

高效液相色谱法测定枳壳饮片中柚皮苷、 橙皮苷和新橙皮苷的含量

张金莲*, 何敏, 谢一辉, 姚冬琴, 余润民, 张的凤
(江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:建立高效液相法测定枳壳饮片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷定量分析方法。方法:Ultimate 3000 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(磷酸调 pH 3) (23:77)。检测波长 283 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C。结果:柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的线性范围分别为 0.316 4 ~ 1.582 4 μg ($r = 0.999 9$), 0.041 2 ~ 0.206 0 μg ($r = 0.999 9$), 0.188 0 ~ 0.940 0 μg ($r = 0.999 9$), 平均回收率均大于 96.11%。结论:该方法专属性强, 结果准确可靠, 重现性好, 可用于枳壳饮片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量测定, 以便更好的控制枳壳饮片的质量。

[关键词] 枳壳饮片; 柚皮苷; 新橙皮苷; 橙皮苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)06-0068-03

Determination of Content of Narigin and Hesperidin and Neohesperidin in Fructus Auranti Pieces by HPLC

ZHANG Jin-lian*, HE Min, XIE Yi-hui, YAO Dong-qin, YU Run-min, ZHANG Di-feng
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine International Education College, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method of determining the content of narigin and hesperidin and neohesperidin in Fructus Auranti pieces by HPLC. **Method:** Ultimate 3 000 C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase was acetonitrile-water (pH was adjusted to 3 by phosphoric acid) (23:77). Wavelength was 283 nm, flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, column temperature was 30 °C. **Result:** naringin, hesperidin and neohesperidin linear ranges were 0.316 4 ~ 1.582 4 μg ($r = 0.999 9$), 0.041 2 ~ 0.206 0 μg ($r = 0.999 9$), 0.188 0 ~ 0.940 0 μg ($r = 0.999 9$). The average coefficient of recovery were greater than 96.11%. **Conclusion:** This method is highly specific, accurate and reliable and has good repeatability. It is suitable for the determination of the content of narigin and hesperidin and neohesperidin in Fructus Auranti pieces. It can be widely used for the quality control of Fructus Auranti pieces.

[Key words] Fructus Auranti pieces; naringin; neohesperidin; hesperidin; HPLC

枳壳为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium*

L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实。性温, 味苦、辛、酸, 归脾、胃经, 具有理气宽中, 行滞消胀之功效, 主治胸胁气滞, 胀满疼痛, 食积不化, 痰饮内停, 胃下垂, 脱肛, 子宫脱垂等^[1]。现代研究表明, 枳壳中主要含有挥发油、黄酮类、生物碱类成分^[2-3]。黄酮类成分是评价枳壳饮片质量的主要指标。2010 年版《中国药典》一部中规定枳壳药材需进行柚皮苷、新橙皮苷含量测定, 现建立 HPLC 法同时测定枳壳饮片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量的方法。

[收稿日期] 20100120(006)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BAI06A07); 江西省卫生厅基金资助项目 (2008Z0026)

[通讯作者] * 张金莲, 教授, 执业中药师, 主要从事中药、中药炮制工艺质量研究工作, Tel: 13979181159, E-mail: alisa189yao@ yahoo. com. cn

1 仪器与试药

Ultimate 3 000 高效液相色谱仪 (Photodiode Array Detector, 自动进样器, 柱温箱, 色谱工作站), AG245 电子分析天平, KQ3200 超声波清洗器 (昆山超声仪器厂), 高速万能粉碎机 (天津市泰斯特一仪器有限公司), GZX-9146MBE 型数显鼓风干燥箱 (上海博讯实业有限公司), HH-2 数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司)。

柚皮苷 (批号 110722-200309)、橙皮苷 (批号 110721-200211) 对照品购自中国药品生物制品检定所, 新橙皮苷 (含量 99.34%) 由江西中医学院重点实验室杨武亮教授提供; 甲醇 (色谱纯, 美国 Merck 公司), 乙腈 (色谱纯, 美国 Merck 公司), 娃哈哈纯净水。其他试剂均为分析纯。樟树枳壳饮片由江西天齐堂中药饮片有限公司提供 (产地樟树)。2007 年 7 月购自安徽亳州药材市场 (产地湖南)、四川天诚药业股份有限公司 (产地四川) 为枳壳药材, 经江西中医学院药学院褚小兰教授鉴定为酸橙 *Citrus aurantium* L. 干燥未成熟果实, 以上枳壳饮片是依据樟帮枳壳的炮制工艺, 先将药材去瓤, 润透, 压制后上架使成型, 切制成凤眼片, 干燥即得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性实验

Ultimate 3000 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (磷酸调 pH 3) (23:77), 检测波长 283 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。在此条件下样品各组分分离良好, 柚皮苷与相邻色谱峰的分度度不低于 1.5, 理论塔板数以柚皮苷计算不低于 3 000, 对照品、供试品溶液和溶剂的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液及样品溶液的制备

精密称取柚皮苷对照品适量, 用无水甲醇溶解, 定容, 摇匀, 得柚皮苷对照品溶液 (0.395 6 mg · mL⁻¹); 精密称取新橙皮苷对照品适量, 用无水甲醇溶解, 定容, 摇匀, 得新橙皮苷对照品溶液 (0.235 mg · mL⁻¹); 精密称取橙皮苷对照品适量, 用无水甲醇溶解, 定容, 摇匀, 得橙皮苷对照品溶液 (0.103 mg · mL⁻¹); 分别取上述柚皮苷对照品溶液 1 mL、新橙皮苷对照品溶液 1 mL、橙皮苷对照品溶液 0.5 mL 混匀, 甲醇定容, 制成 1 mL 含柚皮苷对照品 0.079 12 mg、新橙皮苷对照品 0.047 mg、含橙皮苷对照品 0.010 3 mg 的混合对照品溶液。

2.3 样品溶液的制备

取枳壳饮片粉末 (40 目) 约

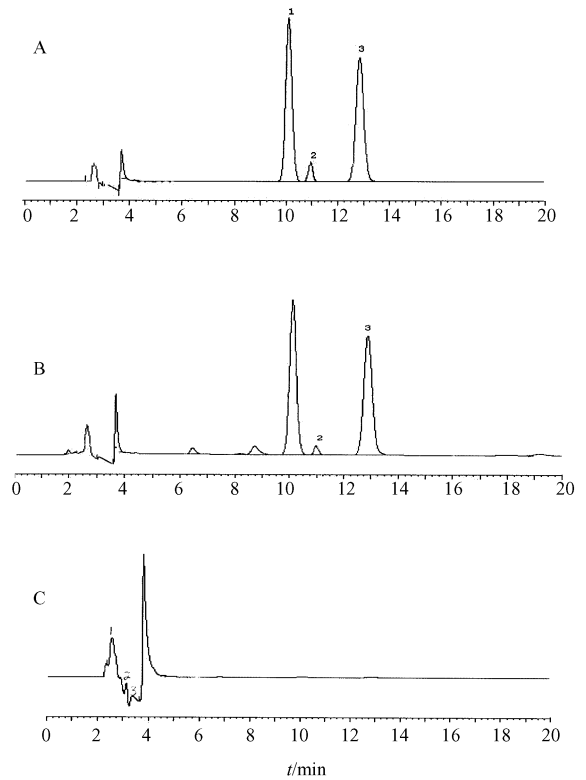


图 1 枳壳饮片 HPLC 图

A. 对照品; B. 供试品; C. 溶剂;

1. 柚皮苷; 2. 橙皮苷; 3. 新橙皮苷。

0.5 g, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加甲醇水浴加热回流 1.5 h 后, 趁热滤过, 滤液置 50 mL 量瓶中, 药渣再提取 2 次 (每次加 10 mL 甲醇提取 10 min), 滤液置同一量瓶中, 待冷却后加甲醇至刻度, 摇匀, 准确取出 5 mL 转移至 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 0.45 μm 滤膜过滤, 续滤液为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 4, 8, 12, 16, 20 μL, 按 2.1 项下的色谱条件, 自动进样, 记录色谱峰面积。以峰面积 A 为纵坐标, 对照品浓度 C 为横坐标, 进行线性回归, 回归结果分别为柚皮苷 $Y = 32.24X - 0.1572, r = 0.9999 (0.3164 \sim 1.5824 \mu\text{g})$; 橙皮苷 $Y = 25.653X + 0.0071, r = 0.9999 (0.0412 \sim 0.2060 \mu\text{g})$; 新橙皮苷 $Y = 38.872X + 0.0468, r = 0.9999 (0.1880 \sim 0.9400 \mu\text{g})$ 。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品混合溶液 10 μL, 注入色谱仪, 在相同的色谱条件下, 重复进样 6 次, 以柚皮苷对照品、新橙皮苷对照品和橙皮苷对照品的峰面积计算, RSD 分别为 2.28%, 2.90%, 2.33%, 表明精密度良好。

2.6 重复性试验

取枳壳药材 (40 目), 按 2.3 项

下方法,精密称 6 份,制备供试品溶液,平行测定,记录色谱峰面积,柚皮苷、新橙皮苷和橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.62%, 1.35%, 0.55%, 结果表明该方法重现性良好。

2.7 稳定性试验 精密称取同一样品溶液,分别在 0, 1, 2, 4, 5 d 进样 10 μL, 记录色谱峰面积, 计算柚皮苷、新橙皮苷和橙皮苷色谱峰面积的 RSD 分别 1.02%, 2.00%, 1.38%, 表明 120 h 内供试品稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知柚皮苷和新橙皮苷含量的枳壳药材 6 份, 每份约 0.25 g, 分别加入柚皮苷和新橙皮苷储备液适量至 100 mL 圆底烧瓶中, 按 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 并按含量

测定方法进行测定, 计算回收率, 结果见表 1。

2.9 样品含量测定 取枳壳饮片中试样品粉末, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 吸取 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 每份样品测 3 次, 依次测定 3 批样品, 计算各指标成分含量, 结果见表 2。

表 1 各组分回收率测定结果 (n=6)

组分	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
柚皮苷	4.008	4.759	99.17	2.26
新橙皮苷	2.033	2.714	96.11	3.17
橙皮苷	2.002	2.782	98.83	2.38

注: 加入量均为 0.791 2 mg。

表 2 枳壳饮片中 3 种成分的含量 (n=3)

样品	柚皮苷/mg · g ⁻¹	RSD/%	橙皮苷/mg · g ⁻¹	RSD/%	新橙皮苷/mg · g ⁻¹	RSD/%
樟树-1	50.85	1.99	2.21	0.54	33.54	0.69
樟树-2	46.82	0.61	2.08	0.43	33.11	0.57
樟树-3	44.70	2.21	1.91	0.56	31.80	1.54
湖南-1	65.99	0.68	2.52	1.26	27.79	0.74
湖南-2	61.72	0.15	2.33	2.91	25.91	0.19
湖南-3	66.62	0.06	2.54	1.40	28.11	0.18
四川-1	44.67	0.57	3.28	0.96	45.09	0.74
四川-2	35.20	0.08	2.46	0.28	36.16	1.30
四川-3	42.91	0.09	2.97	0.15	42.67	0.13

3 讨论

3.1 测定波长的选择 为了保证各指标成分都具有适宜的灵敏度, 作者研究了柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷在流动相中的紫外区吸收特性, 柚皮苷对照品、橙皮苷对照品、新橙皮苷对照品的 3D 图谱显示, 检测波长为 283 nm 的灵敏度较好, 基线平坦, 且与药典一致。故确定检测波长为 283 nm。

3.2 流动相的选择 比较了不同比例乙腈-水 (21.5: 80.5, 22: 78, 23: 77), 最后选定流动相为乙腈-水 (23: 77)。该条件下, 柚皮苷、新橙皮苷、橙皮苷的色谱峰分离效果好, 基线平稳, 且出峰时间在 15 min 内。

3.3 柱温的选择 对比了 20, 25, 30 °C 柱温对柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷出峰时间及峰型的影响, 结果表明 30 °C 柱温下效果最好, 故选择 30 °C 柱温。

通过方法学考察, 建立了高效液相色谱法测定枳壳饮片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷含量的系统条件: Ultimate 3 000 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (磷酸调 pH 3) (23: 77)。检测波长 283 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2010: 171.
- [2] 朱正义. 枳壳麸炒前后黄酮苷的分析比较[J]. 中药材, 1994, 17(6): 30.
- [3] 王发英, 徐欢, 杨武亮, 等. 枳壳质量标准研究[J]. 中成药, 2009, 31(12): 1897.

[责任编辑 邹晓翠]