

## 枳壳麸炒前、后主要活性成分的含量变化

李正红<sup>1</sup>, 夏放高<sup>2</sup>, 陈海芳<sup>1</sup>, 骆利平<sup>1</sup>, 魏莹<sup>1</sup>, 杨标<sup>1</sup>, 袁金斌<sup>1</sup>, 龚千峰<sup>1</sup>, 杨武亮<sup>1\*</sup>

(1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 江西钟山药业有限责任公司, 江西九江 332501)

[摘要] 目的: 考察枳壳饮片麸炒前、后主要活性成分的含量变化。方法: 采用 RP-HPLC 测定柚皮苷、新橙皮苷、辛弗林、川陈皮素、橘皮素、水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏和葡萄内酯的含量, 考察 10 批枳壳饮片麸炒前、后主要活性成分的含量变化。结果: 麸炒后枳壳饮片中柚皮苷、新橙皮苷、辛弗林、川陈皮素、橘皮素、水合橘皮内酯、橘皮内酯和马尔敏含量均略微下降, 而葡萄内酯含量明显上升。葡萄内酯小剂量 ( $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 对正常小鼠小肠运动具有促进作用, 高剂量 ( $9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 则具有抑制作用。结论: 麸炒后葡萄内酯含量的升高是枳壳炮制的目的, 可通过主要活性成分的变化规律阐述枳壳饮片的炮制机制。

[关键词] 枳壳; 麸炒; 主要活性成分; 反相高效液相色谱; 药效试验; 含量变化

[中图分类号] R283.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)19-0018-04

[doi] 10.11653/syfy2013190018

## Content Changes of Main Active Ingredients in Aurantii Fructus before and after Frying with Wheat Bran

LI Zheng-hong<sup>1</sup>, XIA Fang-gao<sup>2</sup>, CHEN Hai-fang<sup>1</sup>, LUO Li-ping<sup>1</sup>, WEI Ying<sup>1</sup>,  
YANG Biao<sup>1</sup>, YUAN Jin-bin<sup>1</sup>, GONG Qian-feng<sup>1</sup>, YANG Wu-liang<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;

2. Jiangxi Zhongshan Pharmaceutical Industry Co. Ltd, Jiujiang 332501, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate content changes of main active constituents in Aurantii Fructus before and after frying with wheat bran. **Method:** The contents of naringin, neohesperidin, synephrine, nobiletin, tangeretin, meranzin hydrate, meranzin, marmin and auraptene were determined by RP-HPLC, content changes of main active constituents from ten batches of Aurantii Fructus before and after frying with wheat bran were investigated. **Result:** The contents of naringin, neohesperidin, synephrine, nobiletin, tangeretin, meranzin hydrate, meranzin and marmin fell down after Aurantii Fructus fried with wheat bran, but the content of auraptene increased significantly. Small dose ( $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) of auraptene had role in promoting normal mice intestinal motility, while high dose ( $9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) showed inhibition. **Conclusion:** Increasing of the content of auraptene risen was purpose of Aurantii Fructus processed with wheat bran, it could elaborate processing mechanisms of Aurantii Fructus through analyzing variation of main active ingredients.

[Key words] Aurantii Fructus; fried with wheat bran; main active constituents; RP-HPLC; efficacy trials; content change

[收稿日期] 20130328(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260612); 国家中医药管理局“中医药行业科研专项”项目(201007011); 江西省青年科学基金项目(20122BAB215039)

[第一作者] 李正红, 硕士, 从事中药质量控制研究, Tel: 0791-87118659, E-mail: lzh7226146@163.com

[通讯作者] \* 杨武亮, 教授, 硕士生导师, 从事中药质量控制研究, Tel: 0791-87118659, E-mail: yangwuliang@163.com

枳壳具有理气宽中、行滞消胀的功效<sup>[1]</sup>,主要化学成分包括挥发油<sup>[2-3]</sup>、黄酮类<sup>[4-5]</sup>、少量香豆素类<sup>[6-7]</sup>及生物碱<sup>[5]</sup>等。生枳壳行气宽中除胀力强,常用于肋肋胀痛、肝气郁结;麸炒后增强了健脾消胀作用,常用于宿食停滞、呕逆暖气。枳壳炮制方法记载有23种,其中麸炒法出现较早,沿用时间最长,文献记载最多,临床应用最广泛,但枳壳的麸炒机制尚不明确。本实验采用RP-HPLC测定枳壳麸炒前、后主要活性成分(柚皮苷、新橙皮苷、辛弗林、川陈皮素、橘皮素、水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏和葡萄内酯)的含量,为阐明枳壳饮片的麸炒机制提供参考。

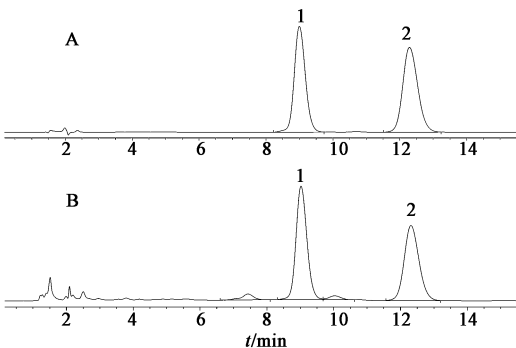
### 1 材料

1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),BT224S型1/万电子天平(德国赛多利斯公司),AE240型1/10万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。柚皮苷、辛弗林对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为110722-200610,110708-200505),新橙皮苷、水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素和葡萄内酯对照品(自制,经<sup>1</sup>H-NMR,<sup>13</sup>C-NMR,ESI-MS鉴定,HPLC归一化法计算纯度均≥98%),聚酰胺(60~90目,浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂),乙腈、甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。枳壳经江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室杨武亮教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实,枳壳饮片与麸炒饮片按2010年版《中国药典》中方法进行制备。

## 2 方法与结果

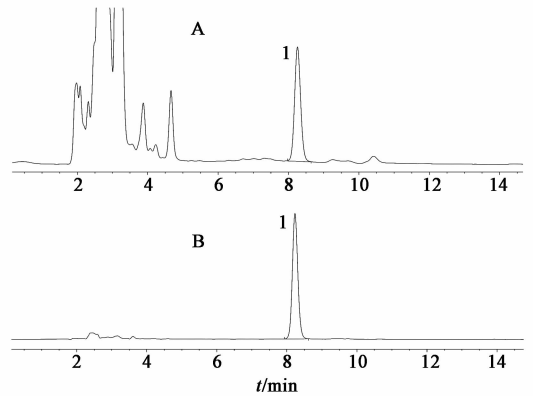
### 2.1 含量测定色谱条件

**2.1.1 柚皮苷和新橙皮苷** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(磷酸调pH 3)(20:80),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长283 nm,柱温25℃,进样量10 μL,见图1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 柚皮苷; 2. 新橙皮苷  
图1 枳壳中柚皮苷和新橙皮苷含量测定 HPLC

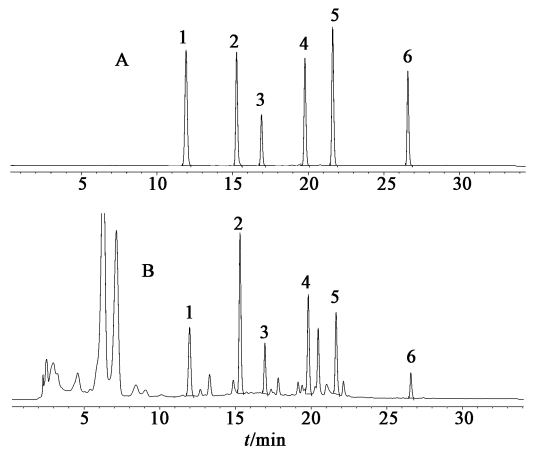
**2.1.2 辛弗林** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(1 L水中含十二烷基磺酸钠2.0 g,用冰醋酸调pH 3)(65:35),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长275 nm,柱温25℃,进样量20 μL,见图2。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 辛弗林  
图2 枳壳中辛弗林含量测定 HPLC

### 2.1.3 多甲氧基黄酮类和香豆素类成分

Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~6 min,49% A; 6~15 min,49%~75% A; 15~26 min,75%~100% A; 26~30 min,100% A; 30~32 min,100%~49% A; 32~35 min,49% A),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长324 nm,柱温25℃,进样量10 μL,见图3。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 水合橘皮内酯; 2. 橘皮内酯; 3. 马尔敏; 4. 川陈皮素; 5. 橘皮素; 6. 葡萄内酯  
图3 枳壳中多甲氧基黄酮类和香豆素类含量测定 HPLC

**2.2 对照品溶液的制备** 取柚皮苷、新橙皮苷、辛弗林、水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素和葡萄内酯对照品适量,精密称定,加甲醇配制柚皮苷、新橙皮苷质量浓度均为80 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液A,含辛弗林30 mg·L<sup>-1</sup>的对照品溶

液 B 及水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素、葡萄内酯质量浓度分别为 60, 30, 20, 30, 30, 30  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合对照品溶液 C。

### 2.3 供试品溶液的制备

**2.3.1 供试品溶液 A** 取样品粗粉约 0.2 g, 精密称定置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 水浴加热回流 1.5 h, 放冷, 称重, 用甲醇补足差重, 摇匀, 滤过, 精密移取续滤液 10 mL 至 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 即得。

**2.3.2 供试品溶液 B** 取样品中粉约 1 g, 精密称定置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 水浴加热回流 1.5 h, 放冷, 称重, 用甲醇补足差重, 摇匀, 滤过, 精密移取续滤液 10 mL, 蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 通过聚酰胺柱, 用水 25 mL 洗脱, 收集洗脱液, 转至 25 mL 量瓶中, 用水定容, 摇匀, 即得。

**2.3.3 供试品溶液 C** 取样品粗粉约 1 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 水浴加热回流 1 h, 冷却, 称重, 用甲醇补足质量, 摇匀, 即得。

**2.4 线性关系考察** 精密吸取各对照品适量进样, 分别按上述色谱条件进行测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得柚皮苷、新橙皮苷、辛弗林、水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素和葡萄内酯的线性方程分别为  $Y = 1.701X - 18.94$  ( $r = 0.9997$ ),  $Y = 1.815X - 32.98$  ( $r = 0.9997$ ),  $Y = 0.468X + 4.499$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 26.655X + 5.701$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 30.003X + 4.03$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 25.123X + 1.787$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 34.659X + 3.366$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 43.035X + 5.348$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 20.287X + 3.467$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围分别为 176.16 ~ 1233.12, 174.24 ~ 1219.68, 177.2 ~ 2126.4, 36.3 ~ 181.5, 23.9 ~ 957, 12.4 ~ 672, 21.9 ~ 109.4, 21.3 ~ 1063, 18.4 ~ 922 ng。

**2.5 精密度试验** 精密移取各对照品适量, 进样, 分别按上述色谱条件测定, 结果柚皮苷、新橙皮苷、辛弗林、川陈皮素、橘皮素、水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏和葡萄内酯峰面积的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 1.3%, 1.1%, 2.6%, 1.8%, 1.5%, 1.6%, 1.1%, 1.2%, 2.0%, 表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取各供试品溶液适量, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 按相应色谱条件测定, 结果柚皮苷、新橙皮苷、辛弗林、水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素、葡萄内酯峰面积的

RSD 分别为 1.57%, 0.95%, 1.6%, 0.6%, 1.1%, 1.9%, 0.5%, 2.0%, 2.4%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 按 2.3 项下方法制备不同供试品溶液各 5 份, 按相应的色谱条件进行测定, 结果柚皮苷、新橙皮苷、辛弗林、水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素、葡萄内酯含量的 RSD 分别为 1.1%, 1.7%, 1.3%, 1.6%, 2.6%, 2.3%, 1.4%, 1.4%, 0.1%, 表明该方法重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

**2.8.1 柚皮苷和新橙皮苷** 取已知含量的枳壳粉末(柚皮苷 4.6%, 新橙皮苷 4.3%) 0.1 g, 精密称定, 共 6 份, 每份样品中分别加入柚皮苷 ( $0.9088 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、新橙皮苷 ( $0.897 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对照品溶液各 5 mL, 按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下条件测定, 计算平均回收率分别为 100.2% (RSD 2.6%), 103.3% (RSD 1.3%)。

**2.8.2 辛弗林** 取已知辛弗林含量的枳壳粉末 0.5 g, 精密称定, 共 6 份, 每份样品中分别精密加入辛弗林对照品溶液 ( $0.254 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 5 mL, 按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.2 项下条件测定, 计算平均回收率 97.7% (RSD 1.4%)。

**2.8.3 多甲氧基黄酮类和香豆素类** 取已知含量的枳壳粉末 0.5 g, 精密称定, 共 6 份, 各精密加入水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素、葡萄内酯质量浓度分别为 1.58, 1.42, 0.27, 1.28, 0.83, 0.28  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合对照品溶液 1 mL, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.3 项下条件测定, 计算平均回收率分别为 98.7% (RSD 2.8%), 99.7% (RSD 2.0%), 99.2% (RSD 2.4%), 98.5% (RSD 2.7%), 102.6% (RSD 2.8%), 103.0% (RSD 2.7%)。

**2.9 最低定量限与检测限** 因样品中 6 个多甲氧基黄酮类和香豆素类的成分含量较低, 故对其最低检测限和定量限进行考察。当信噪比 = 3 时, 水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素和葡萄内酯检测限分别为 0.29, 0.28, 0.32, 0.39, 0.39, 0.32 ng; 当信噪比 = 10 时, 水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素和葡萄内酯的定量限分别为 0.92, 0.91, 1.17, 1.36, 1.37, 1.22 ng。

**2.10 样品测定** 取 10 批枳壳样品适量, 分别按 2.3 项下相应方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下相应色谱条件测定, 结果见表 1。

表1 枳壳麸炒前、后主要活性成分含量测定( $n=3$ )

No.	规格	柚皮苷	新橙皮苷	辛弗林	水和橘皮内酯	橘皮内酯	马尔敏	川陈皮素	橘皮素	葡萄内酯
1	生品	4.37	3.84	0.21	0.276	0.076	0.037	0.101	0.069	-
	麸炒品	4.22	3.68	0.19	0.256	0.069	0.030	0.097	0.066	0.011
2	生品	9.24	7.01	0.23	0.179	0.183	0.024	0.077	0.010	-
	麸炒品	9.11	6.83	0.21	0.175	0.171	0.021	0.072	0.009	0.045
3	生品	6.53	3.99	0.18	0.063	0.099	0.026	0.044	0.035	-
	麸炒品	6.23	3.87	0.15	0.053	0.092	0.022	0.039	0.031	0.048
4	生品	6.59	5.09	0.22	0.181	0.177	0.024	0.103	0.081	-
	麸炒品	6.42	4.86	0.19	0.176	0.172	0.020	0.099	0.080	0.051
5	生品	6.65	4.75	0.23	0.122	0.182	0.026	0.091	0.060	-
	麸炒品	6.59	4.52	0.21	0.119	0.180	0.025	0.085	0.055	0.048
6	生品	6.67	5.12	0.23	0.127	0.224	0.022	0.111	0.076	-
	麸炒品	6.44	4.98	0.20	0.118	0.219	0.020	0.109	0.072	0.050
7	生品	4.81	5.34	0.20	0.21	0.006	0.017	0.015	0.010	-
	麸炒品	4.73	5.02	0.19	0.019	0.004	0.016	0.014	0.008	0.043
8	生品	3.94	4.09	0.15	0.021	0.008	0.021	0.019	0.014	-
	麸炒品	3.89	3.92	0.11	0.018	0.006	0.019	0.016	0.012	0.039
9	生品	8.09	6.10	0.20	0.021	0.009	0.015	0.016	0.012	-
	麸炒品	7.89	6.04	0.18	0.019	0.007	0.014	0.014	0.009	0.056
10	生品	5.46	5.06	0.22	0.016	0.011	0.014	0.017	0.012	-
	麸炒品	5.22	4.89	0.19	0.015	0.010	0.011	0.016	0.008	0.044

注:“-”表示含量低于定量限。样品来源分别为1. 江西省新干县三湖镇陈家村;2. 江西省新干县荷浦乡关帝庙村;3. 江西省新干县金川镇水磨北坑;4. 江西省樟树市黄土岗镇谢家村;5. 江西省樟树市兰溪村陈家;6. 江西省樟树市店下村;7. 重庆市铜梁县六赢山;8. 重庆市荣昌县安富镇;9. 重庆市江津区几江镇;10. 重庆市开县金峰青橙二社。

### 3 讨论

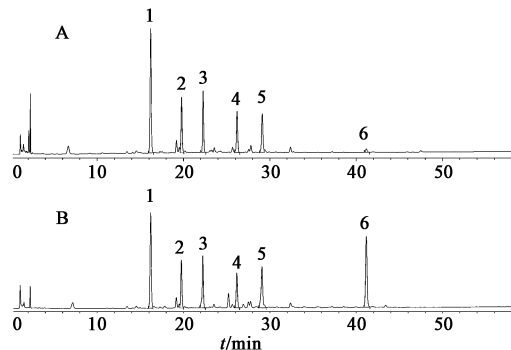
枳壳饮片在炮制前 HPLC 能检测到含有葡萄内酯,但低于定量限;麸炒后葡萄内酯含量明显增高,见图4。通过对医院药房和中药店购买的10批饮片(生饮片和麸炒饮片)进行 HPLC 含量测定,结果表明葡萄内酯含量在麸炒饮片中较生饮片中高。

对麸炒枳壳中分离提纯得到的葡萄内酯进行药效试验,结果表明葡萄内酯小剂量( $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )对正常小鼠小肠运动具有促进作用,高剂量( $9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )则具有抑制作用,即对正常小鼠小肠的运动具有双向调节作用,与枳壳中医临床功效主治相吻合,证明葡萄内酯是麸炒枳壳饮片中药效成分,也是枳壳炮制

的目的。建立的 HPLC 准确可靠、操作简便、重复性高,可作为枳壳中主要活性成分含量测定的方法。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:229.
- [2] 廖凤霞,辛龙涛,陈华,等. 中药枳实与枳壳挥发油成分对比分析[J]. 重庆大学学报:自然科学版,2004,27(5):38.
- [3] 顿文亮. 江西枳壳挥发油成分的气相色谱-质谱法分析[J]. 时珍国医国药,2005,16(10):988.
- [4] 马超一,高文远,高颖,等. 枳壳化学成分和代谢成分的 UPLC-PAD-Q-TOF/MS 分析[J]. 药物评价研究,2010,33(2):110.
- [5] 贾强,白杨,马燕,等. 枳壳和枳实化学成分的 HPLC-ESI-MS 分析[J]. 中草药,2005,36(2):169.
- [6] 杨武亮,陈海芳,余宝金,等. 枳壳活性化学成分研究[J]. 中药材,2008,31(12):1812.
- [7] CHEN H F, ZHANG W G, YUAN J B, et al. Simultaneous quantification of polymethoxylated flavones and coumarins in *Fructus aurantii* and *Fructus aurantii immaturus* using HPLC-ESI-MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 59(5):90.



A. 生品;B. 麸炒品;1. 水合橘皮内酯;2. 橘皮内酯;  
3. 马尔敏;4. 川陈皮素;5. 橘皮素;6. 葡萄内酯

图4 枳壳饮片麸炒前、后 HPLC

[责任编辑 全燕]