

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)08-0079-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.08.019



高效液相色谱法同时测定橘红颗粒中3种黄酮类成分含量

李霞, 易徐航[△], 杨恢检, 熊毓

(江西省萍乡市食品药品检验所, 江西 萍乡 337000)

摘要:目的 建立同时测定橘红颗粒中芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent 5TC-C₁₈(2)柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 醋酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 30℃, 进样量为 10 μL。结果 芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷进样量分别在 0.034 8~0.348 μg($r=0.999\ 5$)、1.047~10.47 μg($r=0.999\ 4$)、0.185 9~1.859 μg($r=0.999\ 7$)范围内与峰面积线性关系良好; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均不大于 2.0%; 平均加样回收率分别为 98.24%, 96.29%, 97.83%, RSD 分别为 1.16%, 1.08%, 2.34%($n=6$)。结论 所建立的方法操作简便、重复性好、结果准确, 可用于同时测定橘红颗粒中上述 3 种黄酮类成分的含量。

关键词: 橘红颗粒; 芸香柚皮苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 黄酮类成分; 高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of Three Flavonoids in Juhong Granules by HPLC

LI Xia, YI Xuhang, YANG Huijian, XIONG Yu

(Pingxiang Institute for Food and Drug Control, Pingxiang, Jiangxi, China 337000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of naringin, naringenin and hesperidin in Juhong Granules. **Methods** The chromatographic column was Agilent 5TC-C₁₈(2) column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% acetic acid aqueous solution (gradient elution), the flow

第一作者: 李霞, 女, 大学本科, 主管中药师, 研究方向为药品检验与质量控制, (电子信箱)406392659@qq.com。

[△]通信作者: 易徐航, 男, 硕士, 主管中药师, 研究方向为药品质量标准, (电子信箱)yixuhang@163.com。

行检查。

本研究针对制剂剂型和所含抑菌成分采用了不同的试验方法, 对于抑菌活性较强的制剂, 采用平皿法若在最低稀释级无法进行方法适用性试验时, 可增加稀释液或培养基体积或采用薄膜过滤法进行检查, 以消除抑菌活性。

综上所述, 本研究中建立的方法操作便捷, 结果准确, 为医院制剂微生物限度质量控制提供了可靠的检测手段, 对于保障制剂质量具有重要意义, 同时也为类似抑菌制剂的检查提供了研究思路。

参考文献

- [1] 邓莉, 陈勇川, 胡斌, 等. 3种医院外用制剂微生物限度检查方法的建立[J]. 中国药业, 2020, 29(17): 68-71.
- [2] 高珊, 唐蕾, 赵伟国. 7种医院外用制剂微生物限度检查法的适用性试验[J]. 海峡药学, 2020, 32(5): 39-41.
- [3] 李翔, 黎春彤, 王晶, 等. 4种医院液体制剂微生物限度检验方法的建立[J]. 中国药师, 2019, 22(6): 1183-1185.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 170.
- [5] 刁伟斌, 吴秀平, 游巧玲. 奥硝唑与替硝唑以及甲硝唑在口腔治疗的应用及药效对比研究[J]. 海峡药学, 2021, 33(2): 139-140.
- [6] 郭莉, 林彤, 冯颖. 盐酸米诺环素联合甲硝唑或替硝唑治疗慢性牙周炎的疗效及安全性比较[J]. 药物评价研究,

2017, 40(9): 1294-1296.

- [7] 李香荷, 张冬, 王强, 等. 注射用克林霉素磷酸酯质量分析[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 40(2): 158-166.
- [8] 方李, 李思, 苏华, 等. 3种含醋酸氯己定制剂的微生物限度检查方法研究[J]. 中国药师, 2017, 20(11): 2071-2073.
- [9] 李敏, 龚亚, 曹健, 等. 6种医院抑菌制剂的微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(8): 951-954.
- [10] 刘祖雄, 徐丹, 曾媛, 等. 氯己定碘溶液剂的抗微生物试验及消毒效果检测[J]. 中国药师, 2020, 23(5): 1001-1003.
- [11] 李诗华, 蔡伟江, 刘长富, 等. 0.2% 新洁尔灭和 5% 甲酚皂消毒液灭菌效果研究[J]. 食品安全检测质量学报, 2020, 11(23): 8709-8714.
- [12] 陈琳, 钱嵘嵘, 花露, 等. 多种抑菌剂抑菌效力检查与研究[J]. 检测认证, 2022(1): 221-224.
- [13] 吴燕燕. 添加羟苯乙酯的加替沙星滴眼液抑菌效力的检测与评价[J]. 海峡药学, 2018, 30(4): 87-90.
- [14] 李翔, 黎春彤, 王晶, 等. 医院耳鼻制剂微生物限度检验方法的建立[J]. 中国医药导报, 2018, 15(34): 23-26.
- [15] 杨凤琼, 李梅丽. 川桑葚中鞣酸的提取及纯化工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(5): 92-96.
- [16] 班芳芳, 胡梁斌, 莫海珍, 等. 异硫氰酸苄酯、乳酸链球菌素和麝香草酚复配物的抑菌活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 52-57.

(收稿日期: 2023-05-15; 修回日期: 2023-12-07)

rate was 1.0 mL / min,the detection wavelength was 280 nm,the column temperature was 30 °C,and the injection volume was 10 μL.

Results The linear ranges of narirutin,naringin and hesperidin were 0.034 8 – 0.348 μg ($r = 0.999\ 5$), 1.047 – 10.47 μg ($r = 0.999\ 4$), 0.185 9 – 1.859 μg ($r = 0.999\ 7$), respectively. The *RSDs* of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of the above three flavonoids were 98.24%, 96.29%, 97.83%, with the *RSDs* of 1.16%, 1.08%, 2.34% ($n = 6$) respectively.

Conclusion The established method is easy, repeatable and accurate, which can be used to simultaneously determine the contents of the above three flavonoids in Juhong Granules.

Key words: Juhong Granules; narirutin; naringin; hesperidin; flavonoid; HPLC; content determination

橘红颗粒为祛痰剂,由化橘红、陈皮、苦杏仁、浙贝母等15味中药组方,有清肺、止咳、化痰功效,可用于治疗痰热咳嗽、痰多、色黄黏稠、胸闷口干等证。组方药材中化橘红、陈皮为祛痰止咳常用药,且均含多种黄酮类成分,其中化橘红主要含柚皮苷、芸香柚皮苷、野漆树苷等成分^[1],陈皮主要含橙皮苷、新橙皮苷、芸香柚皮苷等^[2]。黄酮类化合物为最重要的天然低分子量多酚类化合物,以游离态和糖苷的形式广泛分布于植物体内^[3]。现代药理学研究表明,化橘红、柚皮苷具有一定的抗氧化^[4]及抑制 α -葡萄糖苷酶活性作用^[5],陈皮具有抗炎^[3]和抗氧化^[6]及抗心肌缺血和保护心脑血管作用^[7]。橘红颗粒现收载于2020年版《中国药典(一部)》,但该标准仅对其中陈皮进行了薄层鉴别,采用液相色谱法对浙贝母中的贝母素甲、贝母素乙进行了定性鉴别,并对化橘红中柚皮苷进行了含量测定。且现有报道多仅对制剂中单味药材进行质量鉴别或分析^[8-19],缺乏对橘红颗粒进行全面质量评价的报道。鉴于此,本研究中建立了同时测定橘红颗粒中芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷3种黄酮类成分含量的高效液相色谱(HPLC)法,为全面控制该制剂的质量提供依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪,含二极管阵列检测器(美国Agilent公司);XSR105型、ME204型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度分别为0.01 mg和0.1 mg);XMTD-7000型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

1.2 试药

橘红颗粒样品(8批,均为市售产品,编号为S1-S8,样品信息见表1)。芸香柚皮苷对照品(批号为RF220429-06,含量99.68%),柚皮苷对照品(批号为AL210915-02,含量98.13%),橙皮苷对照品(批号为PR210902-11,含量100%),均购自美国Stanford Chemicals公司;乙腈、冰醋酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent 5TC-C₁₈(2)柱(250 mm×4.6 mm,

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	批号	生产企业
S1	220105	恒拓集团南宁仁盛制药有限公司
S2	200713-1	宁夏启元国药有限公司
S3	20220102	山西华康药业股份有限公司
S4	04220103	通化万通药业股份有限公司
S5	04210901	通化万通药业股份有限公司
S6	22020102	山东孔府制药有限公司
S7	22020101	山东孔府制药有限公司
S8	20211202	山东孔府制药有限公司

5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%醋酸水溶液(B),梯度洗脱(0~15 min时5%A→20%A,15~45 min时20%A→30%A,45~60 min时30%A→100%A,60~65 min时100%A→5%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。

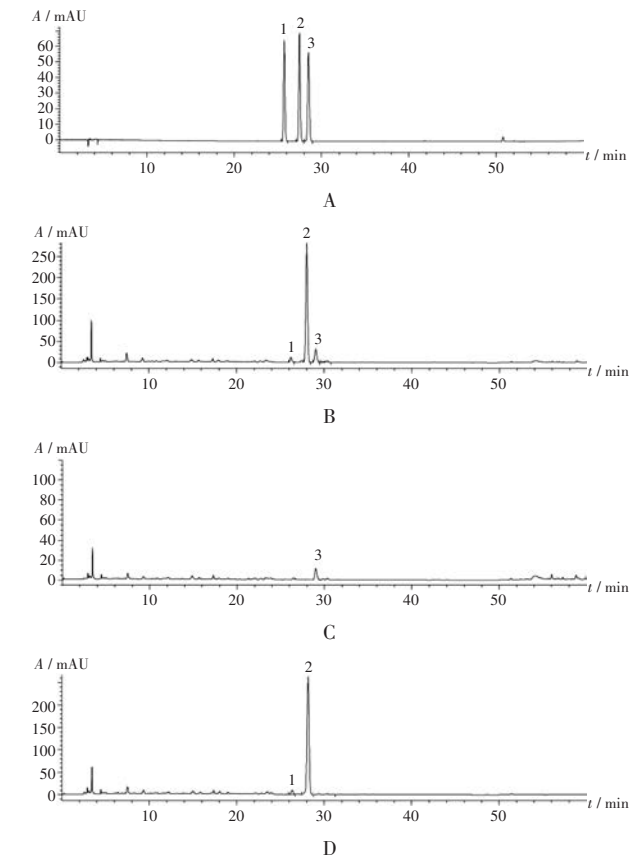
2.2 溶液制备

分别称取芸香柚皮苷对照品10.91 mg、柚皮苷对照品13.34 mg和橙皮苷对照品11.62 mg,加甲醇制成质量浓度分别为0.435 0,0.523 6,0.464 8 mg/mL的单一对照品贮备液;分别精密量取适量,置同一容量瓶中,加甲醇制成质量浓度分别为0.043 5,0.052 4,0.046 5 mg/mL的混合对照品溶液。取样品适量,研细,取约1.0 g,精密称定,精密加入甲醇15 mL使溶解,加热回流30 min,静置,冷却至室温,用甲醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按橘红颗粒处方及工艺分别制备缺化橘红、陈皮的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备相应的阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验^[8]:取2.2项下4种溶液各10 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷色谱峰峰形对称,与其他杂质峰分离良好,且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:取2.2项下单一对照品贮备液各适量,加甲醇稀释,制成含芸香柚皮苷0.017 4 mg/mL、柚皮苷0.524 0 mg/mL、橙皮苷0.093 0 mg/mL的混合对照品溶液,分别精密吸取2,4,8,10,12,16,20 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,以进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐



1. 芸香柚皮苷 2. 柚皮苷 3. 橙皮苷
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺化橘红的阴性对照品溶液 D. 缺陈皮阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Narirutin 2. Naringin 3. Hesperidin

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution lacking Citri Grandis Exocarpium D. Negative reference solution lacking Citri Reticulatae Pericarpium

Fig. 1 HPLC chromatograms

标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得3种待测成分的回归方程 $Y_1 = 15.47627X_1 + 17.93527(r = 0.9995)$, $Y_2 = 14.95932X_2 + 205.64155(r = 0.9994)$, $Y_3 = 16.09739X_3 + 63.08288(r = 0.9997)$ 。结果表明,芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷的进样量分别在 $0.0348 \sim 0.348 \mu\text{g}$ 、 $1.047 \sim 10.47 \mu\text{g}$ 、 $0.1859 \sim 1.859 \mu\text{g}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.83% 、 0.70% 、 1.00% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 $0, 2, 4, 8, 12, 16, 24 \text{ h}$ 时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.50% 、 0.45% 、 0.46%

($n = 7$),表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为220105)适量,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定3次,记录峰面积,并计算样品含量。结果芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷的平均含量分别为 0.1080 、 3.3642 、 0.3456 mg/g , RSD 分别为 2.00% 、 1.99% 、 1.92% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为220105)约 0.5 g ,精密称定,各6份,分别精密加入芸香柚皮苷对照品 0.0435 mg 、柚皮苷对照品 1.0472 mg 和橙皮苷对照品 0.0930 mg ,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表2。

表2 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n = 6$)

待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	$RSD(\%)$
芸香柚皮苷	0.5043	0.0545	0.0435	0.0976	99.08	98.24	1.16
	0.5102	0.0551	0.0435	0.0972	96.78		
	0.5023	0.0542	0.0435	0.0977	100.00		
	0.5124	0.0553	0.0435	0.0978	97.70		
	0.5145	0.0556	0.0435	0.0983	98.16		
	0.5106	0.0551	0.0435	0.0976	97.70		
柚皮苷	0.5043	1.6966	1.0472	2.6851	94.39	96.29	1.08
	0.5102	1.7164	1.0472	2.7336	97.14		
	0.5023	1.6898	1.0472	2.7075	97.18		
	0.5124	1.7238	1.0472	2.7319	96.27		
	0.5145	1.7309	1.0472	2.7444	96.78		
	0.5106	1.7177	1.0472	2.7230	96.00		
橙皮苷	0.5043	0.1743	0.0930	0.2656	98.17	97.83	2.34
	0.5102	0.1763	0.0930	0.2670	97.53		
	0.5023	0.1736	0.0930	0.2660	99.35		
	0.5124	0.1771	0.0930	0.2711	101.08		
	0.5145	0.1778	0.0930	0.2674	96.34		
	0.5106	0.1764	0.0930	0.2643	94.52		

2.4 样品含量测定

取8批样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,采用外标法计算各成分含量。结果见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/g , $n = 2$)

Tab. 3 Results of the content determination of three flavonoids in samples (mg/g , $n = 2$)

编号	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	编号	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷
S1	0.0411	2.4542	0.1548	S5	0.1483	3.9344	0.3658
S2	0.2060	5.7670	0.7932	S6	0.0833	3.7620	0.2810
S3	0.0696	2.3460	0.1901	S7	0.0888	4.6446	0.2516
S4	0.1063	3.3679	0.3415	S8	0.0549	3.8280	0.1446

3 讨论

3.1 指标成分选择

该制剂中君药化橘红配以陈皮,共奏燥湿化痰之功,两者含有的黄酮类化合物与低分子右旋糖酐作用相似,能促进血液循环,缓解血液淤滞,减少血小板聚集,达到活血化瘀效果。其主要活性成分为黄酮类化合物芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷,故以其作为指标成分进行含量研究。对于本研究结果是否受药材的来源、炮制方法、制剂工艺等影响有待进一步考察。

3.2 试验条件选择

预试验中分别对供试品溶液进行超声和加热回流处理,处理时间分别为10,30,45,60,90 min,结果显示,加热回流提取效果比超声更好,提取30 min后的含量无显著差异。黄酮苷元难溶于水或不溶于水,易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂和稀碱液中,故预试验中提取溶剂分别考察了不同体积分数(20%,40%,70%,100%)的甲醇和乙醇,结果纯甲醇提取效果最好,各指标成分能提取完全。因此本研究中最终选择提取条件为加甲醇加热回流30 min。

3.3 液相色谱条件选择

采用二极管阵列检测器对供试品溶液和对照品溶液在210~400 nm波长内进行紫外光谱扫描,发现在280 nm波长处各待测成分响应值较高,同时色谱图基线平稳,噪声小,因此选择280 nm作为检测波长。预试验中分别以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%醋酸水溶液3种不同流动相进行梯度洗脱,结果显示,流动相中添加少量的酸有利于改善色谱峰的拖尾及分离度。因此,选用乙腈-0.1%醋酸水溶液作为流动相,其洗脱效果、各色谱峰峰形、分离度及基线效果均更好。但柚皮苷和橙皮苷保留时间间隔较短,后续仍需进一步优化梯度洗脱条件,以获得更佳的分离效果和灵敏度。

3.4 方法评价

本研究中建立了同时测定制剂中3种黄酮类成分(芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷)含量的HPLC法。结果三者含量差异较大,柚皮苷的含量远高于其他2种黄酮类成分。由于各生产厂家投料用的中药材质量存在差异,质量控制方法和手段也不尽相同。因此,建立橘红颗粒多成分含量测定方法对于保证制剂质量安全具有积极意义。

参考文献

- [1] 李吉华. 化橘红中柚皮苷、柚皮芸香苷、野漆树苷和柚皮素的HPLC测定[J]. 山东中医杂志,2012,31(4):277-278.
- [2] 丁琛,郑艳萍,陈丽. 4种炮制方法对陈皮中橙皮苷和芸香柚皮苷含量的影响[J]. 中国药业,2020,29(21):9-11.
- [3] 徐健,曾万祥,王晓东,等. 陈皮的化学成分与药理学作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2022,41(10):72-73.
- [4] 梁文琳,林泳仪,吴彩霞,等. 化橘红有效成分提取、检测及药理作用的研究进展[J]. 广州化工,2022,5(4):18-19.
- [5] 姜翠翠,董舒梅,邱松山,等. 化橘红柚皮苷对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用[J]. 食品工业,2020,41(6):189-193.
- [6] 崔佳韵,梁建芬. 不同年份新会陈皮挥发油的抗氧化活性评价[J]. 食品科技,2019,44(1):98-102.
- [7] 俞静静,苏洁,吕圭源. 陈皮抗心脑血管疾病相关药理研究进展[J]. 中草药,2016,47(17):3127-3132.
- [8] 吴远波,吴克勤,刘宇政,等. 高效液相色谱法同时测定和肝胆胆颗粒中3种黄酮类成分含量[J]. 中国药业,2021,30(15):71-73.
- [9] 刘佳明,陈洁,张恩蓓,等. 近红外光谱法快速测定化橘红中柚皮苷和野漆树苷的含量[J]. 中南农业科技,2023,44(2):58-62.
- [10] 邓茂芝,洪燕,周云峰,等. 超高效液相串联质谱快速检测橘红颗粒(胶囊、片)中水麦冬酸[J]. 江西中医药,2022,53(11):60-64.
- [11] 袁秀杨,钟英,周云峰. UPLC-MS/MS法测定橘红颗粒中贝母素甲和贝母素乙的含量[J]. 药品评价,2022,19(14):865-868.
- [12] 谢思敏,陈俊妃,侯惠婵,等. 化橘红中展青霉素含量测定方法的建立[J]. 中国药房,2022,33(23):2936-2939.
- [13] 李幸穗,黄淑慧,郭俐麟. 紫外可见分光光度法测定化橘红中总黄酮的含量[J]. 广州化工,2022,50(19):127-129.
- [14] 耿硕. 高效液相色谱法测定化橘红(化州柚)配方颗粒中柚皮苷的含量[J]. 北方药学,2021,18(10):1-3.
- [15] 梁颖,高鸿彬,李晓丹,等. 近红外光谱法快速测定化橘红中柚皮苷的含量[J]. 广州化学,2020,45(4):23-29.
- [16] 钟广智,谭俊青,陈昭. UHPLC-MS法同时测定化橘红中三个黄酮类成分[J]. 海峡药学,2020,32(7):52-55.
- [17] 李文东,魏莹,赵玉玺,等. 高效液相色谱法测定不同品种来源陈皮中多甲氧基黄酮含量[J]. 中国药业,2019,28(13):30-32.
- [18] 蔡梅超. HPLC测定橘红颗粒中柚皮苷的含量[J]. 化工时刊,2012,26(8):17-18.
- [19] 魏燕华,成差群,谭秀芬. 超声波提取法与索氏提取法提取化橘红中柚皮苷的比较[J]. 中国药业,2009,18(16):47-48.

(收稿日期:2023-04-21;修回日期:2023-09-28)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号:78-130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真:(023) 86592565
网上投稿: <http://www.zhongguoyaoye023.com> 或中国药业在线投稿系统