mL/瓶)；乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为纯化水。所用药材(6批)均购自广州康圣药业有限公司，经我院药学部曾聪彦主任药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：DIKMA Luster C_{18}柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：乙腈－0.1%磷酸溶液，梯度洗脱(0～

*基金项目：全国中药特色技术传承人才培训项目[国中医药人教函〔2023〕96号]；广东省中山市老药工传承工作室(曾聪彦)；广东省中山市卫生健康局医学科研项目[2019J155]。

第一作者：胡玉良，女，大学本科，主任药师，研究方向为医院制剂，(电子信箱)86841068@qq.com。

15 min时9%A，15～50 min时25%A）；流速：1.0 mL/min；检测波长：326 nm（绿原酸）、226 nm（栀子苷及夏佛塔苷）；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

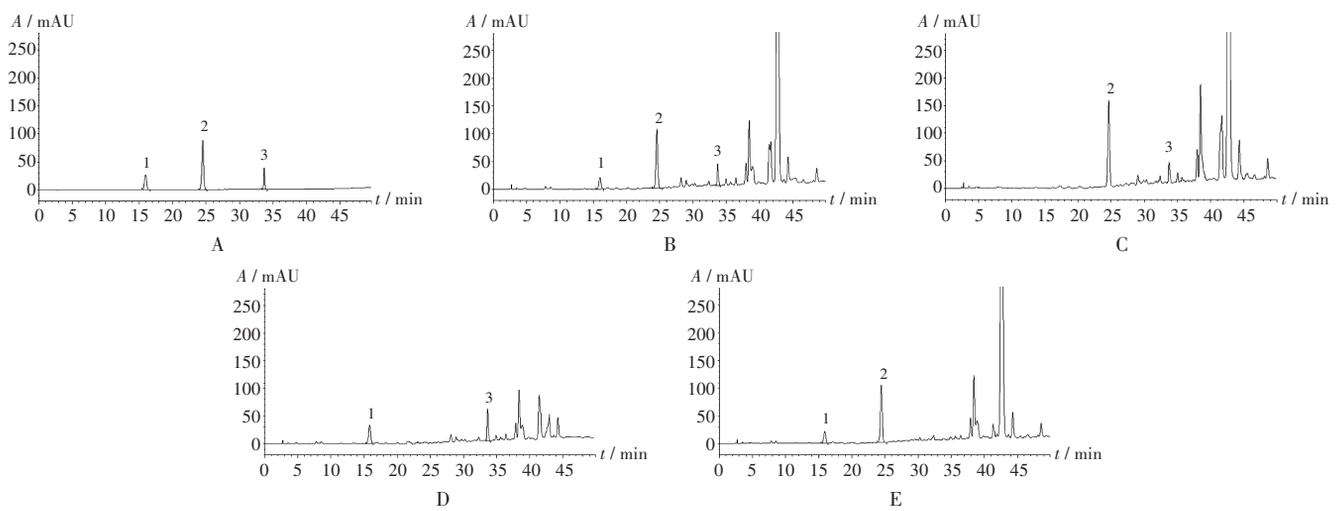
混合对照品溶液：取绿原酸对照品10.18 mg、夏佛塔苷对照品10.00 mg，精密称定，分别置20 mL容量瓶中，加50%甲醇溶解并定容；分别吸取10 mL，分别置2个50 mL容量瓶中，加50%甲醇定容，摇匀，即得每1 mL含绿原酸101.8 μg和每1 mL含夏佛塔苷100 μg的单一对照品贮备液。另取栀子苷对照品20.12 mg，精密称定，置20 mL容量瓶中，加50%甲醇溶解并定容，摇匀，得每1 mL含1.006 mg的栀子苷对照品母液，吸取5 mL，置10 mL容量瓶中，加50%甲醇定容，即得每1 mL含503 μg的栀子苷对照品贮备液。精密吸取各对照品贮备液1 mL，混匀，得每1 mL含绿原酸33.9 μg、夏佛塔苷33.3 μg和栀子苷167.7 μg的混合对照品溶液。

供试品溶液：精密吸取样品（批号为20210317）5 mL，置25 mL容量瓶中，加50%甲醇定容，4 000 r/min离心5 min，分离，取上清液，经0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

阴性对照品溶液：按尿石清合剂的处方比例和工艺制备缺石韦、栀子和广金钱草的阴性样品，按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验：取2.2项下3种溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果供试品溶液色谱在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰，阴性对照无干扰。绿原酸、栀子苷和夏佛塔苷的色谱峰峰形对称，分离度均大于1.5，理论板数均大于10 000。详见图1。



1. 绿原酸 2. 栀子苷 3. 夏佛塔苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C－E. 阴性对照品溶液（分别缺石韦，栀子，广金钱草）

图1 高效液相色谱图

1. Chlorogenic acid 2. Geniposide 3. Schaftoside

A. Mixed reference solution B. Test solution C－E. Negative reference solution (lacking Pyrrosiae Folium, Gardeniae Fructus, and Desmodii Styracifolii Herba

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察：吸取混合对照品溶液2.5，5.0，10.0，20.0，30.0，40.0 μL，按2.1项下色谱条件进样，记录峰面积，以待测成分峰面积（Y）为纵坐标，进样量（X，μg）为横坐标进行线性回归，得回归方程和线性范围。结果见表1。

表1 线性关系考察结果（$n=6$）

Tab. 1 Results of linear relation investigation ($n=6$)

待测成分	回归方程	r	线性范围（μg）
绿原酸	$Y_1=1\,623.2X_1+35.763$	0.999 3	0.085～1.356
栀子苷	$Y_2=994.68X_2-4.189\,8$	1.000 0	0.419～6.708
夏佛塔苷	$Y_3=1\,338.5X_3+0.888\,1$	1.000 0	0.083～1.332

精密度试验：取混合对照品溶液适量，按2.1项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果绿原酸、栀子苷和夏佛塔苷峰面积的*RSD*分别为0.56%，0.14%，0.33%（$n=6$），表明仪器精密度较好。

稳定性试验：取同一份供试品溶液（批号为20210317），分别于室温放置0，3，6，12，24 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果绿原酸、栀子苷和夏佛塔苷峰面积的*RSD*分别为1.19%、0.56%和0.85%（$n=5$），表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验：同一批样品（批号为20210317）6份，按2.2.2项下方法制备供试品溶液，再按2.1项下色谱

条件进样测定，记录峰面积，并计算绿原酸、栀子苷和夏佛塔苷的含量。结果平均含量分别为0.132 8，1.004 0，0.198 9 mg/mL，*RSD*分别为0.39%、0.69%、1.99%（$n=6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取已知含量样品（批号为20210317）6份，每份2 mL，分别置25 mL容量瓶中，精密加入绿原酸对照品贮备液3 mL、栀子苷对照品母液2 mL、夏佛塔苷对照品贮备液4 mL，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，计算加样回收率。结果见表2。

表2 加样回收试验结果（$n=6$）

Tab. 2 Results of the recovery test（$n=6$）

待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
绿原酸	0.265 6	0.305 4	0.562 2	97.12	98.89	1.63
	0.265 6	0.305 4	0.569 7	99.57		
	0.265 6	0.305 4	0.570 1	99.71		
	0.265 6	0.305 4	0.575 0	101.31		
	0.265 6	0.305 4	0.566 0	98.36		
	0.265 6	0.305 4	0.562 7	97.28		
栀子苷	2.008 0	2.012 0	4.062 1	102.09	100.30	1.11
	2.008 0	2.012 0	4.015 4	99.77		
	2.008 0	2.012 0	4.001 9	99.10		
	2.008 0	2.012 0	4.020 5	100.02		
	2.008 0	2.012 0	4.043 8	101.18		
	2.008 0	2.012 0	4.012 4	99.62		
夏佛塔苷	0.397 8	0.400 0	0.779 5	95.43	97.53	1.49
	0.397 8	0.400 0	0.792 7	98.73		
	0.397 8	0.400 0	0.782 3	96.13		
	0.397 8	0.400 0	0.794 0	99.05		
	0.397 8	0.400 0	0.790 1	98.08		
	0.397 8	0.400 0	0.788 9	97.78		

2.4 样品含量测定

取6批留样样品各适量，按2.2项下方法制备供试品溶液，均平行2份，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算绿原酸、栀子苷和夏佛塔苷的含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 样品处理方法

尿石清合剂为中药水提液，药液中含有黄酮类、环烯醚萜苷、有机酸、皂苷类、三萜类、甾体类、多糖类等多种类型化学成分。样品加50%甲醇稀释，使杂质发生醇沉，可去除其中的淀粉、蛋白质等大分子，保留有效成分[7]。矿物类成分悬浮于黏稠的药液体中，使药液难以通过微孔滤膜。离心可使大分子杂质快速沉降，得到澄清的上清液，便于样品的进一步处理。预试验中对3份加50%甲醇后的样品分别直接离心、室温静置2 h后离心、冰箱冷藏2 h后离心，结果测得3种成分含量无明显差异，为节约时间，本研究中采用直接离心法。

表3 样品含量测定结果（mg/mL，$n=2$）

Tab. 3 Results of content determination of samples（mg/mL，$n=2$）

批号	绿原酸	栀子苷	夏佛塔苷
20200714	0.072 8	1.105 4	0.188 5
20200806	0.108 0	1.026 6	0.275 9
20200924	0.078 7	1.354 7	0.291 3
20201126	0.095 4	1.243 0	0.210 4
20210106	0.100 9	1.093 0	0.300 7
20210317	0.132 8	1.004 0	0.198 9

3.2 检测波长

预试验中对3种对照品溶液进行了全紫外波长光谱扫描，结果提示，绿原酸、栀子苷和夏佛塔苷分别在326 nm、238 nm和272 nm波长处有最大吸收。此外，绿原酸在238 nm波长处有较大吸收，但峰不纯，有肩峰，在272 nm波长处为倒峰；栀子苷在272 nm波长处有弱吸收，在326 nm波长处无吸收；夏佛塔苷在326 nm波长和238 nm波长处均有吸收，但吸收峰与272 nm波长处比较更小。预试验中还发现，在226 nm波长处栀子苷和夏佛塔苷均有较大吸收，可作为同时测定栀子苷和夏佛塔苷的波长。综合考虑，最终采用HPLC（波长切换）法，分别在326 nm波长下测定绿原酸的含量，在226 nm波长下同时测定栀子苷和夏佛塔苷的含量。预试验中还对使用和不使用参比波长的图谱作了比较，结果表明，关闭参比波长后绿原酸和夏佛塔苷的峰面积将增大近1倍，而栀子苷的峰面积无变化。为减少样品中其他成分对被测成分的影响，采用360 nm作为参比波长。

3.3 流动相

预试验中参考文献[8－17]，分别选用甲醇－水、乙腈－水作为流动相，无论比例怎样变化，绿原酸保留时间均在3 min左右，且夏佛塔苷的峰形矮胖；选用乙腈－0.1%磷酸溶液作流动相时，待测成分的峰形均尖锐、对称，绿原酸保留时间也大幅延长。故本研究中选择乙腈－0.1%磷酸为流动相。

3.4 批间样品含量差异

本研究中发现，不同批次样品间被测成分含量差异较大，可能因为每批药材自身含量存在较大差异，致使制成的制剂含量差异也大，也可能因为制备工艺中某些参数控制不到位而导致药材提取率不稳定造成。可继续考察更多批次，以制订含量测定限度。因此在尿石清合剂质量标准中建立含量测定方法，有利于促进提升生产工艺，控制制剂质量和保证制剂的有效性。

3.5 方法评价

该方法操作简便，结果准确可靠，可用于尿石清合剂的质量控制。