

# 橘蒴排石颗粒多指标成分含量测定研究

刘佳伟\*

(南京中医药大学连云港附属医院, 连云港 222004)

**摘要:目的** 建立高效液相色谱测定橘蒴排石颗粒中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷含量的方法。**方法** 供试品 50% 甲醇提取液采用 Welch Xtimate C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱分析;流动相:乙腈-0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱;柱温:30 °C;流速:0.8 mL/min;检测波长:280 nm 和 326 nm;进样量:15 μL。**结果** 绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷分别在 3.932~19.66 μg/mL ( $r=1.0000$ )、3.682~18.41 μg/mL ( $r=0.9999$ )、3.860~19.30 μg/mL ( $r=0.9999$ )、5.856~29.28 μg/mL ( $r=0.9998$ )、19.53~97.64 μg/mL ( $r=0.9999$ )和 16.19~80.95 μg/mL ( $r=0.9999$ )范围内线性关系良好,平均回收率分别为 99.43%、100.06%、100.01%、100.06%、99.40% 和 100.05%。**结论** 该方法具有良好准确度,操作简单,可用于橘蒴排石颗粒的质量控制。

**关键词:** 橘蒴排石颗粒; 绿原酸; 新绿原酸; 隐绿原酸; 王不留行黄酮苷; 柚皮苷; 新橙皮苷; 含量测定

## 0 引言

橘蒴排石颗粒是由连云港中医院研制的机构药物制剂,批准文号为苏药制字 Z04000026,该药物是由橘核、小茴香、瞿麦、车前草、冬葵子、石韦、滑石、泽泻、三棱、王不留行、枳壳和川牛膝 12 味药组成的中药复方制剂,具有通经止痛,清利湿热,利水通淋,化痰散结,排石溶石之功效<sup>[1]</sup>,临床上用于尿路结石,能加速体外冲击波碎石术后碎石排出<sup>[2]</sup>。目前,橘蒴排石颗粒质量控制方面主要为处方中单味药的文献报道<sup>[3]</sup>,橘蒴排石颗粒制剂的质量控制尚未有报道,橘蒴排石颗粒为中药复方制剂,所含成分复杂,为了更好地控制产品的质量,保证产品临床疗效,本文首次建立了高效液相色谱(HPLC)对橘蒴排石颗粒多指标成分含量进行同时测定的方法,为橘蒴排石颗粒质量控制提供依据,可作为控制橘蒴排石颗粒质量的有效方法之一。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

Agilent 1260 液相色谱仪, DAD 检测器及 VWD 检测器(美国安捷伦科技公司);梅特勒 XSE104 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);梅特勒 XSR105 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);德意生 040S 型超声波清洗机(深圳市洁盟清洗设备有限公司)。

绿原酸(批号 110753-202119, 含量 96.3%)、新绿原酸(批号 112110-202401, 含量 99.2%)、隐绿原酸(批号 112111-202401, 含量 96.7%)、王不留行黄酮苷(批号 111853-202205, 含量 97.1%)、柚皮苷(批号 110722-202417, 含量 96.1%)、新橙皮苷(批号 111857-202305, 含量 99.6%), 厂家均为中国食品药品检定研究院。乙腈、磷酸为色谱纯试剂,水为自制纯化水,甲醇为分析纯试剂。

4 批橘蒴排石颗粒批号分别为 20230301、20230901、20240102 和 20241001, 连云港市中医院制备。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 溶液配制

(1)对照品溶液:取绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷 6 种对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇配制成含绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷分别为 10、10、10、15、60、50 μg/mL 的混合对照品溶液<sup>[4]</sup>。

(2)供试品溶液:取橘蒴排石颗粒研磨成细粉,精密称定 3 g 细粉,转移至具塞锥形瓶中,加入 20 mL 50% 甲醇,密塞,称重,超声处理(250 W, 50 kHz) 30 min,放冷,再称重,用 50% 甲醇补重,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.2 色谱条件

色谱柱: Welch Xtimate C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm);

\* 通信作者: 刘佳伟, 主管药师, 研究方向为医疗机构药学部中药调剂与质量工作。E-mail: 963026428@qq.com

流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液; 梯度洗脱, 0~5 min: 5% 乙腈; 5~18 min: 5%→24% 乙腈; 18~40 min: 24%→60% 乙腈; 40~45 min: 60% 乙腈; 柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 280 nm(测定王不留行黄酮苷、柚皮苷、新橙皮苷)、326 nm(测定绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸); 进样量为 15  $\mu\text{L}$ <sup>[6-7]</sup>。

### 1.2.3 精密性试验

取 1.2.1 节中配制的混合对照品溶液, 按 1.2.2 节项下色谱条件连续进样 5 针, 记录图谱, 计算测定的 6 种成分峰面积、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷的浓度分别为 983.22、920.58、965.07、975.86、976.38、1011.94  $\mu\text{g/mL}$  的单标溶液, 再分别精密量取 1、1、1.5、5、4 mL 到同一个 50 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇到刻度, 记为混合对照品贮备液。取混合对照品贮备液适量用 50% 甲醇稀释成系列线性溶液, 按 1.2.2 节色谱条件进样测定分析。将浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 作为横坐标、峰面积作为纵坐标, 进行回归<sup>[8]</sup>。

### 1.2.4 稳定性试验

取 20241001 批橘萼排石颗粒研细, 按 1.2.1 节方法制备一份供试品溶液, 于室温条件下放置 0、6、12、18、24、48 h 分别按 1.2.2 节色谱条件进样一针测定分析。计算绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷 6 种成分峰面积的相对标准偏差 (RSD) 值<sup>[9]</sup>。

### 1.2.5 重复性试验

取 20241001 批橘萼排石颗粒研细, 按 1.2.1 节方法制备 6 份供试品溶液, 按 1.2.2 节色谱条件进样测定分析, 计算每份供试品中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷 6 种成分的含量和 RSD 值<sup>[10]</sup>。

### 1.2.6 回收率试验

取 20241001 批橘萼排石颗粒研细, 取约 1.5 g, 共取 6 份, 称定后, 置具塞锥形瓶中, 分别加入混合对照品溶液适量 (6 种测定成分的加入量与 1.5 g 橘萼排石颗粒中的量相当, 加入量分别为绿原酸 0.1278 mg、新绿原酸 0.09206 mg、隐绿原酸 0.09651 mg、王不留行黄酮苷 0.1952 mg、柚皮苷 0.8787 mg、新橙皮苷 0.6072 mg), 然后按照 1.2.1 节方法制备供试品溶液, 按 1.2.2 节下色谱条件进样测定分析。计算绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留

行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷 6 种成分的回收率与 RSD 值。

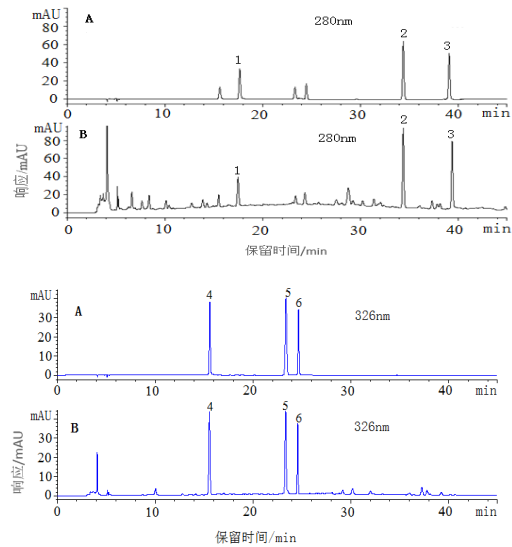
### 1.2.7 样品测定

取 4 批样品 (批号: 20230301、20230901、20240102 和 20241001), 按 1.2.1 节方法制备供试品溶液, 按 1.2.2 节色谱条件进样测定分析, 计算绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷 6 种成分的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 专属性

取对照品溶液和供试品溶液按 1.2.2 节下色谱条件分析, 结果 6 种指标成分均能达到基线分离, 峰形良好 (图 1)。



注: A—混合对照品; B—供试品; 1—王不留行黄酮苷; 2—柚皮苷; 3—新橙皮苷; 4—新绿原酸; 5—绿原酸; 6—隐绿原酸。

图 1 HPLC 色谱图

### 2.2 精密性试验

精密性试验结果显示, 连续进样 5 针绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷峰面积 RSD 分别为 0.91%、1.18%、1.02%、0.65%、1.06% 和 0.78%, 表明进样精密性良好。

### 2.3 线性关系的考察

将浓度作为横坐标、峰面积作为纵坐标, 进行回归, 6 种成分的线性方程、相关系数和线性范围结果见表 1。

表 1 6 种成分线性回归结果

化合物名称	回归方程	$r(n=6)$	线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )
绿原酸	$Y=22.6287X-0.7760$	1.0000	3.932~19.66
新绿原酸	$Y=37.1776X-2.8420$	0.9999	3.682~18.41
隐绿原酸	$Y=28.2751X-3.3770$	0.9999	3.860~19.30
王不留行黄酮苷	$Y=38.2176X+4.4800$	0.9998	5.856~29.28
柚皮苷	$Y=38.5262X+2.2230$	0.9999	19.53~97.64
新橙皮苷	$Y=13.9110X-0.6950$	0.9999	16.19~80.95

## 2.4 稳定性试验

稳定性试验结果显示, 绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷 6 种成分峰面积的 RSD 值分别为 1.85%、1.07%、1.58%、1.97%、1.41% 和 1.46%, 表明供试品溶液在室温条件下放置 48 h 稳定性良好。

## 2.5 重复性试验

重复性试验结果显示, 6 份供试品中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷的平均含量分别为 0.085 mg/g (RSD=2.05%)、0.056 mg/g (RSD=1.96%)、0.069 mg/g (RSD=1.89%)、0.13 mg/g (RSD=1.67%)、0.58 mg/g (RSD=1.78%) 和 0.40 mg/g (RSD=1.15%), 结果表明方法重复性较好。

## 2.6 回收率试验

回收率试验结果显示, 6 份回收率供试品溶液中绿原酸回收率分别为 99.61%、98.04%、98.20%、101.41%、101.17% 和 98.12%, 平均回收率为 99.43%, RSD 为 1.57%; 新绿原酸回收率分别为 100.93%、97.74%、101.93%、101.61%、98.47% 和 99.68%, 平均回收率为 100.06%, RSD 为 1.71%; 隐绿原酸回收率分别为 98.44%、101.65%、101.96%、101.65%、98.02% 和 98.33%, 平均回收率为 100.01%, RSD 为 1.92%; 王不留行黄酮苷回收率分别为 100.97%、101.74%、99.23%、102.15%、98.16% 和 98.10%, 平均回收率为 100.06%, RSD 为 1.80%; 柚皮苷回收率分别为 98.14%、102.06%、98.08%、101.40%、98.01% 和 98.69%, 平均回收率为 99.40%, RSD 为 1.85%; 新橙皮苷回收率分别为 97.89%、102.01%、98.11%、101.52%、99.04% 和 101.71%, 平均回收率为 100.05%, RSD 为 1.91%。上述结果表明方法准确度良好。

## 2.7 样品测定

测定 4 批橘茵排石颗粒中 6 种成分的含量, 结果见表 2。

表 2 橘茵排石颗粒中 6 种成分的含量(n=2)(单位: mg/g)

样品编号	绿原酸	新绿原酸	隐绿原酸	王不留行黄酮苷	柚皮苷	新橙皮苷
20230301	0.058	0.071	0.10	0.089	0.52	0.28
20230901	0.064	0.075	0.092	0.10	0.44	0.35
20240102	0.096	0.062	0.076	0.14	0.61	0.44
20241001	0.085	0.056	0.069	0.13	0.58	0.40

## 3 讨论与结论

采用 DAD 检测器在 200~400 nm 范围对混合对照品溶液和供试品溶液进行扫描, 结果显示, 绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸在 326 nm 有较强吸收, 而王不留行黄酮苷、

柚皮苷和新橙皮苷在 280 nm 有较强吸收, 综合 6 种成分的紫外吸收情况, 确定采用双波长(326 nm 和 280 nm)测定橘茵排石颗粒中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷 6 种成分的含量。

试验比较了中性和酸性流动相体系(有机相均为乙腈, 水相分别为水、0.1% 甲酸和 0.1% 磷酸), 同时对色谱柱进行考察, 结果表明乙腈-0.1% 磷酸流动相体系、Welch Xtimate C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)柱所得供试品色谱图中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷能达到基线分离且峰形均较好, 无其他成分干扰, 能满足定量测定需求。

对供试品提取溶剂、提取方法和提取时间进行了考察, 结果表明用 50% 甲醇超声处理 30 min 可以提取完全橘茵排石颗粒中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、王不留行黄酮苷、柚皮苷和新橙皮苷。

本文采用双波长对橘茵排石颗粒中 6 种成分进行同时测定, 方法简便准确, 可为橘茵排石颗粒质量控制提供依据。

## 参考文献

- [1] 徐建华, 刘洪实, 商洪涛, 等. 橘茵排石冲剂治疗尿路结石 100 例观察[J]. 实用中医药杂志, 2003, 19(12): 627.
- [2] 商洪涛. 体外冲击波碎石术配合橘茵排石冲剂治疗输尿管结石 252 例[J]. 实用中医药杂志, 2007, 23(10): 651.
- [3] 刘兴赋, 郁林娜, 付洋, 等. UPLC 法同时测定橘核中 7 种成分含量[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(3): 179-201.
- [4] 纪玉华, 魏梅, 李国卫, 等. 不同部位车前草 HPLC 特征图谱的建立及多指标成分含量测定[J]. 中药材, 2020, 43(3): 660-664.
- [5] 何琪, 刘家芳, 於祥, 等. 贵州不同产地石韦中咖啡因的含量测定及提取工艺研究[J]. 贵州中医药大学学报, 2023, 45(1): 22-27.
- [6] 童培珍, 李国卫, 何嘉莹, 等. 基于指纹图谱和多指标成分含量测定的枳壳与枳实药材质量差异性研究[J]. 中南药学, 2022, 20(4): 898-904.
- [7] 李丽霞, 王书林, 王强, 等. HPLC 法测定泽泻中 3 种成分的含量[J]. 中药材, 2015, 38(7): 1444-1446.
- [8] 周国洪, 唐力英, 寇真真, 等. 炮制对王不留行中刺桐碱及黄酮苷类成分含量及溶出率的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(22): 18-21.
- [9] 姚娜, 黄燕明, 李雪银, 等. HPLC 同步测定麸炒枳壳配方颗粒特征图谱与柚皮苷橙皮苷新橙皮苷含量[J]. 中国现代中药, 2019, 21(11): 1569-1572.
- [10] 沈蕊, 胡杨, 熊晓通, 等. 高效液相色谱双波长切换法测定石韦配方颗粒中 8 种有效成分[J]. 化学分析计量, 2024, 33(3): 17-22.