

枳壳总黄酮的多指标质量控制

栾连军,江周虹,糜松元,吴永江

(浙江大学现代中药研究所,浙江 杭州 310058)

[摘要] **目的:**建立枳壳总黄酮多指标质量控制方法。**方法:**采用高效液相色谱法测定枳壳总黄酮中有效成分含量和指纹图谱,紫外分光光度法测定总黄酮含量。含量测定色谱条件为:Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为0.02% 磷酸水溶液-乙腈(80:20),流速1 ml/min,柱温35℃,检测波长280 nm。指纹图谱条件为:Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相A(0.5% 醋酸水溶液,V/V)、B(甲醇);梯度洗脱程序(min、B%):0 min、20%,10 min、40%,35 min、70%,50 min、100%;流速1 ml/min,柱温30℃,检测波长320 nm。总黄酮检测波长为283 nm。**结果:**经方法学认证,含量测定和指纹图谱分析各项参数均符合要求;10批枳壳总黄酮样品的含量分析显示:柚皮苷、新橙皮苷含量为38.3%~47.2%及21.0%~28.5%,总黄酮含量79.9%~88.6%;各批次样品指纹图谱分析都显示12个共有峰,与标准谱图比较,指纹图谱相似度均在98.0%以上。**结论:**指纹图谱与关键成分含量测定相结合的分析方法能很好地反映枳壳总黄酮整体质量,是一种有效的质量分析与评价方法。该方法测定结果准确,重复性好,可有效控制枳壳总黄酮质量。

[关键词] 枳壳/化学; 色谱法, 高压液相/方法; 质量控制; 黄酮类/分析; 核苷酸图谱

[中图分类号] R 282.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2011)01-0017-06

Comprehensive quality control method for total flavonoid of *Fructus Aurantii*

LUAN Lian-jun, JIANG Zhou-hong, MI Song-yuan, WU Yong-jiang (Department of Chinese Materia Medica, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a comprehensive quality control method for total flavonoid of *Fructus Aurantii*. **Methods:** RP-HPLC and spectrophotometry were applied for the quantitative and fingerprint analysis of total flavonoid of *Fructus Aurantii*. The contents of naringin and neohesperidin were determined on an Agilent SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm,5 μm). The mobile phase was composed of 0.02% H₃PO₄ and CH₃CN(80:20). The flow rate was 1 ml/min with DAD detected at 280 nm. The column temperature was maintained at 35℃. The fingerprints were developed on an Agilent SB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm,5 μm). The mobile phase was composed of 0.5% HAc and CH₃OH with a linear gradient elution. The ratio of 0.5% HAc and CH₃OH was: 0 min,80:20; 10 min,60:40; 35 min,30:70; 50 min,0:100. The flow rate was 1 ml/min with DAD detected at 320 nm. The column

收稿日期:2010-09-15 修回日期:2010-11-24

基金项目:浙江省中医药重点开发项目(2003KF004).

作者简介:栾连军(1962-),男,副教授,硕导,主要从事药物分析研究.

通讯作者:吴永江(1962-),男,教授,博导,主要从事药物分析研究;E-mail:yjwu@zju.edu.cn

temperature was maintained at 30°C. Meanwhile, the contents of total flavonoid were determined at 283 nm. **Results:** The contents range of naringin, neohesperidin and total flavonoid were 38.3% - 47.2%, 21.0% - 28.5% and 79.9% - 88.6%, respectively. The fingerprints of the effective fractions showed 12 common peaks and the fingerprint similarity was all above 98.0% compared with the standard chromatogram. **Conclusion:** The method reported in this paper can be used effectively for the quality control of total flavonoid of *Fructus Aurantii*.

[**Key words**] FRUCTUS AURANTII/chem; Chromatography, high pressure liquid/methods; Quality control; Flavones/anal; Nucleotide mapping

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2011, 40(1):17-22.]

中药一般为多成分混合物,在质量控制上,仅以指标性成分定量分析远不能从整体上反映中药的内在质量,而目前的分析技术还不能满足对中药所有成分进行含量测定的要求。因此,针对中药的特点,采用多种指标体系对中药进行质量控制与评价,是中药质量分析研究的重要方向。

枳壳为芸香科植物酸橙 (*Citrus aurantium* L) 及其栽培变种的干燥未成熟果实,具有破气消积、化痰散痞的功效。近年来,高效液相色谱 (HPLC) 法广泛用于枳壳黄酮类化合物的分析测定^[1-3],但多是针对枳壳药材及其质量控制。枳壳总黄酮为枳壳的主要有效部位,可采用乙醇提取、大孔树脂纯化富集方法制备。本实验以枳壳中制备的总黄酮有效部位为研究对象,采用指标(有效)成分及总黄酮含量测定,并结合指纹图谱分析手段,从指标(有效)成分、总成分含量和指纹图谱整体相似性 3 个层面考察枳壳总黄酮提取物的质量及批次间的稳定性,探讨能够全面反映中药有效部位内在质量的质控方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配置四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器、柱温箱和 ChemStation 工作站; 752PC Spectrum 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); KQ-250B 型超声器(250 W, 40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司)。

枳壳饮片由中国中医研究院中药所提供并

鉴定; 柚皮苷含量大于 98.5% (美国 Sigma 公司产品); 新橙皮苷(本实验室自制)经波谱分析确证其结构, HPLC 归一化含量大于 98.0%; D-101 型大孔吸附树脂(天津海光化工有限公司); 色谱乙腈(默克公司); 重蒸馏水自制,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

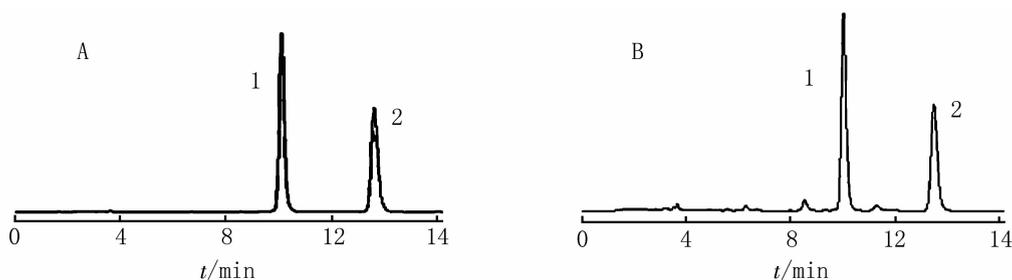
2.1 枳壳总黄酮样品制备 枳壳饮片加 8 倍量 70% 乙醇,加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,提取液合并,浓缩过滤。滤液上 D-101 大孔吸附树脂柱,先用水洗脱至 Molish 反应阴性,除去多糖等杂质,再用 5 倍树脂床体积的 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,减压浓缩,喷雾干燥,得枳壳总黄酮有效部位。采用以上方法总共制备样品 10 批(编号 a-j),经测定总黄酮含量均大于 50%。

2.2 柚皮苷和新橙皮苷的含量测定

2.2.1 混合对照品溶液 取柚皮苷对照品 40 mg,新橙皮苷对照品 25 mg,精密称定,加 20% 乙腈溶解并定容至 25 ml,精密移取上述溶液各 1.8 ml,置同一 10 ml 量瓶中,加 20% 乙腈稀释至刻度,即得。

2.2.2 供试品溶液 取枳壳总黄酮约 70 mg,精密称定,置 100 ml 量瓶中,用 20% 乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相: 0.02% 磷酸-乙腈(80:20),流速: 1.0 ml/min,柱温: 35°C,检测波长: 280 nm,进样量: 10 μl,色谱图见图 1。



1. 柚皮苷;2. 新橙皮苷.

图1 对照品(A)和枳壳总黄酮样品(B)的HPLC图谱

Fig.1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and sample(B)

2.2.4 线性关系考察 取对照品混合溶液,分别进样 $2\ \mu\text{l}$ 、 $5\ \mu\text{l}$ 、 $10\ \mu\text{l}$ 、 $15\ \mu\text{l}$ 、 $20\ \mu\text{l}$ 、 $30\ \mu\text{l}$ 和 $50\ \mu\text{l}$,以进样量(μg)为横坐标(X),色谱峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线并进行回归计算,得柚皮苷和新橙皮苷的线性方程分别为: $Y = 1487.38X - 30.11$, $r = 0.9999$; $Y = 1924.8X - 15.97$, $r = 0.9998$ 。柚皮苷和新橙皮苷进样量分别在 $0.60 \sim 14.87\ \mu\text{g}$ 和 $0.35 \sim 8.68\ \mu\text{g}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 加样回收率试验 取样品(编号*i*,柚皮苷 38.3% ,新橙皮苷 26.2% , $n = 3$) $90\ \text{mg}$,精密称定,置 $25\ \text{ml}$ 量瓶中,加 20% 乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,制成样品储备液。精密移取样品储备液 $1\ \text{ml}$,置 $10\ \text{ml}$ 量瓶中,按柚皮苷、新橙皮苷含量的 80% 、 100% 、 120% 准确加入对照品,制成低、中、高3种浓度的供试品溶液,每个浓度各平行制备3份,进样分析,计算加样回收率。柚皮苷的平均回收率为 101.6% ,RSD为 4.1% ($n = 9$),新橙皮苷的平均回收率为 100.8% ,RSD为 3.0% ($n = 9$)。

2.2.6 重复进样精密度试验 取对照品溶液 $10\ \mu\text{l}$,按“3.2”项下色谱条件,连续进样6次,计算柚皮苷和新橙皮苷含量RSD分别为 0.5% 和 0.2% ($n = 6$)。

2.2.7 重复性试验 取同一样品(编号*i*)6份,制成供试品溶液并进样分析,计算柚皮苷和新橙皮苷含量RSD分别为 0.7% 和 0.8% ($n = 6$)。

2.2.8 稳定性试验 取同一样品(编号*i*),制成供试品溶液,分别于 $0\ \text{h}$ 、 $4\ \text{h}$ 、 $8\ \text{h}$ 、 $10\ \text{h}$ 、 $12\ \text{h}$ 和 $24\ \text{h}$ 进样 $10\ \mu\text{l}$,记录色谱图,考察样品溶液

的稳定性。结果柚皮苷和新橙皮苷含量RSD为 1.1% 和 1.1% ,表明供试品溶液在 $24\ \text{h}$ 内基本稳定。

2.2.9 样品分析 测定了10批枳壳总黄酮样品,其中柚皮苷含量在 $38.3\% \sim 47.2\%$ 之间,平均含量为 41.4% ;新橙皮苷含量在 $21.0\% \sim 28.5\%$ 之间,平均含量为 25.5% 。柚皮苷和新橙皮苷的含量之和大于 60% 。样品中柚皮苷、新橙皮苷的含量有一定的波动,但波动范围小于 10% 。结果见表1。

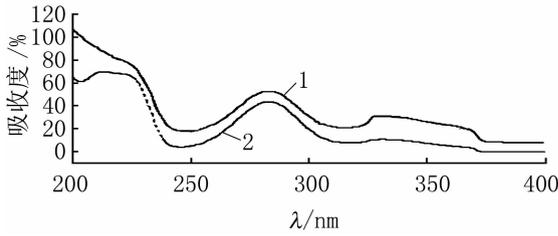
2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 对照品储备液及对照品溶液 取柚皮苷对照品约 $13\ \text{mg}$,精密称定,置 $50\ \text{ml}$ 量瓶中,加 $2\ \text{ml}$ 甲醇超声溶解,加水稀释至刻度,得对照品储备液。精密移取储备液 $0.6\ \text{ml}$,置 $10\ \text{ml}$ 量瓶中,加水稀释至刻度,即得对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 取枳壳总黄酮样品约 $16\ \text{mg}$,精密称定,置 $50\ \text{ml}$ 量瓶中,加 $2\ \text{ml}$ 甲醇超声溶解,加水稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜($0.45\ \mu\text{m}$)滤过。精密移取续滤液 $0.6\ \text{ml}$,置 $10\ \text{ml}$ 量瓶中,加水稀释至刻度,即得。

2.3.3 测定波长的选择 取柚皮苷对照品溶液和供试品溶液,于 $200 \sim 400\ \text{nm}$ 波长处扫描,紫外吸收光谱见图2。供试品和对照品在 $283\ \text{nm}$ 处有最大吸收,故选择 $283\ \text{nm}$ 为测定波长。

2.3.4 线性关系考察 精密移取柚皮苷对照品储备液 $0.3\ \text{ml}$ 、 $0.4\ \text{ml}$ 、 $0.5\ \text{ml}$ 、 $0.6\ \text{ml}$ 、 $0.7\ \text{ml}$ 、 $0.8\ \text{ml}$ 、 $0.9\ \text{ml}$ 和 $1.0\ \text{ml}$,分别置 $10\ \text{ml}$ 量瓶中,加水稀释至刻度,于 $283\ \text{nm}$ 处测定吸收度,以对照品量(mg)为横坐标(X),吸收度为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得柚皮苷的线性方程:



1: 供试品; 2: 柚皮苷对照品.

图 2 供试品溶液(i)和柚皮苷对照品溶液的光谱图

Fig. 2 Spectrogram of the total flavonoid (i) and naringin reference substance

$Y = 2.8868X - 0.0188, r = 0.9999$, 表明柚皮苷在 80.3 ~ 267.6 μg 范围内线性关系良好。

2.3.5 加样回收率试验 取样品 16 mg (编号 i, 总黄酮含量 80.2%, $n = 3$), 精密称定, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇 2 ml 超声溶解, 用水稀释至刻度, 精密移取 0.3 ml, 置 10 ml 量瓶中, 按总黄酮含量的 80%、100%、120% 加入柚皮苷对

照品, 制成低、中、高 3 个浓度的供试品溶液, 每个浓度平行制备 3 份合计共 9 份, 于 283 nm 处测定吸收度, 计算加样回收率。总黄酮的回收率为 100.4%, RSD 为 3.0%, 结果见表 1。

2.3.6 重复测定精密度试验 取对照品溶液, 于 283 nm 连续测定 6 次, 计算吸收度 RSD 为 0.5% ($n = 6$)。

2.3.7 重复性试验 取同一样品 (编号 i) 6 份, 制备供试品溶液, 于 283 nm 处测定吸收度, 计算含量 RSD 为 0.9% ($n = 6$)。

2.3.8 稳定性试验 取同一样品 (编号 i), 制备供试品溶液, 分别于 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h, 于 283 nm 处测定, 计算总黄酮含量 RSD 为 0.2%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.3.9 样品测定 采用所建立方法测定了 10 批枳壳总黄酮样品, 总黄酮含量 79.9% ~ 88.6%, 平均含量 83.7%, 含量波动范围小于 10%, 符合有效部位新药含量要求。各批次样品总黄酮含量见表 1。

表 1 柚皮苷、新橙皮苷及总黄酮加样回收率试验

Table 1 The method recovery of naringin, neohesperidin and total flavonoid ($n = 9, \bar{x} \pm s$)

供试品	本底量/mg	对照品加入量/mg	测得总量/mg	平均回收率/%	RSD/%
柚皮苷	1.41 ± 0.02	1.06	2.43 ± 0.02	101.6	4.1
	1.43 ± 0.01	1.65	3.17 ± 0.02		
	1.43 ± 0.01	2.25	3.75 ± 0.01		
新橙皮苷	0.91 ± 0.01	0.44	1.35 ± 0.02	100.8	3.0
	0.92 ± 0.01	0.81	1.77 ± 0.02		
	0.92 ± 0.0	1.16	2.07 ± 0.01		
总黄酮	97.30 ± 1.6	64.2	161.00 ± 2.61	100.4	3.0
	97.40 ± 1.7	80.3	176.10 ± 1.76		
	104.80 ± 3.7	96.3	204.80 ± 3.09		

2.4 枳壳总黄酮指纹图谱分析

2.4.1 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A (0.5% 醋酸水溶液, V/V)、B (甲醇), 梯度洗脱程序 (min、B%): 0 min、20%, 10 min、40%, 35 min、70%, 50 min、100%; 流速: 1 ml/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μl ; 检测波长: 320 nm。

2.4.2 供试品溶液制备 取枳壳总黄酮约 200 mg, 精密称定, 置 100 ml 量瓶中, 加 20% 甲醇溶解并稀释至刻度, 即得供试品溶液。

2.4.3 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱指纹图谱。结果表明, 各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.2%。归一化面积大于 5% 总峰面积的各色谱峰相对峰面积

RSD 均小于 0.6%。

2.4.4 重复性试验 取同一样品(编号 i)6 份,制成供试品溶液,进样分析,记录色谱指纹图谱。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.2%,归一化面积大于 5% 总峰面积的特色谱峰相对峰面积 RSD 均小于 0.4%。

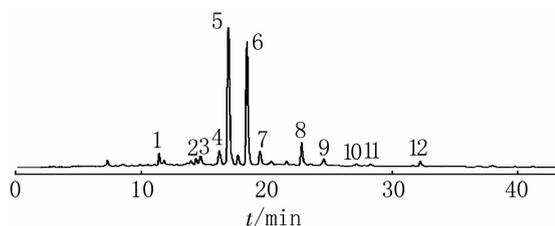
2.4.5 稳定性试验 供试品溶液室温保存,分别于 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h 进样分析,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.20%,归一化面积大于 5% 总峰面积的特色谱峰相对峰面积的 RSD 均小于 0.56%。表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.4.6 指纹图谱获取及相似度评价 取供试品溶液 10 μl ,注入液相色谱,照“2.4.1”项下色谱条件分析,记录色谱图。经比较分析,各批次样品共有 12 个色谱峰,分别为 1(11.4 min)、2(14.4 min)、3(14.7 min)、4(16.2 min)、5(16.9 min)、6(18.4 min)、7(19.5 min)、8(22.8 min)、9(24.6 min)、10(27.2 min)、11(28.3 min)和 12(32.2 min),其中 5(S)号、6 号色谱峰归一化面积占总峰面积的 20% 以上,4 号、8 号色谱峰归一化面积占总峰面积的 5%~10%,其余均小于 5%。以 5 号峰为参照峰 S,计算各共有峰的相对保留时间和归一化面积大于 5% 总峰面积的特色谱峰相对峰面积(图 3)。

采用“中药指纹图谱计算机辅助相似度计算软件”^[4]平台系统,评价不同批次样品指纹图谱的相似度。以 10 批样品色谱峰面积组成样本集,计算各个峰面积的平均值,所得色谱图作为对照用标准模板,每批样品均与标准模板比较,计算指纹图谱相似度。经计算分析,10 批样品指纹图谱相似度均大于 98%,说明样品整体质量具有较好的一致性(表 2)。图 4 为 10 批次样品指纹图谱叠加图。

3 讨论

中药有效部位一般为单味药材中的一类或多类有效成分经提取富集而得。由于提取纯化过程影响因素较多,有效部位的化学组成具有一定的波动性。因此,对于中药有效部位的质量控制,要考虑指标成分的准确测定,更应注重



1-12:各批次样品共有 12 个色谱峰。

图 3 枳壳总黄酮 HPLC 共有模式指纹图谱
Fig. 3 Reference fingerprint of total flavonoid by HPLC

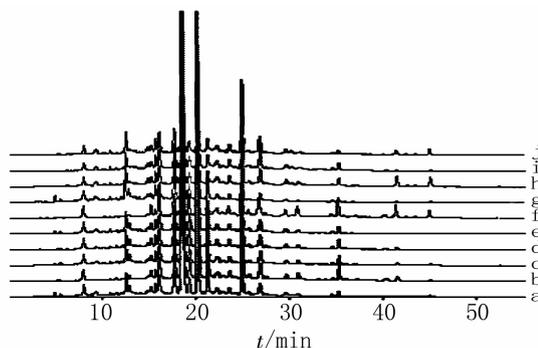


图 4 10 批样品(a-j)HPLC 指纹图谱

Fig. 4 Fingerprints of 10 batches of sample (a-j)

表 2 枳壳总黄酮含量测定和指纹图谱分析结果

Table 2 The result of quantitative analysis and fingerprint of total flavonoid of *Fructus Aurantii* ($n=2, \%$)

样品	有效成分含量		总黄酮含量	指纹图谱相似度
	柚皮苷	新橙皮苷		
a	41.5	25.6	83.2	100.0
b	42.6	21.6	80.6	99.5
c	39.0	24.23	79.9	100.0
d	40.4	24.9	81.6	99.9
e	47.2	21.0	85.4	99.9
f	41.8	28.2	87.3	98.2
g	42.4	28.5	88.6	99.4
h	40.9	27.8	85.0	98.7
i	38.3	26.2	80.2	98.8
j	40.2	27.2	85.0	99.8

有效部位整体上的一致性。本研究采用多指标成分、总成分含量测定及指纹图谱分析相结合方法,建立枳壳总黄酮质量控制体系。研究结果显示,枳壳总黄酮中的主要指标成分柚皮苷、新橙皮苷及总黄酮含量具有一定的波动,指纹图谱相似度分析显示各批次样品具有良好的整体一致性。在实际应用中,可结合生产实际设定相应指标成分、总成分的含量限度范围和指纹图谱相似度水平,用于制备工艺稳定性及产品质量考察,全面控制有效部位的质量。

指纹图谱色谱条件优化过程中,对甲醇-水、甲醇-醋酸水等体系进行考察,结果以甲醇-0.5%醋酸水体系得到的色谱峰峰形以及分离度较好;比较了190 nm~400 nm 波长下的色谱图,结果320nm 波长时色谱峰信息较多,分离情况良好;考察了20℃、30℃、40℃不同柱温的影响,筛选出本实验最佳色谱条件。

References:

[1] ZHOU Da-yong, XU Qing, XUE Xing-ya, et al(周大勇,徐青,薛兴亚,等). Analysis of flavonoid glycosides in *Fructus Aurantii* by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass

spectrometry [J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry** (分析化学), 2006, 34 (S1): 31 (in Chinese)

[2] HU Liu, LUAN Lian-jun, SHAO Qing (胡柳, 栾连军, 邵青). Quantitative analysis and fingerprint study C for quality evaluating of Chinese herb *Fructus Aurantii* [J]. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis** (药物分析杂志), 2004, 24(4): 345 (in Chinese)

[3] CAO Jun, GONG Qian-feng, XIAO Bing-hua, et al (曹君, 龚千锋, 肖兵华, 等). Study on HPLC fingerprint of different growing areas on *Fructus Aurantii* fried with bran [J]. **China Journal of Chinese Medica** (中国中药杂志), 2006, 34(4): 301 (in Chinese)

[4] CHENG Yi-yu, CHEN Min-jun, WU Yong-jiang (程翼宇, 陈闽军, 吴永江). Measures for determining the similarity of chemical fingerprint and a method of evaluating the measures [J]. **Acta Chimica Sinica** (化学学报), 2002, 60 (11): 2017 (in Chinese)

[责任编辑 黄晓花]



中国科技核心期刊 《中华临床医师杂志(电子版)》2011 年度征稿征订

《中华临床医师杂志(电子版)》是中国科技核心期刊,半月刊,全年出刊24期,定价672元,国内刊号CN 11-9147/R,邮发代号80-728,被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

2011年度重点栏目征稿及2011年优惠征订详情请见中华临床医师杂志官方网站 www.clinicmed.net 的期刊动态。

欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志! 欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

投稿邮箱:北京市100035-50信箱 编辑部收 邮编 100035

投稿电子邮箱:Lcdactor@163.com

电话:010-62219211

传真:010-62222508

网址:www.clinicmed.net