

多波长高效液相色谱法同时测定栀子厚朴汤 醇提液中 6 个主要成分的含量

宋静, 于霄, 熊志立*, 李发美

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 目的: 建立同时测定栀子厚朴汤醇提液中栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚与厚朴酚含量的高效液相色谱方法。方法: 采用 Hypersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 238 nm (0 ~ 12 min)、283 nm (12 ~ 30 min)、294 nm (30 ~ 40 min), 柱温 30 °C。结果: 栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚的进样量分别在 1.03 ~ 10.3 μg ($r = 0.9996$)、0.184 ~ 1.84 μg ($r = 0.9996$)、0.880 ~ 8.80 μg ($r = 0.9997$)、0.478 ~ 4.78 μg ($r = 0.9996$)、0.221 ~ 2.21 μg ($r = 0.9998$)、0.538 ~ 5.38 μg ($r = 0.9998$) 范围内与各自峰面积值呈良好线性关系; 平均回收率 ($n = 6$) 分别为 99.4%、99.2%、102.4%、100.3%、102.0%、99.8%。结论: 本方法简便、准确、可靠, 可用于栀子厚朴汤醇提液的质量控制。

关键词: 中药; 汤剂; 栀子厚朴汤; 栀子苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 和厚朴酚; 厚朴酚; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)09-1664-04

Simultaneous determination of six main components in Zhizihoupu ethanol extraction by HPLC at multiple UV wavelengths

SONG Jing, YU Xiao, XIONG Zhi-li*, LI Fa-mei

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for simultaneous determination of geniposide, naringin, hesperidin, neohesperidin, honokiol, and magnolol in Zhizihoupu ethanol extraction. **Methods:** Hypersil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm 5 μm) was adopted with the mobile phase consisting of acetonitrile-water at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, and the detection wavelength was set at 238 nm (0-12 min), 283 nm (12-30 min), 294 nm (30-40 min), and the column temperature was maintained at 30 °C. **Results:** The calibration curves of geniposide, naringin, hesperidin, neohesperidin, honokiol, and magnolol were in good linearity over the ranges of 1.03-10.3 μg ($r = 0.9996$), 0.184-1.84 μg ($r = 0.9996$), 0.880-8.80 μg ($r = 0.9997$), 0.478-4.78 μg ($r = 0.9996$), 0.221-2.21 μg ($r = 0.9998$), 0.538-5.38 μg ($r = 0.9998$), respectively. And the average recoveries of the six constituents were 99.4%, 99.2%, 102.4%, 100.3%, 102.0% and 99.8%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reliable, and can be used for the quality control of Zhizihoupu ethanol extraction.

Key words: traditional Chinese medicine; decoction; Zhizihoupu Tang; geniposide; naringin; hesperidin; neohesperidin; honokiol; magnolol; HPLC method

栀子厚朴汤出自东汉末·张仲景的《伤寒论》, 由栀子、厚朴和枳实 3 味常用中药材组成, 主要用于食道炎、急性胃炎、胆囊炎、慢性胰腺炎等的治疗。

其中, 君药栀子中的栀子苷具有降糖作用^[1]及抗炎镇痛^[2]等功效; 厚朴中的主要成分厚朴酚、和厚朴酚具有抗菌抗病毒、抗氧化、抗肿瘤^[3]等多种药理

* 通讯作者 Tel: (024) 23986289; E-mail: bearry200@126.com

学作用;枳实中的主要成分柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷,具有抗氧化、抗自由基及抗过敏的作用^[4]。目前多采用 HPLC 法测定各成分在相应药材或制剂中的含量^[5~7]。关于栀子厚朴汤的含量测定研究,作者尚未见报道。由于中药复方是个复杂体系,其药效的发挥是多种成分协同作用的结果,因此,建立多组分同时定量的分析方法,对栀子厚朴汤的质量控制具有非常重要的意义。本文采用多波长高效液相色谱法同时测定栀子厚朴汤中栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚 6 个主要成分,方法简便、准确、可靠,为栀子厚朴汤的质量控制研究提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 1100 型 HPLC 仪(美国 Agilent 公司);AL104 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市舒美超声仪器有限公司 300 W 40 kHz)。

1.2 试剂 对照品栀子苷(批号:110749-200714)、柚皮苷(批号:110722-200610)、橙皮苷(批号:110721-200613)、和厚朴酚(批号:110729-200411)、厚朴酚(批号:110730-200710)均购自中国药品生物制品检定所,新橙皮苷(批号:A0033-091007,峰面积归一化法测得含量为 99.5%)购自成都曼斯特生物科技有限公司;栀子、厚朴、枳实药材购于沈阳市同仁堂大药房,经沈阳药科大学路金才教授鉴定,均为正品;乙腈、甲醇为色谱纯,天津市康科德科技有限公司,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 混合对照品溶液 分别取对照品栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚及厚朴酚适量,精密称定,以 70% 甲醇溶液配制成混合对照品溶液 I (栀子苷浓度为 $1.03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,柚皮苷浓度为 $0.184 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,橙皮苷浓度为 $0.880 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,新橙皮苷浓度为 $0.478 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,和厚朴酚浓度为 $0.221 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,厚朴酚浓度为 $0.538 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。精密吸取混合对照品溶液 I 2.5 mL,置于 10 mL 量瓶中,用 70% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,得混合对照品溶液 II。

2.1.2 供试品溶液 取各干燥药材粉碎,过 60 目筛,按原方配比(栀子、厚朴、枳实比例为 1.2:1.2:1.0)混匀,制得样品,称取样品 0.34 g,精密称定,精密加入 70% 乙醇溶液 25 mL,称定重量,

超声(40 kHz)处理 30 min 后,用 70% 乙醇溶液补足重量,摇匀,经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.1.3 阴性样品溶液 取栀子阴性样品 0.22 g、厚朴阴性样品 0.22 g 及枳实阴性样品 0.24 g,分别按“2.1.2”项下方法制备栀子阴性样品溶液、厚朴阴性样品溶液及枳实阴性样品溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验 采用 Hypersil C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱,以乙腈(A)-水(B)为流动相,梯度洗脱[0~10 min,12% A;12~22 min,20% A;27~40 min,55% A],流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长为 238 nm(0~12 min,栀子苷)、283 nm(12~30 min,柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷)、294 nm(30~40 min,和厚朴酚、厚朴酚),柱温 30 °C,进样量 20 μL 。在上述色谱条件下,栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚和厚朴酚的理论板数大于 5000,拖尾因子均在 0.95~1.05 之间,各成分色谱峰同相邻色谱峰分离度均大于 1.5。色谱图见图 1。

2.3 线性关系试验 精密吸取混合对照品溶液 II 4,10,15,20,25,30,35,40 μL ,按上述色谱条件进样测定。以峰面积积分值(Y)为纵坐标,进样量(X)为横坐标进行线性回归,得栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚回归方程分别为:

$$Y = 214X - 32.8 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 41.2X - 7.39 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 195X - 41.4 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 117X - 25.1 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 39.6X - 9.56 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 101X - 20.3 \quad r = 0.9998$$

进样量分别在 1.03~10.3 μg 、0.184~1.84 μg 、0.880~8.80 μg 、0.478~4.78 μg 、0.221~2.21 μg 、0.538~5.38 μg 范围内与各自峰面积呈良好线性关系。

2.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 II 20 μL ,按上述色谱条件连续进样 5 次,测得各峰面积,计算栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 0.3%,0.9%,1.0%,1.3%,0.5%,1.2%,结果表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 取同一批样品 6 份,精密称定,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下分析测定。栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、

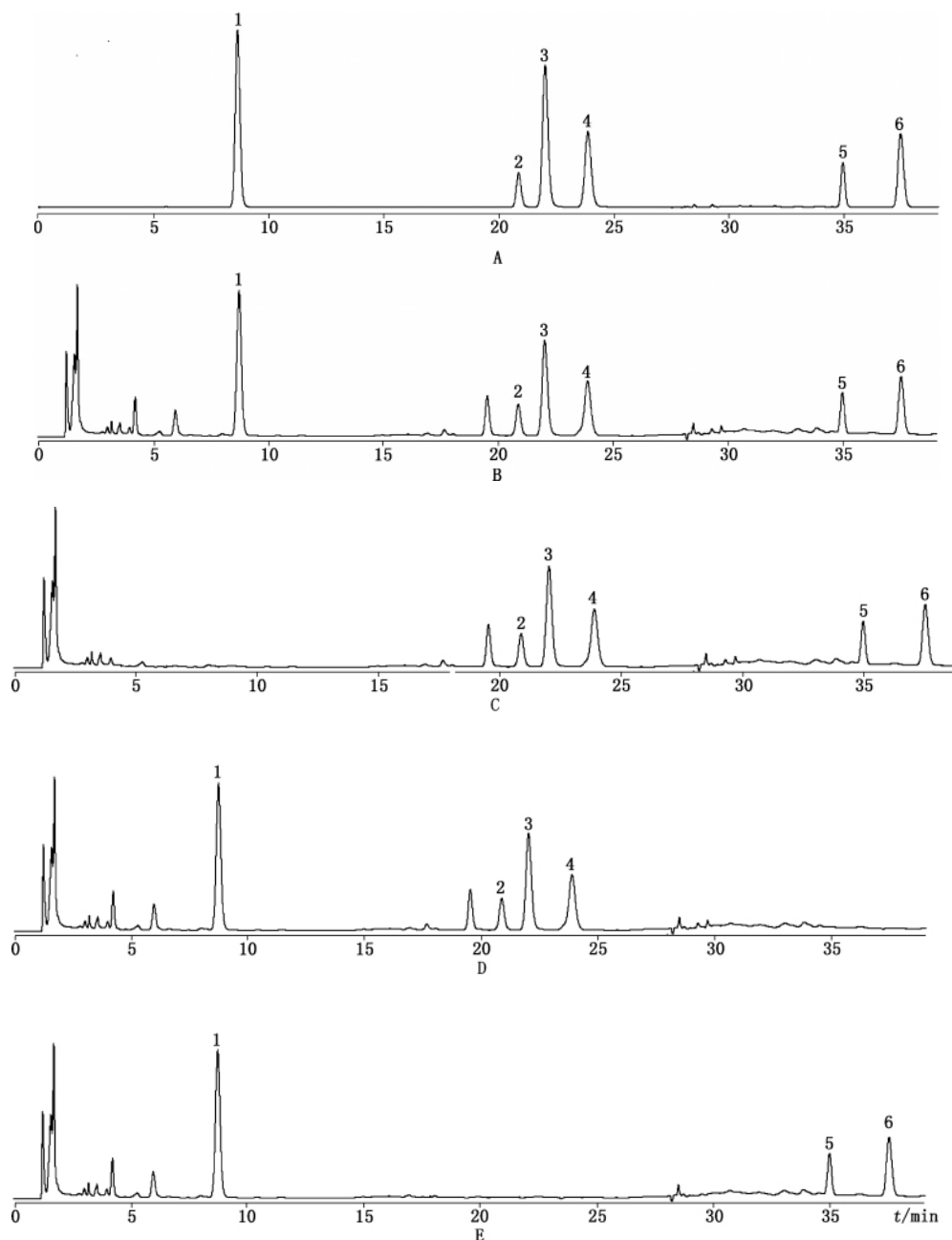


图1 对照品、样品及阴性样品色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substances, sample and negative samples

A. 对照品(reference substances) B. 样品(sample) C. 缺栀子的阴性样品(negative sample without Fructus Gardeniae) D. 缺厚朴的阴性样品(negative sample without Flos Magnoliae Officinalis) E. 缺枳实的阴性样品(negative sample without Fructus Aurantii Immaturus)

1. 栀子苷(geniposide) 2. 柚皮苷(naringin) 3. 橙皮苷(hesperidin) 4. 新橙皮苷(neohesperidin) 5. 和厚朴酚(honokiol) 6. 厚朴酚(magnolol)

新橙皮苷、和厚朴酚及厚朴酚的平均含量分别为 13.5 3.08, 13.7 6.17, 3.38 6.52 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.2%, 1.0%, 0.9%, 1.5%, 1.7%, 1.2%。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别于 0, 8, 16, 24 h 进样分析, 结果栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 0.5%, 1.2%, 1.2%, 0.7%, 1.4%。结果

表明供试品溶液在常温保存下 24 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验 精密称取同一批已知含量的样品 6 份, 每份 0.17 g, 精密称定, 分别准确加入混合对照品溶液 2.5 mL, 按照“2.1.2”项下方法制备供试溶液, 在上述色谱条件下进行试验。结果表明 栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚的回收率 ($n = 6$) 分别为 99.4%, 99.2%,

102.4% ,100.3% ,102.0% ,99.8%; RSD 分别为 1.4% ,1.1% ,0.6% ,1.0% ,1.5% ,1.0%。

2.8 样品测定 按“2.1.2”项下方法制备供试品

溶液,在上述色谱条件下分析测定,按外标一点法计算 3 批栀子厚朴汤中栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚及厚朴酚的含量,结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ $n=3$)

Tab 1 The analytical results of samples

批次 (Lot No.)	栀子苷 (geniposide)	柚皮苷 (naringin)	橙皮苷 (hesperidin)	新橙皮苷 (neohesperidin)	和厚朴酚 (honokiol)	厚朴酚 (magnolol)
1	13.5	3.08	13.7	6.17	3.38	6.52
2	17.8	4.65	14.7	4.81	3.74	6.06
3	9.40	5.27	3.13	5.17	3.49	5.74

3 讨论

3.1 栀子厚朴汤是一经典古方,书中记载其煎服方法为“以水三升半,煮取一升半,取滓”。笔者在供试品溶液制备过程中,采取单因素多水平考察方式,对栀子厚朴汤的提取工艺进行了优化,以 6 个成分的含量为指标,考察了提取方式(超声、回流)、提取溶剂(甲醇、乙醇、水及不同比例的甲醇-水、乙醇-水)、提取倍量(30 倍、60 倍、90 倍)和提取时间(15 min、30 min、45 min),经过直观分析和方差分析,结果显示用 90 倍量的 70% 乙醇超声或回流 30 min 可获得最好的提取效果,即 70% 乙醇提取物比传统的水煎液更能保证药材中主要成分的充分提取,考虑到实验操作的简便性,故采用超声提取方式。

3.2 由于栀子厚朴汤醇提液中栀子苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚及厚朴酚这 6 个成分化学结构不同,紫外吸收差别较大,在同一波长下检测会损失某些成分的灵敏度,故本文应用二极管阵列检测器,采用改变波长的方法,分别在各成分的最大紫外吸收处进行检测,使得各成分在相应波长下有最大吸收,本方法可在同一色谱条件下同时检测上述 6 个主要成分,方法简便、可靠,为其质量标准控制和后续研究提供参考依据。

- (吕秋军) *et al.* Effect of geniposide on blood sugar reduction and its activation to PPAR γ Receptor(栀子苷的降糖作用和对 PPAR γ 受体的激活). *J Sichuan Agric Univ*(四川农业大学学报) 2007, 25(4):415
- FANG Shang-ling(方尚玲),LIU Yuan-cai(刘源才),ZHANG Qing-hua(张庆华) *et al.* Study on analgesic and anti-inflammatory effects of geniposide(栀子苷镇痛和抗炎作用的研究). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药) 2008, 19(6):1374
- YIN Shuai-wen(殷帅文),HE Xu-mei(何旭梅),LANG Feng-xiang(郎锋祥) *et al.* Research development of chemical composition and pharmacological effect in *Magnolia officinalis*(厚朴化学成分和药理作用研究概况). *Guizhou Agric Sci*(贵州农业化学), 2007, 35(6):133
- WANG Wen-kai(王文凯),GAN Xiao-lan(甘晓兰). The study progress of immature bitter orange(中药枳实研究概况). *Hunan Guid J TCM*(湖南中医药导报) 2003, 9(12):55
- ZHAO Jing(赵静),YOU Guo-jun(游国钧),LI Hui(李辉). Determination of jasminoidin in Gardenia at different culling period(不同采收时期栀子中栀子苷的含量测定). *Guid J TCM*(中医药报) 2007, 13(7):102,107
- LIU Xiao-peng(刘晓鹏),JIANG Ning(姜宁). Study on extraction and determination of magnolol and honokiol in Baoji pills(快速提取及测定保济丸中厚朴酚与和厚朴酚的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2009, 29(3):367
- HE Yang(何洋),XIAO Wei-juan(肖伟娟),CAO Yan-wei(曹演威) *et al.* Simultaneous determination of three flavonoids in *Fructus Aurantii Immaturus* by HPLC(高效液相色谱法同时测定枳实中 3 种黄酮类成分的含量). *Pharm Today*(今日药学) 2009, 19(6):46

(本文于 2010 年 10 月 14 日收到)

参考文献

- 1 YAN Jing-en(颜静恩),LI Wan-chen(李晚忱),LÜ Qiu-jun