

RP-HPLC 法测定醋青皮配方颗粒中橙皮苷的含量

吴怀恩^{1,2*}, 谢臻¹, 杨谭¹, 甄汉深^{1,2}, 黄海燕¹

(1. 广西中医学院药学院, 南宁 530001; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的: 建立醋青皮配方颗粒中橙皮苷含量的测定方法。方法: 运用正交试验优化样品处理的提取条件, 采用高效液相色谱法检测橙皮苷含量, 色谱柱为 Shim-pack VP-ODS 柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1% 磷酸(35:65); 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 284 nm。结果: 橙皮苷在 0.112 0 ~1.120 μg 呈良好的线性关系 ($r=0.999 9$), 平均回收率为 102.63%, RSD 为 1.24%。结论: 该法简便可行、快速, 可用于醋青皮配方颗粒的质量控制。

[关键词] 醋青皮配方颗粒; 橙皮苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0061-03

Determination of Content of Hesperidin in Cuqingpi Dispensing Granule by RP-HPLC

WU Huai-en^{1,2*}, XIE Zhen¹, YANG Tan¹, ZHEN Han-shen^{1,2}, HUANG Hai-yan¹

(1. College of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;
2. College of Pharmacy, Chengdu Traditional Chinese Medical University, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of hesperidin in Cuqingpi Dispensing Granule. **Method:** After using the orthogonal test to optimize extracting conditions, hesperidin was separated on Shim-pack VP-ODS (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) column and detected at 284 nm, with methanol-0.1% phosphoric acid solution (35:65) as mobile phase, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Hesperidin was linear in the range of 0.112 0 ~1.120 μg ($r=0.999 9$). The average recovery of hesperidin was 102.63% with RSD 1.24%. **Conclusion:** The method is simple and rapid which can be used for the quality control of Cuqingpi Dispensing Granule.

[Key words] Cuqingpi Dispensing Granule; hesperidin; RP-HPLC

青皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥幼果或未成熟果实的果皮, 经醋制后能引药入肝, 增强舒肝止痛、消积化滞的作用, 同时缓和辛烈之性, 消除发汗作用, 以免伤伐正气^[1-2]。醋青皮配方颗粒是醋制青皮饮片经水提、浓缩、干燥、制粒等工序制成的单味中药配方颗粒剂。据报道^[3-4], 橙皮苷是青皮药材及其中成药制剂中的主要有效成分, 具有显著的抗氧化、抗炎、祛痰平喘、

延缓衰老等作用, 同时对心血管、对肾脏系统都具有显著的药理活性。2005 年版《中国药典》仅有青皮药材的含量测定, 并未对醋制青皮有相应的规定。笔者采用高效液相法^[5-6]控制醋青皮配方颗粒中的橙皮苷含量, 方法简便可行、快速, 可用于控制产品质量。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司)、LG16-W 型高速离心机(北京医用离心机厂)、B3500S-MI 超声清洗仪(上海必能信超声有限公司)、电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂)、BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯)、SHZ-D 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司)。

[收稿日期] 2009-11-30

[通讯作者] 吴怀恩, 讲师, 在读博士生, 主要研究方向中药药效物质基础与质量标准化研究, E-mail: wuhe0001@yahoo.com.cn

1.2 试药 橙皮苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 0721-9909);醋青皮配方颗粒(江阴天江药业有限公司,批号 0808084、0811183、0903311);甲醇为色谱纯,水为高纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Shim-pack VP-ODS 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇 - 0.1% 磷酸溶液(35 65),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 284 nm,柱温 35 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 120 减压干燥至恒重的橙皮苷对照品 5.60 mg,加甲醇溶解制成每 1 mL 含 0.112 0 mg 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取醋青皮配方颗粒 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 15 mL,密塞,称定质量,超声提取 60 min,放冷,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液离心即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方工艺制备不含醋青皮的阴性样品,按 2.2.2 项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 专属性试验 分别精密吸取上述对照品溶液 8 μL、供试品溶液和阴性对照溶液各 2 μL,进样分析。结果,供试品溶液和对照品溶液色谱图上有一保留时间几乎相同的特征峰,而阴性对照溶液在此保留时间无此特征峰。见图 1。

2.4 供试品处理的正交试验 根据橙皮苷的性质及初步预试验结果,采用正交试验 L₉(3⁴) 进行醋青皮配方颗粒的甲醇超声提取工艺研究,以橙皮苷的含量为评价指标,选择甲醇用量、甲醇浓度、超声时间 3 个因素,每个因素设 3 个水平,因素水平见表 1,结果见表 2,方差分析见表 3。

2.4.1 最佳提取工艺的确定 表 2 极差大小显示,各因素作用主次为 B > C > A,由极差分析应选择最佳工艺为 A₃B₃C₃,但从表 3 方差分析可知因素 A 和 C 对结果无显著性影响,从节约成本考虑选择 A₁,从而得到最佳提取工艺 A₁B₃C₃,即 100% 甲醇 30 倍量,超声提取 60 min。

2.4.2 验证试验 精密称取醋青皮配方颗粒 3 份,每份 0.5 g,按照最佳工艺 A₁B₃C₃ 进行超声提取,并按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,以 2.1 项色谱条件精密吸取 2 μL 进样分析。结果表明,本法的提取效果较好。见表 4。

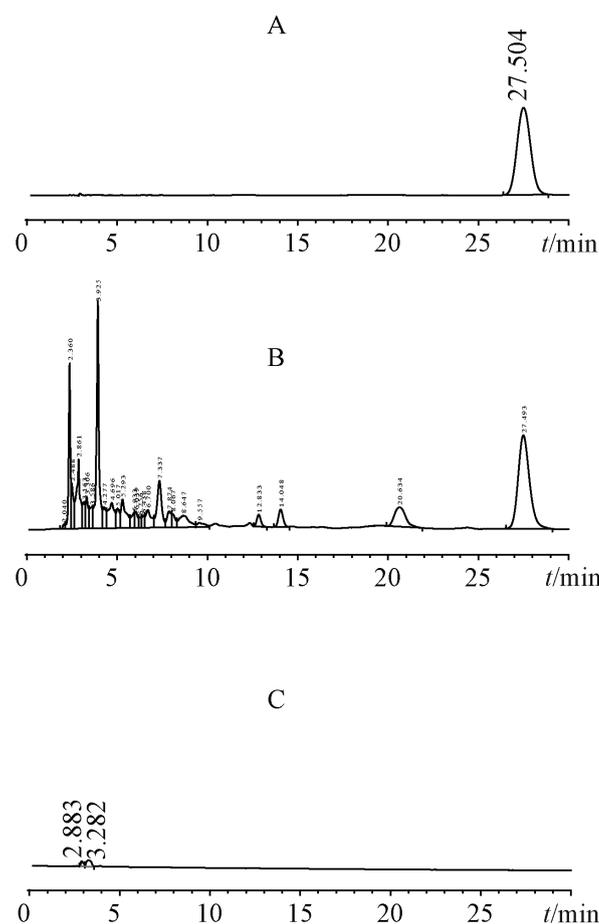


图 1 对照品(A)、供试品(B)、阴性对照样品(C) 色谱图
1. 橙皮苷

表 1 因素水平表

水平	A	B	C
	甲醇用量 / 倍	甲醇浓度 / %	超声时间 / min
1	30	50	20
2	45	75	40
3	60	100	60

表 2 正交试验表 L₉(3⁴)

No.	因素				橙皮苷含量 / mg·g ⁻¹
	A	B	C	D/误差	
1	1	1	1	1	4.228 9
2	1	2	2	2	7.188 4
3	1	3	3	3	12.413 9
4	2	1	2	3	5.802 9
5	2	2	3	1	10.071 7
6	2	3	1	2	10.156 4
7	3	1	3	2	7.695 3
8	3	2	1	3	7.382 4
9	3	3	2	1	13.001 2
K1	23.831 2	17.727 0	21.767 7	27.301 7	
K2	26.030 9	24.642 5	25.992 5	25.040 1	
K3	28.078 9	35.571 6	30.180 8	25.599 2	
极差 R	4.247 6	17.844 6	8.413 2	2.261 6	

表 3 方差分析表

方差来源	离差平方和	<i>f</i>	方差	<i>F</i>	<i>P</i>
A	3.008 441	2	1.504 221	3.251 694 4	>0.05
B	53.965 38	2	26.982 69	58.328 854	<0.05
C	11.797 06	2	5.898 531	12.750 937	>0.05
D (误差)	0.925 192	2	0.462 596		

表 4 验证试验结果 (*n*=3)

No.	橙皮苷含量 / mg·g ⁻¹	平均含量 / mg·g ⁻¹	RSD / %
1	12.589 4		
2	12.296 7	12.603 6	2.50
3	12.924 6		

2.5 线性关系考察 分别精密吸取橙皮苷对照品溶液 1, 4, 6, 8, 10 μL 进样检测, 以进样量 *X* (μg) 为横坐标, 峰面积 *Y* 为纵坐标绘制标准曲线, 得到回归方程为 $Y=2.07 \times 10^3 X - 1.64 \times 10^4$, $r=0.999 9$ 。结果表明, 橙皮苷在 0.112 0 ~ 1.120 μg 范围内, 进样量与峰面积呈良好线性关系。

2.6 精密度实验 精密吸取 2.2.1 项下对照品溶液 8 μL, 连续进样 6 次, 计算峰面积 RSD 为 0.68%。

表 5 样品中橙皮苷加样回收率测定结果 (*n*=6)

No.	样品取样量 / g	样品中含量 / mg	对照品加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
1	0.249 9	3.152 1	3.248 0	6.474 3	102.29		
2	0.250 0	3.153 3	3.248 0	6.464 6	101.95		
3	0.249 8	3.150 8	3.248 0	6.466 9	102.10		
4	0.250 1	3.154 6	3.248 0	6.547 7	104.47	102.63	1.24
5	0.250 6	3.160 9	3.248 0	6.535 0	103.88		
6	0.250 9	3.164 7	3.248 0	6.448 4	101.10		

3 讨论

采用正交实验法对样品的提取条件进行了优化, 确定了采用 100% 甲醇 30 倍量为提取溶液, 超声提取 60 min 的样品前处理方法。

流动相的 pH 对分离有较大的影响, 因为橙皮苷具有双氢黄酮氧苷结构, 呈弱酸性^[7]。以甲醇-水 (25 75) 为流动相^[1] 时拖尾较严重, 改用甲醇-0.1% 磷酸 (35 65), 结果供试品色谱中橙皮苷峰与其它色谱峰达到基线分离。

方法学研究表明, 本法简便可行、快速, 可作为醋青皮配方颗粒的质量控制方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北

表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品 (批号 0808084), 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 以 2.1 项色谱条件分别在 0, 2, 6, 12, 18, 24 h 进样 2 μL, 测定橙皮苷峰面积, RSD 为 2.54%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批 (批号 0808084) 供试品 6 份, 分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 以 2.1 项色谱条件进样分析, 结果橙皮苷平均含量为 12.613 3 mg·g⁻¹, RSD 为 2.52%, 表明本法重复性良好。

2.9 加样回收试验 取同一批 (批号 0808084) 已知含量的供试品 6 份, 分别精密加入一定量的橙皮苷对照品, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 以 2.1 项色谱条件进样, 测定橙皮苷的含量。结果橙皮苷的平均回收率为 102.63%, RSD 为 1.24%, 表明本法准确度较好。见表 5。

2.10 样品的含量测定 按供试品溶液制备方法和色谱条件, 对 3 批醋青皮配方颗粒进行含量分析, 结果分别为 12.610 9, 14.086 8, 13.682 7 mg·g⁻¹。

京: 化学工业出版社, 2005: 137.

[2] 原思通. 医用中药饮片学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 302.

[3] 陈红, 刘传玉, 李承晏. 青皮的化学及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(11): 1050.

[4] 张冬松, 高慧媛, 吴立军. 橙皮苷的药理活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2006, 8(7): 25.

[5] 李先端, 顾雪竹, 林生, 等. HPLC 测定青皮生品及炮制品中橙皮苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(9): 724.

[6] 王耀丽, 张永欣, 毛淑杰. 采用色谱指纹图谱技术考察醋制对青皮的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(6): 460.

[7] 王宁芳. 橙皮苷的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(8): 3759, 3850.

[责任编辑 顾雪竹]