

HPLC法测定不同规格酸橙枳实中新橙皮苷和柚皮苷的含量

黄爱华¹, 曹骋¹, 曾元儿^{1*}, 陈海丰²

(1. 广州中医药大学, 广州 510006 2 云南中医学院, 昆明 650200)

摘要 目的: 建立枳实药材中新橙皮苷和柚皮苷的反相高效液相色谱测定方法, 以考察不同规格酸橙枳实药材中新橙皮苷和柚皮苷的含量。方法: 色谱柱 Merck-Lichrospher RP-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.3% 磷酸溶液 (20:80), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 283 nm, 柱温 35℃。结果: 新橙皮苷进样量在 0.774~3.87 μg 范围内具有良好的线性关系 ($r=0.9997$), 平均回收率 ($n=6$) 为 99.4% (RSD=1.3%); 柚皮苷进样量在 0.816~4.08 μg 范围内具有良好的线性关系 ($r=0.9997$), 平均回收率 ($n=6$) 为 99.9% (RSD=1.6%)。不同规格酸橙枳实药材中新橙皮苷与柚皮苷含量分别为 14.6%, 7.02% (直径 0.5~1.0 cm); 12.3%, 9.78% (直径 1.0~1.5 cm); 10.2%, 10.2% (直径 1.5~2.5 cm)。结论: 本方法准确, 重现性好, 简便易行, 可有效地评价枳实药材的质量, 为枳实药材的商品流通和开发研究提供可靠的依据。

关键词: 枳实; 新橙皮苷; 柚皮苷; 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(2009)09-1448-03

HPLC determination of neohesperidin and naringin in Fructus Aurantii Immaturus of different specifications

HUANG Ai-hua¹, CAO Chen¹, ZENG Yuan-er^{1*}, CHEN Hai-feng²

(1. Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006 China 2 Yunnan College of TCM, Kunming 650200 China)

Abstract Objective To develop an RP-HPLC method for the determination of neohesperidin and naringin in Fructus Aurantii Immaturus of different specifications **Methods** The column was Merck-Lichrospher RP-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); The mobile phase was a mixture of acetonitrile-0.3% phosphoric acid (20:80), at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; The detection wavelength was 283 nm, and the column temperature was 35℃. **Results** The calibration curves of neohesperidin, naringin were in good linearity over the ranges of 0.774~3.87 μg ($r=0.9997$), 0.816~4.08 μg ($r=0.9997$), and the average recoveries ($n=6$) of neohesperidin and naringin were 99.4%, 99.9% with RSD of 1.3%, 1.6% respectively. Neohesperidin and naringin contents in Fructus Aurantii Immaturus of different specifications were 14.6%, 7.02% (diameter 0.5~1.0 cm); 12.3%, 9.78% (diameter 1.0~1.5 cm); 10.2%, 10.2% (diameter 1.5~2.5 cm) respectively. **Conclusion** This method is simple, sensitive, accurate, which will supply evidence for the quality control and research of Fructus Aurantii Immaturus.

Key words Fructus Aurantii Immaturus; neohesperidin; naringin; HPLC

枳实 (Fructus Aurantii Immaturus) 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]。具有破气消积、化痰散痞之功效。枳实中黄酮类成分的含量丰富, 约占 20%, 主要为新橙皮苷 (neohesperidin)、橙皮苷 (hesperidin) 和柚皮苷 (naringin), 其中新橙皮苷经氢化处理后形成的新橙皮苷二氢查耳酮, 是一种无毒、低能量、高甜度的新一代甜味剂, 其甜度是蔗糖的 1000 倍^[2]。目前, 新橙皮苷在欧美一些国家已开

始应用, 具有很大的市场前景。关于枳实中黄酮类成分的含量测定的报道主要集中在新橙皮苷、橙皮苷和柚皮苷 3 种成分^[3], 近年来主要采用 HPLC 法测定三者或其中 2 种或 1 种的含量, 袁诚等^[4]采用 HPLC 法测定了不同规格枳实中辛弗林含量, 但采用 HPLC 法对不同规格枳实药材中新橙皮苷和柚皮苷同时进行含量测定尚未见报道。为此, 本文采用 HPLC 法对不同规格酸橙枳实药材中新橙皮苷和柚

* 通讯作者 Tel: (020) 39358082 E-mail: zengyuaner@126.com

皮苷的含量进行测定, 为评价枳实药材质量提供一种准确可靠的分析方法, 同时可作为其商品流通和开发研究的参考。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (D D NEX, USA), P680四元梯度泵, ASI-100自动进样系统, 检测器 UVD170U, STH585柱温箱及 CHROMELEON 色谱工作站; Satorius BP211D 电子分析天平 (Satorius Co Ltd Germany 0.01 mg); LIBROR AEG-220 电子分析天平 (SHIMADZU Co Ltd, Japan 0.1 mg); Millipore 纯净水发生器 (Millipore Co Ltd, USA)。

柚皮苷对照品, 中国药品生物制品检定所, 批号 0722-200107; 新橙皮苷对照品 (纯度 $\geq 98.0\%$), Sigma 公司。乙腈为色谱纯, 纯净水为自制, 其余试剂均为国产分析纯。枳实药材经广州中医药大学药用植物教研室张丹雁教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果。

2 方法与结果

2.1 对照品储备液的制备 分别取对照品新橙皮苷、柚皮苷各约 10 mg 精密称定, 置于同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 (每 1 mL 中含新橙皮苷 0.387 mg 柚皮苷 0.408 mg)。

2.2 供试品溶液的制备 将枳实粉碎成粗粉, 分别取粉末约 0.1 g 精密称定, 置具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 加热回流 1.5 h, 取出, 放冷, 密塞, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀。取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 弃去初滤液, 取续滤液即得。

2.3 色谱条件 色谱柱: Merck-Lichrospher RP-C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.3% 磷酸溶液 (20:80); 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长: 283 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 理论塔板数: 以柚皮苷峰计算, 不得低于 2000。色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品储备液 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 分别吸取 10 μL 注入液相色谱仪中, 记录新橙皮苷、柚皮苷峰面积。以进样量为 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得新橙皮苷与柚皮苷线性回归方程分别为:

$$Y = 32.68X - 9.223 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 27.74X - 8.017 \quad r = 0.9997$$

线性范围分别为 0.774~3.87 μg 和 0.816~4.08 μg 。

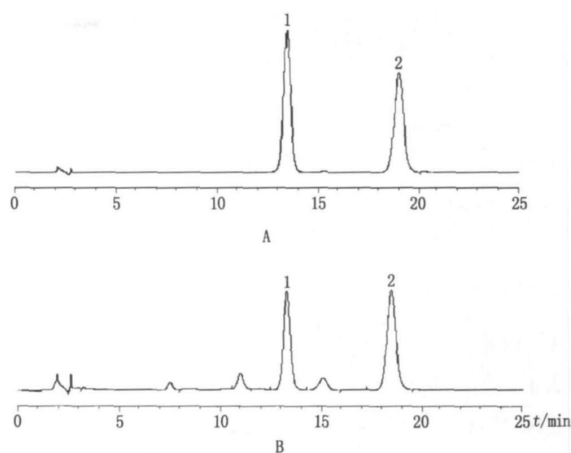


图 1 对照品 (A) 和样品 (直径 1.5~2.5 cm) (B) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substances (A) and sample (diameter 1.5~2.5 cm) (B)

1. 柚皮苷 (naringin) 2. 新橙皮苷 (neohesperidin)

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 (新橙皮苷 0.232 mg $\cdot$ mL⁻¹, 柚皮苷 0.245 mg $\cdot$ mL⁻¹) 10 μL , 按上述色谱条件, 连续进样 6 次, 记录峰面积。结果新橙皮苷平均峰面积 ($n=6$) 为 63.56 RSD 为 1.7%; 柚皮苷平均峰面积 ($n=6$) 为 57.02 RSD 为 1.1%。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 各进样 10 μL , 计算得新橙皮苷及柚皮苷峰面积积分值的 RSD ($n=6$) 分别为 1.2% 和 0.60%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批次药材粉末 0.1 g 共 6 份, 精密称定, 依“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 记录新橙皮苷和柚皮苷峰面积, 计算含量。结果新橙皮苷平均含量 ($n=6$) 为 10.2%, RSD 为 1.7%, 柚皮苷平均含量 ($n=6$) 为 10.2%, RSD 为 0.6%。

2.8 加样回收率试验 分别精密称取已测知含量 (新橙皮苷与柚皮苷含量分别为 10.2%, 10.2%) 枳实药材粉末约 0.05 g 精密加入对照品溶液 (新橙皮苷 0.735 mg $\cdot$ mL⁻¹, 柚皮苷 0.779 mg $\cdot$ mL⁻¹) 6 mL, 依“2.2”项下方法制备供试溶液并测定其含量。结果新橙皮苷及柚皮苷平均回收率 ($n=6$) 分别为 99.4% 和 99.9%, RSD 分别为 1.3% 和 1.6%。

2.9 样品含量测定 将枳实药材按直径大小分为 3 种规格, 分别取 3 种规格的枳实药材粉末约 0.1 g 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定新橙皮苷和柚皮苷的峰面积, 按外标法计算样品中新橙皮苷和柚皮苷的含量, 结果

见表 1。

表 1 不同规格样品的含量测定结果 (%, n = 2)

Tab 1 Results of content detemination of sample of different specifications		
规格 (直径) (diameter) /mm	新橙皮苷 (nchesperidin)	柚皮苷 (naringin)
0.5~ 1.0	14.6	7.02
1.0~ 1.5	12.3	9.78
1.5~ 2.5	10.2	10.2

3 讨论

3.1 在流动相的选择中,乙腈 – 水系统对枳实中黄酮类化合物的分离效果优于甲醇 – 水系统。另外,考虑到目标化合物所含的酚羟基具弱酸性,在水相中加入 0.3% 的磷酸,可改善色谱峰的拖尾,对色谱峰的分离度、峰形等都有较好的效果。在检测波长的选择中,新橙皮苷和柚皮苷均在 283 nm 处有最大吸收值,故选择测定波长为 283 nm。

3.2 本实验对加热回流提取和超声提取 2 种方法进行了考察,确定提取条件为:以甲醇^[5]为提取溶剂、加热回流 1.5 h。该方法具有结果准确、提取效率高的优点。

3.3 枳实为自然脱落的幼果,传统上按生长期及大小将商品药材分为不同规格,实验中按其直径大小划分为 3 个等次,从测定结果来看,不同规格的枳实药材中新橙皮苷和柚皮苷的含量有明显的差异。随着枳实的直径的增大新橙皮苷的含量逐渐降低,而柚皮苷含量随着枳实的直径的增大逐渐升高。活性成分含量的差异将会影响到药材的质量,因此,对

枳实生药进行质量分析和控制是必要的,有利于进一步开发枳实资源,合理用药,保证药材质量的均匀和稳定。对于制备新橙皮苷而言,选择直径小的枳实原料,因其柚皮苷的含量相对较低,有利于新橙皮苷的纯化,从而提高产品的质量和得率。

3.4 本实验只对产地江西新干的不同规格枳实中新橙皮苷和柚皮苷的含量进行了考察,对于其他产地及品种的枳实中两者的含量有待进行进一步研究。

参考文献

1 ChP(中国药典). 2005. VolI (一部): 172

2 DAI Qi- guang(戴启广), CHEN Guo- ping(陈国平), WANG Xing- yi(王幸宜). Novel sweetening agents- dihydrochalcone derivatives(新型甜味剂-二氢查尔酮衍生物). *Fine Chem Intermed* (精细化工中间体), 2004, 34(3): 7

3 XIE Zhen- jian(谢贞建), JIAO Shi- rong(焦士蓉), LI Kai(李恺). Determination of naringin, hesperidin and neohesperidin content in Fructus Aurantii Immaturus from different places by RP- HPLC approach(RP- HPLC 法测定不同产地枳实中的柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷). *JX Hua Univ*(西华大学学报), 2009, 28(2): 25

4 YUAN Cheng(袁诚), WANG Hua(王华), PENG Bi- yun(彭碧云). Quality analysis of different specifications of Fructus Aurantii Immaturus(不同规格枳实药材质量分析研究). *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2005, 16(7): 276

5 YANG Wu- liang(杨武亮), LI Yue- feng(李越峰), REN Yan- dong(任燕冬). Studies on extration of flavones from Fructus Aurantii (枳壳中黄酮提取方法的比较). *J Jiangxi Univ TCM* (江西中医药大学学报), 2005, 17(2): 35

(本文于 2008 年 10 月 16 日收到)