

# HPLC法测定枳壳中川陈皮素、红橘素的含量\*

徐欢<sup>1,2</sup>, 陈海芳<sup>1</sup>, 介磊<sup>1</sup>, 涂明珠<sup>1</sup>, 黎艳刚<sup>1</sup>, 杨武亮<sup>1\*\*</sup>

(1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004 2. 江西中医学院附属医院, 南昌 330006)

**摘要** 目的: 建立测定枳壳药材中川陈皮素、红橘素的 HPLC 定量分析方法。方法: 采用 Venusil XBP C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以乙腈 - 水 (45: 55) 为流动相, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 326 nm, 柱温 25 °C。结果: 川陈皮素、红橘素进样量分别在 0.16~ 3.11 μg 和 0.12~ 2.34 μg 范围内色谱响应线性关系良好, 相关系数均为 0.9999, 平均回收率 (n = 5) 分别为 97.9% 和 99.7%, RSD 值分别为 1.1% 和 0.44%。结论: 本法简便、准确、可靠, 可作为枳壳药材中川陈皮素与红橘素含量测定的有效方法。

**关键词:** 高效液相色谱法; 含量测定; 枳壳; 川陈皮素; 红橘素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1411-04

## HPLC determination of nobiletin and tangeretin in Fructus Aurantii

XU Huan<sup>1,2</sup>, CHEN Hai-fang<sup>1</sup>, JIE Lei<sup>1</sup>, TU Ming-zhu<sup>1</sup>, LI Yan-gang<sup>1</sup>, YANG Wu-liang<sup>1\*\*</sup>

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM of Ministry of Education, Jiangxi College of TCM, Nanchang 330004 China

2. The Affiliated Hospital of Jiangxi College of TCM, Nanchang 330006, China)

**Abstract Objective** To establish a method for the quantification of nobiletin and tangeretin in Fructus Aurantii by HPLC. **Methods** The Venusil XBP C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was adopted with the mobile phase of acetonitrile - water (45: 55) at 25 °C; The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, and the detection wavelength was 326 nm. **Results** The method had good linear relationship within the range of 0.16- 3.11 μg (r = 0.9999) for nobiletin and 0.12- 2.34 μg (r = 0.9999) for tangeretin. The average recoveries (n = 5) were 97.9% (RSD = 1.1%) for nobiletin and 99.7% (RSD = 0.44%) for tangeretin. **Conclusion** This method is convenient, accurate and reliable for the quantification of nobiletin and tangeretin in Fructus Aurantii

**Key words** HPLC; quantification; Fructus Aurantii; nobiletin; tangeretin

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L 及其栽培变种的干燥未成熟果实。7月果皮尚绿时采收, 自中部横切为两半, 晒干或低温干燥。具有理气宽中、行滞消胀之功<sup>[1]</sup>。为了进一步探讨枳壳中理气作用的活性化学成分, 作者对枳壳提取物进行了活性跟踪, 研究发现取自三氯甲烷萃取层的提取物小剂量对正常小鼠胃肠运动有促进作用, 大剂量有抑制作用; 枳壳提取物三氯甲烷萃取层中的多甲氧基黄酮成分川陈皮素与红橘素, 均对正常小鼠有胃肠推进作用, 研究发现这 2 个成分的胃肠推进最低剂量均为 0.66 mg · kg<sup>-1</sup>。据报道川陈皮素对脑肿瘤细胞、鼻咽癌 KB 细胞、Lewis 肺癌等具有极强的抗癌活性<sup>[2-4]</sup>。红橘素对肿瘤细胞、乳腺癌、肺

癌<sup>[5-7]</sup>等具有较强的抗癌活性, 另外还具有抗白血病作用<sup>[8]</sup>和抗真菌作用<sup>[9]</sup>。目前, 枳壳中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷 HPLC 分析<sup>[10-12]</sup>文献报道较多, 但多甲氧基黄酮类成分的定量方法未见报道, 本实验采用 HPLC 法同时测定不同产地枳壳药材和饮片中的川陈皮素与红橘素的含量, 为枳壳药效物质基础研究和药材与饮片的质量控制提供一种可靠的方法。

### 1 仪器、试剂与药材

Agilent 1200 型液相色谱仪及其配套工作软件。水为重蒸水, 乙腈为 HPLC 级, 其他试剂均为分析纯; 对照品川陈皮素和红橘素均为自制, 经谱学确定结构, HPLC 峰面积归一化法计算纯度分别为

\* 国家自然科学基金资助 (30660230)

\*\* 通讯作者 Tel: (0791) 7118657 E-mail: yangwuliang@163.com

99.21%和 98.86%。枳壳药材由江西中医学院药用植物教研室赖学文教授鉴定为 *C. aurantium* L 的干燥未成熟果实。

## 2 色谱条件

色谱柱: Venusil XBP C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 水 (45: 55); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 326 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

## 3 溶液的制备

**3.1 混合对照品储备溶液** 分别精密称取减压干燥至恒重的对照品川陈皮素和红橘素适量, 置同一 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得川陈皮素浓度为 0.3112 mg · mL<sup>-1</sup> 和红橘素浓度为 0.2336 mg · mL<sup>-1</sup> 的混合对照品储备溶液。

**3.2 供试品溶液** 取枳壳粉末 (过 40 目筛) 约 3 g 精密称定, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加甲醇水浴回流提取 3 次 (用量分别为 40, 20, 20 mL, 相对应的提取时间分别为 90, 20, 20 min), 滤液趁热滤过, 合并滤液, 将滤液水浴蒸干, 加入水 30 mL, 用三氯甲烷萃取 3 次 (用量分别 20, 10, 10 mL), 合并三氯甲烷层, 萃取液浓缩至干, 以适量甲醇溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 以甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 有机微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

## 4 线性范围考察及最低检测限

精密吸取混合对照品储备溶液 0.5, 1, 2, 4, 6, 10 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列混合对照品溶液。分别进样 10 μL, 以对照品的进样量 (μg) 为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 绘制标准曲线, 得川陈皮素、红橘素的回归方程分别为:

$$Y = 3.281 \times 10^3 X + 24.71 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 3.952 \times 10^3 X + 20.40 \quad r = 0.9999$$

结果表明川陈皮素、红橘素进样量分别在 0.16 ~ 3.11 μg 和 0.12 ~ 2.34 μg 范围内呈良好线性关系。

在选定的色谱条件下, 当信噪比为 3 时对最低检测限进行测定。结果表明, 川陈皮素、红橘素的最低检测限均为 0.1 ng。

## 5 精密度试验

精密吸取 6 号样品的供试品溶液 10 μL, 注入 HPLC 仪, 连续进样 6 次, 测得川陈皮素、红橘素峰面积的 RSD (n = 6) 分别为 1.5% 和 2.3%。表明仪器精密度良好。

## 6 重复性试验

取 6 号样品粉末 5 份, 按“3.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进行测定。计算得川陈皮素、红橘素含量平均值 (n = 5) 分别为 0.086% 和 0.047%, RSD 分别为 1.5% 和 1.2%。结果表明重复性良好。

## 7 稳定性试验

取 6 号样品的供试品溶液, 自溶液配制后分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 各进 10 μL, 测得川陈皮素、红橘素峰面积的 RSD (n = 6) 分别为 1.9% 和 1.6%, 表明该溶液在 24 h 内基本稳定。

## 8 加样回收率试验

取已知含量的 6 号样品粉末 (川陈皮素的含量为 0.086%, 红橘素的含量为 0.047%) 1.5 g 共 5 份, 精密称定, 每份分别加入川陈皮素浓度为 1.2670 mg · mL<sup>-1</sup> 与红橘素浓度为 0.6097 mg · mL<sup>-1</sup> 的混合溶液 1 mL, 按“3.2”项操作方法制备所需溶液, 测得川陈皮素、红橘素平均回收率 (n = 5) 分别为 97.9% 和 99.7%, RSD 分别为 1.1% 和 0.44%。

## 9 样品的测定

分别精密吸取对照品混合溶液 (川陈皮素浓度为 62.24 μg · mL<sup>-1</sup>, 红橘素浓度为 46.72 μg · mL<sup>-1</sup>) 及供试品溶液各 10 μL, 注入 HPLC 仪, 在上述色谱条件下进行测定, 采取外标法计算川陈皮素与红橘素的量, 结果见图 1 和表 1。

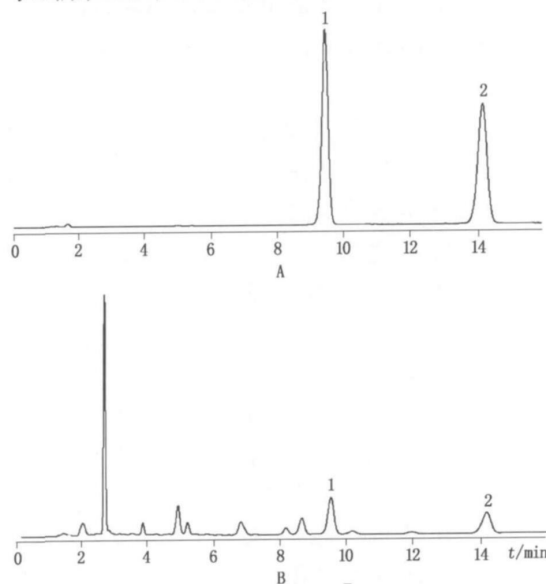


图 1 对照品 (A) 和 5 号样品 (B) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and No. 5 sample from Wuchengxiang (B)

1. 川陈皮素 (nobiletin, 9.4 min) 2. 红橘素 (tangeretin, 14.2 min)

表 1 20份枳壳药材中川陈皮素和红橘素的含量测定结果  
**Tab 1 Contents of nobiletin and tangeretin in 20 sample of Fructus Aurantii**

种名 (species)	编号 (No.)	产地 (growing regions)	含量 (contents) %	
			川陈皮素 (nobiletin)	红橘素 (tangeretin)
香橙 ( <i>Citrus aurantium</i> 'Xiangcheng')	1	江西省新干县 (Xingan Jiangxi)	0.066	0.030
	2	江西省新干县 (Xingan Jiangxi)	0.082	0.058
	3	江西省樟树市昌傅镇 (Changfu Zhangshu Jiangxi)	0.079	0.039
	4	江西省樟树市昌傅镇 (Changfu Zhangshu Jiangxi)	0.090	0.051
	5	江西省樟树市吴城乡 (Wuchengxiang Zhangshu Jiangxi)	0.058	0.039
	6	江西省樟树市吴城乡 (Wuchengxiang Zhangshu Jiangxi)	0.086	0.047
臭橙 ( <i>C. aurantium</i> 'Xiucheng')	7	江西省樟树市黄土岗乡 (Huangtugang, Zhangshu Jiangxi)	0.041	0.027
	8	江西省樟树市昌傅镇 (Changfu Zhangshu Jiangxi)	0.075	0.050
	9	江西省樟树市昌傅镇 (Changfu Zhangshu Jiangxi)	0.070	0.053
	10	江西省新干县 (Xingan Jiangxi)	0.081	0.074
枳橙 ( <i>C. aurantium</i> × <i>Poncirus trifoliata</i> )	11	江西省新干县 (Xingan Jiangxi)	0.069	0.060
	12	湖南省沅江市 (Yuanjiang Hunan)	0.211	0.150
	13	湖南省沅江市 (Yuanjiang Hunan)	0.046	0.029
	14	湖南省沅江市 (Yuanjiang Hunan)	0.210	0.152
	15	湖南省沅江市 (Yuanjiang Hunan)	0.190	0.132
	16	湖南省怀化市 (Huaihua Hunan)	0.173	0.145
	17	重庆市綦江县 (Qijiang Chongqing)	0.020	0.018
代代花 ( <i>C. aurantium</i> 'Daidai')	18	重庆市江津区 (Jiangjin Chongqing)	0.016	0.018
	19	浙江省兰溪市 (Lanxi Zhejiang)	0.054	0.019
	20	浙江省兰溪市 (Lanxi Zhejiang)	0.051	0.020

10 讨论

10.1 色谱条件的选择 本试验分别采用了甲醇-水 (65:35)、甲醇-水 (55:45)和乙腈-水 (45:55)为流动相,结果表明以乙腈-水 (45:55)为流动相时样品中各成分能够达到分离度的要求。经紫外波长扫描川陈皮素、红橘素的对照品溶液在 326 nm 处均有最大紫外吸收,故选择 326 nm 为测定波长。

10.2 提取方法的选择 取 9份枳壳粉末(过 40目筛),每份约 3 g 精密称定,其中 3份分别加甲醇超声提取 3次(用量分别为 40, 20, 20 mL,对应的提取时间分别为 60, 20, 20 min); 3份分别加甲醇水浴加热回流提取 3次(用量分别为 40, 20, 20 mL,对应的提取时间分别为 90, 20, 20 min); 另外 3份加甲醇索氏提取(用量为 80 mL,提取时间为 180 min)。对上述 3种提取方法的提取效果进行比较,结果表明,超

声提取不完全,水浴加热回流提取和索氏提取完全,但加热回流提取法提取时间相对索氏提取法提取时间短,操作简便,故本实验采用加热回流方法。

10.3 提取溶剂的选择 根据川陈皮素、红橘素在甲醇、三氯甲烷、丙酮中都可溶的特点,本试验考察了上述 3种溶剂的提取效果,即采用水浴回流提取方法,在同等溶剂用量情况下提取 3次(用量分别为 40, 20, 20 mL,对应的提取时间分别为 90, 20, 20 min)。结果表明:甲醇的提取效果好且完全,故本实验采用甲醇为提取溶剂。

10.4 小结 本试验首次采用 HPLC 法对不同产地的枳壳药材同时进行川陈皮素、红橘素含量测定,方法简便、准确,重现性好,可作为枳壳药材中川陈皮素、红橘素含量测定的有效方法。

## 参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005 VolI (一部): 171
- 2 Manthey JA, Guthrie N. Antiproliferative activities of *Citrus* flavonoids against six human cancer cell lines *J Agric Food Chem*, 2002, 50( 21): 5837
- 3 Rodríguez J, Yúnez J, Vicente V, *et al*. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines. Relationship between structure and activity. *Melanoma Res*, 2002, 12( 2): 99
- 4 Kawai S, Tanono Y, Katase E, *et al*. Effect of *Citrus* flavonoids on HL-60 cell differentiation *Anticancer Res*, 1999, 19(2A): 1261
- 5 Thomas Walle M. Methoxylated flavones a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass *Semin Cancer Biol*, 2007, 17(5): 354
- 6 Morley K, Koropatnick J. An investigation of the anticancer mechanism of *Citrus* flavonoids tangeretin and nobilletin *Eur J Cancer Suppl*, 2004, 2( 8): 174
- 7 Chen KH, Weng M S, Lin J K. Tangeretin suppresses IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase (COX)-2 expression through inhibition of p38 MAPK, JNK, and AKT activation in human lung carcinoma cells *Biochem Pharmacol*, 2007, 73( 2): 215
- 8 Mak NK, Wong-Leung YL, Chan SC, *et al*. Isolation of anti-leukemia compounds from *Citrus reticulata*. *Life Sci*, 1996, 58( 15): 1269
- 9 Ortuño A, Búñez A, Gómez P, *et al*. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids. Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem*, 2006, 98(2): 351
- 10 YANG Wu-liang(杨武亮), YANG Shi-lin(杨世林), ZHANG Min(张敏), *et al*. RP-HPLC determination of content of naringin and neohesperidin in *Fructus Aurantii* (RP-HPLC法测定枳壳中柚皮苷和新橙皮苷的含量). *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2005, 16( 4): 261
- 11 YE Guo-liang(叶国良), WU Yi-chang(吴仪昌), TIAN Yun-chao(田允超). Determination of hesperidin in four kind of *Fructus Aurantii*(四种枳壳橙皮苷的含量测定). *J Jiangxi Univ Tradit Chin Med*(江西中医学院学报), 2006, 18( 1): 31
- 12 PAN Xin(潘馨). Determination of naringin in *Fructus Poncirus trifoliatae* Immaturi by HPLC(绿衣枳壳中柚皮苷含量测定方法的研究). *Cent South Pharm*(中南药学), 2005, 3(2): 82

(本文于 2008年 9月 18日收到)

## 《药物分析杂志》稿件在线管理系统已开通

本刊于 2008年 10月 23日开通稿件在线管理系统。从即日起,凡投稿本刊,请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 进行网上投稿。

该系统采用 E-mail 作为用户名进行注册。

网上投稿的同时需寄单位介绍信及稿件处理费 50元。

作者在线投稿后,可在线了解稿件情况:编辑-送审-专家已审-待编辑处理稿件-退修-编辑加工完成-已刊出等。

20080580号以前的作者可与编辑部联系修改用户名后,登录此系统。

读者可在线查看本刊目录,了解本刊编委及其他信息,并可在线订阅本刊。

投稿过程中如遇技术问题,请与技术支持联系:010-69296712。

谢谢合作!

《药物分析杂志》编辑部