

内标多控法测定枳实、枳壳、青皮和陈皮中黄酮类成分含量

魏惠珍¹, 谢菲², 饶毅^{1*}, 杜艳龙¹, 金浩鑫¹, 李新南²

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 建立内标多控法测定芸香科植物枳实、枳壳、青皮以及陈皮中黄酮类成分的含量。方法: 以柚皮苷为内标, 建立柚皮苷与橙皮苷、新橙皮苷的相对校正因子, 对其进行耐用性考察; 采用内标多控法计算芸香科植物中黄酮类成分的含量, 并用夹角余弦法对计算值与外标法的实测值进行比较。结果: 流速、柱温、色谱柱以及仪器对相对校正因子无显著影响; 采用内标多控法计算芸香科植物黄酮类成分的含量与外标法的实测值没有显著差异。结论: 所建立的内标多控法可用于枳实、枳壳、青皮以及陈皮中黄酮类成分的定量分析和质量控制。

[关键词] 内标多控法; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0074-04

Determination of Flavone Ingredients in Citrus Aurantium, Bitter Orange Immature, Walnut Peel and Tangerine Peel By Internal Standard Multi-control Method

WEI Hui-zhen¹, XIE Fei², RAO Yi^{1*}, DU Yan-long¹, JIN Hao-xin¹, LI Xin-nan²

(1. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the internal standard multi-control method and applied to the determination of flavonoid compounds in rutaceae plant: citrus aurantium, bitter orange Immature, walnut peel and tangerine peel. **Method:** Naringin as index, establishing the relative correction factor of naringin, hesperidin and neohesperidin and investigating the durability. Internal standard multi-control method was used to determine the content of flavonoid compounds in rutaceae plant, using included angle cosine method to compare the calculated values with measured values by external standard method. **Result:** The flow rate, column temperature, columns and instruments did not have significant effect on the relative correction factor and there was no significant difference between the calculated values of determination of flavonoid compounds in rutaceae plant by "internal standard multi-control method" and measured values by external standard method. **Conclusion:** The established internal standard multi-control method can be used to quantitative analysis and quality control of flavonoid compounds in citrus aurantium, bitter orange immature, walnut peel and tangerine peel.

[Key words] internal standard multi-control method; naringin; hesperidin; neohesperidin; content determination

枳实、枳壳、青皮以及陈皮都属于芸香科植物, 枳实为芸香科植物酸橙及其栽培变种或甜橙的干燥

幼果^[1], 枳壳为芸香科植物酸橙及其栽培变种的干燥未成熟果实^[1], 青皮为芸香科植物橘及其栽培变种的干燥幼果或未成熟果实的果皮^[1], 陈皮为芸香科植物橘及其栽培变种的干燥成熟果皮^[1]。4种植物主要含有黄酮类物质。目前研究结果表明, 此类植物的黄酮成分具有抗癌、抗氧化、抗炎症、预防心血管疾病以及抗菌、抗病毒作用^[2]。本文以中药枳实中黄酮类成分为例, 采用内标多控法, 建立柚皮苷与橙皮苷、新橙皮苷的相对校正因子, 并进行方法学

[收稿日期] 2010-01-29

[基金项目] 国家十一五科技支撑计划项目(2006BAI08B03-05)

[第一作者] 魏惠珍, 副教授, 研究方向中药复方质量控制。Tel: 0791-7119651

[通讯作者] * 饶毅, 教授, 研究方向中药复方质量控制, Tel: 0791-7119609, E-mail: raoyi99@126.com

验证以及耐用性考察;将建立的相对校正因子作为固定参数用于计算枳壳、青皮、陈皮中黄酮类成分的含量,并采用夹角余弦法评价计算结果的准确性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪 (SPD-M10Avp 检测器、CLASS-VP 软件)、Waters-2695-2996 高效液相色谱仪 (Empower 软件)、安捷伦高效液相色谱仪 (Agilent-ChemStation 软件)、pB-10 型 pH 酸度计 (赛多利斯公司)。

1.2 试剂 柚皮苷 (批号 110722-200309, 中国药品生物制品检定所, 供含量测定用)、橙皮苷 (批号 110721-200512, 中国药品生物制品检定所, 供含量测定用)、新橙皮苷由中药固体制剂制造技术国家工程研究中心对照品室制备, 经光谱确定结构, HPLC 面积归一法计算含量为 99.34%; 流动相所用的试剂为色谱纯、水为 MiLLi-Q 超纯水、其他试剂均为分析纯; 枳实、枳壳、青皮、陈皮购自药材市场, 经江西中医学院付小梅副教授鉴定, 枳实为芸香科植物酸橙 *C. aurantium* L. 的干燥幼果, 枳壳为芸香科植物酸橙 *C. aurantium* L. 的干燥未成熟果实, 青皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulate* Blanco 干燥未成熟果实的果皮, 陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulate* Blanco 干燥成熟果皮。

2 方法与结果

2.1 基本原理^[3] 在一定的范围内 (线性范围内) 成分的量 (质量或浓度) 与检测器响应值成正比, 即: $f = W/A$ (W 表示浓度, A 表示响应值)。以易得对照品为指标, 建立该成分与被测成分间的相对校正因子, 然后通过易得对照品的浓度和相对校正因子计算被测组分的含量。

$$f_{km} = \frac{f_k}{f_m} = \frac{W_k \times A_m}{W_m \times A_k}$$
$$W_m = \frac{W_k \times A_m}{f_{km} \times A_k}$$

式中 A_k 为易得对照品的峰面积, W_k 为易得对照品的浓度。 A_m 为被测组分 m 峰面积; W_m 为被测组分 m 浓度

2.2 方法学考察

2.2.1 色谱条件 经色谱条件优化, 所采用的液相条件使 4 种药材中黄酮类成分能够较好分离。色谱柱 Hypersil ODS₂-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (用磷酸调至 pH3.0) (17:83), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 283 nm, 柱温 25 °C。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品粉末约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 1.5 h, 放冷, 再称定质量, 加甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 2 mL 置 10 mL 的量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品、橙皮苷对照品和新橙皮苷对照品适量, 加甲醇制成含柚皮苷 0.085 2 mg · g⁻¹、橙皮苷 0.027 0 mg · g⁻¹ 和新橙皮苷 0.108 6 mg · g⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.4 相对校正因子计算 精密吸取混合对照品溶液 2, 5, 8, 10, 15, 20 μL 进样, 以柚皮苷为内标物, 分别计算柚皮苷对橙皮苷和新橙皮苷的相对校正因子 (f), 见表 1。

表 1 柚皮苷对橙皮苷和新橙皮苷的相对校正因子

| 进样体积/μL | $f_{柚}/f_{橙}$ | $f_{柚}/f_{新}$ |
|---------|---------------|---------------|
| 2 | 1.100 9 | 1.170 0 |
| 5 | 1.134 6 | 1.176 1 |
| 8 | 1.134 5 | 1.173 5 |
| 10 | 1.148 3 | 1.170 1 |
| 15 | 1.149 4 | 1.172 0 |
| 20 | 1.139 3 | 1.168 4 |
| 平均值 | 1.134 5 | 1.171 7 |
| RSD/% | 1.56 | 0.24 |

2.2.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1, 2, 5, 8, 10, 15, 20 μL 进样, 以进样量对峰面积值进行回归, 得柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的回归方程分别为 $Y = 1.37 \times 10^5 X + 7.51 \times 10^2$ ($r = 0.999$), $Y = 4.98 \times 10^4 X + 29.078$ ($r = 0.999$), $Y = 2.04 \times 10^5 X + 1.51 \times 10^3$ ($r = 0.999$), 三者分别在 0.085 2 ~ 1.704, 0.027 04 ~ 0.540 8, 0.108 6 ~ 2.172 0 μg 线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.55%, 0.63%, 0.60%。

2.2.7 溶液稳定性试验 称取枳实饮片粉末约 0.2 g, 精密称定, 按 2.2.2 项下方法制备样品, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定, 记录峰面积, 柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.77%, 0.97%, 0.89%。试验结果表明, 24 h 之内供试品溶液稳定。

2.2.8 重复性试验 取枳实饮片粉末约 0.2 g, 共 6

份,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备样品,测定柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量分别为 12.03%, 3.17%, 14.97%, RSD 分别为 0.41%, 0.81%, 0.91%。

2.2.9 加样回收试验 取枳实饮片粉末约 0.1 g, 共 6 份,精密称定,分别精密加入柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品适量,按 2.2.2 项下方法制备,进行含量测定。计算柚皮苷回收率为 99.06%, RSD 1.81%;橙皮苷回收率为 97.36%, RSD 2.59%;新橙皮苷回收率为 98.93%, RSD 2.25%,见表 2~4。

表 2 柚皮苷加样回收试验

| 取样量 /g | 样品中含量/mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值/% | RSD /% |
|--------|----------|---------|---------|--------|-------|--------|
| 0.1022 | 12.29 | 12.14 | 24.55 | 100.95 | | |
| 0.1017 | 12.23 | 12.04 | 24.48 | 101.71 | | |
| 0.1024 | 12.32 | 12.16 | 24.24 | 98.04 | 99.06 | 1.81 |
| 0.1001 | 12.04 | 11.90 | 23.69 | 97.88 | | |
| 0.1025 | 12.33 | 12.08 | 24.17 | 98.01 | | |
| 0.1015 | 12.21 | 12.01 | 23.95 | 97.75 | | |

表 3 橙皮苷加样回收试验

| 取样量 /g | 样品中含量/mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值/% | RSD /% |
|--------|----------|---------|---------|--------|-------|--------|
| 0.1022 | 3.24 | 3.18 | 6.27 | 95.29 | | |
| 0.1017 | 3.22 | 3.05 | 6.26 | 99.54 | | |
| 0.1024 | 3.25 | 3.19 | 6.46 | 100.75 | 97.36 | 2.59 |
| 0.1001 | 3.17 | 3.34 | 6.35 | 95.11 | | |
| 0.1025 | 3.25 | 3.11 | 6.31 | 98.42 | | |
| 0.1015 | 3.22 | 3.19 | 6.25 | 95.06 | | |

表 4 新橙皮苷加样回收试验

| 取样量 /g | 样品中含量/mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值/% | RSD /% |
|--------|----------|---------|---------|--------|-------|--------|
| 0.1022 | 15.30 | 15.23 | 30.51 | 99.87 | | |
| 0.1017 | 15.22 | 15.31 | 30.61 | 100.49 | | |
| 0.1024 | 15.33 | 15.19 | 29.98 | 96.45 | 98.93 | 2.25 |
| 0.1001 | 14.98 | 15.05 | 30.05 | 100.10 | | |
| 0.1025 | 15.34 | 15.14 | 29.84 | 95.74 | | |
| 0.1015 | 15.19 | 15.21 | 30.54 | 100.89 | | |

3 相对校正因子的耐用性考察

3.1 流速对相对校正因子的影响 本试验考察了流速对相对校正因子的影响,对 0.80, 0.98, 1.00, 1.02, 1.20 mL · min⁻¹ 5 个流速进行考察,精密吸取混合对照品 10 μL 进样,计算相对校正因子。结果表明,流速对相对校正因子无显著影响,RSD 分别为

0.08% 和 0.15%,见表 5。

表 5 不同流速对相对校正因子的影响

| 流速/mL · min ⁻¹ | $f_{柚}/f_{橙}$ | $f_{柚}/f_{新}$ |
|---------------------------|---------------|---------------|
| 0.80 | 1.141 1 | 1.167 4 |
| 0.98 | 1.139 7 | 1.170 2 |
| 1.00 | 1.139 6 | 1.169 9 |
| 1.02 | 1.140 4 | 1.171 1 |
| 1.20 | 1.138 7 | 1.171 8 |
| 平均值 | 1.139 9 | 1.170 1 |
| RSD/% | 0.08 | 0.15 |

3.2 色谱柱柱温对相对校正因子的影响 本试验考察了柱温对相对校正因子的影响,对 20, 25, 28, 35 °C 4 个柱温进行考察,精密吸取混合对照品 10 μL 进样,计算相对校正因子。结果表明,柱温对相对校正因子无显著影响,RSD 分别为 0.50% 和 0.10%,见表 6。

表 6 不同柱温对相对校正因子的影响

| 柱温/°C | $f_{柚}/f_{橙}$ | $f_{柚}/f_{新}$ |
|-------|---------------|---------------|
| 20 | 1.143 9 | 1.172 1 |
| 25 | 1.139 6 | 1.169 9 |
| 28 | 1.152 7 | 1.172 0 |
| 35 | 1.148 6 | 1.172 3 |
| 平均值 | 1.146 2 | 1.171 6 |
| RSD/% | 0.08 | 0.10 |

3.3 不同仪器对相对校正因子的影响 本试验考察了岛津、安捷伦、Waters 3 个常用品牌的高效液相色谱仪对相对校正因子的影响,精密吸取混合对照品 10 μL 进样,计算相对校正因子。结果表明,仪器对相对校正因子无显著影响,RSD 分别为 0.66% 和 0.36%,见表 7。

表 7 不同仪器对相对校正因子的影响

| 仪器品牌 | $f_{柚}/f_{橙}$ | $f_{柚}/f_{新}$ |
|--------|---------------|---------------|
| 岛津 | 1.139 6 | 1.169 9 |
| 安捷伦 | 1.126 5 | 1.161 8 |
| Waters | 1.139 3 | 1.167 7 |
| 平均值 | 1.135 2 | 1.166 5 |
| RSD/% | 0.66 | 0.36 |

3.4 不同色谱柱对相对校正因子的影响 本试验考察了依利特、安捷伦、Waters 柱以及岛津柱 4 个常用品牌的色谱柱对相对校正因子的影响,精密吸取混合对照品 10 μL 进样,计算相对校正因子。结果表明,色谱柱对相对校正因子无显著影响,RSD 分别

为 1.74% 和 0.75%, 见表 8。

表 8 不同色谱柱对相对校正因子的影响

| 色谱柱 | $f_{\text{柚}}/f_{\text{橙}}$ | $f_{\text{柚}}/f_{\text{新}}$ |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| 依利特 | 1.139 6 | 1.169 9 |
| 安捷伦 | 1.094 1 | 1.149 8 |
| Waters | 1.105 7 | 1.164 7 |
| 岛津 | 1.114 8 | 1.165 0 |
| 平均值 | 1.113 6 | 1.162 3 |
| RSD/% | 1.74 | 0.75 |

4 枳实药材黄酮类成分含量测定内标多控法与外标法的比较

分别精密吸取枳实药材供试品溶液和对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 测定。采用外标法和内标多控法计算枳实药材中柚皮苷、橙皮苷以及新橙皮苷的含量, 见表 9。

表 9 枳实药材中黄酮类成分的含量测定 %

| 药材(批号) | 柚皮苷 | | 橙皮苷 | | 新橙皮苷 | |
|---------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| | 外标法 | 内标多控法 | 外标法 | 内标多控法 | 外标法 | 内标多控法 |
| 枳实原药材(080729) | 11.14 | 3.17 | 3.16 | 15.63 | 15.70 | |
| 枳实原药材(080730) | 12.02 | 1.11 | 1.10 | 18.81 | 18.89 | |
| 枳实饮片(080729) | 12.47 | 2.64 | 2.62 | 15.74 | 15.75 | |
| 枳实饮片(080730) | 13.10 | 1.36 | 1.34 | 18.24 | 18.25 | |
| 麸炒枳实(080729) | 11.91 | 4.30 | 4.26 | 13.91 | 13.91 | |
| 麸炒枳实(080730) | 12.59 | 1.42 | 1.40 | 18.14 | 18.15 | |

5 黄酮类成分相对校正因子在枳壳、青皮以及陈皮药材含量测定中的应用

采用对照品柚皮苷和上述建立的相对校正因子计算枳壳、青皮以及陈皮中黄酮类成分的含量, 并与外标法的测定值进行比较, 见表 10。

6 内标多控法和外标法的含量结果比较

将样品通过内标多控法的计算值与外标法的测定值采用夹角余弦值进行比较, 验证内标多控法用于有效成分含量测定结果的准确性。在本实验中, 采用内标多控法和外标法测得的橙皮苷和新橙皮苷的计算值和实测值之间的夹角余弦值分别为 0.9999 和 0.9999, 表明 2 种方法测得含量没有显著差异。

7 讨论

本试验采用内标多控法, 建立柚皮苷与橙皮苷、新橙皮苷的相对校正因子, 并进行方法学验证及耐用性考察, 结果表明, 流速、柱温、不同色谱柱以及不同仪器对相对校正因子没有显著影响, 因此, 试验中

表 10 枳壳、青皮以及陈皮中黄酮类成分的含量测定 %

| 药材(批号) | 柚皮苷 | | 橙皮苷 | | 新橙皮苷 | |
|---------------|------|-------|-------|-------|------|-------|
| | 外标法 | 内标多控法 | 外标法 | 内标多控法 | 外标法 | 内标多控法 |
| 陈皮原药材(090715) | - | 5.89 | 5.87 | - | - | |
| 陈皮原药材(090722) | - | 4.79 | 4.78 | - | - | |
| 陈皮原药材(090802) | - | 6.19 | 6.14 | - | - | |
| 陈皮原药材(090805) | - | 5.83 | 5.79 | - | - | |
| 陈皮原药材(090812) | - | 5.88 | 5.84 | - | - | |
| 陈皮原药材(090822) | - | 5.05 | 5.02 | - | - | |
| 青皮原药材(090705) | - | 14.65 | 14.57 | - | - | |
| 青皮原药材(090713) | - | 11.21 | 11.15 | - | - | |
| 青皮原药材(090721) | - | 15.83 | 15.75 | - | - | |
| 青皮原药材(090805) | - | 7.20 | 7.17 | - | - | |
| 醋青皮(090828) | - | 22.32 | 22.21 | - | - | |
| 醋青皮(090904) | - | 11.58 | 11.53 | - | - | |
| 麸炒枳壳(090902) | 4.97 | 0.46 | 0.46 | 2.78 | 2.78 | |
| 麸炒枳壳(090903) | 4.30 | - | - | 2.02 | 2.02 | |
| 枳壳原药材(090905) | 4.70 | 4.33 | 4.30 | 1.83 | 1.83 | |

注: - 表示未测出。

得到的相对校正因子具有普遍的适用性。

将建立的相对校正因子作为一参数用于枳实、枳壳、青皮、陈皮中黄酮类成分的含量测定, 采用夹角余弦法评价内标多控法计算值的准确性, 结果表明, 内标多控法计算值与外标法的实测值没有显著差异, 因此, 所建立的相对校正因子可作为一固定参数应用于同科属植物中的同类成分质量控制。本次试验建立的相对校正因子是用于同种属同类成分间的含量测定, 同种属植物不同类化学成分以及不同种属植物的同类成分之间是否也存在这种固定的函数关系有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005:172,171,136,132.
- [2] 赵国华, 陈宗道. 柑桔类黄酮生物活性研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(3):71.
- [3] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23):1925.
- [4] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫淼, 等. 一种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法: 向量夹角法[J]. 药学报, 2002, 37(9):71.

[责任编辑 顾雪竹]