

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)23-0099-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.23.022



高效液相色谱法同时测定胃特安片中4种成分含量*

徐 兰, 李 刚, 彭 秘, 肖汉扬, 胡文弋, 陈昊东, 刘碧莹, 张增珠[△]

(中国人民解放军联勤保障部队第九〇八医院, 江西 南昌 330002)

摘要:目的 建立同时测定胃特安片中辛弗林、橙皮苷、23-乙酰泽泻醇B和23-乙酰泽泻醇C含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为Shimadzu Intersil ODS-3柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-含0.1%庚烷磺酸钠及0.1%冰醋酸的磷酸二氢钾溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长分别为275 nm(辛弗林)、283 nm(橙皮苷)、208 nm(23-乙酰泽泻醇B)和246 nm(23-乙酰泽泻醇C), 柱温为室温, 进样量为20 μL。结果 辛弗林、橙皮苷、23-乙酰泽泻醇B、23-乙酰泽泻醇C的质量浓度分别在4.142~66.272 μg/mL、4.584~73.352 μg/mL、3.602~57.632 μg/mL、2.208~35.328 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999\ 6$, $n=6$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于4.50%($n=6$); 平均加样回收率分别为100.55%, 99.18%, 98.91%, 99.14%, RSD分别为2.82%, 2.02%, 1.64%, 2.24%($n=6$)。每片胃特安片分别含辛弗林、橙皮苷、23-乙酰泽泻醇B和23-乙酰泽泻醇C 0.168 3, 0.173 3, 0.154 7, 0.077 4 mg($n=3$)。结论 该方法操作简便、结果准确、重复性好, 可用于胃特安片中多种成分含量的同时测定。

关键词: 高效液相色谱法; 胃特安片; 辛弗林; 橙皮苷; 23-乙酰泽泻醇B; 23-乙酰泽泻醇C; 含量测定

Simultaneous Determination of Four Components in Weite'an Tablets by HPLC

XU Lan, LI Gang, PENG Mi, XIAO Hanyang, HU Wenyi, CHEN Haodong, LIU Biying, ZHANG Zengzhu

(The 908th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the PLA, Nanchang, Jiangxi, China 330002)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of synephrine, hesperidin, alisol B 23-acetate and alisol C 23-acetate in Weite'an Tablets. **Methods** The chromatographic column was Shimadzu Intersil ODS-3 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-potassium dihydrogen phosphate solution (containing 0.1% sodium heptanesulfonate and 0.1% glacial acetic acid) with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelengths were 275 nm (synephrine), 283 nm (hesperidin), 208 nm (alisol B 23-acetate), and 246 nm (alisol C 23-acetate), the column temperature was room temperature, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear ranges of synephrine, hesperidin, alisol B 23-acetate, and alisol C 23-acetate were 4.142-66.272 μg/mL, 4.584-73.352 μg/mL, 3.602-57.632 μg/mL, and 2.208-35.328 μg/mL ($r \geq 0.999\ 6$, $n=6$), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 4.50% ($n=6$). The average recoveries of synephrine, hesperidin, alisol B 23-acetate, and alisol C 23-acetate were 100.55%, 99.18%, 98.91%, and 99.14% with RSDs of 2.82%, 2.02%, 1.64%, and 2.24% ($n=6$), respectively. The contents of synephrine, hesperidin, alisol B 23-acetate, and alisol C 23-acetate in each Weite'an Tablet were 0.168 3, 0.173 3, 0.154 7, and 0.077 4 mg ($n=3$), respectively. **Conclusion** This method is simple, accurate, and reproducible, which can be used for the simultaneous determination of multiple components in Weite'an Tablets.

Key words: HPLC; Weite'an Tablets; synephrine; hesperidin; alisol B 23-acetate; alisol C 23-acetate; content determination

*基金项目: 江西省中医药管理局科技计划项目[2022B1094]。

第一作者: 徐兰, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为药物新剂型及新技术, (电子信箱)xulan2005112056@126.com。

[△]通信作者: 张增珠, 男, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药物新剂型与医院药学, (电子信箱)328860637@qq.com。

- [16] 国家卫生和计划生育委员会. 关于海藻酸钙等食品添加剂新品种的公告[A/OL]. (2016-06-15)[2023-01-12].
<http://www.nhc.gov.cn/sps/s7890/201606/125c3d8fa2034de3b7d52a82608709d2.shtml>.
- [17] 苏昭仑, 叶少文, 张喜金, 等. 一种从维生素K₂包埋剂中提取维生素K₂的方法及检测维生素K₂的方法: CN105301148A[P]. 2016-02-03.
- [18] 孙家慧. 高效液相色谱法快速测定维生素K₂[J]. 天津化工, 2011, 25(6): 55-56.
- [19] 张伟, 吕志浩, 王丽娜. 一种维生素K₂含量的检测方法: CN107688068B[P]. 2019-10-01.
- [20] 张兴, 高平, 张国栋, 等. 一种维生素K₂(MK-7)含量的测定方法: CN104458990B[P]. 2017-01-18.
- [21] 冯振, 景叶松, 弭兆元. 一种同时检测血液样品中多种脂溶性维生素的方法: CN105158394B[P]. 2016-04-27.
- [22] GB/T 27404—2008, 实验室质量控制规范: 食品理化检测[S].
- [23] GB/T 27417—2017, 合格评定 化学分析方法确认和验证指南[S].
- [24] 岳振峰. 国外食品安全化学分析方法验证指南(第4版)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2015: 324.

(收稿日期: 2023-01-30; 修回日期: 2023-06-29)

胃特安片为医院制剂,由枳实、泽泻、白术、川芎、厚朴、半夏、陈皮、黄柏8味中药材组方,具有和胃止痛、健脾消食、安神宁心等功效,临床主要用于治疗胃溃疡、十二指肠溃疡、慢性胃炎等疾病^[1]。方中,枳实具有破气消积、化痰散痞等功效^[2],被广泛应用于治疗心血管、胃肠道等疾病,其有效成分为辛弗林^[3];泽泻具有利水渗湿、泄热、化浊调脂等功效,可用于治疗小便不利、水肿胀满、泄泻尿少、高脂血症等^[4],其主要药效物质基础为23-乙酰泽泻醇B和23-乙酰泽泻醇C^[5];陈皮可理气健脾、燥湿化痰,主要活性成分为橙皮苷^[6]。枳实和泽泻为君药,但目前尚未对两药的主要成分进行含量测定,无法有效控制胃特安片的质量。胃特安片含有多种中药材,不同组分间协同发挥药效,基质、成分较复杂。为提高检测准确度,参考文献^[2-16],以及2020年版《中国药典(一部)》中枳实^{[7]258}、泽泻^{[7]239}和陈皮^{[7]199}含量测定项下的指标性成分,本研究中建立了同时测定胃特安片中辛弗林、橙皮苷、23-乙酰泽泻醇B和23-乙酰泽泻醇C 4种成分含量的高效液相色谱法,旨在提高胃特安片的质量标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-16型高效液相色谱仪[配有LC-16型泵,SPD-M40型二极管阵列(DAD)检测器],AUW220D型电子分析天平(精度为十万分之一),均购自日本Shimadzu公司;KM-410C型智能超声波清洗器(上海之信仪器有限公司,功率为220 W,频率为70 kHz);AZJ-2002-C型超纯水仪(美国Millipore公司);DFT-50型手提式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司);DK-98-II A型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);TGL-16C型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试药

辛弗林对照品(批号为110727-202110,含量为99.8%),橙皮苷对照品(批号为110721-202220,含量为97.2%),23-乙酰泽泻醇B对照品(批号为111846-202006,含量为98.3%),23-乙酰泽泻醇C对照品(批号为112062-202102,含量为99.2%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈(色谱纯,西陇化工股份有限公司);庚烷磺酸钠(上海蓝季科技发展有限公司,批号为39083,含量为99.9%);胃特安片(医院自制,批号分别为20220218,20220516,20220722,规格为每片0.4 g);水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu Intersil ODS-3柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相:A为乙腈,B为磷酸二氢钾溶液

(取磷酸二氢钾0.6 g,庚烷磺酸钠1.0 g,冰醋酸1 mL,加水溶解并稀释至1 000 mL),梯度洗脱(0~7 min时12%A,7~14 min时12%A→75%A,14~20 min时75%A→90%A,20~25 min时90%A,25~30 min时90%A→12%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:275 nm(0~7 min,辛弗林),283 nm(7~10 min,橙皮苷),246 nm(10~20 min,23-乙酰泽泻醇C),208 nm(20~30 min,23-乙酰泽泻醇B);柱温:室温;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

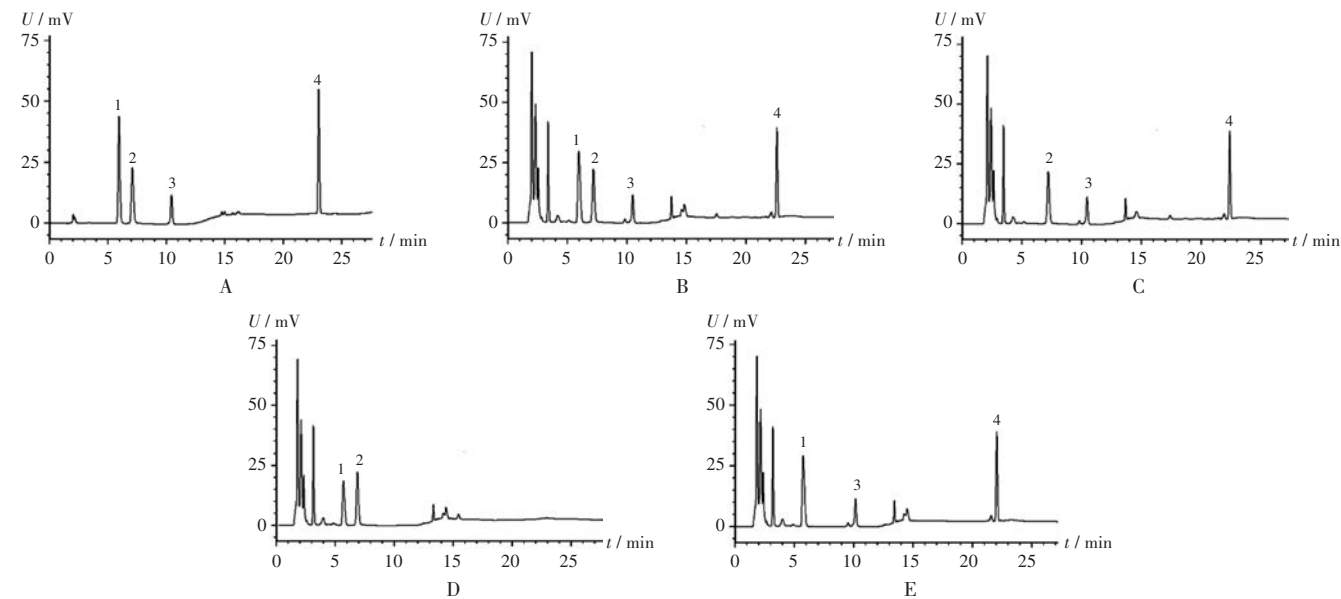
取辛弗林对照品8.3006 mg、橙皮苷对照品9.4327 mg、23-乙酰泽泻醇B对照品7.3286 mg、23-乙酰泽泻醇C对照品4.4516 mg,精密称定,分别置10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得质量浓度分别为0.8284,0.9169,0.7204,0.4416 mg/mL的对照品贮备液;分别精密量取上述对照品贮备液各0.5 mL,置25 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得质量浓度分别为16.57,18.34,14.41,8.83 μg/mL的混合对照品溶液。取样品适量,粉碎,取细粉(过60目筛)0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声(功率为220 W,频率为70 kHz)处理60 min,静置并冷却至室温,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,离心(转速为5 000 r/min)10 min,取上清液,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。按处方工艺分别制备缺泽泻、枳实和陈皮的阴性样品,按供试品溶液制备方法分别制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果4种成分的色谱峰分离度大于1.5,理论板数均大于3 000,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察:分别精密吸取2.2项下4种成分的对照品贮备液0.05,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,按2.1项下色谱条件进样测定,各待测成分质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得各待测成分的回归方程。结果见表1。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液和供试品溶液各20 μL,按2.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果混合对照品溶液中辛弗林、橙皮苷、23-乙酰泽泻醇B和23-乙酰泽泻醇C峰面积的RSD分别为1.68%,2.47%,1.02%,1.41%($n=6$),供试品溶液中以上4种成分峰面积的RSD分别为0.85%,1.94%,1.35%,0.92%($n=6$),表明仪器精密度良好。



1. 辛弗林 2. 橙皮苷 3. 23 - 乙酰泽泻醇C 4. 23 - 乙酰泽泻醇B
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C - E. 阴性对照品溶液(分别缺枳实、泽泻、陈皮)

图1 高效液相色谱图

1. Synephrine 2. Hesperidin 3. Alisol C 23 - acetate 4. Alisol B 23 - acetate
A. Mixed reference solution B. Test solution C - E. Negative reference solution (lacking Aurantii Fructus Immaturus, Alismatis Rhizoma, and Citri Reticulatae Pericarpium, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 线性关系考察结果($n = 6$)

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

成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)
辛弗林	$Y = 6\,380.9X + 1\,382.9$	0.999 9	4.142~66.272
橙皮苷	$Y = 5\,536.3X + 835.6$	0.999 7	4.584~73.352
23 - 乙酰泽泻醇B	$Y = 5\,142.6X + 1\,185.3$	0.999 8	3.602~57.632
23 - 乙酰泽泻醇C	$Y = 2\,417.4X + 2\,041.5$	0.999 6	2.208~35.328

稳定性试验:取供试品溶液适量,分别于室温放置0,2,4,6,8,12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果辛弗林、橙皮苷、23 - 乙酰泽泻醇B和23 - 乙酰泽泻醇C峰面积的RSD分别为3.48%,2.86%,3.81%,4.24%($n = 6$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为20220516)6份,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,并计算含量。结果辛弗林、橙皮苷、23 - 乙酰泽泻醇B和23 - 乙酰泽泻醇C的含量分别为0.414 0,0.457 8,0.357 3,0.219 5 mg/g,RSD分别为2.92%,2.80%,3.02%,3.95%($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知4种成分含量的样品(批号为20220516)适量,粉碎(过60目筛),取细粉1.0 g,精密称定,分别精密加入4种成分对照品贮备液各500 μL ,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,计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取样品(批号分别为20220218,20220516,20220722)适量,精密称定,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,以外标法计算样品中4种成分的含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 检测波长选择

全波长范围扫描4种化合物,辛弗林、橙皮苷、23 - 乙酰泽泻醇B和23 - 乙酰泽泻醇C分别于275,283,208,246 nm波长处有明显吸收,差异较大,杂质干扰较少。采用DAD检测器实时扫描功能,获得所有波长下的色谱图和即时色谱图,可提高检测效率,实现了在同一色谱条件下4种活性成分最大吸收波长处同时测定含量的目的。

3.2 流动相选择

因辛弗林为含氮生物碱类化合物^[3],极性较强,一般流动相系统中不易在色谱柱上保留,如前期试验考察乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-水等流动相系统时发现,辛弗林在色谱柱上呈极弱保留,且保留时间很不稳定。在乙腈-磷酸二氢钾溶液中加入离子对试剂庚烷磺酸钠后,辛弗林在色谱柱上的保留时间延长,稳定性较好,且胃特安片中其他组分未产生明显干扰,故本研究中选择2.1项下流动相系统。

表 2 加样回收试验结果 (n = 6)

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

成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
辛弗林	0.404 3	0.414 2	0.831 2	103.07	100.55	2.82
	0.428 5	0.414 2	0.832 6	97.56		
	0.396 8	0.414 2	0.822 4	102.75		
	0.411 5	0.414 2	0.840 3	103.52		
	0.424 1	0.414 2	0.831 6	98.38		
	0.418 9	0.414 2	0.824 8	98.00		
橙皮苷	0.447 3	0.458 5	0.894 3	97.49	99.18	2.02
	0.438 3	0.458 5	0.902 7	101.29		
	0.452 8	0.458 5	0.916 5	101.13		
	0.463 2	0.458 5	0.922 9	100.26		
	0.468 8	0.458 5	0.911 2	96.49		
	0.470 3	0.458 5	0.921 5	98.41		
23-乙酰泽泻醇B	0.355 3	0.360 2	0.706 4	97.47	98.91	1.64
泻醇B	0.342 7	0.360 2	0.707 2	101.19		
	0.372 5	0.360 2	0.732 1	99.84		
	0.358 5	0.360 2	0.708 3	97.11		
	0.349 0	0.360 2	0.708 8	99.89		
	0.365 4	0.360 2	0.718 3	97.97		
23-乙酰泽泻醇C	0.210 5	0.220 8	0.427 6	98.32	99.14	2.24
泻醇C	0.217 7	0.220 8	0.441 8	101.49		
	0.226 6	0.220 8	0.441 2	97.19		
	0.225 2	0.220 8	0.451 2	102.36		
	0.208 4	0.220 8	0.425 1	98.14		
	0.228 7	0.220 8	0.443 6	97.33		

表 3 样品中 4 种成分含量测定结果 (mg / 片)

Tab. 3 Results of the content determination of four components in Weite'an Tablets (mg / tablet)

批号	辛弗林	橙皮苷	23-乙酰泽泻醇B	23-乙酰泽泻醇C
20220218	0.167 3	0.163 3	0.145 9	0.081 8
20220516	0.183 8	0.180 6	0.163 6	0.073 7
20220722	0.153 9	0.175 9	0.154 5	0.076 6
$\bar{X}$	0.168 3	0.173 3	0.154 7	0.077 4

3.3 提取溶剂与方法选择

本研究中考察了不同提取溶剂(甲醇、50% 甲醇溶液、75% 甲醇溶液、乙腈、2% 冰醋酸溶液)对待测成分提取效果的影响,结果显示,酸性溶剂提取后测得样品中辛弗林的含量最高,这可能是由于辛弗林属生物碱类化合物^[8],在酸性溶剂中可成盐而增加了溶解度,但其他 3 种成分的含量非常低。不同提取溶剂中,4 种成分总含量从大到小依次为甲醇、75% 甲醇溶液、50% 甲醇溶液、2% 冰醋酸溶液、乙腈。4 种成分结构中均含有羟基,在醇溶液中有较高的溶解度,综合考虑后选择甲醇为提取溶剂。曾考察不同提取方法(回流、超声)和提取时

间(30, 60, 90 min)对待测成分提取效果的影响,结果显示,超声提取法效果优于回流提取法。超声提取法有利于甲醇渗透穿过枳实、泽泻和陈皮的细胞壁和细胞膜,能很好地将 4 种成分同时溶出,提取率较高,且操作简便;超声提取时间越长,提取效果越好,但超声处理 60 min 和 90 min 所测得 4 种成分的含量无显著差异。故最终选择 2.2 项下供试品溶液的制备方法。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于胃特安片中多种成分含量的同时测定。

参考文献

[1] 李先飞,封传华,张 静,等. 胃特安片质量标准研究[J]. 西部中医药,2021,34(9):31-34.

[2] 黄牧坤,王卫东,李明杰. RP-HPLC 法测定胃得安胶囊中 23-乙酰泽泻醇 B、辛弗林和厚朴酚 3 种成分的含量[J]. 广东药科大学学报,2022,38(5):66-69.

[3] 陈燕军,吴有根. 离子交换色谱法测定枳实中辛弗林含量[J]. 亚太传统医药,2013,9(6):46-47.

[4] 翁艳鸿,李玲慧,倪林君,等. 不同产地泽泻煮散的含量测定及其化学计量学分析[J]. 中国医院药学杂志,2022,42(1):1-6.

[5] 魏 玮,相 芳,许 诺,等. 泽泻不同炮制品中 7 个化学成分的含量测定[J]. 中国药师,2021,24(12):2284-2287.

[6] 封传华,张 静,任 琦,等. 高效液相色谱法同时测定胃特安片中盐酸小檗碱和橙皮苷的含量[J]. 医药导报,2018,37(12):1485-1487.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.

[8] 罗 平,范茜茜. HPLC 测定枳实薤白桂枝汤颗粒中辛弗林的含量[J]. 中国中医药现代远程教育,2022,20(2):142-144.

[9] 承 晨,李 莉. HPLC 法同时测定代代花中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和辛弗林的含量[J]. 药学与临床研究,2020,28(4):263-265.

[10] 张东霞,张火旺. 高效液相色谱法测定复方半夏片中橙皮苷含量[J]. 中国药业,2023,32(3):84-86.

[11] 张婷婷,梁 燕,彭 灿. 不同方法提取陈皮中黄酮类有效成分含量比较[J]. 中国药业,2021,30(13):40-43.

[12] 曲楠楠. 高效液相色谱法测定枳实导滞丸中辛弗林含量[J]. 中国药业,2013,22(13):27-28.

[13] 杨立志,姜雪敏. 高效液相色谱法测定益康胶囊中 23-乙酰泽泻醇 B 含量[J]. 中国药业,2017,26(9):33-35.

[14] 李俊卿,王金凤,李占芳,等. 山东省市售龙胆泻肝丸(水丸)质量分析[J]. 中国药业,2022,31(9):94-97.

[15] 庄会芳,徐 丽,袁晓梅,等. 荆防合剂质量标准提升研究[J]. 中国药业,2022,31(23):75-80.

[16] 梁冬牛,陈 峰,郑 磊. 固相萃取-超高效液相色谱法同时测定舒肝和胃丸 5 种成分含量[J]. 中国药业,2021,30(3):53-56.

(收稿日期:2022-12-05;修回日期:2023-06-10)