

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.03.015

固相萃取-超高效液相色谱法同时测定舒肝和胃丸中5种成分含量*

梁冬牛¹, 陈峰², 郑磊^{1△}

(1. 山东省立第三医院, 山东 济南 250031; 2. 华润山东医药有限公司, 山东 济南 250031)

摘要:目的 建立同时测定舒肝和胃丸中芍药苷、橙皮苷、柚皮苷、欧前胡素与佛手柑内酯5种成分含量的固相萃取-超高效液相色谱(SPE-UPLC)法。方法 采用索氏提取法提取样品,用固相萃取(SPE)柱分离后进样测定,色谱柱为Poroshell 120 SB-C₁₈柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm),流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min时10%A~40%A, 10~15 min时40%A~45%A, 15~20 min时45%A~100%A),流速为0.5 mL/min,检测波长分别为230 nm(芍药苷)、283 nm(橙皮苷、柚皮苷)、248 nm(欧前胡素、佛手柑内酯),柱温为30℃,进样量为5 μL。结果 芍药苷、橙皮苷、柚皮苷、欧前胡素、佛手柑内酯检测的质量浓度线性范围分别为2.180~43.600 μg/mL($r=0.9999$), 2.526~50.520 μg/mL($r=0.9999$), 0.959~19.180 μg/mL($r=0.9999$), 3.493~69.860 μg/mL($r=0.9999$), 4.707~94.140 μg/mL($r=0.9998$);平均加样回收率分别为92.83%, 95.72%, 93.36%, 94.70%, 95.23%, RSD分别为2.27%, 2.17%, 1.79%, 2.38%, 2.00% ($n=6$)。结论 该方法重复性好,结果准确,可为舒肝和胃丸的质量控制提供依据。

关键词:超高效液相色谱法;固相萃取;舒肝和胃丸;芍药苷;橙皮苷;柚皮苷;欧前胡素;佛手柑内酯;含量

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)03-0053-04

Simultaneous Determination of Five Components in Shugan Hewei Pills by Solid-Phase Extraction and Ultra-Performance Liquid Chromatography

LIANG Dongniu¹, CHEN Feng², ZHENG Lei¹

(1. Shandong Provincial Third Hospital, Ji'nan, Shandong, China 250031; 2. China Resources Shandong Pharmaceutical Co., Ltd., Ji'nan, Shandong, China 250031)

Abstract: Objective To establish a solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography(SPE-UPLC) method for the simultaneous determination of paeoniflorin, hesperidin, naringin, imperatorin and bergapten in Shugan Hewei Pills. **Methods** The samples were extracted by the Soxhlet extraction method and determined after being separated by the SPE column. The chromatographic column was Poroshell 120 SB-C₁₈ column(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm), the mobile phase was methanol(A)-0.1% phosphoric acid solution(B), with gradient elution(0-10 min, 10%A-40%A; 10-15 min, 40%A-45%A; 15-20 min, 45%A-100%A), the flow rate was 0.5 mL/min, the detection wavelengths were 230 nm for paeoniflorin, 283 nm for hesperidin and naringin, 248 nm for imperatorin and bergapten, respectively, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 5 μL. **Results** The linear ranges were 2.180-43.600 μg/mL for paeoniflorin($r=0.9999$), 2.526-50.520 μg/mL for hesperidin($r=0.9999$), 0.959-19.180 μg/mL for naringin($r=0.9999$), 3.493-69.860 μg/mL for imperatorin($r=0.9999$), 4.707-94.140 μg/mL for bergapten($r=0.9998$), respectively. The average recoveries were 92.83%, 95.72%, 93.36%, 94.70%, 95.23%, the RSDs were 2.27%, 2.17%, 1.79%, 2.38%, 2.00% ($n=6$).

Conclusion The method is reproducible and accurate, which can provide a theoretical basis for the quality control of Shugan Hewei Pills.

Key words: ultra-performance liquid chromatography; solid-phase extraction; Shugan Hewei Pills; paeoniflorin; hesperidin; naringin; imperatorin; bergapten; content

舒肝和胃丸由佛手、白芍、陈皮、醋香附、木香等13味中药组方,舒肝解郁、和胃止痛^{[1]1603},用于治疗肝胃不和、两胁胀满、胃脘疼痛、食欲不振、呃逆呕吐、大便失调^[2]。方中,佛手疏肝理气、和胃止痛^{[1]178},陈皮理气健脾、燥湿化痰^{[1]191},白芍养血调经、柔肝止痛、平抑肝阳^{[1]105}。其质量标准收载于2015年版《中国药典(一部)》,以芍药苷含量作为质量控制指标。单一成分的含量作为该药的质量控制指标,不能有效控制组方中其他组分的质量水平,更不能有效控制产品质量^[3-5]。单婷婷等^[6]的研究仅

对舒肝和胃丸中的挥发性成分进行控制,缺少对多种组分的综合评价。与传统高效液相色谱(HPLC)法相比,超高效液相色谱(UPLC)技术具有分析速度快、灵敏度高、节约流动相等优点^[7-9],尤其是用于分析多组分样品时可显著提高分析效率。该制剂中,佛手为君药,白芍和陈皮为臣药。本研究中以白芍、陈皮和佛手中的主要成分芍药苷、橙皮苷、柚皮苷、欧前胡素和佛手柑内酯为研究对象,建立测定其含量的固相萃取-超高效液相色谱(SPE-UPLC)法,以综合评价产品质量。现报道如下。

*基金项目:中国药学会精准用药科技传播促进行动2019年重点项目[CMEI2019KPYJ(JZYY)00204]。

第一作者:梁冬牛,男,大学本科,药师,研究方向为医院药学,(电话)0531-81656579(电子信箱)280839370@qq.com。

△通信作者:郑磊,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为临床药学,(电话)0531-81656686(电子信箱)zhenglei8501@163.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1290 型超高效液相色谱仪[配有二极管阵列(DAD)检测器、自动进样器、柱温箱, BOND ELUT 型固相萃取(SPE)柱(500 mg:3 mL), 均购自美国 Agilent 公司]; XP205 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司, 精度为十万分之一); KQ-600DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为 600 W, 频率为 40 kHz); Milli-Q advantage A10 型超纯水机(美国密理博公司); HSE-24B 型固相萃取装置(天津市恒奥科技公司)。

1.2 试药

芍药苷对照品(批号为 110736-201943, 含量为 95.1%), 橙皮苷对照品(批号为 110721-201818, 含量为 96.2%), 柚皮苷对照品(批号为 110722-201815, 含量为 91.7%), 欧前胡素对照品(批号为 110826-201918, 含量为 99.0%), 佛手柑内酯对照品(批号为 520036-201401, 含量为 99.2%), 均购自中国食品药品检定研究院; 舒肝和胃丸(大蜜丸, 北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 规格为每丸 6 g, 批号分别为 19013386, 18011800, 18011801, 200202, 200401); 甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 磷酸(优级纯, 中国医药集团有限公司); 超纯水(实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Poroshell 120 SB-C₁₈ 柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 230 nm(芍药苷), 283 nm(橙皮苷、柚皮苷), 248 nm(欧前胡素、佛手柑内酯); 柱温: 30℃; 进样量: 5 μL; 流动相: 甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min 时 10% A~40% A, 10~15 min 时 40% A~45% A, 15~20 min 时 45% A~100% A)。

2.2 溶液制备

供试品溶液: 取样品适量, 研碎, 取 2.0 g, 精密称

定, 用定量滤纸包好, 置索氏提取器中, 加甲醇 100 mL, 采用索氏提取法提取 1 h, 蒸干提取液, 残渣加甲醇 1 mL 溶解, 加入预先活化的 SPE 柱, 加水 3 mL 通过 SPE 柱, 弃水, 再用 70% 甲醇 10 mL 洗脱, 收集洗脱液, 置 50 mL 容量瓶中, 并用甲醇定容, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

对照品溶液: 取芍药苷对照品 22.92 mg, 橙皮苷对照品 26.26 mg, 柚皮苷对照品 10.46 mg, 欧前胡素对照品 35.28 mg, 佛手柑内酯对照品 47.45 mg, 精密称定, 分别置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀, 作为对照品贮备溶液; 分别精密量取各对照品贮备溶液 1 mL, 置同一 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

阴性对照品溶液: 按 2015 年版《中国药典(一部)》方法, 取方中除白芍、陈皮、佛手的 10 味中药饮片, 按样品制备方法制备不含白芍、陈皮、佛手的阴性样品, 同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 分别取 2.2 项下 3 种溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 色谱图见图 1。结果各成分色谱峰峰形对称, 且与相邻色谱峰分离度良好, 阴性对照无干扰。采用 UPLC 仪自带的 DAD 检测器光谱学纯度检测功能, 分别检测 5 种成分色谱峰的光谱学纯度, 结果均在仪器给出的阈值范围内, 表明 5 种待测成分色谱峰均为单一的色谱峰, 无色谱峰重叠干扰。

线性关系考察: 取对照品贮备溶液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL, 分别置 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得各对照品标准系列溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以各对照品溶液的质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归, 绘制标准曲线。结果见表 1。

精密度试验: 精密量取同一对照品溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 连续测定 6 次。结果见表 1,

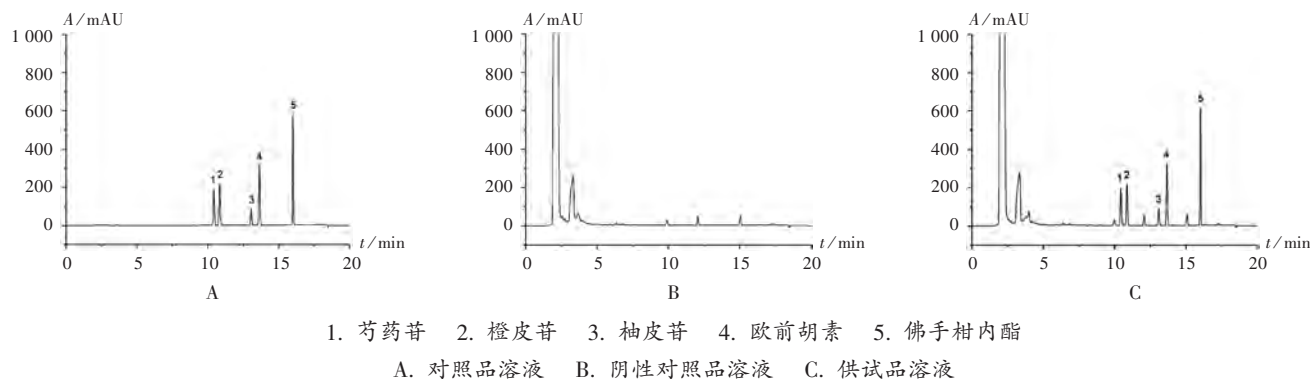


图 1 超高效液相色谱图

1. paeoniflorin 2. hesperidin 3. naringin 4. imperatorin 5. bergapten
A. Reference solution B. Negative reference solution C. Test solution

Fig. 1 UPLC chromatograms

表1 线性关系、精密度、稳定性及重复性试验结果

Tab. 1 Results of linear relationship, precision, stability and repeatability tests of five components

成分	线性关系试验			精密度试验	稳定性试验	重复性试验
	回归方程	$r(n=5)$	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	峰面积的 $RSD(\%)$	峰面积的 $RSD(\%)$	含量的 $RSD(\%)$
芍药苷	$Y=52.56X+7.616$	0.999 9	2.180~43.60	1.20	1.29	1.48
橙皮苷	$Y=51.89X+10.53$	0.999 9	2.526~50.52	1.12	1.18	1.29
柚皮苷	$Y=54.63X+3.022$	0.999 9	0.959~19.18	1.03	1.39	1.37
欧前胡素	$Y=50.48X+13.05$	0.999 9	3.493~69.86	1.45	1.16	1.39
佛手柑内酯	$Y=50.08X+25.69$	0.999 8	4.707~94.14	1.67	1.00	1.16

表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为19013386)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,分别于0,4,8,12,24 h时进样,记录各成分色谱峰峰面积。结果见表1,表明供试品溶液在24 h内稳定。

重复性试验:取样品(批号为19013386)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,共6份,分别进样测定,记录各成分色谱峰峰面积,并计算含量。结果见表1,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为19013386)1.0 g,共6份,精密称定,置索氏提取器中,分别精密加入对照品贮备溶液0.25 mL,依法制备供试品溶液,进样测定,计算5种待测成分的回收率。结果见表2。

耐用性试验:取2.2项下供试品溶液,分别考察不同型号高效液相色谱仪(Agilent 1290型和LC20A型)、色谱柱[Poroshell 120 SB-C₁₈柱(100 mm×4.6 mm,2.7 μm)和Accucore C₁₈柱(100 mm×4.6 mm,2.6 μm)]、柱温(30℃,40℃和室温)和流速(0.45,0.50,0.55 mL/min)对检测结果的影响。结果在上述范围内改变色谱条件,各色谱峰分离度均良好,表明方法耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取样品适量,依法制备供试品溶液,分别进样测定2次,计算各成分含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

UHPLC技术具有灵敏度高、分离度好、分析周期短的优点,更适合于检测中药中多种成分。Poroshell 120 SB-C₁₈柱为表面多孔型颗粒填料,即核-壳型填料,具有极窄的粒径分布和扩散路径,可减小涡流扩散,缩短传质路径和减弱传质阻力,柱效较高^[10],故色谱柱选用Poroshell 120 SB-C₁₈柱。舒肝和胃丸中5种成分具有不同的紫外吸收特征,王桢旭^[4]报道的芍药苷为230 nm,杨冰^[11]报道的柚皮苷和橙皮苷为283 nm,彭春梅等^[12]报道的欧前胡素为248 nm,王向锋等^[13]报道的佛手柑内酯为248 nm。本研究中采用DAD检测器,扫描5种成分的紫外吸收曲线,发现5种成分分别于230,283,248 nm波长处具有较强紫外吸收,这与文献报道一致,故分别

表2 加样回收试验结果($n=6$)

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

成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	$RSD(\%)$
芍药苷	1.010 5	0.552 7	0.545 0	1.065 9	94.17	92.83	2.27
	1.024 1	0.560 2	0.545 0	1.063 3	92.31		
	1.006 6	0.550 6	0.545 0	1.041 2	90.02		
	1.001 8	0.548 0	0.545 0	1.056 7	93.34		
	1.021 5	0.558 8	0.545 0	1.056 2	91.27		
	1.003 1	0.548 7	0.545 0	1.071 4	95.91		
橙皮苷	1.010 5	0.641 7	0.631 5	1.261 5	98.15	95.72	2.17
	1.024 1	0.650 3	0.631 5	1.253 4	95.50		
	1.006 6	0.639 2	0.631 5	1.250 7	96.83		
	1.001 8	0.636 1	0.631 5	1.221 8	92.75		
	1.021 5	0.648 7	0.631 5	1.241 6	93.89		
	1.003 1	0.637 0	0.631 5	1.251 0	97.23		
柚皮苷	1.010 5	0.249 6	0.239 8	0.478 1	95.29	93.36	1.79
	1.024 1	0.253 0	0.239 8	0.481 5	95.29		
	1.006 6	0.248 6	0.239 8	0.472 3	93.29		
	1.001 8	0.247 4	0.239 8	0.470 6	93.08		
	1.021 5	0.252 3	0.239 8	0.471 2	91.28		
	1.003 1	0.247 8	0.239 8	0.468 2	91.91		
欧前胡素	1.010 5	0.907 4	0.873 2	1.720 5	93.14	94.70	2.38
	1.024 1	0.919 6	0.873 2	1.716 1	91.22		
	1.006 6	0.903 9	0.873 2	1.736 2	95.32		
	1.001 8	0.899 6	0.873 2	1.726 8	94.73		
	1.021 5	0.917 3	0.873 2	1.768 4	97.47		
	1.003 1	0.900 8	0.873 2	1.741 9	96.32		
佛手柑内酯	1.010 5	1.258 1	1.176 8	2.356 1	93.30	95.23	2.00
	1.024 1	1.275 0	1.176 8	2.381 5	94.03		
	1.006 6	1.253 2	1.176 8	2.395 2	97.04		
	1.001 8	1.247 2	1.176 8	2.386 2	96.79		
	1.021 5	1.271 8	1.176 8	2.368 5	93.19		
	1.003 1	1.248 9	1.176 8	2.390 6	97.02		

选用230 nm(芍药苷)、283 nm(橙皮苷、柚皮苷)、248 nm(欧前胡素、佛手柑内酯)作为检测波长。

3.2 提取方式选择

分别考察了索氏提取法、超声波提取法和加热回流提取法的提取效果。采用超声波提取法时,需使用甲醇150 mL,分3次提取,然后合并提取液,提取过程较复