

# TLC - 双波长分光光度法测定枳壳中的橙皮苷和柚苷

丁 望, 王道福(解放军第 89 医院, 潍坊 261021)

**摘要;目的:**测定枳壳中的橙皮苷和柚苷。**方法:**根据二氢黄酮在碱性溶液中的显色反应,利用 TLC - 双波长分光光度联立方程法,在波长 418nm 和 358nm 测定样品吸收度,然后计算枳壳中的橙皮苷和柚苷含量。**结果:**橙皮苷的含量为 2.91%,柚苷的含量为 3.80%。**结论:**此法准确,重现性好。

**关键词:**枳壳;橙皮苷;柚苷;TLC - 双波长分光光度法。

**中图分类号:**R927.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1006 - 0111(2001)05 - 0305 - 03

枳壳为常用中药,具有破气消积,行气除痞的作用,二氢黄酮苷是其活性成分,其中主要包括橙皮苷(hesperidin)和柚苷(naringin)<sup>[1]</sup>,两者分别具有降低血管脆性及异常通透性和抗炎解痉作用。<sup>[2-4]</sup>植物中的橙皮苷和柚苷含量测定方法多有报道。诸如液相色谱法<sup>[5]</sup>薄层层析 - 比色法<sup>[6]</sup>等。由于枳壳中的橙皮苷和柚苷 TLC 上 Rf 值十分接近,很难将其分开,因此我们选用 TLC - 双波长分光光度法同时测定枳壳中的橙皮苷和柚苷,此法测定结果准确,重现性好。

## 1 仪器与试剂

岛津 UV - 265FW 紫外分析仪(日本岛津),R200D 半微量电子天平(德国)。枳壳饮片(湖南长沙药材站提供)粉碎过 100 目筛。甲醇、吡啶、乙酸乙酯、甲酸和氢氧化钠均为分析纯。硅胶 H - CMC 薄层的制备:取硅胶 H(青岛海洋化工厂)3.5g,加 3.5 倍 0.5% 的 CMC 溶液,研磨调成糊状,用倾注法铺于 15cm × 15cm 的玻璃板上,晾干,105 ~ 110℃ 活化 30min。橙皮苷对照品溶液:取橙皮苷对照品溶液(中国药品生物制品检验所提供),精密称定 0.1246g 置于 25ml 量瓶中,先用少量吡啶 - 甲醇(1 : 9)温热溶解,然后再用此溶液稀释至刻度,摇匀。用 5ml 移液管移取该液 5ml 于 50ml 量瓶中,再用吡啶 - 甲醇(1 : 9)稀释至刻度,摇匀,备用。柚苷对照品溶液:取柚苷对照品(中国药品生物制品检验所提供),精密称定 0.00500g 于 25ml 量瓶中,用少量吡啶 - 甲醇(1 : 9)溶解,然后稀释至刻度,摇匀。用 10ml 移液管移取该液 10ml 置于 50ml 容量瓶中,同样用吡啶 - 甲醇(1 : 9)稀释至刻度,摇匀备用。

## 2 实验方法与结果

### 2.1 紫外吸收光谱的绘制

取橙皮苷对照品溶液 6ml 柚苷对照品 3ml,各 2 份,分 2 组,一组加 2N 的 NaOH 0.1ml,另一组不加,

以下同橙皮苷和柚苷标准曲线操作。在 270 ~ 600nm 波长范围作吸收曲线(见图 1)由图可见未加碱的橙皮苷和柚苷均在 288nm 下有最大吸收,其吸收曲线基本相同。加碱后橙皮苷的最大吸收在 288nm 和 358nm。柚苷的最大吸收在 288nm 和 418nm,因此我们选用 358nm 和 418nm 为测定波长。

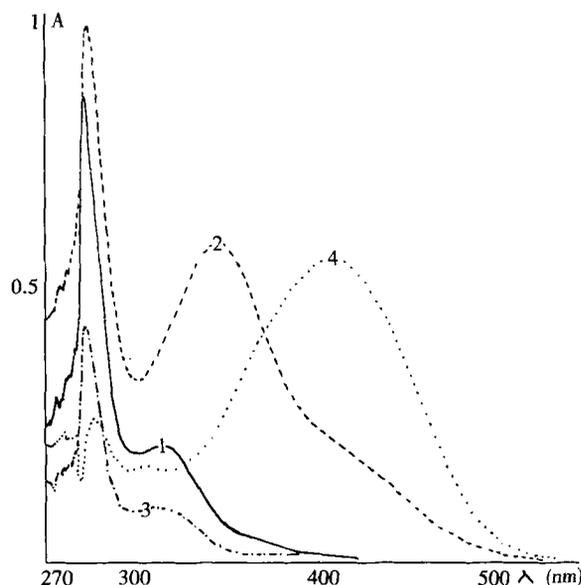


图 1 橙皮苷柚苷紫外吸收变化

1. 橙皮苷 2. 加碱橙皮苷 3. 柚苷 4. 加碱柚苷

### 2.2 标准曲线的绘制

**2.2.1 橙皮苷标准曲线的绘制** 量取橙皮苷对照品溶液 2.0、4.0、6.0、8.0g,分别置于 10ml 量瓶中,各加 2N 的氢氧化钠溶液 0.1ml,用吡啶 - 甲醇(1 : 9)稀释至刻度,摇匀,放置 2.5h,用同法处理的溶媒作空白,置 1cm 石英比色池中,分别于 418nm 和 358nm 处测吸收度,绘制标准曲线,用最小二乘法处理得回归方程为:  $C_{\text{橙}} = 0.1542A_{\text{橙}418} + 0.0006$ ,  $r = 0.9987$ ;  $C_{\text{橙}} = 0.0644A_{\text{橙}358} + 0.0009$ ,  $r = 0.9996$ 。

**2.2.2 柚苷标准曲线的绘制** 取柚苷对照品溶液

1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml,用相同的方法绘制标准曲线,用最小二乘法处理得回归方程为:  $C_{\text{柚}} = 0.0256A_{\text{柚}418} + 0.0005, r = 0.9994$ ;  $C_{\text{柚}} = 0.0662A_{\text{柚}358} + 0.0006, r = 0.9983$ 。实验结果表明,橙皮苷和柚苷在实验浓度范围内符合 Beer - Lambert 定律。

**2.3 橙皮苷和柚苷与氢氧化钠作用时间及其稳定性**

取橙皮苷对照品溶液 8ml,置 10ml 量瓶中,加 2N 的氢氧化钠 0.1ml,用吡啶 - 甲醇(1 : 9) 稀释至刻度,摇匀,放置 1.0、2.0、2.5、2.75、3.0、3.5、12h,在 358nm 下测定吸收度。柚苷重复上述操作,取量为 4ml,在 418nm 测吸收度。结果见图 2

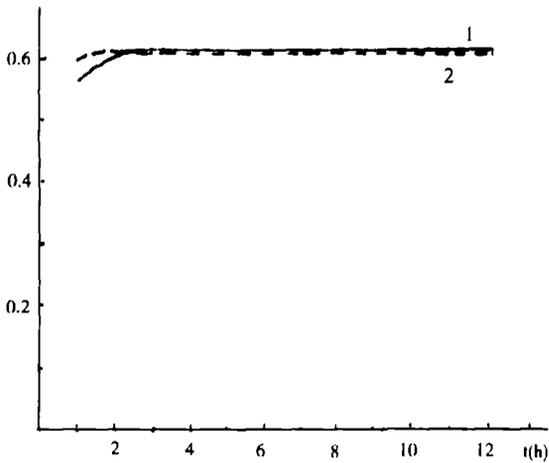


图 2 橙皮苷柚苷稳定性考查  
1. 橙皮苷 2. 柚苷

结果表明,橙皮苷和柚苷在 2N 的氢氧化钠中分别放置 2.5h 和 1.5h 吸收度达最高值且稳定。

**2.4 枳壳中橙皮苷和柚苷的含量测定**

**2.4.1 提取**,取枳壳粗粉 1g,置索氏提取器中,加甲醇 120ml,置水浴中提取 6h,浓缩提取液至干,然后用吡啶 - 甲醇(1 : 9) 溶解,定量的将提取物移入 25ml 量瓶中,稀释至刻度,混合均匀作样品液。

**2.4.2 薄层层析分离橙皮苷和柚苷及测定吸收度**用微量进样器取样品液 50ul,在硅胶 H-CMC 薄层上点成条状,点橙皮苷和柚苷对照品溶液,以乙酸乙酯 - 甲酸 - 水(7 : 2 : 3) 上层液作展开剂,上行展开 10cm,取出薄层板,挥尽展开剂,在 365nm 紫外灯下审视,样品、橙皮苷和柚苷均在 R<sub>F</sub>0.4 处呈现黄色斑条和斑点。结果见图 3。定位后刮取斑条于层析柱中,用 8ml 吡啶 - 甲醇(1 : 9) 洗脱至 10ml 量瓶中,加 2N 氢氧化钠 0.1ml 再用吡啶 - 甲醇(1 : 9) 稀释至刻度,摇匀放置 2.5h,用同法处理的溶媒作空白,在 358nm 和 418nm 处测样品的吸收度,同时用上述方法在波长 270nm 和 600nm 作样品的吸收曲线。见图 4

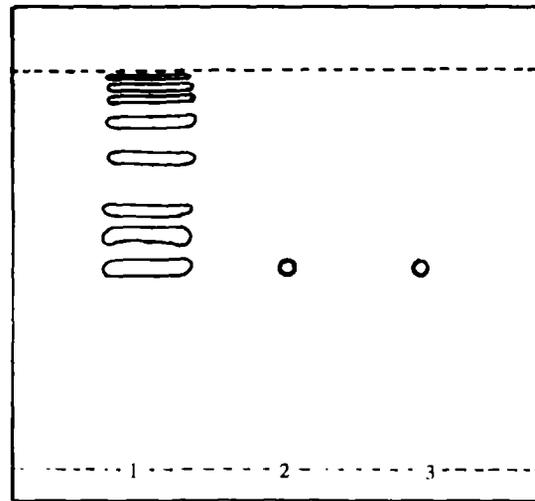


图 3 枳壳样品废液薄层析图  
1. 样品溶液 2. 橙皮苷对照品溶液  
3. 柚苷对照品溶液

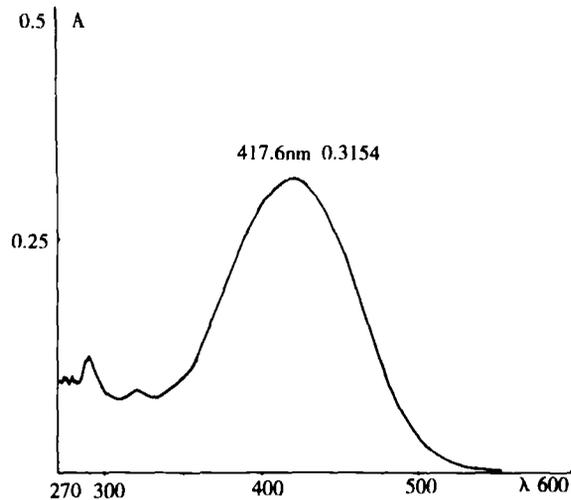


图 4 枳壳样品溶液吸收曲线

根据吸收度的加和性有:

$$A_{\text{柚}358} = A_{\text{柚}358} + A_{\text{柚}358} \quad A_{\text{柚}418} = A_{\text{柚}418} + A_{\text{柚}418} \quad C_{\text{柚}} = 0.0762A_{\text{柚}358} - 0.0295A_{\text{柚}418} + 1.072 \times 10^{-3} \dots \dots \textcircled{1}$$

$$C_{\text{柚}} = 0.0305A_{\text{柚}418} - 0.0127A_{\text{柚}358} + 4.215 \times 10^{-4} \dots \dots \textcircled{2}$$

解方程得橙皮苷和柚苷含量

**2.5 重现性实验**

精密称取枳壳粗粉 1g,按含量测定方法操作,计算橙皮苷和柚苷含量。结果见表 1

表 1 橙皮苷和柚苷的含量测定结果

样品含量 (g)	橙皮苷含量 (%)			柚苷含量 (%)		
	测得值	X	CV	测得值	X	CV
1.0166	2.91			3.81		
1.0145	2.91			3.80		
1.0087	2.91	2.91	1.9	3.80	3.80	3.0
1.0145	2.91			3.81		
1.0140	2.90			3.80		
1.0157	2.91			3.81		

2.6 回收率实验

2.6.1 样品溶液:同含量测定。

2.6.2 对照品溶液:精密称取橙皮苷对照品 0.00320g,柚苷对照品 0.00340g 于 5ml 量瓶中用吡啶-甲醇(1:9)溶解并稀释至刻度,摇匀。

表 2 橙皮苷的回收率

样品中橙皮苷 (mg)	加入橙皮苷 (mg)	测得值 (mg)	回收率 (%)	平均值 (x ± SD)
0.0622	0.0161	0.0782	99.87	
0.0631	0.0321	0.0951	99.89	99.89 ± 0.81
0.0633	0.0480	0.1112	99.91	

表 3 柚苷的回收率

样品中柚苷 (mg)	加入柚苷 (mg)	测得值 (mg)	回收率 (%)	平均值 (x ± SD)
0.0833	0.0170	0.1005	100.2	
0.0832	0.0341	0.1172	99.91	100.2 ± 0.90
0.0822	0.0512	0.1341	100.49	

2.6.3 薄层层析:在 H-CMC 薄层板上分别点样品溶液 50μl,样品溶液 50μl + 对照品 25μl;样品溶液 50μl,样品溶液 50μl + 对照品 50μl;样品溶液 50μl,样品溶液 50μl + 对照品 75μl 以下同含量测定

(上接第 304 页)

精取斑蝥素 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1mg,在 200~300nm 波长范围内扫描,在 298nm 处有最大吸收。另精取对照品溶液 0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0ml,置 10ml 容量瓶中加氯仿稀释至刻度,摇匀,在 298nm 波长处测定吸收度。以浓度为横坐标吸收度为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为  $Y = 24.87 - 36C, r = 0.9950$ ,结果表明斑蝥素在 0.02~0.1mg 范围内线性关系良好。

4.3 精密度试验

精取斑蝥素浓度为 0.05mg/ml 和 0.1mg/ml 溶液,分别同一天及第 2 天重复多次进样,计算日内和日间差异。结果日间精密度 ( $n = 7$ ) RSD 分别为 2.5% 和 1.3%,日内精密度 ( $n = 6$ ) RSD 分别为 2.1% 和 1.5%。

4.4 回收率及线性试验

取本品 10ml 制备方法同供试品溶液制备。精密量取 5ml 加入斑蝥素标准品 10.6mg,按样品测定项下操作。结果 5 次测定平均回收率为 99.3%,RSD 为 2.6%。取同一样品 5 批次,按样品测定 ( $n = 3$ ) RSD 为 2.0%。

5 样品含量测定

取本品 10ml,提取分离方法同供试品溶液制备;按上述相同浓度测定吸收度,依标准曲线计算含

量,测得吸收度,计算回收率。橙皮苷的回收率为 99.89%,柚苷的回收率为 100.2%,结果见表 2、3。

7 小结与讨论

本文利用 TLC-双波长分光光度法同时测定了枳壳中的橙皮苷和柚苷,方法快速,结果准确,重现性好。由于枳壳的产地收获的季节以及炮制工艺的不同所得结果会有所不同。刮取板条前,展开剂一定要挥尽,否则将影响含量测定,致使结果偏低。

致谢山东中医药研究所杨树斌教授指导,在此表示感谢。

参考文献:

[1] 中药大辞典. 江苏新医学院编,1507.  
 [2] 王宪楷,赵守训,潘德济等. 天然药物化学,275.  
 [3] Nothover B. J. et al; Brit. J. Pharmacol. 1962;18:340.  
 [4] Borkowski B. et al; Pharm. Zentralhalle. 1960;99:208.  
 [5] Trifiro et al; Ind. Conserver. 1980;55(3):194.  
 [6] Fisher J. F. et al; J. Food Sci. 1966;31(6):974.  
 [7] Drawert F. et al; Anal. chem. 1966;217(1):22.

收稿日期:2000-05-17

量,结果见表 1。

6 讨论

表 1 乌斑抗癌中药栓剂中斑蝥素含量测定 ( $n = 3$ )

批号	含量 (mg/ml)	RSD (%)
970701	0.17	1.0
970702	0.16	0.98
970703	0.17	1.1
970903	0.17	1.2
971015	0.15	0.99
971015	0.16	1.0

据文献报道,斑蝥素有一定的挥发性,因此本文样品处理操作过程中始终保持密闭的原则,样品暴露时操作速度要快,尽量减少操作过程中样品与空气的接触时间;我们在实验过程中对 5 份标准品和样品均按样品方法处理前后的含量数据进行统计学处理,结果表明,样品处理前后含量无显著性差异。试验中我们比较了不同溶剂对斑蝥素的洗脱能力,结果以石油醚、氯仿为佳,且洗脱时间短,故采用石油醚为洗脱剂。制备过程中要保持该栓剂中 1~100μm 的微粒才能较好地栓塞肿瘤动脉,否则栓塞局部易吸收,以致重新建立血液循环,造成栓塞失败。本品临床应用中深受医师和患者的欢迎,成品价廉,质量易控制,方法快捷,具有实用性。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 2000 版一部. 2000:31~32.  
 [2] 王泽民. 当代结构药物全集(下册)[M]. 北京:北京科学技术出版社. 1993:2125~2126. 收稿日期:2001-04-13