

UPLC法同时测定胃苏颗粒中4种成分的含量

郭殷锐*,张广唱,王 剑*(广州中医药大学基础医学院,广州 510006)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3443-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.41

摘要 目的:建立同时测定胃苏颗粒中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷含量的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈,流动相为乙腈-0.2%磷酸(梯度洗脱),流速为0.40 ml/min,检测波长为284 nm,柱温为30 ℃,进样量为1 μl。结果:芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的检测质量浓度线性范围分别为9.38~93.75 μg/ml($r=0.999\ 7$)、32.25~322.50 μg/ml($r=0.999\ 7$)、11.25~112.50 μg/ml($r=0.999\ 9$)、11.88~118.75 μg/ml($r=0.999\ 8$);定量限分别为20、18、18、18 ng,检测限分别为6、5、5、5 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为96.24%~103.12%(RSD=2.45%, $n=6$)、98.43%~102.10%(RSD=1.42%, $n=6$)、96.10%~101.41%(RSD=2.07%, $n=6$)、95.57%~99.06%(RSD=1.44%, $n=6$)。结论:该方法快速、高效,适用于同时测定胃苏颗粒中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量。

关键词 超高效液相色谱法;胃苏颗粒;芸香柚皮苷;橙皮苷;新橙皮苷;柚皮苷;含量测定

Simultaneous Determination of Four Components in Weisu Granule by UPLC

GUO Yinrui, ZHANG Guangchang, WANG Jian (College of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of narirutin, naringin, hesperiden and neohesperiden in Weisu granule. METHODS: UPLC was performed on the column of ACQUITY UPLC BEH C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.2% Phosphoric acid aqueous (gradient elution) at a flow rate of 0.40 ml/min, the detection wavelength was 284 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 1 μl. RESULTS: The linear range was 9.38-93.75 μg/ml for narirutin ($r=0.999\ 7$), 32.25-322.50 μg/ml for naringin ($r=0.999\ 7$), 11.25-112.50 μg/ml for hesperiden ($r=0.999\ 9$) and 11.88-118.75 μg/ml for neohesperidin ($r=0.999\ 8$); limits of quantitation were 20 ng, 18 ng, 18 ng and 18 ng, the limits of detection were 6 ng, 5 ng, 5 ng and 5 ng, respectively; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 96.24%-103.12% (RSD=2.45%, $n=6$), 98.43%-102.10% (RSD=1.42%, $n=6$), 96.10%-101.41% (RSD=2.07%, $n=6$) and 95.57%-99.06% (RSD=1.44%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is rapid and efficient, and suitable for the simultaneous determination of narirutin, naringin, hesperiden and neohesperiden in Weisu granule.

KEYWORDS UPLC; Weisu granule; Narirutin; Hesperiden; Neohesperidin; Naringin; Content determination

胃苏颗粒为紫苏梗、香附、陈皮、香橼、佛手、枳壳、槟榔、炒鸡内金8味药材组合而成的复方制剂,具有理气消胀、和胃止痛的功效,主治气滞型胃痛、慢性胃炎及消化性溃疡^[1-3]。查阅相关文献^[4-6],对于胃苏颗粒质量控制的研究,目前仅见高效液相色谱(HPLC)法对其中柚皮芸香苷、柚皮苷等成分的含量测定报道,未见采用超高效液相色谱(UPLC)法的相关报道。UPLC法作为一种新型液相色谱技术,相比传统HPLC,具有分离能力强、分析速度快、灵敏度高的特点^[7-9]。因此,笔者开展本项研究,旨在利用UPLC法建立一种快速、准确、有效测定胃苏颗粒中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷含量的方法,为其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY型UPLC仪,包括QSM四元溶剂管理器、二极管阵列(PDA)检测器、SM-FTN样品管理器、CH-A型柱温箱、Empower3色谱工作站(美国Waters公司);BP211D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);KQ-100DE型超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司,功率:100 W,频率:40 kHz)。

* 硕士研究生。研究方向:中医药延缓衰老、中草药成分。电话:020-39358637。E-mail:75706868@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中医药延缓衰老、中草药成分。E-mail:zswj@gzucm.edu.cn

1.2 药品与试剂

胃苏颗粒(扬子江药业集团有限公司,批号:13122301、14021403、14022701、14080902、14101002、14102801、15011202、15022301,规格:5 g/袋);芸香柚皮苷对照品(批号: MUST-12040812,纯度≥98.0%)、橙皮苷对照品(批号: MUST-11030701,纯度≥98.0%)、新橙皮苷对照品(批号: MUST-12030914,纯度≥98.0%)、柚皮苷对照品(批号: MUST-12040812,纯度≥98.0%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;乙腈、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸(B),梯度洗脱(0 min, 16% A; 6 min, 35% A);流速:0.40 ml/min;检测波长:284 nm;柱温:30 ℃;进样量:1 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷对照品各适量,精密称定,置于同一25 ml量瓶中,用80%乙醇溶解并定容,制成每1 ml含芸香柚皮苷93.75 μg、柚皮苷322.50 μg、橙皮苷112.50 μg、新橙皮苷118.75 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品约0.5 g,精密称定,置于50 ml具塞锥形瓶中,加80%乙醇40 ml,浸泡30 min,超声提取30 min,称定质量,用80%乙醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液^[4] 按胃苏颗粒的处方比例和制备工艺,制备缺陈皮、枳壳、香橼和佛手的阴性对照品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,各成分均能达到基线分离,分离度均>1.5,理论板数以柚皮苷峰计≥13 000;柚皮芸香苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷保留时间分别为4.485、4.773、4.987、5.266 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

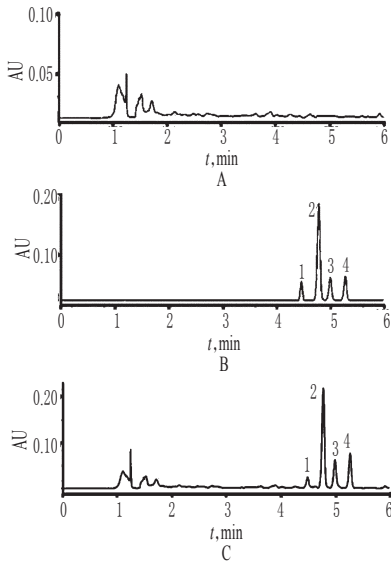


图1 超高效液相色谱图

A. 阴性对照; B. 混合对照品; C. 供试品; 1. 芸香柚皮苷; 2. 柚皮苷; 3. 橙皮苷; 4. 新橙皮苷

Fig 1 UPLC chromatograms

A. negative control; B. mixed reference substance; C. test sample; 1. naringutin; 2. naringin; 3. hesperidin; 4. neoheperidin

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液0.5、1、2、3、4、5 ml,分别置于5 ml量瓶中,用80%乙醇定容,摇匀,得系列线性溶液。取上述溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的回归方程与线性范围,详见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/ml}$
柚皮芸香苷	$y=5\,558.34x+806.00$	0.999 7	9.38~93.75
柚皮苷	$y=8\,253.39x+2\,247.80$	0.999 7	32.25~322.50
橙皮苷	$y=5\,587.34x+267.80$	0.999 9	11.25~112.50
新橙皮苷	$y=5\,347.40x+212.60$	0.999 8	11.88~118.75

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按

“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD),详见表2。

表2 定量限与检测限

Tab 2 Quantitation limit and detection limit

待测成分	LOQ, ng	LOD, ng
芸香柚皮苷	20	6
柚皮苷	18	5
橙皮苷	18	5
新橙皮苷	18	5

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,柚皮芸香苷、橙皮苷、新橙皮苷和柚皮苷峰面积的RSD分别为1.54%、0.89%、1.05%、1.10% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:13122301)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柚皮苷峰面积的RSD分别为1.27%、1.18%、1.59%、0.84% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:13122301)6份,每份约0.50 g,精密称定,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,记录峰面积并计算各成分的平均含量,详见表3。

表3 重复性试验结果

Tab 3 Result of reproducibility tests

待测成分	平均含量, mg/g	RSD, %
芸香柚皮苷	1.363 7	1.72
柚皮苷	7.154 6	1.28
橙皮苷	3.481 4	1.80
新橙皮苷	4.127 4	1.06

2.9 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:13122301)适量,共6份,每份约0.25 g,精密称定,分别加入芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷柚皮苷对照品各适量,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,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

2.10 样品含量测定

取8批样品各适量,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,记录峰面积并计算各成分的含量,结果见表5。

3 讨论

3.1 提取方法与溶剂的选择

试验中考察了超声提取法与加热回流提取法提取待测成分的差异。结果,超声处理30 min与加热回流1 h,芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的提取率无显著性差异,考虑超声提取法简便易行,本试验选择超声提取法。同时,还考察了不同体积分数(0%、20%、40%、60%、80%、100%)甲醇、乙醇超声提取对4种待测成分提取率的影响。结果,以80%乙醇作为

提取溶剂时对4种待测成分的提取最为完全,且提取液易于过滤。故本试验采用80%乙醇作为提取溶剂。

表4 加样回收率试验结果(n=6)
Tab 4 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	取用量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
芸香柚皮苷	0.248 6	0.339 0	0.327 0	0.676 2	103.12	98.52	2.45
	0.250 8	0.342 0	0.327 0	0.659 7	97.16		
	0.253 2	0.345 3	0.327 0	0.668 4	98.81		
	0.248 8	0.339 3	0.327 0	0.660 3	98.17		
	0.251 0	0.342 3	0.327 0	0.657 0	96.24		
	0.252 5	0.344 3	0.327 0	0.663 5	97.61		
柚皮苷	0.248 6	7.154 6	1.782 0	3.536 4	98.64	99.69	1.42
	0.250 8	1.794 4	1.782 0	3.586 5	100.57		
	0.253 2	1.811 5	1.782 0	3.630 9	102.10		
	0.248 8	1.780 1	1.782 0	3.542 2	98.88		
	0.251 0	1.795 8	1.782 0	3.549 8	98.43		
	0.252 5	1.806 5	1.782 0	3.580 1	99.53		
橙皮苷	0.248 6	0.865 5	0.854 0	1.700 4	97.76	98.12	2.07
	0.250 8	0.873 1	0.854 0	1.693 8	96.10		
	0.253 2	0.881 5	0.854 0	1.729 6	99.31		
	0.248 8	0.866 2	0.854 0	1.703 4	98.03		
	0.251 0	0.873 8	0.854 0	1.739 8	101.41		
	0.252 5	0.879 1	0.854 0	1.699 8	96.10		
新橙皮苷	0.248 6	1.025 4	1.051 0	2.066 5	99.06	97.08	1.44
	0.250 8	1.034 5	1.051 0	2.038 9	95.57		
	0.253 2	1.044 4	1.051 0	2.058 2	96.46		
	0.248 8	1.026 2	1.051 0	2.040 4	96.50		
	0.251 0	1.035 3	1.051 0	2.071 3	98.57		
	0.252 5	1.041 5	1.051 0	2.054 0	96.34		

表5 样品含量测定结果(n=3, mg/g)

Tab 5 Result of contents determination of samples (n=3, mg/g)

样品批号	含量			
	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
13122301	1.363 7	7.154 6	3.481 4	4.127 4
14021403	1.098 6	5.965 3	3.064 7	3.309 7
14022701	1.019 0	6.098 0	2.785 4	3.045 3
14080902	1.289 2	5.864 2	2.987 6	2.876 4
14101002	1.273 8	6.133 0	3.468 1	4.108 7
14102801	1.152 4	6.860 1	2.893 7	3.864 0
15011202	1.552 4	7.644 2	3.012 5	3.375 2
15022301	1.305 6	7.053 6	3.310 6	4.332 8
平均含量	1.256 8	6.596 6	3.125 5	3.629 9

3.2 检测波长的选择

对混合对照品溶液和供试品溶液均采用PDA检测器进行紫外全波长扫描(200~400 nm)。结果,芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷色谱峰在284 nm处均有最大吸收,并参照相关文献^[9-11],本试验最终选择284 nm为检测波长。

3.3 流动相的选择

本试验考察了甲醇-0.1%/0.2%磷酸、甲醇-0.5%/1.0%醋酸、乙腈-0.1%/0.2%磷酸、乙腈-0.5%/1.0%醋酸等不同流动相系统。结果,乙腈-0.2%磷酸效果最好,基线最为平稳,分析时间短,各待测成分分离度高、峰型较好,且液相系统压力低。故最终选用乙腈-0.2%磷酸作为本试验的流动相。

3.4 样品含量测定结果分析

对8批胃苏颗粒中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷进行含量测定。结果表明,芸香柚皮苷含量为1.019 0~1.552 4 mg/g,平均含量为1.256 8 mg/g;柚皮苷含量为5.864 2~7.644 2 mg/g,平均含量为6.596 6 mg/g;橙皮苷含量为2.785 4~3.481 4 mg/g,平均含量为3.125 5 mg/g;新橙皮苷含量为2.876 4~4.332 8 mg/g,平均含量为3.629 9 mg/g。可见,8批样品间4种成分含量存在一定差异,可能与批次跨度较大、生产原料质量存在一定差异有关,但总体来说8批样品中4种成分的含量与均值差值较小,较为稳定。

综上所述,本方法快速、高效,适用于同时测定胃苏颗粒中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:1 171.
- [2] 杨佳静, 薛佳, 周华方, 等. HPLC法同时测定胃苏颗粒中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(4):372.
- [3] 赵沈娟, 黄新兰, 石晶萍, 等. 胃苏颗粒的质量标准研究[J]. 中国药事, 2009, 23(1):70.
- [4] 李玲, 赵顺, 罗疆南, 等. 一测多评法测定胃苏颗粒中4种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4):751.
- [5] 李沁媛, 唐亚琴, 徐辉, 等. 高效液相色谱法测定胃苏颗粒中橙皮苷和柚皮苷含量[J]. 西南科技大学学报, 2011, 26(2):82.
- [6] 葛晓磊, 张欣, 李伟欣, 等. RP-HPLC同时测定胃苏颗粒中间体中3种黄酮苷的含量[J]. 食品与药品, 2016, 18(2):112.
- [7] 李化, 刘静, 董红敬, 等. HPLC法与UPLC法同时测定黄芩中5种黄酮类成分含量的比较[J]. 中国药房, 2014, 25(35):3 293.
- [8] 陈佳, 王钢力, 姚令文, 等. 超高效液相色谱(UPLC)在药物分析领域中的应用[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11):1 976.
- [9] 朱露, 雷鹏, 黄琪, 等. 反相高效液相色谱法测定枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量[J]. 中南药学, 2013(12):934.
- [10] 王元清, 严建业, 师白梅, 等. 不同批次枳壳中柚皮苷、新橙皮苷、总黄酮、挥发油的含量比较及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):146.
- [11] 宋剑锋, 冯敬骞, 胡建华, 等. HPLC法同时测定常山胡柚花中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的量[J]. 中草药, 2014, 45(6):854.

(收稿日期:2015-07-30 修回日期:2016-05-16)

(编辑:刘 柳)