

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.12.07

高效液相色谱法测定去滞散中柚皮苷和新橙皮苷的含量

张景艳¹, 张 宏², 王 磊¹, 李建喜^{1*}

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 兰州 730050; 2. 甘肃省兽药饲料监察所, 兰州 730030)

[收稿日期] 2017-06-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 12-0036-06 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 为了测定去滞散中枳壳的含量, 采用 C18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 在室温下, 以乙腈-水(20:80, 用磷酸调节 pH 值至 3)为流动相, 283 nm 为检测波长, 流速为 1.0 mL/min, 建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定方法。结果显示, 柚皮苷在 0.08~4 μg 范围内线性关系良好, $R^2=0.9999$, 回收率为 94.4%~101.7%, RSD 为 2.23%; 新橙皮苷在 0.08~4 μg 范围内线性关系良好, $R^2=0.9995$, 回收率为 90.6%~100.0%, RSD 为 2.85%。本方法简便、准确、快速, 可用于控制去滞散中枳壳的含量。

[关键词] 去滞散; 枳壳; 柚皮苷; 新橙皮苷; 高效液相色谱法

RP-HPLC Determination of Naringin and Neohesperidin in Quzhi San

ZHANG Jing-yan¹, ZHANG Hong², WANG Lei¹, LI Jian-xi^{1*}

(1. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Science of CAAS, Lanzhou, 730050, China;

2. Gansu Institute of Veterinary Drug and Feed Inspection, Lanzhou 730030, China)

Corresponding author: LI Jian-xi, E-mail: 195425319@qq.com

Abstract: A method for the determination of *Aurantii fructus* in Quzhi San was developed by the reverse high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The C18 column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water (20:80, pH was adjusted to 3 by H_3PO_4) and the detection wavelength was 283 nm. The results showed that Naringin had a good linear relationship at the range of 0.08~4 μg ($R^2=0.9999$) and the recovery rate were 94.4%~101.7%, $RSD=2.23\%$. Neohesperidin had a good linear relationship at the range of 0.08~4 μg ($R^2=0.9995$) and the recovery rate were 90.6%~100.0%, $RSD=2.85\%$. The method was simple, accurate and fast in the determination of *Aurantii fructus* in Quzhi San.

Key words: Quzhi San; *Aurantii fructus*; Naringin; Neohesperidin; RP-HPLC

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(项目编号:20130340-15)

作者简介: 张景艳, 助理研究员, 从事中兽医医学研究; 张 宏, 为共同第一作者。

通讯作者: 李建喜。E-mail: 195425319@qq.com

去滞散是运用中兽医传统理论,在《元亨疗马集》“曲蘖散”的基础上,对其进行药味加减,并通过临床试验筛选后研制出的一种中药复方散剂^[1],由六神曲、枳壳、山楂、黄芪、当归、茯苓、甘草等中药配伍,经粉碎制成,具有健脾和胃,补中益气,消食化积的功效。主要用于猪、牛食欲不振、消化不良、便秘腹胀。本试验拟建立去滞散中君药枳壳的含量测定方法,以控制去滞散的质量^[2]。为了更准确的反映枳壳中理气和行滞的主要药理活性成分,试验中分别测定了柚皮苷和新橙皮苷的含量。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(配二元泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器等);XDB-C18 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);Waters600 高效液相色谱仪;电子天平(型号为 AE100,AE240),购自梅特勒-托利多公司。

1.2 试药与试剂 柚皮苷对照品(批号为 110722-201111)、新橙皮苷对照品(批号为 111857-201102)均购自中国食品药品检定研究院;去滞散样品(批号分别为 20130502,20130504,20130506),由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所制备与提供;甲醇为色谱纯(赛默飞);超纯水为 Simplicity 超纯水器(Millipore 公司)二次制备,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 流动相:乙腈-水(20:80,用磷酸调节 pH 值至 3);流速:1.0 mL/min;检测波长 283 nm;柱温:室温;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取柚皮苷、新橙皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含柚皮苷、新橙皮苷各 80 μg 的溶液(实际浓度柚皮苷 80.8 μg/mL、新橙皮苷 80.4 μg/mL),即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 1.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 50 mL,密塞,称定重量,加热回流 1.5 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液

10 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方及制法制备不含枳壳的阴性制剂,取枳壳阴性制剂 1.3 g,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性和专属性试验 精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按 2.1 项色谱条件测定,结果见图 1,理论塔板数按柚皮苷峰计算为 3517,分离度为 2.72。阴性对照色谱在与对照品和供试品色谱相同保留时间处无干扰峰。结果表明处方中其他成分对枳壳的定量检测无干扰,专属性能满足检测要求。

2.4 线性范围 取浓度同为 80 μg/mL 的柚皮苷、新橙皮苷对照品溶液,分别进样 1、5、10、20、50 μL,按上述色谱条件测定峰面积,以各自峰面积为纵坐标,以柚皮苷、新橙皮苷质量(μg)为横坐标,进行线性回归,柚皮苷回归方程 $y = 1711.5x - 33.197$, $R^2 = 0.9999$,柚皮苷在 0.08~4 μg 范围内线性关系良好;新橙皮苷回归方程 $y = 1735.2x + 0.9598$, $R^2 = 0.9995$,新橙皮苷在 0.08~4 μg 范围内线性关系良好。

2.5 准确度 采用加标回收的方法,在已知含量的去滞散中加入一定质量的柚皮苷或新橙皮苷对照品,使其制备后在供试品中的量分别为其限度值的 80%(L 组)、100%(M 组)、120%(H 组),每组制备 3 份。再按照 2.1 项色谱条件测定峰面积,计算出实际加入的标准物质的量,用实际计算出来的加入量比上由称量得到的加入量,即得。

$$\text{回收率 } R(\%) = \frac{\text{实测含量} - \text{称取的样品含量}}{\text{添加量}} \times 100\%$$

柚皮苷回收率 将柚皮苷对照品按高、中、低 3 个浓度添加到批号为 20130502 的去滞散中,按 2.2 中的方法制备供试品溶液,精密量取 10 μL 上机测定,柚皮苷回收率为 94.4%~101.7%,RSD 为 2.23%。结果见表 1。

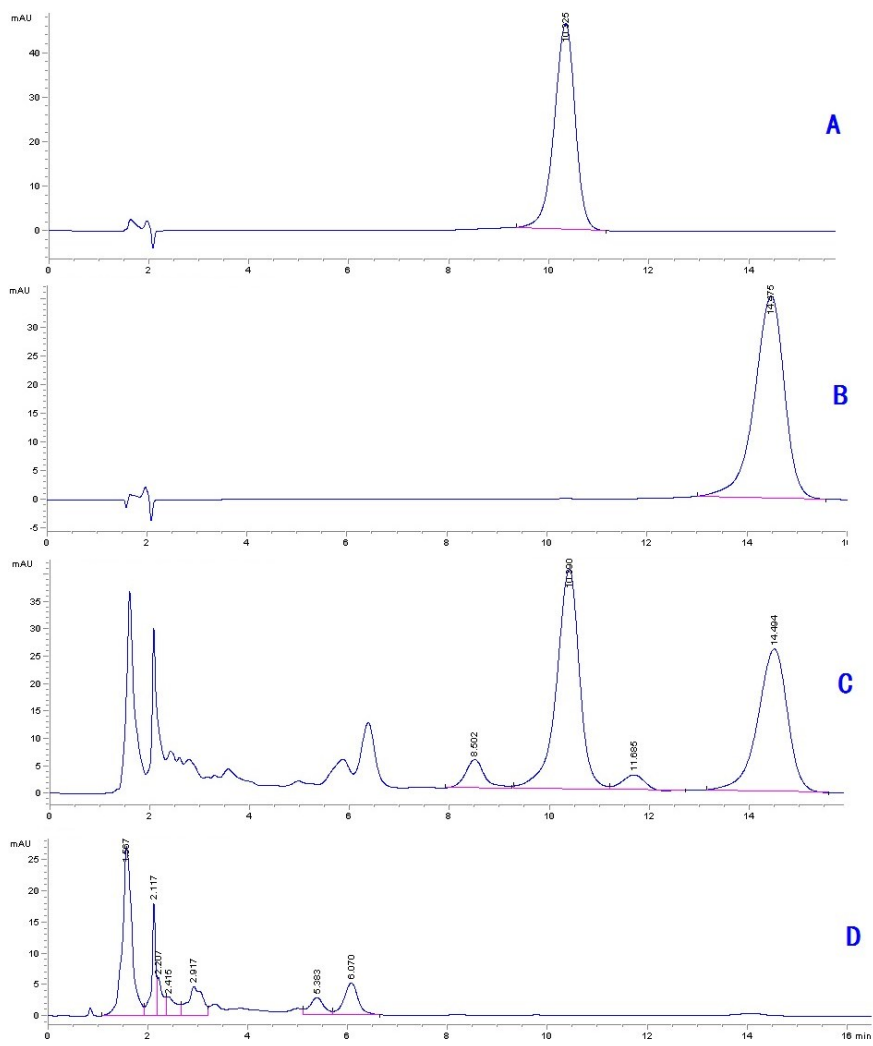


图 1 专属性试验色谱图(A、B、C、D 分别为柚皮苷、新橙皮苷、去滞散供试品、枳壳阴性对照)

Fig 1 HPLC chromatograms of specific test

(A:Naringin; B:Neohesperidin; C:Quzhi San; D:*Aurantii fructus* negative control)

表 1 柚皮苷加样回收率试验

Tab 1 Recovery results of Naringin

序号	样品重量/g	柚皮苷含量/mg	柚皮苷添加量/mg	测得柚皮苷总含量/mg	回收率/%	RSD/%
L1	0.754 8	4.99	3.02	8.06	101.7	2.23
L2	0.7512	4.97	3.15	8.02	96.8	
L3	0.7499	4.96	3.05	7.92	97.1	
M1	0.7525	4.97	5.24	9.96	95.2	
M2	0.7509	4.96	5.01	9.85	97.6	
M3	0.7489	4.95	5.17	10.01	97.9	
H1	0.7482	4.95	6.99	11.55	94.4	
H2	0.7513	4.97	7.15	11.99	98.2	
H3	0.7501	4.96	7.06	12.03	100.1	

新橙皮苷回收率 将新橙皮苷对照品按高、中、低 3 个浓度添加到批号为 20130502 的去滞散中,按 2.2 中的方法制备供试品溶液,精密量取 10 μL 上机测定,新橙皮苷回收率为 90.6%~100.0%,*RSD* 为 2.85%。结果见表 2。

表 2 新橙皮苷加样回收率试验

Tab 2 Recovery results of Neohesperidin

序号	样品重量	新橙皮苷含量 /mg	新橙皮苷添加量 /mg	测得新橙皮苷总含量 /mg	回收率	<i>RSD</i> /%
L1	0.741 6	3.69	2.12	5.61	90.6	2.85
L2	0.751 7	3.74	2.09	5.75	96.2	
L3	0.755 2	3.76	2.1	5.71	92.9	
M1	0.749 8	3.74	4.03	7.77	100.0	
M2	0.753 6	3.75	3.95	7.6	97.5	
M3	0.760 1	3.79	3.97	7.53	94.2	
H1	0.753 4	3.75	5.99	9.52	96.3	
H2	0.745 6	3.71	5.86	9.46	98.1	
H3	0.756 8	3.77	6.08	9.61	96.1	

2.6 精密度 取供试品(批号:20130502)溶液,精密量取 10 μL,重复进样 6 次,测得柚皮苷峰面积 *RSD* 为 0.64%,新橙皮苷峰面积 *RSD* 为 1.09%,结果见表 3。

表 3 精密度试验

Tab 3 Precision test

序号	柚皮苷			新橙皮苷		
	峰面积	平均峰面积	<i>RSD</i> /%	峰面积	平均峰面积	<i>RSD</i> /%
1	1319.5	1314.8	0.64	1135.2	1116.7	1.09
2	1322.1			1109.1		
3	1315.6			1113.9		
4	1299.8			1099.7		
5	1311.0			1121.2		
6	1320.9			1120.9		

2.7 耐用性 取按准确度测定项下制得的样品,保持流动相比比例和流速不变,在 Waters600 和 Agilent 1100 色谱仪上分别使用 Agilent SB-C18 (4.6 mm×150mm,5 μm)柱和 Agilent XDB-C18 柱 (4.6 mm×150mm,5 μm) 色谱柱,于 20 ℃、30 ℃、40 ℃ 条件下进行测试,考察方法的耐用性,结果表明该方法能够耐受不同液相色谱仪、色谱柱、柱温

等因素的小范围变化,测定去滞散中柚皮苷、新橙皮苷的含量无显著差异,说明耐用性良好。

2.8 含量测定 取 3 批去滞散(批号分别为 20130502,20130504,20130506),分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,精密量取 10 μL 上机测定峰面积,通过外标法计算柚皮苷和新橙皮苷的含量,结果见表 4。根据 3 批样品中柚皮苷和新橙皮苷的含

量实测值,参考 2015 年版《中华人民共和国兽药典》二部^[3]枳壳含量测定项下柚皮苷和新橙皮苷含量理论值,确定含量限度为每 1 g 去滞散中含枳壳

以柚皮苷计不得低于 5.0 mg,以新橙皮苷计不得低于 4.0 mg。

表 4 含量测定结果(单位:mg/g)

Tab 4 Content determination results of three batch Quzhi San(unit:mg/g)

批号	柚皮苷			新橙皮苷		
	含量 1	含量 2	平均值	含量 1	含量 2	平均值
20130502	6.612	6.607	6.61	5.012	5.109	5.06
20130504	6.358	6.402	6.38	5.126	5.215	5.17
20130506	6.121	6.112	6.12	4.985	4.768	4.88

3 讨论与小结

3.1 含量测定成分的选择 去滞散中六神曲、枳壳、山楂为主药,主要起健脾和胃、行滞消胀、消食、健胃等功能。六神曲为传统成方曲剂,在加工生产中,普遍存在处方原料入药方式及配比不一致、生产工艺不一致、质量评价体系不完善、发酵环境中的菌种不同等问题^[4-5],限制了六神曲中化学成分的研究,因此选择另一主药枳壳作为去滞散的定量参数。枳壳具有理气宽中、行滞消胀等功效,研究表明枳壳的水提物能够增强肠蠕动^[6];枳壳的醇提物和水提物对猪源链球菌有较强的抑菌活性^[7],是中兽医临床常用的药物之一,常用于畜禽胀满疼痛,食积不化,胸胁气滞,痰饮内停,脏器下垂等。枳壳理气、行滞的重要成分为柚皮苷、新橙皮苷^[8-9],并且柑橘属多种植物果实含有柚皮苷而不含有新橙皮苷,不作为枳壳的基原植物^[10],所以去滞散中含量测定的成分选择为柚皮苷和新橙皮苷。

3.2 样品前处理方法的选择 柚皮苷和新橙皮苷同属枳壳的黄酮类成分,其提取、分离方法主要有水浴回流提取法、醇或碱液提酸沉法、索氏提取法、超声辅助提取法和超临界流体萃取等方法^[11]。参考 2015 年版《中华人民共和国兽药典》二部枳壳含量测定项下前处理方法,本试验采用甲醇作为溶剂,加热回流 1.5 h,结果证明该方法能够较为完全的提取出去滞散中的柚皮苷和新橙皮苷,并且枳壳阴性对照无干扰。

3.3 含量测定限度的确定 枳壳收录在 2015 年版《中华人民共和国兽药典》二部,其含量限度为柚皮苷($C_{27}H_{32}O_{14}$)不得少于 4.0%,新橙皮苷($C_{28}H_{34}O_{15}$)不得少于 3.0%,由于未见相关毒性报道,所以上限规定。在去滞散处方中枳壳所占比例约为 13.3%,理论含量为每 1 g 去滞散中含枳壳以柚皮苷计不得低于 5.32 mg,以新橙皮苷计不得低于 3.99 mg。在实际样品(批号分别为 20130502, 20130504, 20130506)测定时,柚皮苷含量为 6.12~6.61 mg/g,新橙皮苷含量为 4.88~5.17 mg/g,均为理论值 115%以上,说明制剂生产过程中质量稳定。因此,参考含量理论值并取整数部分确定了含量测定的限度下限,上限未作规定。随着对枳壳中柚皮苷、新橙皮苷等有效成分研究的深入,其毒理作用必将逐渐明晰,届时可以考虑设定更加合理的限度范围。

用高效液相法测定去滞散中柚皮苷、新橙皮苷的含量,方法简便,准确,灵敏度高,回收率好,可有效控制该制剂中主药枳壳的含量,含量限度为每 1 g 去滞散中含枳壳以柚皮苷计不得低于 5.0 mg,以新橙皮苷计不得低于 4.0 mg。

参考文献:

[1] 张 宏,封士兰,李建喜,等. 去滞散的显微与薄层色谱鉴别[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(23):164-166.

Zhang H, Feng S L, Li J X, et al. Identification of Quzhiisan by

- Microscopy and Thin layer chromatography [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(23):164-166.
- [2] 高 光. 兽用中药研制与申报工作中有关质量标准研究的技术要求[J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(1):4-7.
- Gao G. Technical requirements for quality standard research and application in veterinary traditional Chinese Medicine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2003, 37(1):4-7.
- [3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一五年版二部[S].
- China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia volume II 2010 edition[S].
- [4] 张南方, 韩顺意, 张义生. 六神曲质量标准研究[J]. 中医学报, 2015(1):98-100.
- Zhang N F, Han S Y, Zhang Y S. Studies on the quality standard of medicated leaven [J]. China Journal of Chinese Medicine, 2015 (1):98-100.
- [5] 练晶军. 六神曲质量特征及发酵变化研究[D]. 北京中医药大学, 2011.
- Lian J J. Study on the changes of quality and fermentation characteristics of Medicated leaven [D]. Beijing University of Chinese Medicine, 2011.
- [6] Wang S Y, Liu Y P, Fan Y H, *et al.* Mechanism of aqueous fructus aurantii immaturus extracts in neuroplexus of cathartic colons[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21 (31): 9358-9366.
- [7] 宋晓言, 赵 晴, 田立杰, 等. 30 味中药提取物与环丙沙星联用对猪源链球菌体外抑菌作用研究[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(3):62-65.
- Song X Y, Zhao Q, Tian L J, *et al.* Cooperative effect of thirty Chinese herbs extract in combination with Ciprofloxacin against on *Streptococcus suis in vitro*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(3):62-65.
- [8] 陈建真, 袁 华, 陈 彬. 枳实和枳壳中黄酮苷类成分的比较研究[J]. 中国中医药科技, 2015, 22(5):529-530.
- Chen J Z, Yuan H, Chen B. A comparative study of flavonoid glycosides in *Fructus aurantii immaturus* and *Fructus aurantii*[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2015, 22(5):529-530.
- [9] 袁金斌, 魏 玲, 张 敏, 等. 高效液相色谱法测定枳壳中柚皮苷、新橙皮苷、川陈皮素和红橘素的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(6):515-517.
- Yuan J B, Wei L, Zhang M, *et al.* Determination of naringin, neohesperidin and nobiletin and tangeretin in *Fructus aurantii* by HPLC [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2010, 30 (6):515-517.
- [10] 杨武亮, 杨世林, 张 敏, 等. RP—HPLC 法测定枳壳中柚皮苷和新橙皮苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16 (4):261-263.
- Yang W L, Yang S L, Zhang M, *et al.* Determination of naringin, neohesperidin in *Fructus aurantii* by Rp-HPLC [J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2005, 16(4): 261-263.
- [11] 刘学仁. 柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的提取与分析研究[D]. 湖北师范学院, 2011.
- Liu X R. Studies on extraction and analysis of Naringin, Hesperidin, and Neohesperidin [D]. Hubei Normal University, 2011.

(编辑:陈 希)