

• 质量标准 •

高分离度快速液相色谱法测定不同产地 枳实中主要黄酮类成分的含量

王 淳, 吕署一, 宋志前, 王 超, 刘振丽*

(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立高分离度快速液相色谱法(RRLC)测定枳实中主要黄酮类成分含量的方法。方法: RRLC 色谱条件为 Zobax Extend-C₁₈(4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-2% 乙酸(33: 77); 检测波长 283 nm; 流速 1 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C。结果: 27 个批次样品中有 19 个批次中的主要黄酮类成分为橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷和柚皮芸香苷, 按各成分含量比例它们又可以分为两组, 一组以柚皮苷和新橙皮苷含量较高, 另一组则以柚皮芸香苷和橙皮苷含量较高; 其余 8 个批次的主要黄酮类成分为橙皮苷和柚皮芸香苷, 不含有柚皮苷和新橙皮苷, 并都以橙皮苷含量较高。各样品主要黄酮成分含量之和为 12.4% ~ 38.07%。结论: RRLC 方法稳定可靠, 分析时间是 HPLC 的三分之一。枳实中黄酮类成分的种类和各成分的含量比例是不同的。

[关键词] 高分离度快速液相色谱法; 枳实; 黄酮; 含量

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)06-0001-03

Determination of Flavonoids in Fructus Aurantii Immaturus by RRLC

WANG Chun, LV Shu-yi, SONG Zhi-qian, WANG Chao, LIU Zhen-li*

(The Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RRLC method for the content determination of flavonoids in Fructus Aurantii Immaturus. **Method:** RRLC was applied with a Zobax Extend-C₁₈ column by methanol-2% ethanoic acid (33: 77) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 °C and the UV detection wavelength was 283 nm. **Result:** In the 27 batches samples, 19 batches contained hesperidin, narirutin, neohesperidin and naringin, and they can divide into two groups by the ratio of flavonoids: in one group the content of hesperidin and narirutin were higher, and in another group the content of neohesperidin and naringin were higher; The other 8 batches only contain hesperidin and narirutin, and the content of hesperidin was higher. The content range of 4 kinds of main flavonoids in each sample were from 12.4% to 38.07%. **Conclusion:** The method is stable and reliable, and the analysis time of RRLC method was one-third of that of the HPLC method. The types and the content ratios of flavonoids in Fructus Aurantii Immaturus were different.

[Key words] RRLC; Fructus Aurantii Immaturus; flavonoid; content

[收稿日期] 2008-12-17

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30772726); 北京市自然科学基金资助项目(7072052)

[通讯作者] * 刘振丽, Tel: (010) 64014411-2503; E-mail: zhenli_liu@sina.com

枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck. 的干燥幼果^[1], 有破气消积, 化痰除痞的功效。主要含有黄酮、生物碱和挥发油 3 大类有效成分。黄酮类成分主要包括橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷和柚皮芸香苷等^[2]。对枳实中黄酮类成分的含量测定有采用高效

液相色谱法(HPLC)的报道^[3-5],未见采用高分离度快速液相色谱法(RRLC)进行测定的报道。RRLC 是最新现代分析技术,由于色谱柱使用了亚二微米填料,提高了分析的分离度、灵敏度和分析速度。本文采用 RRLC 法对 27 个批次枳实主产地的样品中主要黄酮类成分的含量进行了分析。

1 仪器 材料与试药

Agilent 1200 SL 型高分离度快速液相色谱仪(RRLC):G1322A 在线脱气机,G1312B SL 型二元泵,G1316B SL 型恒温箱,G1315C DAD SL 型检测器,G1367C SL 型自动进样器,HP 化学工作站;DK-98-1 型电热恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司);Sartorius CP225D 型电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)。枳实样品分别来自重庆江津、江西新干和清江、湖南沅江及贵州,见表 3。橙皮苷对照品(批号:0721-200010,含量测定用)、柚皮苷对照品(批号:110722-200309,含量测定用)购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其它试剂为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zobax Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×50 mm, 1.8 μm),流动相为甲醇-2% 乙酸(33:77);检测波长:283 nm;流速:1 mL·min⁻¹;柱温:30 °C。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品、柚皮苷对照品适量,加甲醇分别制成每 1 mL 含橙皮苷 103.2 μg,柚皮苷 87.2 μg 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备 分别取各枳实样品粉末(过四号筛)各 0.1 g,精密称定,精密加入甲醇溶液 25 mL,称定重量,加热回流 1 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,0.20 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 线性关系的考察 精密吸取等体积的两种对照品溶液混合,得到每 1 mL 含橙皮苷 51.6 μg、柚皮苷 43.6 μg 的混合对照品溶液。精密吸取混合对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9 mL,分别定容至 10 mL,吸取各浓度对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以测得的峰面积积分值为纵坐标,进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,橙皮苷 $Y=1613.9X+6.251, r=0.9999$,表明橙皮苷在 0.0516~0.4644 μg 具有良好的线性关系;柚皮苷 $Y=976.56X+35.15, r=0.9998$,表明柚

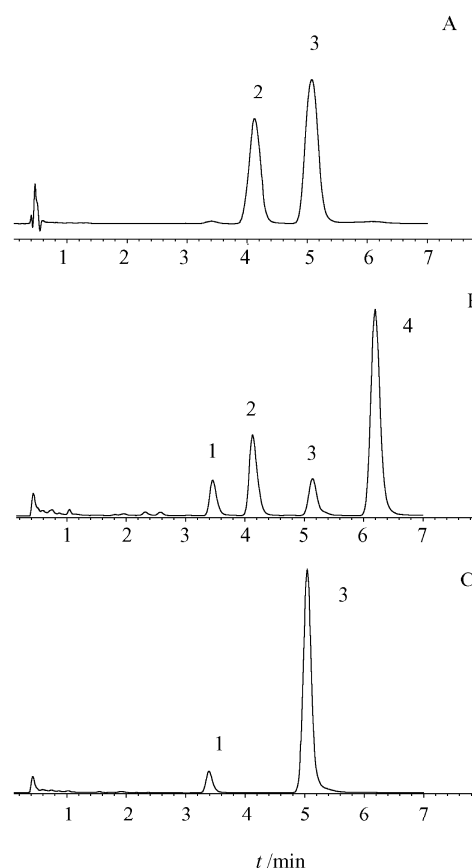


图 1 枳实中黄酮类成分的 RRLC 图

A. 对照品; B. 江西新干产臭橙; C. 贵州晴隆产甜橙;

1. 柚皮芸香苷; 2. 柚皮苷; 3. 橙皮苷; 4. 新橙皮苷

皮苷在 0.0436~0.3924 μg 具有良好的线性关系。

2.5 精密实验 精密吸取同一供试品溶液重复进样 6 次,柚皮芸香苷、柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷峰面积积分值的 RSD 分别为 1.42%, 1.41%, 1.84%, 1.47%。

2.6 稳定性实验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样,柚皮芸香苷、柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷峰面积积分值的 RSD 分别为 0.93%, 0.94%, 0.85%, 0.73%。表明供试品在 24 h 内稳定。

2.7 重复性实验 取同一枳实药材粉末(过四号筛)0.1 g, 6 份,按供试品溶液处理,进行含量测定,测得的柚皮芸香苷、柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷含量的 RSD 分别为 2.3%, 2.0%, 2.5%, 2.7%。

2.8 回收率实验 取同一枳实药材粉末(过四号筛)0.05 g, 6 份,精密称定,分别精密加入橙皮苷、柚皮苷对照品,按供试品溶液处理,进行含量测定,计算结果见表 1 和表 2,回收率符合要求。

2.9 样品含量测定 柚皮芸香苷与柚皮苷、新橙皮苷与橙皮苷分别为两对同分异构体,它们在紫外吸

表 1 橙皮苷加样回收率测定结果

编号	称样量 (g)	样品中量 (mg)	加入量 (mg)	实测值 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	0.053 79	1.054	1.032	2.062	97.6	97.9	1.3
2	0.051 22	1.004	1.032	2.008	97.3		
3	0.053 31	1.045	1.032	2.035	95.9		
4	0.049 60	0.972	1.032	1.996	99.2		
5	0.053 09	1.041	1.032	2.053	98.1		
6	0.049 52	0.971	1.032	1.996	99.4		

表 2 柚皮苷加样回收率测定结果

编号	称样量 (g)	样品中量 (mg)	加入量 (mg)	实测值 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	0.053 79	2.227	2.18	4.387	99.1	97.0	1.4
2	0.051 22	2.121	2.18	4.257	98.0		
3	0.053 31	2.207	2.18	4.302	96.1		
4	0.049 60	2.054	2.18	4.131	95.3		
5	0.053 09	2.198	2.18	4.316	97.2		
6	0.049 52	2.050	2.18	4.154	96.5		

收光谱中的吸收系数相同,因此在缺少柚皮芸香苷和新橙皮苷对照品的情况下,参考文献方法^[6],分别根据橙皮苷和柚皮苷对照品的峰面积和进样量计算样品中新橙皮苷和柚皮芸香苷的含量。参照文献^[2]并根据 DAD 检测器测定的色谱峰紫外吸收光谱图,确认柚皮芸香苷和新橙皮苷色谱峰。

分别精密吸取各供试品溶液和混合对照品溶液 5 μL 进样,测定峰面积,计算含量。各样品中主要黄酮类成分含量测定结果见表 3。

3 讨论

本研究结果显示(表 3),27 个批次样品中有 19 个批次中的主要黄酮类成分为橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷和柚皮芸香苷,而按各成分含量比例又可分为两组。第一组样品共有 15 个,以柚皮苷和新橙皮苷含量较高。第二组样品共有 4 个,以柚皮芸香苷和橙皮苷含量较高。其余 8 个批次的主要黄酮类成分为橙皮苷和柚皮芸香苷,不含有柚皮苷和新橙皮苷。而所有样品中 4 种黄酮类成分含量之和相差不是很大。枳实中黄酮类成分的种类和各成分的含量高低与产地之间似乎没有规律性,是否与枳实的来源品种或生长期等有关,值得进一步研究。

本研究建立了 RRLC 测定枳实中黄酮类成分含量的方法。与 HPLC 比较^[3],RRLC 在没有牺牲分辨率、精密度和灵敏度的前提下,7 min 内即完成了整

表 3 枳实样品中主要黄酮类成分含量测定结果(n=3)

样品来源	编号	柚皮芸香苷 (%)	柚皮苷 (%)	橙皮苷 (%)	新橙皮苷 (%)	总和 (%)
江西新干县神政桥乡大斜村	1	0.59	3.50	1.26	14.78	20.13
	2	1.51	4.14	1.96	12.74	20.35
	3	0.58	6.21	1.32	17.04	25.15
	4	13.15	0.15	12.35	0.12	25.77
	5	14.78	0.38	12.06	0.50	27.72
麦斜乡中曾村	1	0.80	11.99	0.96	18.38	32.13
	2	0.88	11.16	1.18	17.51	30.73
桃溪乡板埠谭家村	1	0.81	10.13	1.72	11.81	24.47
桃溪乡板埠瓦桥村	1	0.61	7.94	0.75	15.26	24.56
桃溪乡板埠西管村	1	12.29	0.09	10.86	0.17	23.41
七琴镇钱塘村	1	13.33	0.14	13.15	0.13	26.75
三湖镇	1	0.46	7.94	0.39	7.16	15.95
清江县	1	0.61	7.23	1.65	17.12	26.61
重庆江津区白沙镇桥头	1	0.64	9.47	1.18	24.34	35.63
	2	0.55	9.06	1.21	27.25	38.07
	3	0.53	8.57	1.42	25.15	35.67
	4	0.29	11.54	0.52	19.05	31.40
李市镇牌坊村	1	1.58	—	21.71	—	23.29
重庆市区	1	1.23	—	24.32	—	25.55
奉节市新城乡	1	0.38	—	11.92	—	12.4
湖南沅江市市内	1	0.87	12.67	1.76	9.48	24.79
新湾镇丽园村	1	0.59	8.24	0.98	20.18	29.99
贵州省黔西南晴隆县鸡场镇	1	0.90	—	27.55	—	28.45
	2	1.76	—	19.66	—	21.42
	3	0.56	—	25.99	—	26.55
	4	0.34	—	27.32	—	27.66
贵州省贵阳市	1	2.50	—	10.25	—	12.75

个分析,而 HPLC 则需要 30 min。提高了分析速度,减少了溶剂消耗和环境污染,节省了实验经费。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999: 3695.
- [2] 赵宇. 枳实、枳壳色谱指纹图谱研究[D]. 中国优秀硕士学位论文全文数据库(硕士),2005: 47-48.
- [3] 刘振丽,宋志前,张玲,等. 枳实饮片中 3 类化学成分含量测定[J]. 中国中药杂志,2006,31(17): 1425-1427.
- [4] 梁远园,冯彪,祝晨霖,等. HPLC 法测定枳实药材中橙皮苷与柚皮苷的含量[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(5): 359-361.
- [5] 曾祖平,何薇,崔立山. 高效液相法测定枳实中黄酮类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(7): 9-10.
- [6] 王青,袁丹. 不同产地枳实与枳壳中黄酮类成分的含量测定[J]. 黑龙江医药,2008,21(3): 1-3.