

[质 量]

RP-HPLC 法测定橘红丸中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷和迷迭香酸

谢强胜, 王 坤, 尹宁宁

(山东省食品药品检验所, 山东 济南 250101)

摘要: 目的 建立同时检测橘红丸(化橘红、陈皮、甘草、炒紫苏子等)中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷和迷迭香酸的测定方法。

方法 采用 RP-HPLC 法。C₁₈ 色谱柱; 甲醇-0.3% 磷酸水溶液为流动相; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 284 nm。结果

根据回归方程 4 种成分线性范围分别为甘草苷 2.16 ~ 64.8 μg/mL $R^2 = 0.999\ 6$; 柚皮苷 7.59 ~ 227.7 μg/mL $R^2 = 0.999\ 2$; 橙皮苷 7.54 ~ 226.62 μg/mL $R^2 = 0.999\ 5$; 迷迭香酸 1.704 ~ 51.12 μg/mL $R^2 = 0.998\ 9$ 。平均回收率分别为甘草苷 102.1% ,RSD 1.43% ($n=6$) 柚皮苷 100.8% ,RSD 0.71% ($n=6$) ,橙皮苷 98.7% ,RSD 1.44% ($n=6$) ,迷迭香酸 99.6% ,RSD 0.82% ($n=6$)。结论 该方法经济适用,操作简便、准确,重复性好,可用于橘红丸的质量控制。

关键词: 橘红丸; 甘草苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 迷迭香酸; 反相高效液相色谱

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)12-2085-04

Determination of liquiritin ,naringin ,hesperidin ,and rosmarinic acid in Juhong Pill by RP-HPLC

XIE Qiang-sheng , WANG Kun , YIN Ning-ning

(Shandong Provincial Institute for Food and Drug Control , Jinan 250101 , China)

ABSTRACT: **AIM** To develop a method for determining liquiritin ,naringin ,hesperidin ,and rosmarinic acid in Juhong Pill (*Citri grandis Exocarpium* , *Citri reticulatae Pericarpium* , *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* , *Perillae Fructus* , etc.) . **METHODS** The quantitative analysis was carried out on a column of Thermo Hypersil BDS C₁₈ by RP-HPLC , by using a mobile phase of CH₃OH - 0.3% phosphoric acid under a flow rate of 1.0 mL/min. 284 nm was selected as the detection wavelength. **RESULTS** The linear ranges of liquiritin ,naringin ,hesperidin , and rosmarinic acid fell within the ranges of 2.16-64.8 μg/mL , 7.59-227.7 μg/mL , 7.54-226.62 μg/mL and 1.704-51.12 μg/mL , respectively. The four components showed good linear correlations ($R^2 = 0.999\ 6$, $0.999\ 2$, $0.999\ 5$, $0.998\ 9$) . The recoveries were 102.1% for liquiritin , 100.8% for naringin , 98.7% for hesperidin , 99.6% for rosmarinic acid , respectively. The relative standard deviations were 1.43% , 0.71% , 1.44% , and 0.82% , respectively ($n=6$) . **CONCLUSION** This method is simple , economical , accurate , reproducible and convenient for the quality control over Juhong Pill.

KEY WORDS: Juhong Pill; liquiritin; naringin; hesperidin; rosmarinic acid; RP-HPLC

橘红丸收载于《中国药典》2010 年版一部^[1], 处方是由《古今医鉴》之清金降火汤^[2]处方加减而成, 由化橘红、陈皮、甘草、炒紫苏子等十五味药组成, 具清肺、化痰、止咳之功效, 用于痰热咳嗽、痰多、色黄黏稠、胸闷口干等症。橘红丸现行标准中含量测定是以柚皮苷为指标, 测定化橘红中柚皮苷含量^[3-4]。本实验参考相关报道^[5-6]增加了对其陈皮(臣药)、

甘草及炒紫苏子等药味有效成分橙皮苷^[7]、甘草苷^[8]、迷迭香酸^[9]的定量测定, 通过方法学验证, 该方法操作简便、准确、重复性好, 有利于更好的对橘红丸进行质量评价和监控。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 液相色谱仪, LC solutions 工作站 (日本岛津公司); UV-2550 紫外分光光度计 (日本

收稿日期: 2011-05-04

作者简介: 谢强胜 (1979—) 男, 主管药师, 硕士, 从事药品检验及质量标准研究。Tel: (0531) 81216523, E-mail: xieqiangsheng@yahoo.com.

cn

岛津公司); METTLER AE240 电子天平(瑞士梅特勒公司)。甘草苷(批号 111610-200604)、柚皮苷(批号 110722-200610)、橙皮苷(批号 110721-200512)对照品均购自于中国药品生物制品检定所,迷迭香酸(批号 09092931)对照品购自于北京百灵威科技有限公司;甲醇(分析纯、色谱纯);橘红丸(批号 9035022,北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂;批号 20081209,马鞍山神鹿科瑞药业有限公司;

批号 090202,成都九芝堂金鼎药业有限公司),均为水蜜丸。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.5 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.3%磷酸溶液(25:75),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 284 nm,柱温 35℃;进样量 10 μL。色谱图见图 1。

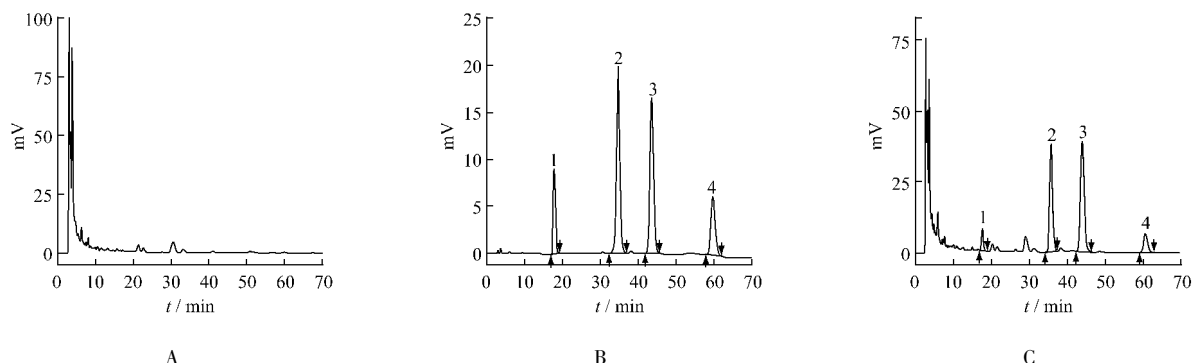


图 1 阴性对照(A)、混合对照品(B)和橘红丸(C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of negative sample(A), mixed reference substances(B) and Juhong Pills(C)

1. 甘草苷 2. 柚皮苷 3. 橙皮苷 4. 迷迭香酸
1. liquiritin 2. naringin 3. hesperidin 4. rosmarinic acid

2.2 对照品溶液的制备 精密称取甘草苷、柚皮苷、橙皮苷和迷迭香酸适量,分别配成质量浓度为 21.6、75.9、75.54、17.04 μg/mL 混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取供试品 1.0g,精密称定,精密加入甲醇 25mL,称定质量,超声处理 30min,用甲醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性溶液的制备 取不加甘草、化橘红、陈皮、炒紫苏子的空白样品按照供试品溶液的制备项下的方法,制成溶液,即得。

2.5 线性关系考察 取适量对照品溶液,分别进样 1、5、10、15、20、30μL,由峰面积对质量浓度求得工作曲线,得回归方程。甘草苷: $A = 1637.2C - 15187$, $R^2 = 0.9996$,线性范围: 2.16 ~ 64.8 μg/mL。柚皮苷: $A = 1844.6C + 5564.5$, $R^2 = 0.9992$,线性范围: 7.59 ~ 227.7 μg/mL。橙皮苷: $A = 1876.1C - 27754$, $R^2 = 0.9995$,线性范围: 7.54 ~ 226.62 μg/mL。迷迭香酸: $A = 1968.6C - 11162$, $R^2 = 0.9989$,线性范围: 1.704 ~ 51.12 μg/mL。

2.6 精密度试验 取同一橘红丸供试品溶液(批号 9035022),连续进样 6 次,测定峰面积值,计算得甘草苷 RSD 为 1.26%,柚皮苷 RSD 为 0.63%,橙皮苷 RSD 为 0.77%,迷迭香酸 RSD 为 1.40%。

2.7 稳定性试验 取同一橘红丸供试品溶液(批号 9035022),分别于 0、2、4、6、8 h 进样,测定峰面积值,计算得甘草苷 RSD 为 1.12%,柚皮苷 RSD 为 0.73%,橙皮苷 RSD 为 0.22%,迷迭香酸 RSD 为 1.53%。

2.8 重复性试验 取同一批橘红丸(批号 9035022) 6 份,按供试品溶液制备项下方法进行制备,在上述色谱条件下分别进样测定并计算。甘草苷平均质量分数为 0.423 mg/g, RSD 为 0.93%;柚皮苷质量分数为 2.915 mg/g, RSD 为 0.33%;橙皮苷质量分数为 3.538 mg/g, RSD 为 1.16%;迷迭香酸质量分数为 0.091 mg/g, RSD 为 1.39%。

2.9 加样回收试验 取批号 9035022 橘红丸 6 份,精密称取 0.50 g(约相当于甘草苷 0.212 mg、柚皮苷 1.458 mg、橙皮苷 1.761 mg 和迷迭香酸 0.046 mg),分别置 25 mL 量瓶中,精密加入对照品溶液(甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、迷迭香酸质量浓度分别为 0.043 0、0.292 1、0.351 4、0.009 2 mg/mL) 5 mL,加入甲醇至刻度,称定质量,超声处理 30 min,用甲醇补足减失的质量,滤过,取滤液即得。并按上述色谱条件进行测定,计算回收率,结果表明本法具有良好的回收率,结果见表 1~4。

2.10 样品的测定 取不同厂家橘红丸 3 批,按

表 1 甘草苷的加样回收率试验结果

Tab. 1 The results of recovery test of liquiritin

取样量	原有量	加入量	实测总	回收率	平均回收	RSD
/g	/mg	/mg	量/mg	/%	率/%	/%
0.501 9	0.210 1	0.215 0	0.428 1	101.4		
0.502 8	0.210 5	0.215 0	0.427 7	101.0		
0.506 4	0.212 0	0.215 0	0.432 9	102.7	102.1	1.02
0.496 6	0.207 9	0.215 0	0.426 4	101.6		
0.505 7	0.211 7	0.215 0	0.435	103.8		
0.498 3	0.208 6	0.215 0	0.428 1	102.1		

表 2 柚皮苷的加样回收率试验结果

Tab. 2 The results of recovery test of naringin

取样量	原有量	加入量	实测总	回收率	平均回收	RSD
/g	/mg	/mg	量/mg	/%	率/%	/%
0.501 9	1.454 0	1.460 5	2.929 9	101.1		
0.502 8	1.456 6	1.460 5	2.933	101.1		
0.506 4	1.467 0	1.460 5	2.928	100.0	100.8	0.86
0.496 6	1.438 6	1.460 5	2.930 5	102.1		
0.505 7	1.465 0	1.460 5	2.921 1	99.7		
0.498 3	1.443 5	1.460 5	2.915 7	100.8		

表 3 橙皮苷的加样回收率试验结果

Tab. 3 The results of recovery test of hesperidin

取样量	原有量	加入量	实测总	回收率	平均回收	RSD
/g	/mg	/mg	量/mg	/%	率/%	/%
0.501 9	1.792 0	1.757 0	3.507 9	97.7		
0.502 8	1.795 2	1.757 0	3.536 6	99.1		
0.506 4	1.808 1	1.757 0	3.520 3	97.5	98.7	1.29
0.496 6	1.773 1	1.757 0	3.532 7	100.1		
0.505 7	1.805 6	1.757 0	3.523 1	97.8		
0.498 3	1.779 2	1.757 0	3.540 2	100.2		

表 5 橘红丸中有效成分的测定结果 (n=3)

Tab. 5 Determination of active components in Juhong Pills (n=3)

批号	甘草苷/(mg/g)	RSD/%	柚皮苷/(mg/g)	RSD/%	橙皮苷/(mg/g)	RSD/%	迷迭香酸/(mg/g)	RSD/%
9035022	0.418 7	0.36	2.896 9	0.12	3.570 5	0.12	0.091 3	0.86
20081209	0.064 8	0.29	1.891 1	0.60	2.935 6	0.22	0.031 7	0.35
090202	0.068 8	0.57	1.656 9	0.41	3.123 1	0.74	0.056 9	0.19

柚皮苷、迷迭香酸对 3 种溶媒无选择性,而橙皮苷以甲醇为溶媒提取量最高^[13],故选择甲醇作为本实验的提取溶媒。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 69-70, 80-81, 176-177, 318, 1222-1223.

[2] 李世华, 王育学, 薛军, 等. 龚廷贤医学全书[M]//龚信. 古今医鉴. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 1205.

[3] 陈志霞, 林励, 孙冬梅. 橘红黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2003, 34(7): 657.

[4] 黄美声, 沈玉刚. 反相高效液相色谱法测定橘红中柚皮苷

表 4 迷迭香酸的加样回收率试验结果

Tab. 4 The results of recovery test of rosmarinic acid

取样量	原有量	加入量	实测总	回收率	平均回收	RSD
/g	/mg	/mg	量/mg	/%	率/%	/%
0.501 9	0.045 8	0.046 0	0.091 7	99.7		
0.502 8	0.045 9	0.046 0	0.091 6	99.3		
0.506 4	0.046 2	0.046 0	0.092 3	100.1	99.6	0.70
0.496 6	0.045 3	0.046 0	0.091 2	99.7		
0.505 7	0.046 2	0.046 0	0.092 4	100.5		
0.498 3	0.045 5	0.046 0	0.090 8	98.5		

供试品溶液制备项下方法进行测定,按外标法计算,结果见表 5。

3 讨论

3.1 提取方法的选择^[10]: 分别使用超声和加热回流两种方式处理,各进行 15 min、30 min、60 min 时间考察。实验结果显示两种提取方式相当,15 min 提取不完全,而提取 30 min 和 60 min 效果相当,故提取方法确定为超声处理 30 min 进行提取。

3.2 吸收波长的选择: 用紫外分光光度计对对照品溶液进行 190~400 nm 扫描,甘草苷在 277 nm 有最大吸收;柚皮苷^[11]和橙皮苷在 284 nm 处有最大吸收,迷迭香酸在 291 nm 处有最大吸收。通过对全光谱扫描图比较 4 种物质在 284 nm 均有紫外吸收且分离效果好、峰型好,而柚皮苷和橙皮苷均有最大吸收峰,故采用 284 nm 为本实验的吸收波长。

3.3 提取溶媒的选择: 对样品分别采用 30% 甲醇溶液、70% 甲醇溶液、甲醇为溶媒进行提取,甘草苷、

的含量[J]. 中草药, 1990, 21(5): 15.

[5] 丁桂兰, 薛亚光, 邢春来, 等. HPLC 法测定橘红丸中柚皮苷、橙皮苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(9): 707.

[6] 李伟光, 梁敬钰. 迷迭香酸的研究进展[J]. 海峡药学, 2004, 16(1): 1.

[7] 王静竹, 陈定一, 王晶. 高效液相法测定陈皮中橙皮甙的含量[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(7): 424.

[8] 伍蔚萍, 阎宏涛, 孙文基. HPLC 法测定甘草中甘草苷的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(4): 425.

[9] 黄亮辉, 苏琪, 赵婷婷, 等. 白苏子和紫苏子生品及其炮制品中迷迭香酸的含量测定[J]. 中药材, 2010, 33(12): 1856.

[10] 陈永刚, 林励, 魏燕华, 等. 超声波提取法与索氏提取法提取橘红柚皮苷的比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(4): 309.

[11] 袁旭江 林 励 陈志霞. 化橘红中柚皮苷元的含量特点探讨
[J]. 广州中医药大学学报 2004 21(5):391.

[12] 姜舜尧. HPLC 法测定 2 种含陈皮中成药中的橙皮苷含量
[J]. 中成药 2001 23(8):612.

枳术颗粒质量标准研究

张 俐, 王 玉

(江苏省食品药品检验所, 江苏 南京 210008)

摘要:目的 建立枳术颗粒(枳实、白术、荷叶)的质量控制方法。方法 采用薄层色谱法鉴别本制剂中的枳实、白术、荷叶;采用高效液相色谱法测定本制剂中辛弗林、荷叶碱、柚皮苷、新橙皮苷。辛弗林色谱条件:流动相 甲醇-水(含 0.2% 磷酸钠 0.3% 十二烷基硫酸钠,用磷酸调 pH 值至 3.5)(50:50);检测波长 275 nm。荷叶碱色谱条件:以乙腈为流动相 A,以水(含 2.2% 三乙胺,1.1% 冰醋酸)为流动相 B 梯度洗脱;检测波长为 270 nm。柚皮苷和新橙皮苷色谱条件:流动相 乙腈-水(20:80);检测波长 284 nm。结果 定性鉴别方法专属性强、薄层效果佳。辛弗林的进样量在 0.020 6~1.028 3 μg 范围内呈现良好的线性关系 相关系数 $r=0.999\ 9$;荷叶碱的进样量在 0.020 9~0.521 μg 范围内呈现良好的线性关系 相关系数 $r=0.999\ 9$;柚皮苷进样量在 0.377~3.770 μg 范围内呈现良好的线性关系 相关系数 $r=1.000\ 0$;新橙皮苷进样量在 0.301 6~3.016 μg 范围内呈现良好的线性关系 相关系数 $r=1.000\ 0$ 。4 个待测成分的平均回收率分别为 99.7%、97.8%、99.9%、99.5%(RSD%均 $\leq 2.0\%$)。结论 本方法准确可靠、重现性好,可有效控制枳术颗粒的质量。

关键词: 枳术颗粒; 辛弗林; 荷叶碱; 柚皮苷; 新橙皮苷; TLC; RP-HPLC; 质量标准

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-4528(2011)12-2088-07

Quality standard for Zhizhu Granules

ZHANG Li, WANG Yu

(Jiangsu Provincial Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the quality standard for Zhizhu Granules (*Aurantii Fructus immaturus*, *Atractylodes macrocephala Rhizoma*, *Nelumbinis Folium*). **METHODS** In the prescription, *Aurantii Fructus immaturus*, *Atractylodes macrocephala Rhizoma*, *Nelumbinis Folium* were identified by TLC, and RP-HPLC was adopted to determine synephrine, nuciferine, naringin, neohesperidin in the granules. The chromatographic conditions of synephrine included the methanol-water (containing 0.2% Na_3PO_4 , 0.3% SDS, adjusting pH to 3.5 by H_3PO_4) (50:50) as the mobile phase at the detection wavelength of 275 nm. Nuciferine was determined with acetonitrile-water (containing 2.2% triethylamine, 1.1% acetic acid) as gradient eluent at the detection wavelength of 270 nm. The contents of naringin and neohesperidin were determined once by HPLC with mobile phase consisting of acetonitrile-water (20:80). The UV wavelength was set at 284 nm. **RESULTS** The established identification methods were proper and reflecting a good specificity. The experiment showed good linear relationship at the ranges of 0.020 6~1.028 3 μg for synephrine, 0.020 9~0.521 μg for nuciferine, 0.377~3.770 μg for naringin, 0.301 6~3.016 μg for neohesperidin ($r=0.999\ 9$, $0.999\ 9$, $1.000\ 0$, $1.000\ 0$), respectively. In addition, the average recoveries were 99.7%, 97.8%, 99.9%, 99.5% (RSD $\leq 2.0\%$), respectively. **CONCLUSION** The established methods are not only practical but capable of effectively controlling the quality of Zhizhu Granules.

KEY WORDS: Zhizhu Granules; synephrine; nuciferine; naringin; neohesperidin; TLC; RP-HPLC; quality standard

收稿日期: 2011-08-29

作者简介: 张 俐(1972—)女,副主任药师,硕士,研究方向: 中药分析。Tel: (025) 86632807, E-mail: timsmother@126.com