



枳实中辛弗林的固相萃取-HPLC测定

胡静¹, 廖茂梁^{1,2}, 韦玮¹, 张铁军^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193;

2. 天津药物研究院, 天津 300193)

[摘要] 目的: 利用固相萃取-反相高效液相色谱法测定枳实中辛弗林的量, 建立一种较佳的枳实中辛弗林的测定方法。方法: 考察不同的样品处理方法及不同色谱条件对含量测定结果的影响, 并进行方法学考察。结果: 2% 冰醋酸超声 30 min, 提取液通过 C₁₈ 固相萃取小柱 (500 mg, 径高比 2:1) 处理, 可得到较好的纯化效果。辛弗林进样量在 0.0996 μg 呈良好的线性关系 ($r=0.9995$), 平均回收率和 RSD 分别为 100.8% 和 2.5%, 所测得各批次枳实中辛弗林的质量分数在 0.27.9 mg · g⁻¹。结论: 本方法简便、准确, 可为枳实质量评价提供有效手段。

[关键词] 枳实; 辛弗林; 固相萃取; 高效液相色谱

枳实是常用理气药, 始载于《神农本草经》, 列为中品。为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *C. sinensis* Osbeck 的干燥幼果, 主要栽培于江西、浙江、四川、湖南、贵州等省^[1]。具有破气除痞、化痰消积的功效。近代临床用于治疗胃扩张、胃下垂、子宫下垂、脱肛等脏器下垂病症, 是中医临床常用药物。枳实主要含辛弗林 (synephrine)、*N*-甲基酪胺 (*N*-methyl tyramine)、 γ -2 氨基丁酸、乙酰去甲辛弗林^[2] 以及橙皮苷 (hesperidin) 和新橙皮苷 (neohesperidin)、挥发油等。辛弗林 (synephrine) 是枳实中起重要作用的有效成分, 具有增强心血输出量、提高总外周血管阻力而使左心室压力及动脉血压上升, 以及松弛支气管平滑肌的作用^[3-4], 具有良好的开发前景。

《中国药典》一部 2005 年版收录的枳实中辛弗林含量测定方法采用聚酰胺柱进行纯化, 文献报道中有采用聚酰胺柱, 氧化铝柱等方法^[5-6], 本实验采用更为简便的固相萃取纯化技术, HPLC 法对枳实中辛弗林进行测定, 为枳实的质量控制提供参考依据, 为该药的进一步研究奠定基础。

1 仪器与试剂

Lab Alliance 高效液相色谱仪 (Series III 泵, Model 201 型检测器), 紫外-可见分光光度计 (UV 1601, Shimadzu), 电子天平 (Sartorius BP211D, 美国), 电子天平 (AB204-N, Mettler-Toledo Instr Ltd), 超声波清洗器 (HS-3120, 奥特赛恩斯机器有限公司), 恒温加热套 (LXJ-II B, 上海安亭科学仪器厂)。

辛弗林对照品 (批号 0727-200105, 中国药品生物制品检定所), 甲醇 (天津市康科德科技有限公司, 色谱纯), 冰醋酸, 十二烷基磺酸钠 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯), YWG-C₁₈ (天津博瑞健合色谱技术有限公司, 4060 μm), C₁₈ 固相萃取小柱为自制 (500 mg, 径高比 2:1), 聚酰胺 (江苏临江试剂化工厂, 6090 目), 磷酸二氢钾 (天津市化学试剂六厂, 分析纯), 十二烷基硫酸钠 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯), 各批号枳实药材, 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-磷酸二氢钾水溶液 (取磷酸二氢钾 0.6 g, 十二烷基磺酸钠 1.0 g, 冰醋酸 1 mL, 加水溶解并稀释至 1 000 mL) (50:50); 柱温室温; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 275 nm; 理论塔板数以辛弗林峰计算不低于 7 000。在此色谱条件下, 辛弗林对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) 的 HPLC 图见图 1。

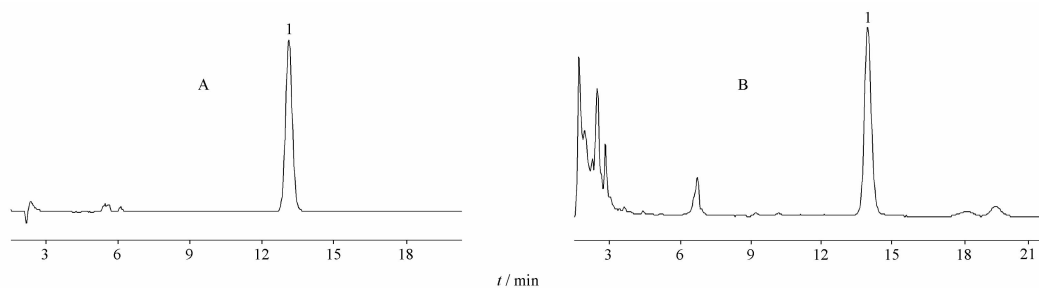
2.2 对照品溶液的制备 称取辛弗林对照品

[收稿日期] 2009-07-06

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划项目 (2006BAI06A01-02)

[通信作者] * 张铁军, Tel/Fax: (022) 23006848, E-mail: tiezheng4@sina.com

[作者简介] 胡静, 硕士研究生, 主要从事中药复方研究和新药开发研究, Tel: 13920633282, E-mail: hjing@163.com



A. 对照品; B. 样品; 1. 辛弗林。

图 1 辛弗林对照品和枳实药材的 HPLC 图

2.49 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加 2% 的冰醋酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加 2% 冰醋酸稀释至刻度, 配制成 0.049 8 g · L 的溶液, 摇匀, 即得, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取枳实粉末(过 60 目筛)约 1 g, 准确称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 2% 冰醋酸 50 mL, 超声 30 min。摇匀, 滤过。精密量取续滤液 10 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 用 2% 冰醋酸稀释至刻度, 摇匀, 经过 C₁₈ 小柱处理, 收集续滤液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 μL 进样, 测定峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 计算线性回归方程为 $Y = 12\ 134X + 133.5$, $r = 0.999\ 5$, 结果辛弗林进样量在 0.00996 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取辛弗林对照品溶液及供试品溶液 10 μL, 分别重复进样 6 次, 测定辛弗林峰面积, 结果对照品溶液峰面积的 RSD 0.95%, 供试品溶液峰面积的 RSD 0.66%。

2.6 重复性试验 精密称取已知含量的同一批枳实药材粉末(过 60 目筛)6 份, 分别按照 2.3 项下的供试品溶液制备方法, 制备供试品溶液。分别进样 10 μL。测定, 记录峰面积, 计算辛弗林的质量分数, RSD 0.99%。

2.7 稳定性试验 将供试品溶液室温分别放置 0, 2, 4, 6, 8 h 后, 进样 10 μL, 测定辛弗林的峰面积, 结果峰面积的 RSD 0.90%, 表明供试品溶液在室温下 8 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的同一批枳实药材粉末(过 60 目筛)9 份, 每份 0.5 g, 精密称定。分为 3 组, 每组依次分别加入药材中已知辛弗林含量的 80%, 100%, 120% 的辛弗林对照品。按 2.3 项下方法制备成供试品溶液, 每次进样 10 μL。加样回收率的平均值 100.8%, RSD 2.5%。

2.9 样品测定 取不同批次的枳实药材粉末(过 60 目筛), 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别吸取 10 μL 进样, 记录辛弗林的峰面积, 采用外标一点法计算辛弗林的质量分数, 结果见表 1。

表 1 枳实药材中辛弗林的质量分数 (n = 3)

批号	产地	品种	来源	炮制方法	质量分数/mg · g ⁻¹
080315	福建	甜橙	天津华丰大药房	炒枳实	7.9
080301	福建	甜橙	河北康派中药材有限公司	炒枳实	2.8
070968	四川	甜橙	安国市昌达中药材饮片有限公司	炒枳实	3.6
04120922B	湖南	酸橙	天津市中药饮片厂	麸炒枳实	5.0
080811	江西	酸橙	广东康美药业股份有限公司	生枳实	1.5
0805469	江西	酸橙	江西樟树市庆仁中药饮片有限公司	麸炒枳实	0.5
0807005	江西	酸橙	江西樟树天齐堂中药饮片有限公司	麸炒枳实	1.2
806110101	四川	酸橙	北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司	炒枳实	0.6
0804004	江西	酸橙	江西樟树天齐堂中药饮片有限公司	麸炒枳实	0.2

3 讨论

文献报道中采用 275 nm 作为辛弗林的 HPLC

测定吸收波长^[7], 本实验对对照品溶液进行了紫外扫描, 结果在 275 nm 处辛弗林有最大吸收, 与文献



报道一致,故采用 275 nm 作为辛弗林的 HPLC 测定吸收波长。

比较了《中国药典》一部 2005 年版中枳实项下的流动相系统以及乙腈-水-磷酸-十二烷基磺酸钠(25:75:0.1:0.1),乙腈-水-磷酸-十二烷基磺酸钠(32:68:0.1:0.1),乙腈-水-磷酸-十二烷基硫酸钠-三乙胺(32:68:0.1:0.1:0.2)等系统,结果药典中的流动相系统较佳。

本实验比较了聚酰胺柱,氧化铝柱,固相萃取 C_{18} 小柱的纯化效果,考察了聚酰胺或氧化铝的用量,层析柱的径高比以及不同溶剂的洗脱效果,同时还比较了不同有机溶剂萃取的纯化效果。结果发现聚酰胺柱,氧化铝柱以及有机溶剂萃取的纯化效果不理想,分离度低,重复性差,辛弗林回收率不高。采用 C_{18} 小柱的纯化效果良好,将样品溶液经 C_{18} 小柱过滤,取续滤液进样,辛弗林在过柱前后基本没有损失。

本实验比较了甲醇回流,甲醇超声,2% 冰醋酸超声及 0.1% 磷酸超声提取,并比较了 0.5%,1%,2%,3% 的冰醋酸作为提取溶剂进行超声提取,又比较了不同提取时间的影响,实验结果表明,2% 冰醋酸超声 30 min,经过 C_{18} 小柱处理,所测定的枳实中辛弗林的含量最高,回收率高,分离度高,峰形良好,重现性好。

本实验针对批号为 080315 的炒枳实,将《中国药典》一部 2005 年版中枳实中辛弗林的测定方

法^[7]与本实验所确定的测定方法进行了比较。结果显示,按照药典方法测得的辛弗林的质量分数为 $4.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,按照本实验方法测得的辛弗林的质量分数为 $7.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,这可能是由于辛弗林为生物碱类化合物,采用酸性溶剂更容易将其提取出来。从图 2 可见,采用本实验所确定的方法,杂质峰明显减少,可以大大的减少对色谱柱的损害。

在本实验中采用固相萃取技术进行供试品制备,方法更加简便,稳定,准确,所测得不同产地枳实中辛弗林的质量分数在 $0.27.9 \text{ m} \cdot \text{g}^{-1}$,可能是由于产地,品种以及炮制方法不同,而导致质量不等,此方法可作为枳实药材质量评价的参考依据。

[参考文献]

- [1] 李劲松. 枳实的研究概况[J]. 福建中医学院学报,2005,10(15):51.
- [2] 彭国平,牛贺明,徐丽华. 枳实活性成分的研究[J]. 南京中医药大学学报自然科学版,2001,17(2):91.
- [3] 朱玲,杨峰,唐德才. 枳实的药理研究进展[J]. 中医药学报,2004,32(2):64.
- [4] 陈廉,王殿俊,常复蓉等. 青皮、陈皮、枳实药理作用的比较[J]. 江苏中医杂志,1981(3):60.
- [5] 许妍,付辉政. RP-HPLC 法测定枳实中辛弗林的含量[J]. 药品评价,2005,2(6):436.
- [6] 卢文彪,曾元儿. 高效液相色谱法测定大承气颗粒剂中辛弗林的含量[J]. 时珍国医国药,2002,13(7):400.
- [7] 中国药典. 一部[S]. 2005:172.

[责任编辑 王亚君]