

中图分类号: R932; R284.1; R286.0
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.17.015

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2025)17-0080-04



益气健脾口服液质量标准提升研究*

郑文燕, 连晓吟, 陈佩文, 刘 珍, 刘潇潇[△]

(广东省药品检验所, 广东 广州 510180)

摘要:目的 提升益气健脾口服液的质量标准。方法 采用薄层色谱法对制剂中的鸡内金、莲子进行定性鉴别;采用固相萃取-高效液相色谱法测定制剂中枸橼酸的含量,色谱柱为 GL Sciences InerSustain AQ-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.04% 庚烷磺酸钠溶液(用磷酸调 pH 至 2.3)-乙腈(99:1, V/V),流速为 0.5 mL/min,检测波长为 210 nm,柱温为 35℃,进样量为 10 μL。结果 鸡内金、莲子药材的薄层色谱斑点清晰,分离度好,且阴性对照无干扰。枸橼酸的质量浓度在 0.102 6~5.130 6 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=1.000\ 0$, $n=6$);精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.5%;平均回收率为 97.71%, RSD 为 0.86% ($n=9$)。15 批样品的枸橼酸含量为 5.82~10.90 mg/mL。结论 该方法操作简便、专属性强、重复性好、结果准确,可用于益气健脾口服液的质量控制。拟定限度为每 1 mL 制剂中含有机酸以枸橼酸(C₆H₈O₇)计应不得少于 4.0 mg。

关键词: 益气健脾口服液;薄层色谱法;固相萃取;高效液相色谱法;鸡内金;莲子;枸橼酸

Improvement of Quality Standard of Yiqi Jianpi Oral Liquid

ZHENG Wenyan, LIAN Xiaoyin, CHEN Peiwen, LIU Zhen, LIU Xiaoxiao

(Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou, Guangdong, China 510180)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Yiqi Jianpi Oral Liquid. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used to qualitatively identify Galli Gigerii Endothelium Corneum and Nelumbinis Semen in the preparation. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the content of citric acid in the preparation by solid-phase extraction. The chromatographic column was GL Sciences InerSustain AQ-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), and the mobile phase was 0.04% sodium heptanesulfonate solution (adjusted to pH 2.3 with phosphoric acid)-acetonitrile (99:1, V/V), the flow rate was 0.5 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 35℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots of Galli Gigerii Endothelium Corneum and Nelumbinis Semen were clear, with good separation and no interference from the negative control. The linear range of citric acid was 0.102 6–5.130 6 mg/mL ($r=1.000\ 0$, $n=6$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 1.5%. The average recovery of citric acid was 97.71%, with an RSD of 0.86% ($n=9$). The content of citric acid in 15 batches of samples was in the range of 5.82–10.90 mg/mL. **Conclusion** The method is simple, highly specific, with good reproducibility, and accurate results, which can be used for quality control of Yiqi Jianpi Oral Liquid. The proposed limit is that the content of citric acid (C₆H₈O₇) in 1 mL preparation should not be lower than 4.0 mg.

Key words: Yiqi Jianpi Oral Liquid; TLC; solid phase extraction; HPLC; Galli Gigerii Endothelium Corneum; Nelumbinis Semen; citric acid

益气健脾口服液由山药、乌梅、南山楂、太子参、鸡内金、稻芽、桑叶、莲子、绿豆、白扁豆、黑豆 11 味药材组方,具有健脾益气、和胃化食功效,可辅助治疗脾胃虚弱证,临床用于治疗不思饮食、食后腹胀、神倦乏力、面色不华、大便不调等症^[1]。益气健脾口服液现行标准中仅收录了南山楂、太子参、桑叶 3 味药材的薄层色谱(TLC)鉴别^[2],其含量测定以枸橼酸为指标性成分,采用电位滴定法测定制剂中有机酸的含量。但实际生产中使用氢氧化钠溶液调节药液 pH 值的步骤会中和部分有机酸,导致有机酸含量测定结果偏低,无法真实反映产品质量。故本研究中建立了鸡内金、莲子的 TLC 鉴

别法,以及测定枸橼酸含量的固相萃取-高效液相色谱(SPE-HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);IQ7000 型超纯水仪(美国 Merck Millipore 公司);CP224S ME 5 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为万分之一);KQ-A1000GDE 型恒温数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 1 000 W,频率为 40 kHz);CAMAG-TLC Visualizer 3 型薄层成像系统

*基金项目:国家药品监督管理局药品监管科学体系建设重点项目[RS2024Z006];广东省药品监督管理局科技创新项目[2023YDZ10]。

第一作者:郑文燕,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药品质量分析与控制,(电子信箱)244816443@qq.com。

[△]通信作者:刘潇潇,女,博士研究生,主任中药师,研究方向为中药质量标准,(电子信箱)730155206@qq.com。

(瑞士 Camag 公司); TW20 型水浴箱(德国 Julabo 公司); 预制硅胶 G 薄层板(德国 Merck 公司)。

1.2 试药

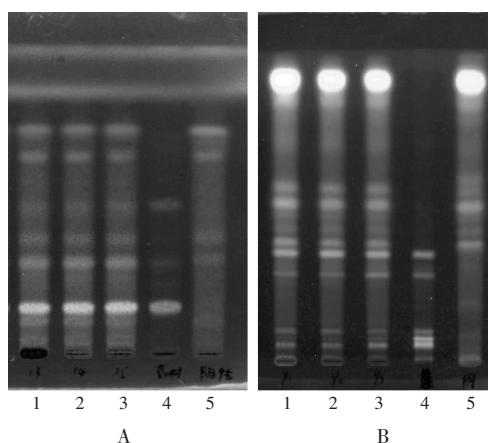
枸橼酸对照品(批号为 100396 - 202104, 含量为 99.7%), 鸡内金对照药材(批号为 121153 - 202003), 莲子对照药材(批号为 121121 - 201205), 均购自中国食品药品检定研究院; 益气健脾口服液(批号分别为 10221036, 10221043, 10221062, 10221067, 10222003, 10222014, 10222015, 10222016, 10222018, 10222019, 10222021, 10222035, 22122601, 22122701, 22122801, 编号为 S1 - S15), 11 味单味药材样品, 均由广州一品红制药有限公司提供; 乙腈(色谱纯, 美国 Honeywell 公司); 甲醇、磷酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 庚烷磺酸钠(色谱纯, 山东禹王和天下新材料有限公司); 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

鸡内金^[3]: 取样品 10 mL, 加三氯甲烷 15 mL, 振摇提取 2 次, 合并提取液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 即得供试品溶液。取鸡内金对照药材 0.2 g, 加水 10 mL, 加热回流 0.5 h, 滤过, 滤液加三氯甲烷 15 mL, 振摇提取 2 次, 合并提取液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 即得鸡内金对照药材溶液。取缺鸡内金的阴性样品 10 mL, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0502 TLC 法^[4]试验, 吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯 - 三氯甲烷 - 甲酸(3.0:3.0:0.5, V/V/V) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点, 且阴性对照无干扰。详见图 1 A。

莲子^[5-6]: 取样品 30 mL, 加盐酸 2 mL, 加乙醚 20 mL, 振摇提取 2 次, 弃乙醚液, 水液加氨试液调 pH 至 9 ~ 11, 加乙醚 30 mL, 振摇提取 2 次, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加甲醇 0.5 mL 使溶解, 即得供试品溶液。取莲子对照药材 2 g, 加甲醇 50 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL、盐酸 2 mL, 加乙醚 20 mL, 振摇提取 2 次, 弃乙醚液, 水液加氨试液调 pH 至 9 ~ 11, 再加乙醚 30 mL, 振摇提取 2 次, 合并乙醚液, 用无水硫酸钠脱水, 滤过, 回收溶剂蒸干, 残渣加甲醇 0.5 mL 使溶解, 即得莲子对照药材溶液。取缺莲子的阴性样品 30 mL, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0502 TLC 法^[4], 吸取上述供试品溶液 5 ~ 10 μ L 和阴性对照品溶液、对照药材溶液各 2 ~ 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正丁醇 - 水 - 醋酸



1 - 3. 供试品溶液(编号为 S13 - S15) 4. 对照药材溶液
5. 阴性对照品溶液
A. 鸡内金(365 nm) B. 莲子(365 nm)

图 1 薄层色谱图

1 - 3. Test solution (numbered S13 - S15) 4. Reference medicinal material solution 5. Negative reference solution
A. Galli Gigerii Endothelium Corneum (365 nm) B. Nelumbinis Semen (365 nm)

Fig. 1 TLC chromatograms

(8:5:1, V/V/V) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 挥干, 用热风吹 5 min, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点, 且阴性对照无干扰。详见图 1 B。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件^[7-10]与系统适用性试验

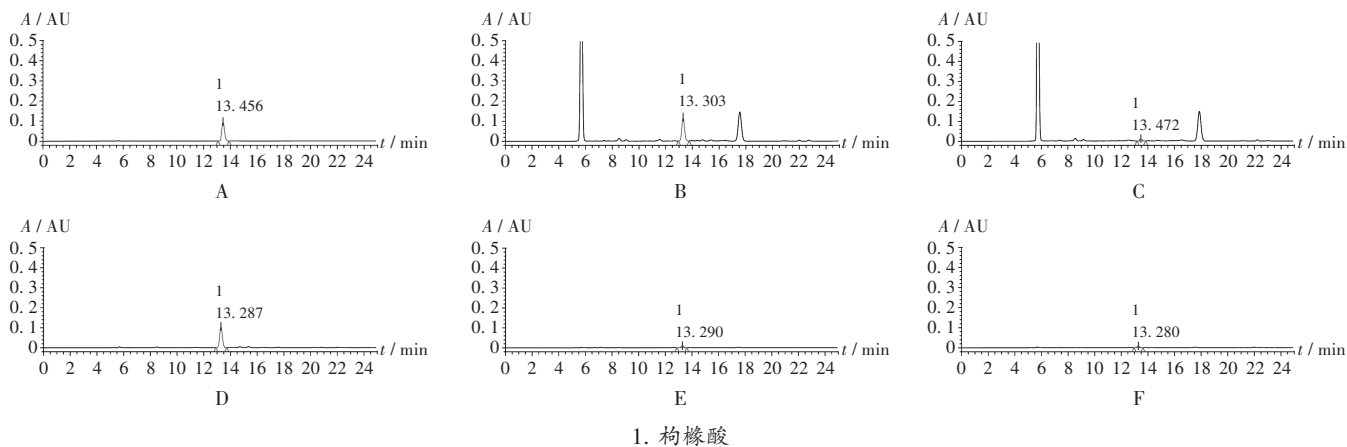
色谱柱: GL Sciences InerSustain AQ - C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.04% 庚烷磺酸钠溶液(用磷酸调 pH 至 2.3) - 乙腈(99:1, V/V); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。在此色谱条件下, 理论板数按枸橼酸峰计应不低于 7 000。

2.2.2 溶液制备

精密量取样品 10 mL, 置 20 mL 容量瓶中, 加 1% 氨水溶液定容, 摇匀, 精密量取 5 mL, 通过用甲醇、水各 6 mL 预洗的强阴离子 Welchrom[®] SAX SPE 柱(6 mL/g), 用 5% 甲醇溶液 5 mL 洗脱, 弃洗脱液, 再用 2% 磷酸 - 5% 甲醇溶液 15 mL 洗脱, 收集洗脱液, 置 20 mL 容量瓶中, 加 5% 甲醇溶液定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。取枸橼酸对照品适量, 精密称定, 加 5% 甲醇溶液制成质量浓度为 1 mg/mL 的枸橼酸对照品溶液。按益气健脾口服液处方工艺制备缺乌梅的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取样品处方中 11 味单味药材, 按样品制备工艺及供试品溶液制备方法, 分别制备处方中各单味药材供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.2.2 项下供试品溶液、对照品溶液、阴性对照品溶液各 10 μ L, 按 2.2.1 项下色谱条件进



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液(编号为S14) C. 阴性对照品溶液(缺乌梅) D - F. 单味药材供试品溶液(分别为乌梅、绿豆、黑豆)
图2 高效液相色谱图

1. Citric acid
A. Reference solution B. Test solution (numbered S14) C. Negative reference solution (lacking Mume Fructus) D - F. Test solution of Mume Fructus, Phaseoli Radiati Semen, and Sojae Semen, respectively

Fig. 2 HPLC chromatograms

样测定,记录色谱图。结果阴性对照品溶液中含少量枸橼酸,其峰面积约为供试品溶液峰面积的10%。为进一步确定枸橼酸来源,将11味单味药材供试品溶液依次进样测定。结果显示,绿豆、黑豆药材供试品溶液中均含少量枸橼酸。详见图2。可见,枸橼酸并非乌梅药材的专属性成分,但供试品溶液中约90%的枸橼酸来自乌梅药材,且以枸橼酸为代表的有机酸成分是乌梅发挥药效的主要成分^[11-12]。为评价益气健脾口服液质量、保证制剂有效性,本研究采用原标准的判定依据,以“每1 mL中含有机酸以枸橼酸($C_6H_8O_7$)计”进行计算。

线性关系考察:取枸橼酸对照品适量,精密称定,加5%甲醇溶液制成质量浓度分别为0.102 6, 0.256 5, 0.513 1, 1.026 1, 2.052 2, 5.130 6 mg/mL的系列对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以对照品溶液质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1\,336\,081.77X - 8\,089.33$ ($r = 1.000\,0, n = 6$)。结果表明,枸橼酸的质量浓度在0.102 6~5.130 6 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限确定:取2.2.2项下对照品溶液适量,加5%甲醇溶液逐级稀释,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N) > 10时的质量浓度为定量限。结果枸橼酸的定量限为1.24 μ g/mL。

精密度试验:精密吸取“线性关系考察”项下质量浓度为1.026 1 mg/mL的枸橼酸对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果枸橼酸峰面积的 RSD 为0.36% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批样品(编号为S14)适量,按

2.2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果样品中枸橼酸平均含量为9.869 2 mg/mL, RSD 为0.57% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批样品(编号为S13)适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果枸橼酸峰面积的 RSD 为1.18% ($n = 8$),表明供试品溶液放置24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取枸橼酸对照品适量,精密称定,加水制成质量浓度为25.653 0 mg/mL的加标溶液。精密量取同一批样品(编号为S14)5 mL,平行9份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,置20 mL容量瓶中,分别精密加入加标溶液1 mL(低浓度)、2 mL(中浓度)、3 mL(高浓度),各3份,用1%氨水溶液定容,摇匀,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n = 9$)
Tab. 1 Result of the recovery test ($n = 9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
49.346 2	25.653 0	74.769 7	99.11		
49.346 2	25.653 0	74.706 6	98.86		
49.346 2	25.653 0	74.408 5	97.70		
49.346 2	51.306 0	99.322 0	97.41		
49.346 2	51.306 0	99.537 6	97.83	97.71	0.86
49.346 2	51.306 0	99.508 0	97.77		
49.346 2	76.959 0	123.621 9	96.51		
49.346 2	76.959 0	124.095 1	97.13		
49.346 2	76.959 0	124.027 1	97.04		

2.2.4 样品含量测定

取15批样品(编号为S1 - S15)各适量,按2.2.2项

下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算样品中枸橼酸的含量。结果15批样品中枸橼酸的含量分别为7.65, 5.82, 9.34, 7.45, 10.38, 9.39, 10.02, 10.01, 9.86, 9.59, 10.78, 8.30, 10.90, 9.90, 8.71 mg/mL。

2.2.5 含量限度拟定

益气健脾口服液中药枸橼酸主要来自药材乌梅,故以药材乌梅中枸橼酸的转移率来拟定枸橼酸限度。样品处方中乌梅的投料比为10%,2020年版《中国药典(一部)》规定乌梅水分不得高于16.0%,含枸橼酸不得低于12%。结合15批样品中投料的乌梅饮片枸橼酸含量成品中枸橼酸含量及测定结果,计算得枸橼酸从药材到成品的平均转移率为39.39%。按最低含量限度要求,则每1 mL制剂含有机酸以枸橼酸计约为4.0 mg。故拟定枸橼酸含量限度为每1 mL益气健脾口服液中含有机酸以枸橼酸($C_6H_8O_7$)计应不低于4.0 mg。

3 讨论

3.1 强阴离子 SPE 柱选择

针对枸橼酸在水溶液中易解离成阴离子的特点,预试验中分别考察了Welchrom® SAX SPE柱、CNWBOND SAX SPE柱、Agilent Bond Elut - SAX SPE柱、Agilent Bond Elut Plexa PAX cartridge SPE柱4种阴离子SPE柱对枸橼酸的净化富集效果。结果显示,不同SPE柱对枸橼酸的富集效果差异明显,其中Welchrom® SAX SPE柱与CNWBOND SAX SPE柱对枸橼酸的吸附性好,富集效果明显优于其余2种SPE柱,且前者效果更好。故最终选择Welchrom® SAX SPE柱。

3.2 供试品溶液制备方法选择

枸橼酸为三元酸,其在25℃时的电离常数为 $pK_1 = 3.13$, $pK_2 = 4.76$, $pK_3 = 6.40$ 。为保证供试品溶液中的有机酸与强阴离子SPE柱的填料能完全结合,使有机酸在柱中得到充分吸附,本研究中采用1%氨水溶液作为稀释溶剂,以使枸橼酸离子化完全。同时,试验过程中对SPE柱的淋洗溶剂(水、5%甲醇溶液、10%甲醇溶液)、洗脱溶剂(2%磷酸溶液、含2%磷酸的5%甲醇溶液)、洗脱溶剂用量(10, 15, 20 mL)分别进行了考察,最终选取5%甲醇溶液作为淋洗溶剂,用15 mL含2%磷酸的5%甲醇溶液洗脱。

3.3 流动相选择

为使枸橼酸能以分子形式稳定存在,本研究中通过离子对试剂调节流动相的pH以抑制其离子化,分别考察了0.5%磷酸二氢铵溶液、0.02 mol/L磷酸二氢钠溶液、0.04%庚烷磺酸钠溶液等流动相体系。结果显示,以0.04%庚烷磺酸钠溶液(用磷酸调pH至2.3) - 乙腈(99:1, V/V)为流动相时,枸橼酸分离效果好,峰形佳,故选择其为流动相。

3.4 含乌梅中药制剂的有机酸检测情况

益气健脾口服液处方中的乌梅投料量约为10%。乌梅具有增强食欲、促进肠道蠕动、消除炎症的作用。有机酸类化合物是乌梅发挥药效的重要物质基础,其中以枸橼酸的含量最高。2020年版《中国药典(一部)》中以枸橼酸为药材乌梅含量测定的指标性成分。以枸橼酸为代表的有机酸类化合物成分极性大,在反相色谱柱上不易被保留,且中成药成分复杂、杂质干扰多,致使含乌梅的中药制剂中缺乏有机酸相关的质量控制项目或专属性强的质量控制方法。2020年版《中国药典(一部)》记载的含乌梅中药制剂共24个品种,均未收载有机酸的含量测定方法。本研究中基于强阴离子SPE柱对有机酸的纯化和富集,以离子对试剂作为流动相,延长有机酸在反相色谱柱上的保留时间,建立了一种快速、高效的有机酸检测方法,可为含乌梅中药制剂的质量控制提供了参考。

3.5 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、专属性强、重复性好、结果准确,可用于益气健脾口服液的质量控制。

参考文献

- [1] 何翠婷,郭伟仪,吴海谊,等. 益气健脾疗法联合三联活菌对消化不良的疗效[J]. 中国城乡企业卫生, 2020, 35(1): 160 - 161.
- [2] WS - 5257(B - 0257) - 2014Z, 国家药品标准: 益气健脾口服液[S].
- [3] 粤PFKL20220047, 广东省中药配方颗粒质量标准: 鸡内金配方颗粒[S].
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 59 - 60.
- [5] 闫雪生,陈雪,姚乾元. 小儿健胃素口服液薄层层析研究[J]. 中成药, 1995, 17(5): 13 - 15.
- [6] 校合香,邹阳,邓芬,等. 健脾肥儿口服液质量标准研究[J]. 中国药业, 2005, 14(5): 32 - 33.
- [7] 孟德钢,许菊,薛冬,等. HPLC - DAD 波长切换法测定含化上清片中4种主要成分的含量[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 31(4): 293 - 297.
- [8] 云环,刘鑫,何悦,等. 固相萃取 - 超高效液相色谱法同时测定乳制品中6种有机酸[J]. 分析试验室, 2014, 33(5): 609 - 613.
- [9] 吴蓉,范胜莲. 高效液相色谱法测定山楂药材和小儿麦枣咀嚼片中枸橼酸含量[J]. 中国药业, 2019, 28(20): 20 - 23.
- [10] 群培,翟雪,金乾,等. UPLC法测定不同海拔及不同采收期乌梅中枸橼酸和苹果酸[J]. 中成药, 2019, 41(6): 1338 - 1343.
- [11] 熊建飞,周光明,许丽,等. 离子色谱法测定山楂和乌梅中的有机酸[J]. 食品科技, 2012, 37(9): 284 - 287.
- [12] 万莹莹,袁嘉成,杜微波,等. 乌梅配方颗粒质量控制研究[J]. 山东化工, 2023, 52(4): 67 - 71.

(收稿日期: 2024 - 09 - 22; 修回日期: 2025 - 04 - 09)