

筛选了适宜的流动相甲醇-水-冰醋酸(36.4 : 63 : 0.6),在此条件下,阿魏酸与血浆中蛋白质杂峰、内源性物质、当归提取物的其他成分以及这些成分的体内代谢物和结合性成分均能很好的分离,峰形良好,且阿魏酸保留时间适宜(约10 min),最低检测质量浓度1.49 ng/ μ L,精密度好。

本检测方法的建立为活血温里复方中活血药主要有效成分阿魏酸血药浓度和生物利用度的研究提供了可靠的检测方法。

References:

- [1] Liu W J, Yang L, Qin W J. Determination of ferulic acid in rat serum by HPLC after oral administration of Shuguan Liquid extract [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36 (5): 339-340.
- [2] Huang J Q, Huang X, Zhang L, *et al.* Improved RP-HPLC method for determination of ferulic acid concentration in human serum [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (9): 792-794.
- [3] Xia D Y, Guo T, Pan W H, *et al.* Determination of plasma level of ferulic acid in Xinshu Oral Liquid by HPLC and its *in vivo* pharmacokinetics in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (1): 36-38.

从枳壳中分离纯化新橙皮苷对照品

许永兴,瞿海斌,程翼宇*

(浙江大学 中药科学与工程学系,浙江 杭州 310027)

摘要:目的 从枳壳提取物中分离纯化高纯度新橙皮苷。方法 枳壳提取物经大孔树脂处理后,用正丁醇萃取分离、浓缩,将浓缩物重结晶3次。正丁醇萃取物的浓缩是关键。结果 优化的枳壳提取物中分离新橙皮苷的工艺使新橙皮苷的纯化得率达48.6%,纯度达98.7%。结论 该方法简单易行,为制备高纯度的新橙皮苷提供了一种经济、可行的方法。

关键词:枳壳;新橙皮苷;分离;纯化

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)04-0525-03

Isolation and purification of neohesperidin reference substance from *Fructus Aurantii*

XU Yong-xing, QU Hai-bin, CHENG Yi-yu

(Department of Chinese Medicine Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310072, China)

Abstract: Objective To isolate and purify high-purity neohesperidin from *Fructus Aurantii* extract. **Methods** *Fructus Aurantii* extract was treated by macroporous resin and extracted by *n*-butanol, then concentrated and some solid was precipitated. After crystallizing the precipitate three times, neohesperidin was obtained. The concentration of *n*-butanol extract was optimized, which was of great importance in the whole preparation. **Results** The yield of neohesperidin was 48.6% and purity of neohesperidin was up to 98.7% in *Fructus Aurantii* extract. **Conclusion** High-purity neohesperidin could be prepared feasibly and economically by proposed method.

Key words: *Fructus Aurantii*; neohesperidin; isolation; purification

新橙皮苷属于黄酮体化合物中的二氢黄酮类,通常在酸橙、枳实、枳壳、陈皮中含量较高。新橙皮苷经氢化处理后形成新橙皮苷二氢查耳酮,是一种特殊的甜味剂,其甜度是蔗糖的1 000倍。而且新橙皮苷具有较好的耐热性和耐酸性,在食品的杀菌和加工过程中很稳定,可广泛应用于热处理的食品。目前,新橙皮苷在欧美一些国家已开始应用,但由于生产成本较高,使用受到限制。另外,也有报道新橙皮

苷二氢查耳酮是一种前景广阔的新型药用赋型剂。

新橙皮苷多从柑橘类植物中提取,但柑橘类植物中除了新橙皮苷之外,往往还含有柚皮苷、橙皮苷等理化性质非常接近的黄酮苷类物质,这使得从柑橘类植物中分离新橙皮苷非常困难。Del Rio等研究了西班牙产的不同品种、不同季节的柑橘中的新橙皮苷、柚皮和橙皮苷的含量,选择了一个新橙皮苷含量很高,而柚皮和橙皮苷含量很少的柑橘品种来提

收稿日期:2004-06-04

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划资助项目(90209005)

作者简介:许永兴(1976—),男,浙江东阳人,硕士研究生,研究方向为制药工程。

* 通讯作者 E-mail: chengyy@zju.edu.cn

取新橙皮苷^[1]。本实验利用新橙皮苷和柚皮苷在正丁醇和水中溶解度的差异从枳壳提取物中分离高纯度橙皮苷,大大扩大了提取新橙皮苷的原料取材范围,使得一些柚皮苷和新橙皮苷含量都较高的原料(如枳壳)也可以使用。

1 材料与仪器

新橙皮苷、柚皮苷对照品(Sigma 公司,纯度均大于 98%),枳壳药材产于江西,购自华东医药股份有限公司,试剂均为分析纯。岛津高效液相色谱仪。

2 方法与结果

2.1 新橙皮苷的 HPLC 测定^[2]

2.1.1 色谱条件:Lichrospher C₁₈柱,流动相为乙腈-水(20:80),体积流量为 1 mL/min,检测波长为 280 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备:精密称取新橙皮苷对照品 5.57 mg,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 标准曲线的绘制:精密吸取新橙皮苷对照品溶液 5、10、15、20、30、40 μ L,在上述色谱条件下进样,测定峰面积值。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算得回归方程 $A=2 \times 10^5 C + 544\ 842$, $r=0.999\ 8$ 。结果表明新橙皮苷在 2.285~22.28 μ g 与峰面积呈良好线性关系。

2.2 枳壳提取液的制备:称取枳壳药材 440 g,用 8 倍量水煎煮 2 h,然后再用 8 倍量的 95%乙醇回流提取 2 h。将水提物减压浓缩至 250 mL;过 D-101 大孔树脂柱(80 cm $\times$ 5.0 cm),用 30%乙醇洗脱 1 600 mL,弃去,用 60%乙醇洗脱 2 000 mL,收集 60%乙醇段,与 95%乙醇提取液合并,减压浓缩至无乙醇。加适量的水,得 600 mL 浓缩液。液相分析结果表明提取液中新橙皮苷的质量浓度为 13.66 g/L。

2.3 用正丁醇萃取分离枳壳提取液:正丁醇与枳壳提取液体积比按 1.2:1,用 3 600 mL 正丁醇萃取 5 次,所得萃余液中新橙皮苷的质量浓度仅为 0.14 g/L,萃取率为 $[(13.66 - 0.14) \times 0.6] / (13.66 \times 0.6) = 99.0\%$ 。可见按本法可以把大部分的新橙皮苷转移到正丁醇相。

2.4 正丁醇萃取液的减压浓缩:将正丁醇萃取液 3 600 mL 加入 400 mL 正丁醇稀释成 4 000 mL 正丁醇母液,测得新橙皮苷的质量浓度为 2.03 g/L。将其平均分成 5 份(800 mL/份),分别浓缩到不同的体积(表 1),放置过夜,使沉淀完全。

2.5 新橙皮苷纯度的测定:采用高效液相色谱面积归一化法评价纯度,这个纯度并不是新橙皮苷真正

的纯度,但它可以反映混合物中新橙皮苷的质量分数,将这个纯度称之为表观纯度(P_{app})。

2.6 纯化得率的计算:按下式计算。

纯化得率 = 结晶量 $\times$ 结晶体的表观纯度/(浓缩前正丁醇萃取液 $\times$ 新橙皮苷质量浓度) $\times 100\%$

2.7 测定结果:测定了各自的固体沉淀量及沉淀中新橙皮苷的表观纯度 P_{app} ,同时测定了各沉淀经第 1 次重结晶后的晶体量及晶体中新橙皮苷的表观纯度,见表 1。可以看出,随浓缩倍数的增加,固体沉淀量增多,固体沉淀的表观纯度逐渐减少;结晶量先增多后减少,直到最后不能形成晶体,而结晶纯度逐渐降低。在本实验条件下,C 方案的纯化得率最高。但由于各枳壳提取液本身的新橙皮苷的质量浓度各不相同,杂质种类、多少也不一样,所以本实验的结论对于另外的实验只能是一个参考的作用。

2.8 枳壳提取液中杂质对新橙皮苷的促溶作用:将正丁醇萃取液浓缩结晶,分离晶体,取上清液,测定上清液中新橙皮苷的质量浓度,结果见表 1。这个质量浓度可以认为是新橙皮苷在各自不同环境中的饱和浓度。浓缩倍数越高,杂质越多,新橙皮苷的饱和浓度也越高,显示了杂质对新橙皮苷的促溶能力。

表 1 各不同方案下新橙皮苷产量、表观纯度和得率
Table 1 Output, apparent purity, and yield of neohesperidin at different operation

编号	浓缩操作			沉淀操作		结晶操作		新橙皮苷纯化得率/%	上清液中 新橙皮苷/ (g $\cdot$ L ⁻¹)
	浓缩前体 积/mL	浓缩后体 积/mL	浓缩 倍数	固体沉 淀量/g	表观纯 度/%	结晶 量/g	表观纯 度/%		
A	800	310	2.6	0.864	79.32	0.432	94.52	24.9	8.46
B	800	210	3.8	1.928	78.44	0.897	94.04	51.4	8.70
C	800	160	5.0	2.967	74.08	1.053	91.92	59.0	12.32
D	800	125	6.4	4.128	69.13	0.632	89.16	34.7	18.60
E	800	50	16.0	4.858	62.96	0	—	—	25.71

2.9 新橙皮苷的重结晶:最佳纯化方案得到的新橙皮苷结晶还含有相当一部分的杂质,所以对结晶体用 50%乙醇又进行了两次重结晶,得白色针状晶体 0.8 g,经 HPLC 法检测纯度为 98.7%,纯化得率为 48.6%。相当于从 88 g 枳壳中提取的提取物,所以从枳壳中提取新橙皮苷的产品得率为 0.9%。

3 讨论

3.1 枳壳提取物的预处理:枳壳提取物中的多糖类物质会使正丁醇萃取过程发生较为严重的乳化现象,所以在萃取前枳壳提取物最好经大孔树脂分离纯化;另外,乙醇的存在会影响正丁醇和水的分层,所以萃取前枳壳提取物应除去乙醇。

3.2 不同浓缩比例对新橙皮苷得率和纯度的影响:由表 1 可知,从 A 到 C 过程析出的主要是新橙皮

苷,杂质却因未到饱和而很少析出,所以固体沉淀量增加(从0.864 g增加到2.967 g),但其表观纯度下降不大(从79.32%下降到74.08%)。从C到E过程,柚皮苷等杂质也逐渐达到饱和析出,所以固体沉淀量迅速增加(从2.967 g增加到4.858 g),表观纯度下降明显(从74.08%下降到62.96%)。从结晶的角度看,在D和E中,虽然固体沉淀量很多,但由于固体沉淀中杂质太多,其中不单只有柚皮苷,还有许多色素类杂质都沉淀析出,对结晶产生很大的影响,直至E无法结晶。所以,本实验中新橙皮苷的分离是一种基于新橙皮苷和柚皮苷在正丁醇溶解度差异的分离方法,所以正丁醇萃取液的减压浓缩的程度是非常关键的一步,直接关系到新橙皮苷的纯度和

生产得率。

3.3 杂质促溶作用对新橙皮苷产品得率的影响:表1显示的促溶能力暗示着枳壳的提取方法对最终新橙皮苷产品得率的影响是非常复杂的,一方面是新橙皮苷提取率对最终产品得率的影响;还有另一个不能忽略的方面是不同的提取方法会带入不同的杂质,这也会对最终产品得率和质量产生影响。

References:

- [1] Del Rio J A, Fuster M D, Sabate F, et al. Selection of *Citrus* varieties highly productive for the neohesperidin dihydrochalcone precursor [J]. *Food Chem*, 1997, 59: 433-437.
- [2] Li J, Shi R B, Lin B. Quantitative determination of neohesperidin in the antidepressive fraction of Sini Powder by RP-HPLC [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2004, 27 (1): 54-56.

RP-HPLC 法测定金槐冠心病片中薯蓣皂苷元的含量

徐雄良¹, 向 轶¹, 柯尊洪², 张志荣^{1*}

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 成都康弘科技实业(集团)有限公司, 四川 成都 610041)

摘要:目的 建立 RP-HPLC 法测定金槐冠心病片中薯蓣皂苷元含量的方法。方法 采用 RP-HPLC 法, Shim-pack CLC-ODS 柱(150 mm×6.0 mm, 5 μm), 以甲醇-乙腈(3:2)为流动相, 在 206 nm 波长下测定样品水解后的薯蓣皂苷元含量。结果 该方法专属性强; 平均空白回收率为 95.6%, RSD 为 2.44%, 平均加样回收率为 98.7%, RSD 为 2.66% (n=6)。结论 该方法简便, 分离效果好, 可用于金槐冠心病片中薯蓣皂苷元的质量控制。

关键词: 金槐冠心病片; 薯蓣皂苷元; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)04-0527-03

Quantitative analysis of diosgenin in Jinhuai Guanxin Tablet by RP-HPLC

XU Xiong-liang¹, XIANG Yi¹, KE Zun-hong², ZHANG Zhi-rong¹

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu Kanghong Science and Technology Industry (Group) Co., Ltd., Chengdu 610041, China)

Key words: Jinhuai Guanxin Tablet; diosgenin; HPLC

金槐冠心病片由四川省中药研究所于 1973 年研制, 对冠状动脉粥样硬化性冠心病具有较好的治疗效果^[1], 收载于《四川省药品标准》(中药成方制剂, 1993 年版)。本品由穿山龙、槐米、雪胆 3 味药材经提取压制而成, 具有活血、散结、通脉等功效。原标准未对其质量进行控制。穿山龙为方中主药, 主要含有多种水溶性和水不溶性皂苷, 其中水不溶性皂苷主要为薯蓣皂苷元与不同糖类结合而成的薯蓣皂苷, 常通过测定水解后生成的薯蓣皂苷元来控制穿山龙的质量。由于本品穿山龙是以 70% 乙醇渗漉后的提

取物投料, 因此可通过直接水解穿山龙总皂苷来测定片中的薯蓣皂苷元。文献报道^[2]在低波长下采用 RP-HPLC 测定穿山龙中薯蓣皂苷元的含量, 本实验在此基础上进一步考察其色谱条件, 测定金槐冠心病片中薯蓣皂苷元的含量。该方法简便、分离效果好, 可用于控制本品的质量。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10Avp 高效液相色谱仪, 包括 SPD-10Avp 紫外可见光检测器, CLASS-VP V5.03 色谱数据处理工作站; CQ-250 型超声波清

收稿日期: 2004-07-06

基金项目: 四川省重点科技项目(01SG008-01)

* 通讯作者 Tel: (028) 85501566 Fax: (028) 85456898 E-mail: zrztl@vip.sina.com