

## 一测多评法测定枳实中 4 种黄酮类成分

陈建维, 刘 圆, 刘晟楠, 曾恋情, 殷文静, 杨世林, 饶 毅, 魏惠珍\*

江西中医药大学, 江西 南昌 330006

**摘要:** 目的 建立枳实 *Aurantii Immaturus Fructus* 中 4 种黄酮类成分芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的一测多评法, 验证该方法在枳实质量评价中应用的准确性及可行性。方法 以橙皮苷为内标, 分别建立橙皮苷与芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷的相对校正因子, 计算枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷的量, 实现一测多评。同时采用外标法测定枳实中 4 种黄酮类成分的量, 并比较计算值与实测值的差异, 以验证一测多评法在测定中的科学性及可行性。结果 各相对校正因子重复性良好, 一测多评法测定结果与外标法测定结果无显著差异。结论 以橙皮苷为内标同时测定芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷的一测多评法可用于枳实的定量分析。

**关键词:** 一测多评; 枳实; 芸香柚皮苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 相对校正因子

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)09-1374-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.021

## Determination of flavonoids in *Aurantii Immaturus Fructus* by multi-components with single marker

CHEN Jian-wei, LIU Yuan, LIU Sheng-nan, ZENG Lian-qing, YIN Wen-jing, YANG Shi-lin, RAO Yi, WEI Hui-zhen

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

**Abstract: Objective** To establish a method for simultaneously determination for the content of four flavones (narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin) in *Aurantii Immaturus Fructus* by single marker, which is feasible and accurate. **Methods** Taking hesperidin as internal standard substance, to establish a method for quantitative analysis of multi-components with single marker. To determinate the content of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in *Aurantii Immaturus Fructus*. The contents in 10 batches of samples were determined by both external standard method and QAMS. The scientificity and feasibility of the method were evaluated by comparison of the quantitative results between external standard method and QAMS. **Results** The relative correction factor (RCF) was perfect. The results calculated with a single marker were consistent with the results by the external standard method. **Conclusion** The method with a single marker is accurate and feasible to evaluate the quality of *Aurantii Immaturus Fructus*.

**Key words:** quantitative analysis multi-components by single marker; *Aurantii Immaturus Fructus*; narirutin; naringin; hesperidin; neohesperidin; relative correction factor

枳实 *Aurantii Immaturus Fructus* 为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果<sup>[1-2]</sup>。枳实中化学成分主要包括生物碱类、黄酮类及挥发油类。《中国药典》2010 年版仅对枳实中生物碱量进行了限定, 不能完全反应枳实药材的整体质量。枳实中黄酮类成分占其组成的 22.45%~33.76%, 具有广泛的药理作用<sup>[3-4]</sup>。本

实验采用 HPLC 法同时测定了枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的量, 并利用以上 4 种黄酮类成分内在的函数和比例关系, 采用一测多评法<sup>[5-8]</sup>, 以橙皮苷为内标成分, 得出芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷与橙皮苷之间的相对校正因子 ( $f_R$ )<sup>[9-10]</sup>, 计算出这 3 种黄酮类成分的量, 为枳实药材多指标定量测定提供全新的分析模式。

收稿日期: 2014-11-19

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (201113A104B06)

作者简介: 陈建维 (1975—), 女, 中级, 本科, 研究方向为中药质量控制。Tel: 13767062980 E-mail: kathyjwchen@sina.com

\*通信作者 魏惠珍 (1965—), 女, 副主任药师, 硕士研究生导师, 研究方向为中药质量控制新技术研究。

Tel: 13870939636 E-mail: weiuihuzhen101@126.com

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); AB104-N 万分之一天平 (梅特勒-托利多); AUW2200 十万分之一天平 (SHIMADZU 岛津); KQ3200 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); Mili-Q 超纯水仪 (美国 Milipore 公司)。

### 1.2 试剂

柚皮苷对照品 (批号 110722-201111, 质量分数为 93.2%), 橙皮苷对照品 (批号 110721-201115, 质量分数为 95.3%), 新橙皮苷对照品 (批号 111857-201102, 质量分数为 99.6%) 均购自中国食品药品检定研究院, 芸香柚皮苷对照品 (130817, 质量分数为 99.5%) 购自南昌品正贸易有限公司。10 批枳实均由市场购得, 经江西中医药大学药学教研室付小梅教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果。

甲醇 (色谱纯, 上海振兴化工一厂); 36% 乙酸 (分析纯, 汕头市西陇化工厂); Milipore 超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取芸香柚皮苷对照品 9.79 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液; 精密称取柚皮苷对照品 8.90 mg、新橙皮苷对照品 9.59 mg 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液; 精密称取橙皮苷对照品 4.95 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别精密量取 1 mL 芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品储备液置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

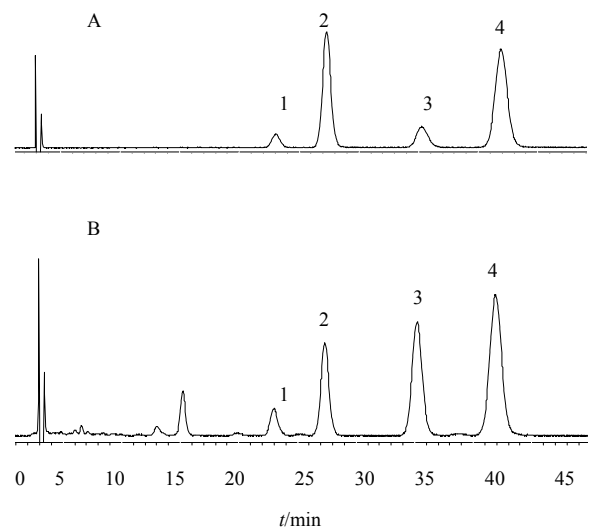
**2.1.2 供试品溶液的制备** 取本品粉末约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 2 h, 放冷, 再称定质量, 加甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 2 mL 置 10 mL 的量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

### 2.2 色谱条件

依利特色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-醋酸水溶液 (25 : 75), 体积流量 1.0 mL/min, 进样体积 10 μL, 检测波长 283 nm, 柱温为室温。

## 2.3 方法学考察

**2.3.1 系统适应性及专属性试验** 精密量取混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶液各 10 μL, 在上述色谱条件下进样分析。结果显示, 供试品溶液色谱中呈现与对照品保留时间相同的色谱峰; 芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷与其相邻色谱峰的分度均大于 1.5, 拖尾因子在 0.97~1.10, 理论板数以橙皮苷计大于 3 000, 阴性对照在相应位置处未见色谱峰, 方法专属性良好。混合对照品、样品 HPLC 图见图 1。



1-芸香柚皮苷 2-柚皮苷 3-橙皮苷 4-新橙皮苷  
1-narirutin 2-naringin 3-hesperidin 4-neohesperidin

图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图

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

**2.3.2 标准曲线的绘制** 分别精密吸取系列质量浓度的混合对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标 (Y), 进样量为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 并进行线性回归。实验结果表明, 各成分在各自浓度范围内呈良好的线性关系。结果见表 1。

**2.3.3 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 记算芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的峰面积的 RSD 分别为 1.0%、0.2%、1.4%、0.4% (n=6)。表明仪器精密度良好。

**2.3.4 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别于制备后 0、4、8、12、24 h 后进样 10 μL, 测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的峰面积积分值 RSD 分别为 1.5%、1.0%、1.3%、0.9%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

表 1 4 种黄酮类成分的线性关系考察结果

Table 1 Results of linear equations of four flavonoids

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ $\mu\text{g}$
芸香柚皮苷	$Y=1\ 698\ 309.8 X+334.4$	0.999 6	0.009 6~0.287 8
柚皮苷	$Y=1\ 917\ 180.9 X+10\ 679.4$	0.999 9	0.024 9~2.488 4
橙皮苷	$Y=1\ 991\ 663.9 X-5\ 938.8$	1.000 0	0.018 9~1.509 6
新橙皮苷	$Y=1\ 993\ 023.3 X+7\ 031.9$	0.999 9	0.028 7~2.865 5

**2.3.5 重复性试验** 取样品适量, 平行制备 6 份供试品溶液并依法测定。结果芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的质量分数平均值分别为 3.02%、8.77%、2.79%、11.32%, RSD 值分别为 2.0%、0.8%、2.0%、1.1% ( $n=6$ )。表明本试验重复性良好。

**2.3.6 加样回收率试验** 精密称取已测定的样品 6 份, 每份 0.1 g, 分别加入一定量的对照品, 按照供试品溶液的制备方法制备样品溶液, 进行回收率测定。结果表明, 芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的平均回收率分别为 105.57%、100.00%、100.12%、100.00%, RSD 值分别为 1.3%、1.5%、2.4%、2.2%。表明该方法的准确度良好。

**2.3.7 耐用性考察** 分别采用 3 种不同品牌的色谱柱依利特 Hypersil ODS、Welch Ultimate RXB-C<sub>18</sub>、COSMOSIL (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 以及 3 台不同品牌高效液相色谱仪岛津 LC 10-AT、Waters 2695-2996、Angilent 1260 进行测定时, 考察仪器色谱行为的变化。实验结果表明, 各条件下所测量的 RSD<3.0%, 分离效果理想。因此, 枳实中 4 种黄酮类成分定量测定条件较宽, 具有较好的耐用性。

**2.4  $f_R$  的确定**

**2.4.1 待测组分  $f_R$  的计算** 取混合对照品溶液, 进样 5、10、15、20、30  $\mu\text{L}$  测定, 以橙皮苷为内标, 分别计算芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷的  $f_R$ , 结果见表 2。

表 2 4 种黄酮类成分  $f_R$  ( $n=3$ )

Table 2 RCF of four flavonoids ( $n=3$ )

进样体积/ $\mu\text{L}$	$f_{\text{橙皮苷/芸香柚皮苷}}$	$f_{\text{橙皮苷/柚皮苷}}$	$f_{\text{橙皮苷/新橙皮苷}}$
5	1.10	1.02	0.98
10	1.17	1.01	0.98
15	1.14	1.02	0.98
20	1.17	1.03	0.99
30	1.17	1.04	1.00
平均值	1.15	1.02	0.99
RSD%	2.70	1.10	0.90

**2.4.2  $f_R$  重现性考察** 采用岛津 LC 10-AT, 分别考察了 3 种不同品牌的色谱柱依利特 (Hypersil ODS, Welch Ultimate XB-C<sub>18</sub>, COSMOSIL 5C12-MS-II); 采用依利特 Hypersil ODS 色谱柱, 分别考察了岛津 LC 10-AT、Waters 2695-2996 和 Angilent 1260 液相色谱系统对校正因子的影响, 结果各成分的  $f_R$  重现性良好 (RSD<5%)。结果见表 3。

表 3  $f_R$  重现性考察 ( $n=3$ )

Table 3 Reproducibility of RCF ( $n=3$ )

仪器	色谱柱	$f_{\text{橙皮苷/芸香柚皮苷}}$	$f_{\text{橙皮苷/柚皮苷}}$	$f_{\text{橙皮苷/新橙皮苷}}$
岛津	COSMOSIL	1.16	1.01	0.97
	依利特	1.19	1.04	1.00
	Welch	1.18	1.02	0.99
Angilent	依利特	1.17	1.04	0.99
	Waters	依利特	1.09	0.94
RSD/%		3.40	4.10	3.70

**2.4.3  $f_R$  的确定** 根据《一测多评法建立的技术指南》<sup>[14]</sup>, 综合影响校正因子 ( $f$ ) 的上述因素, 取各次实验获得的  $f_R$  的平均值, 最终确定芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷的  $f_R$  分别为 1.16、1.01、0.98。

**2.5 待测色谱峰的定位**

通过计算在不同色谱仪器或不同色谱柱中各待测成分色谱峰与橙皮苷色谱峰的相对保留时间, 对各待测成分进行定位。结果表明相对保留时间的波动较小, 其 RSD 均小于 5%, 结果见表 4。

表 4 各成分的相对保留时间 ( $n=3$ )

Table 4 Relative retention time of each compound ( $n=3$ )

仪器	色谱柱	相对保留时间		
		芸香柚皮苷	柚皮苷	新橙皮苷
岛津	依利特	0.69	0.82	1.24
	COSMOSIL	0.66	0.78	1.18
	Welch	0.70	0.81	1.21
Angilent	依利特	0.66	0.80	1.18
Waters	依利特	0.69	0.80	1.19
RSD%		2.80	1.80	2.10

### 2.6 一测多评法与外标法测定结果比较

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 10  $\mu$ L, 注入高效液相色谱仪, 依法测定 10 批样品, 采用外标法和一测多评法计算枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的量, 测定

结果见表 5。常规的外标法实测值与一测多评法计算的质量分数值相对误差 < 3%, 表明 2 种方法测得结果没有显著性差异。由此说明一测多评法在枳实药材的多指标成分质量评价中应用是可行的。

表 5 一测多评与外标法测定结果比较

Table 5 Determination of contents of flavonoids by multi-components with single marker and external standard method

批号	橙皮苷/ %				芸香柚皮苷			柚皮苷			新橙皮苷		
	外标法/%	一测多评法/%	相对误差/%	外标法/%	一测多评法/%	相对误差/%	外标法/%	一测多评法/%	相对误差/%	外标法/%	一测多评法/%	相对误差/%	
90301	15.71	1.00	1.01	-1.32	0.00	0.00	—	0.00	0.00	—	0.00	0.00	—
130701	2.79	3.02	2.99	1.00	8.77	8.56	2.45	11.32	11.25	0.62			
20130510	18.53	3.84	3.80	1.17	0.00	0.00	—	0.00	0.00	—	0.00	0.00	—
20121116	20.19	1.36	1.38	-1.45	2.29	2.25	2.00	3.05	3.08	-1.11			
20120907	0.00	3.93	3.92	0.26	0.00	0.00	—	0.00	0.00	—	0.00	0.00	—
100903050090	1.05	1.53	1.48	3.67	5.33	5.20	2.50	5.02	4.96	1.11			
20120705	1.16	0.92	0.94	-1.65	12.50	12.35	1.19	18.27	18.10	0.97			
120424	0.00	0.85	0.84	1.19	8.15	8.14	0.12	0.00	0.00	—	0.00	0.00	—
1308005	0.96	0.78	0.77	1.30	6.91	6.88	0.44	11.76	11.56	1.73			
130227	2.55	2.86	2.85	0.35	7.68	7.57	1.45	10.34	10.13	2.07			

### 3 讨论

因橙皮苷价廉易得、性质稳定, 故本实验选择橙皮苷为内参物质进行一测多评分析。

橙皮苷与芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷的  $f_R$  的评价中, 考察了不同色谱柱、不同液相色谱仪的影响。结果表明, 在本实验条件下  $f_R$  具有较好的重现性, 一测多评法与外标法在枳实药材 4 种黄酮类成分的测定中无显著差异。但因对照品质量分数、流动相配比及检测波长的变化,  $f$  在实际操作中难以建立统一标准。本实验只考察了一测多评法在同类成分间测定的可行性, 一测多评法在不同类型化合物间定量测定的可行性仍需进一步研究。一测多评法作为一种新的多指标质量评价模式, 在中药现代化多组分同步定量的发展进程中具有广泛的应用前景。

#### 参考文献

[1] 梁远园, 冯 彪, 祝晨蓁, 等. HPLC 法测定枳实药材中橙皮苷与柚皮苷的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2006, 16(5): 359-361.  
 [2] 朱祥枝, 潘东明. 四种枳实中药材柚皮甙、橙皮甙和辛

弗林含量的比较分析 [J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2005, 23(1): 91-93.

[3] 申 严. 枳实黄酮类成分的研究与开发 [D]. 北京: 首都师范大学, 2004.  
 [4] 王巧能. 枳实中黄酮类化合物的提取、分离、鉴定与生物活性研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2008.  
 [5] 徐晶晶, 徐 超, 刘 斌. 一测多评法测定薄荷药材中 4 种黄酮苷的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(3): 234-239.  
 [6] 何 兵, 刘 艳, 李春红, 等. 一测多评法同时测定鱼腥草不同部位中 6 种活性成分的量 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2160-2164.  
 [7] 蔡雪萍, 李振华, 华俊磊, 等. 一测多评法测定枇杷叶有效部位中 6 种三萜酸成分的量 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 3057-3062.  
 [8] 陈繁华, 郭伟魁, 严倩茹, 等. 一测多评在中药制剂质量评价中的研究 [J]. 中国医药指南, 2013, 26(29): 481-482.  
 [9] 马会利, 郭庆梅, 周凤琴. “一测多评法”在中药质量控制中应用研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2014, 18(3): 282-284.  
 [10] 罗祖良, 仇 峰, 韦日伟, 等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.