

HPLC 同时测定木香分气丸中柚皮苷、 橙皮苷和新橙皮苷的含量

陈晓明¹, 王巍^{2*}, 闵庆璐³

(1. 大连天宇制药有限公司, 大连 辽宁 116110;

2. 辽宁中医药大学药学院, 大连 辽宁 116600; 3. 大连美罗大药厂, 大连 辽宁 116036)

[摘要] 目的: 建立木香分气丸中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量测定方法。方法: 采用反相 HPLC, 色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-1% 磷酸水(21:79), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 283 nm, 柱温 30 ℃。结果: 柚皮苷进样量在 0.110 8 ~ 1.218 8 μg 线性关系良好($r=0.999 4, n=6$), 平均回收率为 97.5% (RSD 0.80%, $n=6$); 橙皮苷进样量在 0.226 8 ~ 2.494 8 μg 线性关系良好($r=0.999 7, n=6$), 平均回收率 99.0% (RSD 1.7%, $n=6$); 新橙皮苷进样量在 0.084 8 ~ 0.932 8 μg 线性关系良好($r=0.999 4, n=6$), 平均回收率为 98.2% (RSD 1.6%, $n=6$)。结论: 该方法重复性好、灵敏度高、定量准确, 可作为木香分气丸质量控制方法之一。

[关键词] 木香分气丸; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0115-03

Determination of Narigin, Hesperidin and Neohesperidin in Muxiang Fenqi Pill by HPLC

CHEN Xiao-ming¹, WANG Wei^{2*}, MIN Qing-lu³

(1. Dalian Tianyu Pharmaceutical Co., Ltd., Dalian 116110, China;

2. School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China;

3. Dalian Merro Pharmaceutical Factory, Dalian 116036, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for determination of narigin, hesperidin and neohesperidin in Muxiang Fenqi Pill. **Method:** The analysis was carried out with an Agilent C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column and the mobile phase of acetonitrile-1% phosphoric acid (21:79). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was set at 283 nm. **Result:** The calibration curve was linear within the range of 0.110 8-1.218 8 μg ($r=0.999 4, n=6$), 0.226 8-2.494 8 μg ($r=0.999 7, n=6$) and 0.084 8-0.932 8 μg ($r=0.999 4, n=6$) for narigin, hesperidin and neohesperidin. The average recoveries were 97.5% (RSD 0.80%, $n=6$), 99.0% (RSD 1.7%, $n=6$) and 98.2% (RSD 1.6%, $n=6$) respectively. **Conclusion:** The results showed this method is reproducible, sensitive and accurate for determination of narigin, hesperidin and neohesperidin in Muxiang Fenqi Pill.

[Key words] Muxiang Fenqi Pill; narigin; hesperidin; neohesperidin; HPLC

木香分气丸是由木香、砂仁、枳实等 16 味中药经粉碎、过筛制成的水泛丸, 功能与主治是宽胸消

胀、理气止呕, 用于肝郁气滞、脾胃不和所致的胸膈痞闷、两胁胀满、胃脘疼痛、倒饱嘈杂、呕吐恶心、嗝气吞酸, 临床应用广泛^[1]。《中国药典》2010 年版(一部)中对其质量控制只限于显微鉴别和对木香和厚朴的薄层色谱法鉴别, 尚未确立该成药的含量测定指标及测定方法, 为保证制剂的内在质量, 本试验采用高效液相色谱法, 以柚皮苷、橙皮苷和新橙皮

[收稿日期] 20120410(002)

[第一作者] 陈晓明, 从事新药开发研究, Tel: 13842686963

[通讯作者] * 王巍, 从事分析化学教学与科研, Tel: 15940997065, E-mail: ww101737@126.com

苷为指标,建立其含量测定方法,为该中成药的质量控制提供实验依据。

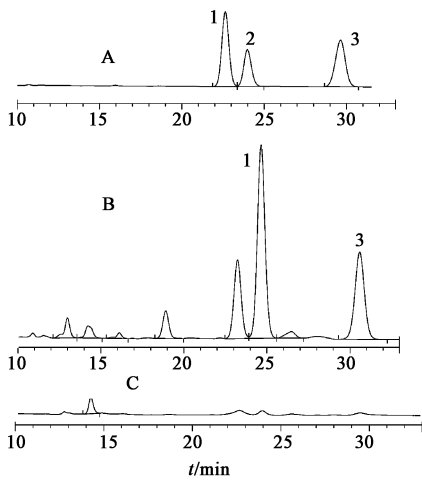
1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国安捷伦科技公司),配有四元泵,在线脱气机,紫外检测器。FA1004B 型分析天平(上海精密科学仪器有限公司),AS3120B 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试药 木香分气丸由甘肃佛仁制药科技有限公司生产(批号 20100406,20100503,20100529),组方中各药材均购自大连阳光大药房。柚皮苷(批号 110722-200309)、橙皮苷(批号 110722-200613)购自中国药品生物制品检定所;新橙皮苷购自上海原叶生物制品检定所,纯度 > 98%。甲醇、乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水(21:79),检测波长 283 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹。在此条件下,样品中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷与相邻组分均能够达到完全分离。理论塔板数按柚皮苷计算,不低于 4 000。见图 1。



A. 对照品; B. 木香分气丸样品; C. 阴性液;
1. 柚皮苷; 2. 橙皮苷; 3. 新橙皮苷

图 1 木香分气丸 HPLC

2.2 对照品溶液制备 分别精密称取干燥至恒重的柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷适量,加甲醇制成质量浓度分别为 0.110 8, 0.226 8, 0.084 8 g·L⁻¹ 的溶液作为对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液制备 取木香分气丸,研细,取 0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加甲醇 25 mL,称定质量,回流 1 h,放冷,称定质量(必要时补足减

失的质量),摇匀,滤过,取续滤液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.4 测定法 精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 5 μL,注入高效液相色谱仪,测定,记录色谱峰面积,以外标一点法分别计算柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量。

2.5 阴性干扰试验 取方中去除枳实和陈皮的各药味,按处方比例及制备工艺制得空白样品,取该空白样品按 2.3 项下方法操作,制备阴性对照液。精密吸取 5 μL,注入高效液相色谱仪,测定,结果表明阴性液无干扰。见图 1。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性范围考察 分别精密吸取 3 种对照品溶液各 1, 3, 5, 7, 9, 11 μL 注入高效液相色谱仪测定。以进样量为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,分别进行线性回归。结果柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的回归方程分别为 $Y = 1\,484.7X + 10.623$ ($r = 0.999\,4$, $n = 6$), $Y = 1\,591X + 25.094$ ($r = 0.999\,7$, $n = 6$), $Y = 9\,034.2X - 17.192$ ($r = 0.999\,4$, $n = 6$)。表明柚皮苷在 0.110 8 ~ 1.218 8 μg,橙皮苷在 0.226 8 ~ 2.494 8 μg,新橙皮苷在 0.084 8 ~ 0.932 8 μg 进样量与色谱峰面积线性关系良好。

2.6.2 精密度考察 精密吸取供试品溶液 5 μL,重复进样 6 次,分别记录柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的色谱峰面积,计算 RSD 分别为 0.75%, 0.94%, 1.49%,表明仪器精密度良好。

2.6.3 稳定性考察 将供试品溶液分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 时精密吸取 5 μL 注入高效液相色谱仪测定,记录柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的色谱峰面积,计算 RSD,分别为 1.76%, 0.69%, 1.49% ($n = 6$)。表明 10 h 内测定,样品稳定性良好。

2.6.4 重复性考察 取木香分气丸样品 6 份,按供试品溶液制备方法操作,并测定,分别计算柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的平均含量及相应的 RSD。结果柚皮苷平均含量为 5.143 mg·g⁻¹, RSD 0.82% ($n = 6$);橙皮苷平均含量为 10.26 mg·g⁻¹, RSD 1.9% ($n = 6$);新橙皮苷的含量为 5.898 mg·g⁻¹, RSD 2.6% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

2.6.5 回收率考察 取木香分气丸样品 6 份,每份 0.25 g,研细,精密称定,置圆底烧瓶中,分别精密加入柚皮苷对照品溶液(0.617 2 g·L⁻¹) 2 mL、橙皮苷对照品溶液(0.742 1 g·L⁻¹) 3 mL 和新橙皮苷对照品溶液(0.678 4 g·L⁻¹) 2 mL,其余按供试品溶液制备方法操作,精密吸取供试品溶液 5 μL 进行测定,

计算回收率,结果表明柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的回收率均在 95.0% ~ 105.0%,RSD 亦符合相关规定。结果见表 1。

表 1 木香分气丸中两种成分回收率考察

成分	成药中 含量 /mg	加入量 /mg	实测 总量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
柚皮苷	1.263 3	1.234 4	2.464 5	97.3	97.5	0.80
	1.247 5	1.234 4	2.457 8	98.0		
	1.266 4	1.234 4	2.480 4	98.3		
	1.272 0	1.234 4	2.473 4	97.3		
	1.236 8	1.234 4	2.448 2	98.1		
	1.259 2	1.234 4	2.446 5	96.2		
橙皮苷	2.535 2	2.226 3	4.748 4	99.4	99.0	1.7
	2.503 4	2.226 3	4.719 6	99.5		
	2.541 3	2.226 3	4.716 5	97.7		
	2.552 6	2.226 3	4.702 4	96.6		
	2.481 9	2.226 3	4.735 2	101.2		
	2.527 0	2.226 3	4.743 5	99.6		
新橙皮苷	1.451 2	1.356 8	2.774 5	97.5	98.2	1.6
	1.433 0	1.356 8	2.765 2	98.2		
	1.454 7	1.356 8	2.798 9	99.1		
	1.461 1	1.356 8	2.830 2	100.9		
	1.420 7	1.356 8	2.738 6	97.1		
	1.446 5	1.356 8	2.757 5	96.6		

2.7 样品含量测定 取 3 批木香分气丸(批号 20100406,20100503,20100529),按试验中所建立的方法测定柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量,结果见表 2。

表 2 3 批木香分气丸含量测定($n=2$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

批号	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
20100406	5.115 0	10.250	5.872 1
20100503	5.102 2	10.239	5.861 0
20100529	5.077 9	10.218	5.821 8
平均值	5.098 4	10.236	5.851 6

3 结果与讨论

3.1 供试品溶液制备方法考察 对甲醇、三氯甲烷、乙酸乙酯的提取效果进行了比较,结果甲醇提取所得供试品,色谱峰面积较大,即提取效率较高。以

甲醇为溶剂,进一步考察超声提取和回流提取的效果,结果回流提取色谱峰面积较大,提取效率较高,因此试验中确定以回流提取的方法制备供试品溶液。

3.2 色谱条件考察 对甲醇-水、乙腈-水不同比例组成^[2-8]的流动相系统进行了考察,结果在乙腈-0.1%磷酸水(21:79)时,柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷色谱峰与相邻组分均有较好的分离,并且阴性对照无干扰。即在该色谱条件下,能够准确测定 3 组分的含量。由于柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷在 283 nm 附近均有最大吸收,因此,本实验的检测波长仍选为 283 nm。试验中以柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷为指标,建立含量测定方法,经方法学验证,表明该方法重复性好、精密度高、样品稳定性好,回收率符合要求,因此可以用于本制剂的质量控制。

由于木香分气丸中枳实与陈皮均含有橙皮苷,因此在制备阴性对照液时,制备了除枳实阴性液、除陈皮阴性液和除枳实和陈皮双阴性液,结果发现前两种阴性液均有干扰,双阴无干扰。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010;530.
- [2] 唐德智.通宣理肺胶囊中柚皮苷、橙皮苷和黄芩苷的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(15):93.
- [3] 杨华,何希荣,顾雪竹.HPLC测定胆舒胶囊中橙皮苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):92.
- [4] 林桂梅,来有雪,于晓黎,等.麸炒枳实的炮制工艺优化[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):21.
- [5] 康四和,周锐,聂晶.HPLC测定小儿消积止咳口服液柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量[J].中成药,2010,32(12):2088.
- [6] 徐海燕,金艺,张红霞,等.HPLC同时测定胃力片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[J].中成药,2010,38(2):1355.
- [7] 许栋明,程可建.RP-HPLC同时测定温胆汤中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷和甘草酸[J].中国中药杂志,2011,36(1):45.
- [8] 谢贞建,焦土蓉,李恺.RP-HPLC法测定不同产地枳实中的柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷[J].西华大学学报:自然科学版,2009,28(2):65.

[责任编辑 顾雪竹]