

HPLC 法测定牙膏中柚皮苷的含量

覃青云, 卢凯玲*

(柳州两面针股份有限公司, 广西柳州 545001)

摘要: 建立了高效液相色谱测定牙膏中柚皮苷含量的方法。采用的色谱条件: Hypersil BDS C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 40 ℃; 以水(A相)和乙腈(B相), 梯度洗脱程序为: 0~15 min, 10%~100% B; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 283 nm; 进样量为 20 μL。结果表明, 柚皮苷的质量浓度在 14.55~116.40 μg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系($r=0.9999$), 平均加标回收率为 97.56%。该方法稳定、准确, 重现性好, 可作为牙膏中柚皮苷的含量测定和质量控制方法。

关键词: HPLC 法; 牙膏; 柚皮苷

中图分类号: Q946.83 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0707-04

Determination of naringin in toothpaste by high performance liquid chromatography

QIN Qing-Yun, LU Kai-Ling*

(Liuzhou Liangmianzhen Co. Ltd, Liuzhou 545001, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method was developed for determining the content of Naringin in toothpaste. The chromatographic analysis was carried out on a Hypersil BDS C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was water(A) and acetonitrile(B) with gradient elution (0~15 min, 10%~100% B). The flow rate was maintained at 1.0 mL/min; The detection wavelength was set at 283 nm and the column temperature was controlled at 40 ℃, The sample injection volume was 20 μL. The results showed that the mass concentration of Naringin with good linearity vs. the peak area within ranges of 14.55~116.40 μg/mL, $r=0.9999$. The average recovery was 97.56%. The method was proved to be stable, reproducible and precise, It could be used for determination and quality control of naringin in toothpaste.

Key words: HPLC; toothpaste; Naringin

柚子 (*Citrus grandis*), 又称文旦, 是芸香科柑桔属水果, 有沙田柚、蜜柚、胡柚、葡萄柚、文旦柚、枰山柚等品种。它原产于中国、印度、马来西亚一带, 在我国沿海的浙江、福建、广东、广西有种植(邓婷婷, 2008)。柚皮占整个柚子的 43%~48%, 柚皮除含有水分、维生素、矿物质等人体必需的营养素外, 还含有多种对人体有益的非营养性生理活性成分, 如黄酮类化合物(杨洋, 2001)、精油(张晨, 2000)、天然色素(林春绵, 1996)、膳食纤维(王林果, 2008)等。中医认为, 柚皮具有止咳、化痰、理气、抗炎、止

痒等功效。现代医学研究表明, 柚皮提取物具有抗氧化、抗凝、抗微生物、抗癌、抑酶、抗衰老、降血糖、降血压等活性(贾冬英, 2001; 冯宝民, 2001)。柚皮苷是柚皮提取物的活性成分之一, 全称为柚皮素-7-O-新橙皮糖苷, 是一种双氢黄酮类化合物(苏玲, 2008)。柚子中 50% 以上的柚皮苷分布于果皮内, 柚皮苷具有多种生物活性, 如抗氧化、抗突变、抗肿瘤、抑菌、改善微循环、降低毛细血管的脆性等, 在医药、食品等领域有广泛应用(贾冬英, 2002)。

柚皮提取物牙膏是两面针公司研发的新型消炎

收稿日期: 2009-01-22 修回日期: 2009-08-19

基金项目: 柳州市科技计划项目(2006040501)[Supported by the Science and Technology Plan of liuzhou(2006040501)]

作者简介: 覃青云(1955-), 男, 广西柳州市人, 高级工程师, 主要从事中草药在日化产品中的应用研究, (E-mail) qinqy@lmz.com.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence)

止血牙膏,根据功效型牙膏国家标准的要求,牙膏中的活性成分需定性或定量检测(黄光伟,2009)。柚皮提取物多用于药品和保健食品中(李芳,2007;贺肇东,2008;苏东林,2008)。目前尚无添加柚皮提取物作为牙膏功效剂以及检测其中柚皮苷含量方法的文献报道。为有效控制牙膏的产品质量,本研究以柚皮提取物中的主要活性成分柚皮苷为指标,采用 HPLC 分析法,测定牙膏中柚皮苷含量,为两面针新型消炎止血牙膏建立相应的质量控制方法提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪,配有色谱工作站和 DAD 检测器,美国 Agilent 公司;AND HM-200 电子天平,日本 AND 公司;As3120 超声清洗仪,Automatic 科学仪器公司;LG10-2.4A 离心机,北京医用离心机厂;RE52-98 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;ZFMQ05001 Milli-Q PLUS 超纯水仪,美国 Millipore 公司;柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110722-200309);牙膏(规格:每支 120 g,柳州两面针股份有限公司生产);乙腈,色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;甲醇,色谱纯,Fisher 公司;超纯去离子水。

1.2 色谱条件

色谱柱:依利特 Hypersil BDS C18(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:A 为超纯去离子水,B 为乙腈;梯度洗脱:0min 10% B,0→15 min 内 10%→100% B;流速:1.0 mL/min;柱温:40 °C;检测波长:283 nm;进样量:20 μL。

1.3 标准溶液和样品溶液的配制

称取柚皮苷对照品 0.0291 g,置 100 mL 容量瓶中,加入适量甲醇,振荡溶解,再加甲醇至刻度,摇匀,备用。准确称取 3 g 牙膏样品于具塞锥形瓶中,加 10 mL 甲醇,使样品充分分散,超声波提取 60 min,离心沉淀,取上清液于 100 mL 圆底烧瓶中,50 °C 水浴减压回收甲醇,浓缩提取液至 2~3 mL,转移至 10 mL 容量瓶,并以甲醇稀释至刻度,用 0.45 μm 滤膜过滤,滤液为供试品溶液。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

取柚皮苷对照品溶液在 200~400 nm 波长范

围内扫描。扫描结果表明,在 283 nm 处柚皮苷有最大吸收,而且供试品中此处的杂峰干扰最小,本实验选择 283 nm 作为检测波长。

通过以甲醇、乙腈分别和水作不同比例等度洗脱和不同时间的梯度洗脱试验,得出前述最佳洗脱条件,在此条件下,理论塔板数按柚皮苷峰计算大于 57 900,分离度大于 37.00,具有良好的分离效果。采用 1.2 的色谱条件,对照品的标准色谱图见图 1,供试品的色谱图见图 2。

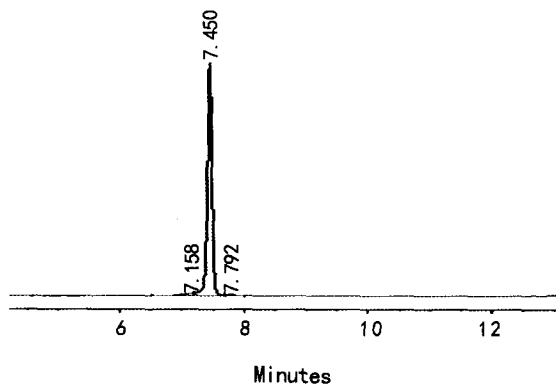


图 1 对照品的标准色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of control solution

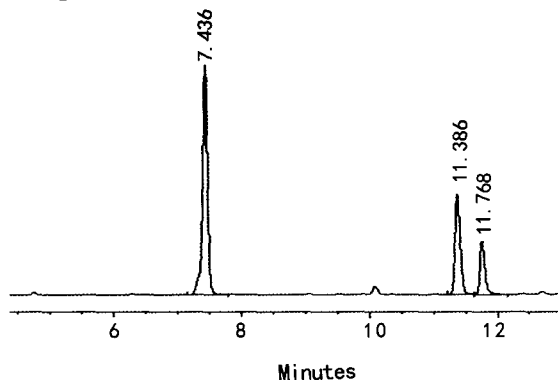


图 2 供试品的色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of sample solution

2.2 线性关系

精密吸取 1.3 配制的柚皮苷对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度、摇匀,依前述色谱条件进行测定。以浓度(Y)对峰高(X)进行线性回归,得回归方程: $Y=0.1571x-0.1526$, ($r=0.9999$)。结果表明,柚皮苷浓度在 14.55~116.40 μg/mL 与峰高呈良好的线性关系(图 3)。

2.3 精密度试验

取用牙膏样品制备的供试品溶液,依前述色谱条件连续进样 6 次(编号为 1、2、3、4、5、6),测定柚

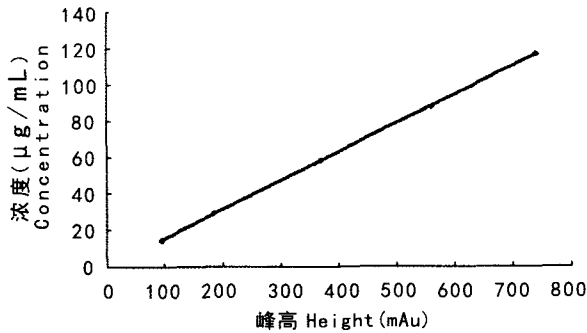


图3 对照品标准曲线

Fig. 3 Standard curve of sample solution

皮苷含量。结果显示,柚皮苷含量分别为 78.39、78.47、78.95、78.73、79.21、78.05 $\mu\text{g/g}$,平均值为 78.63 $\mu\text{g/g}$,RSD 为 0.53%。

2.4 稳定性试验

取用牙膏样品制备的供试品溶液,依前述的色谱条件在 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、23.0、24.0 h 分别进样检测柚皮苷含量。结果显示,供试品溶液 24 h 内测定结果稳定,柚皮苷含量分别为 78.39、78.28、78.39、78.45、78.82、78.21、78.14、78.60 $\mu\text{g/g}$,平均值为 78.41 $\mu\text{g/g}$,RSD 为 0.28%。

2.5 重现性试验

取同一支牙膏平行称取样品 6 份(编号为 1、2、3、4、5、6),依照 1.3 方法分别制备供试品溶液,进样测定,计算得牙膏样品中柚皮苷的含量。结果显示,柚皮苷含量分别为 78.45、79.03、78.26、77.98、78.68、78.41 $\mu\text{g/g}$,平均值为 78.47 $\mu\text{g/g}$,RSD 为 0.46%,表明分析方法重现性良好。

表 1 回收率试验结果 (n=3)
Table 1 Test results of recovery

编号 No.	本底值 Sample (μg)	加入量 Added (μg)	实测量 Result (μg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average (%)	RSD (%)
1	79.24	14.55	93.72	99.52	97.56	2.33
2	78.84	14.55	92.69	95.19		
3	79.11	29.10	107.71	98.28		
4	79.58	29.10	108.84	100.55		
5	78.64	43.65	120.88	96.77		
6	78.79	43.65	120.27	95.03		

2.6 回收率试验

精密称取已知含量的牙膏 6 份平行样,分别精密加入不同量的柚皮苷对照品,搅匀,依照 1.3 方法制成供试品溶液,按上述方法进行测定,并计算加样回收率,结果平均回收率为 97.56%,表明本方法准

确可靠。结果见表 1。

2.7 样品的测定

取牙膏样品 6 批,按 1.3 方法制备供试品溶液测定,每批测量 3 次,计算牙膏中柚皮苷含量,结果见表 2。

表 2 牙膏中柚皮苷的测定结果
Table 2 Determination of Naringin in toothpaste

编号 No.	1	2	3	4	5	6
柚皮苷含量 ($\mu\text{g/g}$) Content of naringin	79.13	78.66	78.70	76.08	78.64	79.23
RSD (%)	0.57	0.57	0.36	0.51	0.56	0.30

3 结论与讨论

(1)柚皮提取物多用于医药、保健食品中,李芳(2007)、贺肇东(2008)、苏东林(2008)报道过柚皮苷的检测,但都是测定药材、药品或保健品中柚皮苷的含量,这些样品中柚皮苷的含量较高,而且是采用等度洗脱的方法。韩彩轩(2003)报道采用反相高效液相色谱法进行检测分析。对于牙膏样品,它是一种口腔卫生用品,其主要作用是清洁牙齿保持口腔卫生。把柚皮提取物添加到牙膏中,只是利用柚皮提取物所具有的消炎止血的功效,在刷牙时起到辅助功效的作用,因此,样品中添加的柚皮提取物相对较少,而且牙膏是一种由十几种原料组成的混合物,其中包含有表面活性剂和香精等多种有机成分,对分析的干扰很大。为了达到理想的分离效果,本研究首次将柚皮提取物添加到牙膏中,不仅利用柚皮提取物所具有的消炎止血作用,使牙膏具有消炎止血的辅助效果,而且对牙膏的提取和检测条件进行优化,最终建立了以水—乙腈为流动相,梯度洗脱的分析方法,并在实际工作中加以应用。

(2)根据国家功效性牙膏标准的要求,需要检测牙膏中添加的功效成分含量,现有文献报道的柚皮苷检测方法,都是采用高效液相色谱法中的等度洗脱方法。而牙膏中的成分比较复杂,柚皮提取物的添加量又相对较少,因此,采用等度洗脱法不能将牙膏中的柚皮苷进行有效分离。作者经过研究,在化学成分复杂、含柚皮提取物少的牙膏中,建立了梯度洗脱法,较好地分离检测其中柚皮苷的含量。最佳测定条件:依利特 Hypersil BDS C18(250 mm \times 4.6 mm,5 μm)色谱柱;流速为 1.0 mL/min;柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$;检测波长为 283 nm。结果表明,该方法的分离

效果好,质量浓度在 14.55~116.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰高呈良好的线性关系($r=0.9999$),平均回收率为 97.56%。将该方法应用于样品的测定,其稳定性、重现性和准确性良好,可作为牙膏的质量控制方法。

参考文献:

- 邓婷婷,刘素纯,贺建华. 2008. 柚皮提取物有效成分的研究概况[J]. 中国食物与营养, 6:16-19
- Feng BM(冯保民), Yuan YG(苑艳光), Pei YH(裴月湖). 2001. Chemical and pharmacological advances of the study on *Citrus grandis*(柚的化学与药理研究进展)[J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 18(3):228-232
- Han CX(韩彩轩). 2003. Detection of naringin from healthy foods by using reversed phase high performance liquid chromatography (反相高效液相色谱法测定保健食品中的柚皮苷)[J]. *China Trop Med*(中国热带医学), 3(3):357-358
- He ZD(贺肇东), Chen Q(陈强), Zhu BF(朱贵峰), et al. 2008. Determination of naringin in fructus ponciri trifoliatae by RP-HPLC(PR-HPLC 法测定绿衣枳实中柚皮苷的含量)[J]. *J Strait Pharm*(海峡药理学), 20(5):37-38
- Huang GW(黄光伟), Wei BH(韦宝韩), Lu KL(卢凯玲), et al. 2009. Determination of total flavonoids from the extract of *Ginkgo* leaf in toothpaste by HPLC(HPLC 法测定牙膏中银杏叶提取物总黄酮的含量)[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*(香料香精化妆品), 3:25-27
- Jia DY(贾冬英), Yao K(姚开), Tan M(谭敏), et al. 2001. Advance in research of physiologically-active compounds in pummelo peel(柚果皮中生理活性成分的研究进展)[J]. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业), 27:77-78
- Jia DY(贾冬英), Yao K(姚开), Tan M(谭敏). 2002. Ethanol extract processing of naringin from pummelo pericarp(柚皮中柚皮苷的乙醇提取工艺研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), 33(9):801-802
- Lin CM(林春绵), Wang ZJ(王忠杰), Mao HZ(茅惠忠). 1996. A study on the extraction and stability of the pigment from pomelo peel(柚皮色素的提取及其稳定性研究)[J]. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业), 4:50-53
- Li F(李芳), Zhou JP(周建平), Lei JL(雷建林), Cao XX(曹勋学), et al. 2007. Determination of naringin in Jiegu Xujin capsules by HPLC(HPLC 测定接骨续筋胶囊中柚皮苷的含量)[J]. *Modern Tradit Chin Med*(现代中医药理学), 27(6):57-59
- Su DL(苏东林), Shan Y(单杨), Li GY(李高阳), et al. 2008. Determination of hesperidin and naringin in citrus peel by RP-HPLC simultaneously(PR-HPLC 法同时测定柑桔皮中橙皮苷和柚皮苷的含量)[J]. *Sci Tech Food Industry*(食品工业科技), 6:288-290
- Su L(苏玲), Liu QD(刘启德). 2008. Biological activity and pharmacokinetics of Naringin(柚皮苷生物活性和药代动力学研究新进展)[J]. *Chin J Pharm Tech Economics Management*(中国医药技术经济与管理), 2(10):74-80
- Wang LG(王林果), Jiang LY(蒋玲艳), Huang GH(黄国欢), et al. 2008. Extraction and Application of Dietary Fiber from Pomelo Peel(柚皮中膳食纤维的提取及其应用)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 36(24):10 492-10 494
- Yang Y(杨洋), Yu L(余炼), Deng LG(邓立高), et al. 2001. Study on extraction technology of flavonoid from pomelo peel and determination of naringin(柚皮黄酮的提取工艺及其含量测定)[J]. *Guangxi J Light Industry*(广西轻工业), 4:47-50
- Zhang C(张晨), Liu zw(刘志伟). 2000. Extraction of pomelo peel oil by super critical CO₂(CO₂ 超临界萃取技术提取沙田柚皮的研究)[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*(香料香精化妆品), 3:10-12
- =====
- (上接第 668 页 Continue from page 668)
- The cloning of replicase gene of banana bunchy top virus and the gene expression(香蕉束顶病毒复制酶基因克隆及转基因表达)[J]. *J Trop and Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), 12(4):142-146
- Remy S. 2000. Genetic transformation of banana(*Musa* spp.) for disease resistance by expression of antimicrobial protein[D]. Belgium; K. U. Leuven
- Roux NS, Toloza A, Dolezel J, et al. 2004. Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutants in *Musa* spp[C]//Jain SM, Swennen R. Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Enfield USA; Science Publishers, Inc:33-43
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1992. Molecular cloning; A laboratory manual(2nd ed)[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Worrall D, Elias L, Ashford D, et al. 1998. A carrot leucine-rich repeat protein that inhibits ice recrystallization[J]. *Science*, 282(2):115-117
- Xu CX(徐春香), Panis B, Strosse H, et al. 2004a. The induction of embryogenic callus and establishment of embryogenic cell suspension of *Musa* spp(香蕉胚性愈伤组织的诱导及胚性细胞悬浮系的建立)[J]. *J South China Agric Univ(Sci Nat)*(华南农业大学学报·自然科学版), 25(1):70-73
- Xu CX(徐春香), Panis B, Strosse H, et al. 2004b. Factors affecting banana(*Musa* spp., AAB Group) plant regeneration via embryogenesis(影响体胚发生途径香蕉植株再生的因素)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 2004, 40(3):293-296
- Xu CX, Panis B, Strosse H, et al. 2005. Establishment of embryogenic cell suspensions and plant regeneration of the dessert banana Williams(*Musa* AAA group)[J]. *J of Horti Sci Biotech*, 80(5):523-528
- Yin MA(尹明安), Cui HW(崔鸿文), Fan DM(樊代明), et al. 2001. Cloning and sequencing of antifreeze protein gene in *Daucus carota* var *sativus* Hoffm Deutschl(胡萝卜抗冻蛋白基因的克隆及测序)[J]. *Acta Bot Boreo-Occident Sin*(西北植物学报), 21(2):226-231
- Zhao L(赵凌), Wang CL(王才林), Zhang YD(张亚东), et al. 2006. Transformation of antifreeze protein gene(AFP) from carrot(*Daucus carota*) into rice(*Oryza sativa* L.) by pollen-tube pathway(花粉管介导的转抗冻蛋白基因(AFP)水稻)[J]. *Jiangsu J Agri Sci*(江苏农业学报), 22(4):315-317