

文章编号: 1006 - 2858(2010)03 - 0231 - 05

HPLC 法测定通舒口爽胶囊中 3 种成分的含量

崔玉芹, 张洪霞, 李 晶, 门金玉, 赵怀清

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立测定通舒口爽胶囊中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷含量的 HPLC 方法。方法 采用 Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相: 甲醇 - 乙腈 - 体积分数为 0.05 % 的磷酸水溶液 (体积比为 20 10 65), 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 柱温: 30 °C, 检测波长: 280 nm。结果 柚皮苷在 8.88 ~ 88.8 mg · L⁻¹ 内呈线性关系 ($r = 0.999\ 7$), 平均回收率为 100.5%; 橙皮苷在 7.60 ~ 76.0 mg · L⁻¹ 内呈线性关系 ($r = 0.999\ 6$), 平均回收率为 100.5%; 新橙皮苷在 10.56 ~ 105.6 mg · L⁻¹ 内呈线性关系 ($r = 0.999\ 9$), 平均回收率为 100.5%。结论 本实验建立的方法可作为通舒口爽胶囊质量控制方法之一。

关键词: 通舒口爽胶囊; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917 **文献标志码:** A

通舒口爽胶囊收载于国家中成药标准汇编内科脾胃分册, 本方来自云南流传的彝药, 由大黄、牡丹皮、当归、枳实、秦艽、茵陈、木贼、夏枯草八味中药制备而成, 具有清热除湿、化浊通便之功效, 用于大肠湿热所致的便秘、口臭、牙龈肿痛^[1]。方中枳实为常用中药, 具有破气消积, 化痰散痞等功效^[2]。枳实主要活性成分为挥发油及黄酮类成分, 其中黄酮类成分主要为柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷^[3], 有研究表明黄酮类成分中橙皮苷对离体肠管有先兴奋后抑制作用, 能降低毛细血管通

透性。橙皮苷、柚皮苷有抗炎作用, 新橙皮苷等黄酮类能抑制毛细血管脂性和恢复损伤所致紫斑而具康复作用。柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷化学结构式见图 1。原有质量标准中没有对枳实的有效成分进行测定, 然而复方中药药效的发挥是多组分共同作用的结果, 为了更好地控制药品质量, 本文作者采用 HPLC 法测定胶囊中枳实的柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷 3 种黄酮类的含量, 为通舒口爽胶囊的质量控制提供参考依据。

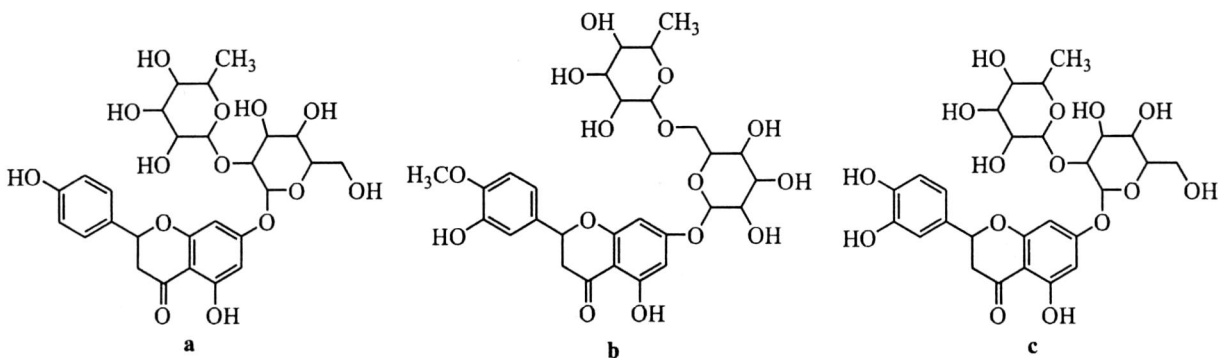


Fig 1 The structures of naringin (a), hesperidin (b) and neohesperidin (c)

1 仪器与试剂

LC - 10ATyp 泵 (日本 Shimadzu 公司),
SPD - 10A_{vp} 检测器 (日本 Shimadzu 公司), KQ -

50B 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

柚皮苷对照品、橙皮苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110722 - 200610、110721 - 200512), 新橙皮苷 (原料药, 纯度质量分数大于

收稿日期: 2009 - 05 - 04

作者简介: 崔玉芹 (1979 -), 女 (汉族), 山东临沂人, 硕士, 主要从事药物分析学研究, E-mail yuqin2895720@163.com; 赵怀清 (1955 -), 男 (汉族), 辽宁锦州人, 教授, 主要从事药物质量评价方法及其药代动力学研究, Tel 024 - 23986250, E-mail zhaohq1955@126.com。

99.5%,上海倍翔生物科技有限公司),甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为自制重蒸水,通舒口爽胶囊(市售品,批号:070501、070502、070601)。

大黄、牡丹皮、当归、枳实、秦艽、茵陈、木贼、夏枯草均为市售中药材,由沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil- C_{18} (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),流动相: 甲醇-乙腈-体积分数为 0.05% 的磷酸水溶液(体积比为 20 10 65),流速: 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$,检测波长: 280 nm,柱温: 30 $^{\circ}$ C,进样量: 20 μ L。

2.2 混合对照品溶液的制备

取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,配制成质量浓度分别为 0.60、0.50、0.40 g $\cdot$ L $^{-1}$ 的柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的储备液。取各对照品储备液 3.7、3.8、6.6 mL 至 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 88.8、76.0、105.6 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 的柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的混合对照品溶液。

2.3 样品溶液的制备

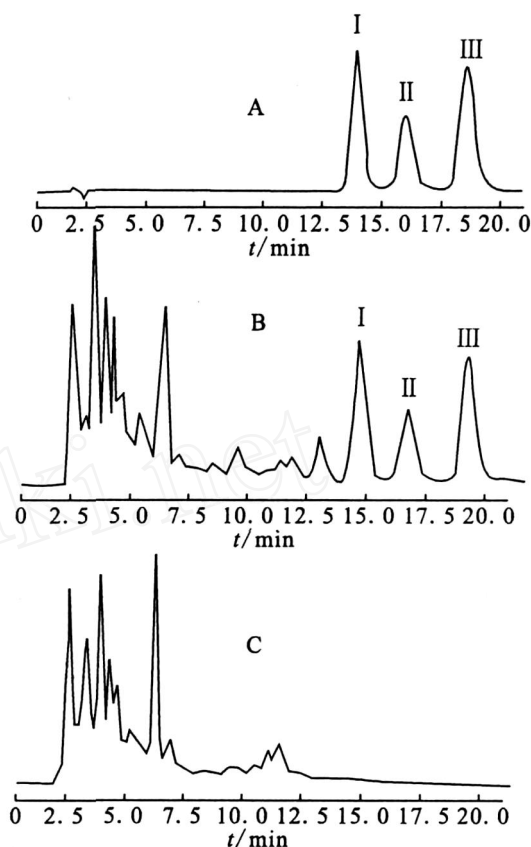
取通舒口爽胶囊内容物约 1.0 g,精密称定,精密加入 30 mL 冰醋酸-甲醇(体积比为 20 80),超声 30 min,过滤,取 15 mL 滤液蒸干,精密加入 25 mL 的重蒸水溶解,用氯仿萃取 3 次,每次 10 mL,取水层 10 mL 减压蒸干后用 10 mL 甲醇溶解,过 0.45 μ m 的微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.4 阴性溶液的制备

按处方比例称取除枳实以外的其余药材,按制备工艺制成缺枳实的阴性样品,按“2.3”条方法制得阴性对照溶液。

2.5 系统适用性试验

取供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5,色谱峰对称因子均在 0.95 ~ 1.05 之间。理论塔板数按柚皮苷计算不低于 4 000;按橙皮苷计低于 3 000;按新橙皮苷计算不低于 4 000。阴性对照对样品测定无干扰,色谱图见图 2。



A—Reference substance; B—Sample; C—Sample without *Citrus aurantium* L.; —Naringin; —Hesperidin; —Neohesperidin

Fig 2 Chromatograms of naringin, hesperidin and neohesperidin

2.6 线性关系的考察

依次精密吸取混合对照品储备液 1、2、4、6 和 8 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成系列质量浓度的混合对照品溶液。分别取上述溶液各 20 μ L,在上述色谱条件下进样分析,以对照品质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,回归方程分别为:

柚皮苷: $Y = 2.909 \times 10^4 X + 2.476 \times 10^2$ ($r = 0.9997$, $n = 6$);

橙皮苷: $Y = 1.939 \times 10^4 X + 2.310 \times 10^2$ ($r = 0.9996$, $n = 6$);

新橙皮苷: $Y = 2.639 \times 10^4 X + 1.466 \times 10^2$ ($r = 0.9999$, $n = 6$)。

结果表明:柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷质量浓度分别在 8.88 ~ 88.80、7.60 ~ 76.00、10.56 ~ 105.60 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 内,质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.7 精密度试验

取同一对照品溶液(柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷)的质量浓度分别 35.52、30.40、42.24 mg·L⁻¹),按上述色谱条件,重复进样 6 次,计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷色谱峰面积的 RSD (*n* = 6)分别为 0.62%、0.81%、0.81%。

2.8 重复性试验

取同一批号(070501)的样品,按“2.3 条方法平行制备 6 份样品,按上述色谱条件进样分析,计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量的 RSD 分别为 0.62%、0.9%、0.86% (*n* = 6)。

2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号: 070501),室温放置,分别于 0、2、4、8、12、24 h 注入液相色谱仪,依法测定。计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷色谱峰面积的 RSD 分别为 0.74%、0.52%、0.51% (*n* = 6)。结果表明样品溶液在 24 h 内比较稳定。

2.10 回收率试验

取已知含量的供试品(批号: 070501)约 0.5 g, 9 份,精密称定,分别加入柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品溶液适量,做成低、中、高 3 种质量浓度,每一质量浓度 3 份,按“2.3 条方法制备样品,按上述方法测定分析,结果见表 1。

Table 1 Results of the recoveries(*n* = 9)

Compound	<i>m</i> _{basic value} /mg	<i>m</i> _{added} /mg	<i>m</i> _{found} /mg	Recovery /%	$\bar{x}$ /%	RSD /%
Naringin	0.913 8	0.420 0	1.338 1	101.0	100.5	0.99
	0.914 2	0.420 0	1.330 7	99.2		
	0.913 5	0.420 0	1.343 1	100.1		
	0.913 3	0.840 0	1.765 7	101.5		
	0.914 7	0.840 0	1.752 9	99.8		
	0.913 6	0.840 0	1.748 0	99.3		
	0.915 1	1.260 0	2.183 1	100.6		
	0.914 9	1.260 0	2.201 3	102.1		
	0.914 6	1.260 0	2.187 9	101.1		
Hesperidin	0.901 4	0.400 0	1.301 7	100.1	100.5	0.95
	0.901 7	0.400 0	1.303 6	100.5		
	0.901 0	0.400 0	1.303 4	100.6		
	0.900 8	0.800 0	1.715 1	101.8		
	0.902 3	0.800 0	1.715 2	101.6		
	0.901 2	0.800 0	1.707 5	100.8		
	0.902 6	1.200 0	2.110 7	100.7		
	0.902 5	1.200 0	2.094 0	99.3		
	0.902 1	1.200 0	2.088 7	98.9		
Neohesperidin	1.221 8	0.544 0	1.774 2	101.5	100.5	0.63
	1.222 3	0.544 0	1.774 4	101.5		
	1.221 3	0.544 0	1.767 3	100.4		
	1.221 1	1.080 0	2.302 5	100.1		
	1.223 1	1.080 0	2.303 4	100.0		
	1.221 6	1.080 0	2.301 3	100.0		
	1.223 5	1.600 0	2.835 1	100.7		
	1.223 3	1.600 0	2.830 2	100.4		
	1.222 8	1.600 0	2.820 3	99.8		

2.11 样品测定

取 3 批通舒口爽胶囊样品,每批 3 份,按“2.2.2 条方法制备供试品溶液,在上述色谱条

件下进样分析,记录色谱峰面积,按外标一点法计算含量。结果见表 2。

Table 2 Determ ination results of samples(n = 3)

Na	Naringin		Hesperidin		Neohesperidin	
	w / %	RSD / %	w / %	RSD / %	w / %	RSD / %
070501	0. 179	1. 00	0. 175	0. 65	0. 240	0. 85
070502	0. 180	0. 65	0. 177	0. 74	0. 241	0. 32
070601	0. 181	0. 44	0. 176	0. 50	0. 241	0. 92

3 讨论

a. 曾参考文献 [2 - 5],采用不同比例的甲醇 - 酸水溶液测定 ,柱效太低 ,不能达到测定的要求 ,采用不同比例的乙腈 - 酸水溶液测定 ,柚皮苷和橙皮苷之间的分离度达不到测定的要求。采用甲醇 - 乙腈 - 酸水系统后 ,使各测定物质的柱效和相邻两物质之间的分离度达到测定要求 ,最终流动相系统定为甲醇 - 乙腈 - 体积分数为 0. 05%的磷酸水溶液 (体积比为 20 10 65)。

b. 柚皮苷最大吸收波长为 283 nm,橙皮苷最大吸收波长为 284 nm,新橙皮苷最大吸收波长为 280 nm,参照文献 [3 - 4],最终选择测定波长为 280 nm。

c. 因为本药方是多味药材组成的复杂的复方 ,且方中有几味药材是原粉入药 ,给测定带来了较大的干扰。参考文献 [2, 4 - 6],用甲醇、不同比例的甲醇 - 水、纯水超声提取 ,测定时干扰较多 ,待测物质的峰和相邻峰之间的分离度达不到要求。对于提取液 ,曾尝试蒸干后 ,用水复溶 ,然后用氯仿萃取 ,留水层进样 ,测定峰周围还有一些较小的干扰峰。据文献 [7]报道柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷在醋酸中有较好的溶解度 ,尝试用不同比例的甲醇 - 醋酸超声提取 ,提取液蒸干后 ,用水复溶 ,然后用氯仿萃取 ,取水层蒸干 ,甲醇复溶

进样 ,待测组分色谱峰周围不再有干扰峰。对不同比例的甲醇 - 醋酸的提取液进行处理进样 ,发现甲醇 - 醋酸 (体积比为 80 20)时提取率最高 ,对不同的超声时间 20、30、45 m in进行比较 ,发现 30 m in和 45 m in无明显差别 ,比 20 m in的提取率高 ,所以提取时间定为 30 m in。

参考文献 :

[1] 国家中成药标准汇编 :内科 ·脾胃分册 [S]. 国家药品监督管理局 ,2002: 48 - 50

[2] 梁远园 ,冯彪 ,祝晨藻 ,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

[3] 张贵军 . 常用中药鉴定大全 [M]. 黑龙江 :黑龙江科技出版社 ,1993: 405

[4] 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

[5] 李秀玲 ,李龙 ,肖红斌 . 反相高效液相色谱法测定枳实、枳壳中橙皮甙和柚皮甙的含量 [J]. 色谱 ,2002, 20 (6): 585 - 586

[6] 邓桂明 ,欧阳荣 ,周新蓓 . 高效液相色谱法测定枳实中橙皮苷的含量 [J]. 医药导报 ,2004, 23 (6): 414 - 415

[7] 赵陆华 . 中药高效液相色谱法应用 [M]. 北京 :中国医药科技出版社 ,2005: 715 - 724

Determ ination of naringin, hesperidin and neohesperidin in Tongshukoushuang capsules by HPLC

CU I Yu-qin, ZHANG Hong-xia, L I J ing, M EN Jin-yu, ZHAO Huai-qing
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of naringin, hesperidin and neohesperidin in Tongshukoushuang (traditional Chinese medicines) capsules **M ethods** The analysis was carried out

on a Diamonsil- C_{18} (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) column with a mobile phase of methanol-acetonitrile-0.05% (Φ) phosphoric acid solution (V V V = 20 10 65). The flow rate was 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$ and column temperature was 30 $^{\circ}$ C. The detection wavelength was set at 280 nm. **Results** The calibration curve was linear within the range of 8.88 - 88.80 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ($r=0.9997$), 7.60 - 76.00 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ($r=0.9996$), 10.56 - 105.60 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ($r=0.9999$), for naringin, hesperidin and neohesperidin, respectively. The average recoveries were 100.5%, 100.5% and 100.5% for naringin, hesperidin and neohesperidin, respectively. **Conclusions** This method is convenient, accurate and reproducible for determination of naringin, hesperidin and neohesperidin in Tongshukoushuang capsules

Key words: Tongshukoushuang capsule; naringin; hesperidin; neohesperidin; HPLC

(上接第 215页)

Determination of the contents of isoflavone glycosides from hydrolyzate of *Mackia amurensis*

ZHANG Huimei, WANG Dong, LI Xiong, CUI Zheng

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To determine the contents of formononetin, afmosin and glycitein after hydrolysis from the bark of *Mackia amurensis* by HPLC. **Methods** A DiamonsilTM C_{18} column was used for HPLC; the mobile phase was acetonitrile and aqua containing 0.05% (w) phosphoric acid with the volume ratio of 35 65 and the UV detection wavelength was set at 260 nm; the flow rate was 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$; the column temperature was 35 $^{\circ}$ C. **Results** The linear range of formononetin was 5.0 - 25.2 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ($r=1.0000$), the average recovery was 98.43% with RSD of 1.04%; the linear range of afmosin was 4.2 - 21.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ($r=0.9996$), the average recovery was 97.62% with RSD of 0.52%, the linear range of glycitein was 4.8 - 24.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ($r=0.9996$), the average recovery was 98.38% with RSD of 0.230%. **Conclusions** The method is stable, precise, reproductive and can be applied to the determination of formononetin, afmosin and glycitein

Key words: *Mackia amurensis*; isoflavone; hydrolysis; assaying; HPLC