

HPLC 法测定枳壳中川陈皮素

徐欢,陈海芳,余宝金,介磊,罗小泉,杨武亮

(江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室,江西 南昌 330004)

摘要:目的 建立 HPLC 测定枳壳中川陈皮素的方法。方法 选用色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(55:45),检测波长 330 nm,体积流量为 1.0 mL/min,柱温 25℃。结果 川陈皮素进样量在 61.4~614 ng 与峰面积呈良好线性关系($r=0.99981, n=6$);川陈皮素的加样回收率 99.81%(RSD=2.38%)。结论 该法简便、准确、可靠,可作为枳壳药材中川陈皮素测定的有效方法。

关键词: HPLC 法;定量测定;枳壳;川陈皮素

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)01-0142-02

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。具有理气宽中、行滞消胀之功^[1]。为了进一步探讨枳壳中理气作用的活性化学成分,本实验对枳壳提取物进行了进一步的研究。活性跟踪发现,取自氯仿萃取层的提取物小剂量对正常小鼠胃肠运动有促进作用,大剂量具有抑制作用,川陈皮素为枳壳提取物中氯仿萃取层的主要成分之一。另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^[2-4]。本实验采用 HPLC 法测定不同产地枳壳药材和饮片中的川陈皮素的量,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 仪器与试剂

1.1 仪器:Agilent 1200 高效液相色谱仪,VWD 检测器,Agilent 1200 色谱工作站;瑞士梅特勒 AE—240 十万分之一电子天平。

1.2 试剂:甲醇为色谱纯(Merk 公司);其他试剂均为分析纯;水为重蒸水。川陈皮素对照品为自制,经光谱确定结构,HPLC 峰面积归一化法计算质量分数为 99.21%。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,来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(55:45),检测波长 330 nm,体积流量为 1.0 mL/min,柱温 25℃,进样量 10 μL。理论塔板数按川陈皮素峰计算,应不得低于 5 000。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取减压干燥至恒重

的川陈皮素对照品 15.35 mg,置 250 mL 量瓶中,加醇定容至刻度,摇匀,备用。

2.3 供试品溶液的制备:取枳壳粉末(60 目)约 3 g,精密称定,置 250 mL 圆底烧瓶中,分别加甲醇 40、20、20 mL,水浴回流 1.5 h、20 min、20 min,提取 3 次,滤液趁热滤过,合并滤液,滤液浓缩至约 50 mL,用甲醇定容,摇匀,过 0.45 μm 膜,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性范围考察:精密量取上述对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL 分别置 6 个 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。分别进样 10 μL,以对照品的质量浓度(ng/mL)为横坐标(X),峰面积积分为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程: $Y=31.6404904X-1.0644198, r=0.99981$ 。结果表明川陈皮素进样量在 61.4~614 ng 呈良好线性关系。

2.5 精密度试验:取同一对照品溶液,重复进样 6 次,测定峰面积,计算 RSD 为 0.89%($n=6$)。

2.6 重现性试验:取同一样品粉末(江西樟树吴城乡产),精密称取 5 份,制备供试品溶液,进样测定川陈皮素的量,计算得 RSD 为 1.41%($n=5$)。

2.7 稳定性试验:取供试品溶液,自溶液配制后分别在 0、2、4、8、12、24 h 各进 10 μL,测得川陈皮素峰面积,计算 RSD 为 0.94%($n=6$),表明该样品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.8 加样回收率试验:精密称取 6 份已测川陈皮素量的江西樟树吴城乡产样品各约 1.5 g,分别精密加入川陈皮素对照品溶液(0.892 mg/mL) 1 mL,按

收稿日期:2008-04-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30660230)

作者简介:徐欢(1984—),江西丰城人,硕士研究生,研究方向为中药质量标准研究。

*通讯作者 杨武亮 Tel:(0791)7118657

“2.3”项下方法操作,在上述色谱条件下进行测定,计算得平均加样回收率为 99.81%,RSD 为 2.38%(n=6)。

2.9 样品的测定:分别精密吸取供试品溶液 10 μL,注入色谱仪,在上述色谱条件下进行测定,计算川陈皮素的量,结果见表 1 和图 1。

表 1 不同产地枳壳药材的测定结果(n=3)

Table 1 Determination of Fructus Aurantii from various habitats (n=3)

编号	样品来源	商品名称	川陈皮素/%
1	2003-07-31 江西新干(香橙)采集	江枳壳	0.053
2	2003-07-25 江西樟树吴城乡采集	江枳壳	0.055
3	2003-07-31 江西樟树吴城乡采集	江枳壳	0.059
4	2004-07-31 江西新干(臭橙)采集	江枳壳	0.023
5	2002-10-02 购于重庆綦江县药材公司	川枳壳	0.013
6	2002-09-30 购于重庆江津药材公司	川枳壳	0.015
7	2002-11-15 购于湖南怀化药材公司	湘枳壳	0.120
8	2002-11-17 购于湖南沅江药材公司	湘枳壳	0.177
9	2002-11-08 购于江西樟树药材市场湖南沅江产	湘枳壳	0.182
10	2002-11-17 购于湖南沅江药材公司	湘枳壳	0.170
11	2002-12-04 浙江兰溪药农家购(大暑后)	苏枳壳	0.050
12	2002-12-04 浙江兰溪药农家购(大暑前)	苏枳壳	0.062
13	2002-10-29 购于武汉国药集团	枳壳饮片	0.069
14	2002-11-17 购于湖南沅江药材公司	(炒)枳壳	0.175
15	2002-10-29 购于湖北九州通购,沅江产	枳壳饮片	0.046
16	2002-11 购于南昌三店堂药房	枳壳饮片	0.137

3 讨论

3.1 流动相的选择:参考文献方法[5]结果分离不好,且流动相复杂。本试验选择了不同配比的流动相,结果表明,甲醇-水(55:45)分离效果较好。川陈皮素在 330 nm 处有最大紫外吸收。

3.2 提取方法的选择:通过超声提取、加热回流提取及索氏提取的比较,超声提取不完全,加热回流提

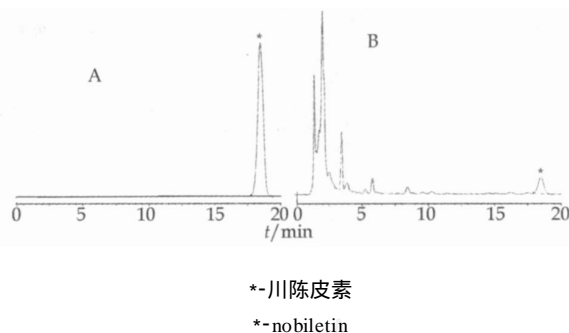


图 1 对照品(A)和样品(B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

取和索氏提取完全,但加热回流提取法提取时间相对较短,操作简便,故本实验采用加热回流方法。

3.3 提取溶剂的选择:实验中考察了甲醇、乙醇、氯仿、丙酮作为提取溶剂,结果表明,甲醇的提取效果好且完全,本实验采用甲醇为提取溶剂。

3.4 本试验首次采用 HPLC 法对不同产地的枳壳药材进行川陈皮素的测定,方法简便、准确、重现性好,可作为枳壳药材中川陈皮素测定的有效方法。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] Manthey J A, Guthrie N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines [J]. *Agric Food Chem*, 2002, 50(21): 5837-5843.
- [3] Rodriguez J, Yanez 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 [J]. *Melanoma Res*, 2002, 2(12): 99-107.
- [4] Ka Waii S, Tomono Y, Katase E, et al. Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation [J]. *Anticancer Res*, 1999, 2(19): 1261-1269.
- [5] 钱士辉,朱玲英,陈 廉. RP-HPLC 法测定陈皮药材中川陈皮素的含量[J]. *南京中医药大学学报*, 1998, 14(4): 219-220.

(上接第 72 页)

品中 3 种有效成分和杂峰难以分离,为此调小流动相的极性,最终选择甲醇-水(15:85)为流动相可使 3 种成分有较好的分离度。由于京尼平苷酸、绿原酸中有羧基、酚羟基,在中性溶剂中两种成分易电离,从而在色谱柱上存在“双保留”现象,为此,在流动相中加入少量冰醋酸,可抑制羧基、酚羟基的离解,从而使两峰的峰形得到改善。经实验测定优化,选择甲醇-水-冰醋酸(15:85:1.5)为流动相。

本实验同时测定杜仲雄花及杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷,为评定杜仲雄花及杜仲雄花茶的质量提供了快捷、可行的测定方法,可用于其质量控制,也适用于大量样品的快速处理。

参考文献:

- [1] 王俊丽,陈丕铃. 杜仲的研究与应用[J]. *中草药*, 1993, 24(12): 665-667.
- [2] 杜红岩. 杜仲活性成分与药性研究的新进展[J]. *经济林研究*, 2003, 21(2): 58-61.
- [3] 王嗣岑,贺浪冲,高锦明,等. RP-HPLC 法同时分离测定杜仲叶中 3 种有效成分[J]. *西北药学杂志*, 2001, 16(1): 15-16.
- [4] 李芳东,杜红岩. 杜仲[M]. 北京:中国中医药出版社, 2001.
- [5] 张康健,董娟娥,马柏林,等. 杜仲次生代谢产物差异性的研究[J]. *林业科学*, 2002, 38(6): 12-16.
- [6] Deyam T, Seinshibe S, Nakezawa Y. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and *Siberian Ginseng* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12): 1057-1060.
- [7] 谢碧霞,杜红岩. 绿色食品开发利用[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003.
- [8] 杜红岩,李芳东,杜兰英. 杜仲雄花茶及其加工工艺[P]. 中国专利:CN1220096, 1999-06-23.
- [9] 戚向阳,陈 维,张声华. 反相高效液相色谱法测定杜仲中京尼平苷、京尼平苷酸及绿原酸的含量[J]. *药物分析杂志*, 2000, 20(1): 22-24.