

# 玳玳黄酮滴丸质量分析

连赞芳, 陈丹<sup>\*</sup>, 曾令军, 蔡韦炜, 陈强, 曾华平, 林伊莉(福建中医药大学药学院, 福州 350122)

**摘要:** 目的 建立玳玳黄酮滴丸质量评价方法。方法 采用薄层色谱法鉴别玳玳黄酮滴丸, 并对玳玳黄酮滴丸进行重金属及砷盐的检查; 建立高效液相色谱法同时测定玳玳黄酮滴丸主要药效成分柚皮苷和新橙皮苷含量的方法。结果 薄层色谱主要成分斑点清晰可见, 阴性对照无干扰; 玳玳黄酮滴丸重金属及砷盐的限量均小于百万分之十; 新橙皮苷在

---

**基金项目:** 福建省发展和改革委员会产业技术开发项目(闽发改高技[2011]1598 号); 福建省自然科学基金项目(2012J01386); 福建省科技计划项目(2010Y2004)

**作者简介:** 连赞芳, 女, 硕士生 Tel: 13799930952 E-mail: 429354514@qq.com **\*通信作者:** 陈丹, 女, 博士, 教授 Tel: 13515026709 E-mail: 13515026709@163.com

4.088~16.352  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内呈良好线性关系, 柚皮苷在 4.084~16.336  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内呈良好线性关系, 3 批玳玳黄酮滴丸新橙皮苷平均含量分别为 75.32, 74.82, 73.76  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 柚皮苷平均含量分别为 63.05, 63.21, 62.07  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论 所建立的鉴别、检查、含量测定方法稳定简便, 可有效控制玳玳黄酮滴丸质量。

关键词: 玳玳黄酮滴丸; 薄层色谱; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)07-0827-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.014

## Quality Analysis on Daidai Flavones Dropping Pills

LIAN Yunfang, CHEN Dan\*, ZENG Lingjun, CAI Weiwei, CHEN Qiang, ZENG Huaping, LIN Yili(Department of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method for the quality evaluation of Daidai Flavones dropping pills. **METHODS** TLC was applied to the identification of Daidai Flavones dropping pills and to check heavy metal and arsenic salts in Daidai Flavones dropping pills. In addition, the contents of naringin and neohesperidin in Daidai Flavones dropping pills was determined by HPLC. **RESULTS** The qualitative identification with TLC was specific, and negative control had no interference. The contents of heavy metals and arsenic salts were less than ten over one million of Daidai Flavones dropping pills. Neohesperidin had a good linearity in the range of 4.088~16.352  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , naringin had a good linearity in the range of 4.084~16.336  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The average contents of neohesperidin in three batches of daidai flavones dropping pills were 75.32, 74.82, 73.76  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively; and naringin were 63.05, 63.21, 62.07  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively. **CONCLUSION** The established method is stability and simple, and can be used to control the quality of Daidai Flavones dropping pills effectively.

**KEY WORDS:** Daidai Flavones dropping pills; TLC; HPLC; content determination

玳玳(*Citrus aurantium* L. var *daidai* Tanaka)属芸香科柑桔亚属植物, 为酸橙的变种, 又称代代、代代圆, 本植物的未成熟果实称玳玳花枳壳或苏枳壳, 幼果又被当作枳实入药<sup>[1]</sup>。玳玳果性微寒, 味苦、酸, 具有疏肝和胃、理气止痛、行气宽中、消食化痰之功效<sup>[2]</sup>。玳玳果经本课题组优选的制备工艺获得的玳玳黄酮有效部位提取物的主要活性成分为柚皮苷和新橙皮苷, 药理实验表明玳玳黄酮提取物具有良好的抗氧化和降血脂作用<sup>[3-9]</sup>。但玳玳黄酮提取物仅微溶于水, 胃肠道透膜吸收较差, 为改善其生物利用度, 本课题组通过正交实验设计, 优选了玳玳黄酮滴丸的制备工艺, 同时通过体外溶出实验证明了玳玳黄酮滴丸具有良好的溶出度。为了有效控制玳玳黄酮滴丸的质量, 本实验采用薄层色谱法鉴别玳玳黄酮滴丸, 考察重金属及砷盐限量, 建立同时测定玳玳黄酮滴丸柚皮苷和新橙皮苷含量的高效液相色谱法, 为玳玳黄酮滴丸的质量控制奠定基础。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 包括 Waters 2996 阵列检测器, Empower 3 色谱工作站; ARA520 百分之一电子天平、AR2140 万分之一电子天平和 XS205 十万分之一电子天平

均购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; DWJ-2000S 滴丸机(烟台百药泰中药科技发展有限公司)。

### 1.2 试剂

玳玳果(福建恒馨天然香料有限公司, 批号: 20100613, 福建中医药大学药学院中药鉴定教研室范世明高级实验师鉴定为玳玳 *Citrus aurantium* L. var *daidai* Tanaka 的果实); 玳玳黄酮滴丸(自制, 棕黄色至棕褐色滴丸, 平均丸重约 35 mg); 玳玳黄酮提取物(自制, 总黄酮含量为 76.27%); 柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110722-200609, 纯度 $\geq 98\%$ ); 新橙皮苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111857-201001, 纯度 $\geq 98\%$ )薄层色谱硅胶 G(青岛海洋化工有限公司, 批号: 20120213); 甲醇、乙腈为色谱纯; 水为纯净水; 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 薄层色谱鉴别

**2.1.1 对照品溶液的配制** 分别精密称取柚皮苷、新橙皮苷对照品适量, 加甲醇适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别制成每 1 mL 含 1 mg 柚皮苷的柚皮苷对照品溶液和每 1 mL 含 1 mg 新橙皮苷的新橙皮苷对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的配制** 取玳玳黄酮滴丸 20

丸, 研细, 用 20 mL 甲醇溶解, 滤过, 取续滤液即得玳玳黄酮滴丸供试品溶液; 取玳玳黄酮提取物适量, 用适量甲醇溶解, 滤过, 取续滤液即得玳玳黄酮提取物供试品溶液; 称取玳玳果药材粗粒适量, 用甲醇超声提取 30 min, 浓缩至 10 mL, 即得玳玳果药材供试品溶液。

**2.1.3 阴性对照品溶液的配制** 取缺玳玳黄酮提取物空白滴丸处方组分, 按玳玳黄酮滴丸制备工艺及“2.1.2”项下同法操作, 即得。

**2.1.4 薄层色谱分析** 采用硅胶 G 薄层色谱法, 分别吸取“2.1.1”项下对照品溶液和“2.1.2”项下供试品溶液各 10  $\mu$ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(13:6:2)下层溶液为展开剂, 预饱和 20 min 后展开, 取出, 晾干, 喷以 3%三氯化铝乙醇液, 105  $^{\circ}$ C 加热 5 min, 置 365 nm 紫外灯下检视。供试品中柚皮苷和新橙皮苷等成分斑点获得良好分离。薄层色谱鉴别结果表明, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置, 显相同颜色的荧光斑点, 斑点清晰, 阴性对照品溶液无干扰。结果见图 1。

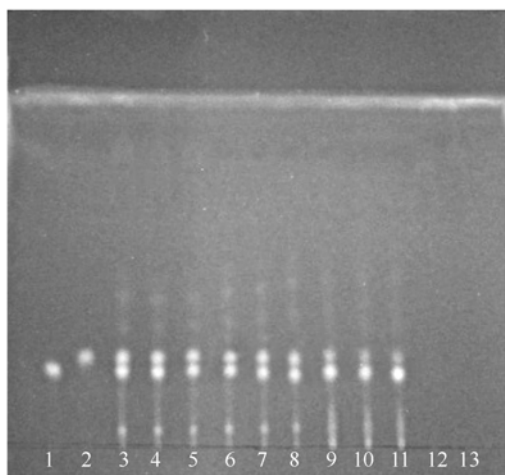


图 1 TLC 鉴别结果

1-柚皮苷对照品; 2-新橙皮苷对照品; 3-5-玳玳黄酮滴丸; 6-8-玳玳黄酮提取物; 9-11-玳玳果药材; 12-13-阴性对照

Fig. 1 TLC identify the results

1-naringin; 2-neohesperidin; 3-5-Daidai Flavones dropping pills; 6-8-total flavones active constituent; 9-11-medicinal materials Daidai fruit; 12-13-negative control

## 2.2 重金属检查

取玳玳黄酮滴丸 3 批各适量, 研细, 分别称取样粉末 1.0, 2.0, 4.0 g 置炽灼至恒重的坩埚中, 按中国药典 2010 年版一部 IX E 第二法, 考察 3 批玳玳黄酮滴丸重金属杂质限量。暂定玳玳黄酮滴丸重金属限量为百万分之十。结果见表 1。

表 1 玳玳黄酮滴丸重金属检查结果

Tab. 1 Results of heavy metal test of Daidai Flavones dropping pills

| 批号       | 百万分之二十 | 百万分之十 | 百万分之五 | 结论     |
|----------|--------|-------|-------|--------|
| 20130325 | <      | <     | >     |        |
| 20130326 | <      | <     | >     | <百万分之十 |
| 20130327 | <      | <     | >     |        |

## 2.3 砷盐检查

取玳玳黄酮滴丸 3 批各适量, 研细, 分别称取样粉末 0.10, 0.20, 0.40 g 置炽灼至恒重的坩埚中, 按中国药典 2010 年版一部 IXF 第一法, 考察 3 批玳玳黄酮滴丸砷盐限量。暂定玳玳黄酮滴丸砷盐限量为百万分之十。结果见表 2。

表 2 玳玳黄酮滴丸砷盐检查结果

Tab. 2 Results of arsenic salt test of Daidai Flavones dropping pills

| 批号       | 百万分之二十 | 百万分之十 | 百万分之五 | 结论     |
|----------|--------|-------|-------|--------|
| 20130325 | <      | <     | >     |        |
| 20130326 | <      | <     | >     | <百万分之十 |
| 20130327 | <      | <     | >     |        |

## 2.4 含量测定

**2.4.1 对照品储备液的配制** 精密称取柚皮苷、新橙皮苷对照品各约 10.0 mg, 分别置 100 mL 量瓶, 加流动相适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度 0.102 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的柚皮苷对照品储备液, 浓度 0.102 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的新橙皮苷对照品储备液。

**2.4.2 混合对照品溶液的配制** 分别精密量取柚皮苷对照品储备液、新橙皮苷对照品储备液各 10 mL 至 25 mL 量瓶, 加流动相适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液(柚皮苷浓度 0.040 84  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、新橙皮苷浓度 0.040 88  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

**2.4.3 供试品溶液的配制及测定** 取干燥至恒重的玳玳黄酮滴丸 20 丸, 研细, 精密称取粉末约 20.0 mg, 置 50 mL 量瓶, 加流动相适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 4.0 mL 于 10 mL 量瓶, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。分别精密量取对照品溶液、供试品溶液各 20  $\mu$ L, 注入高效液相色谱仪, 测定, 外标法计算。

**2.4.4 阴性对照品溶液的配制** 取缺玳玳黄酮提取物的滴丸空白处方, 按照玳玳黄酮滴丸制备工艺及“2.4.3”项下方法操作, 即得。

**2.4.5 测定波长的选择** 分别取对照品溶液、供试品溶液, 以流动相为空白, 在 200~400 nm 波长扫描。结果显示, 对照品溶液和供试品溶液的吸

收光谱相似,最大吸收波长均在 284 nm,而阴性对照溶液在此无吸收,表明基质对玳玳黄酮滴丸中柚皮苷和新橙皮苷的含量测定无影响,故选择测定波长 284 nm。

#### 2.4.6 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:

Lichrocart C<sub>18</sub>(250 mm×4 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸水溶液(22:78); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 284 nm; 柱温: 25 ℃; 进样量: 20 μL。相邻色谱峰分离度均>1.5,理论板数按新橙皮苷峰计算,不得<3 000。结果见图 2。

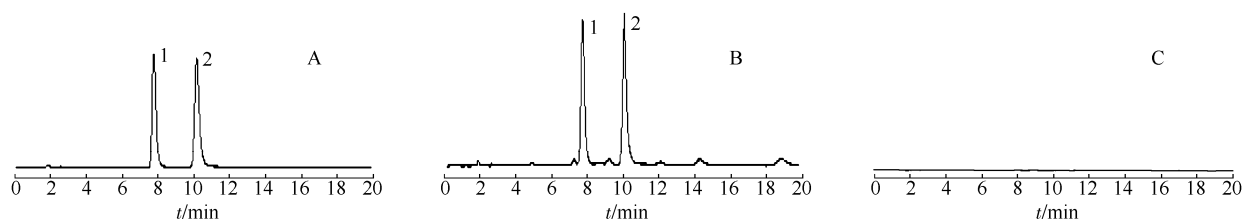


图 2 高效液相色谱图

A-柚皮苷、新橙皮苷混合对照品溶液; B-玳玳黄酮滴丸; C-阴性对照品溶液; 1-柚皮苷; 2-新橙皮苷

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-mixed reference substance; B-Daidai flavones dropping pills; C-negative dropping pills; 1-reference substance of naringin; 2-reference substance of neohesperidin

**2.4.7 标准曲线制备和线性关系考察** 精密量取混合对照品溶液 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mL 置 10 mL 量瓶,用流动相适量溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪,记录色谱图。以峰面积为纵坐标,对照品浓度为横坐标,绘制标准曲线。计算柚皮苷回归方程  $Y=3.0712 \times 10^4 X - 3.8279 \times 10^3$ ,  $r=0.9999$ , 浓度在 4.084~16.336 μg·mL<sup>-1</sup> 内线性关系良好;新橙皮苷回归方程  $Y=3.4107 \times 10^4 X - 4.3069 \times 10^3$ ,  $r=0.9999$ , 浓度在 4.088~16.352 μg·mL<sup>-1</sup> 内线性关系良好。

**2.4.8 精密度试验** 分别精密吸取同一份混合对照品溶液(柚皮苷浓度 10.210 μg·mL<sup>-1</sup>、新橙皮苷浓度 10.220 μg·mL<sup>-1</sup>),连续进样 6 次,各 20 μL,记录峰面积,结果柚皮苷和新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.38%、0.67%,表明仪器精密度良好。

**2.4.9 重复性试验** 取同一批玳玳黄酮滴丸(批号:20130717),研细,分别精密称取 6 份,按“2.2.3”项下同法操作,测定,结果滴丸中柚皮苷含量分别为 60.22, 62.00, 61.94, 62.56, 62.72, 62.76 mg·g<sup>-1</sup>,新橙皮苷含量分别为 71.38, 73.57, 73.37, 73.47, 74.32, 74.23 mg·g<sup>-1</sup>;柚皮苷平均含量 62.03 mg·g<sup>-1</sup> (RSD=1.54%,  $n=6$ ),新橙皮苷平均含量 73.39 mg·g<sup>-1</sup> (RSD=1.45%,  $n=6$ )。

**2.4.10 稳定性试验** 取混合对照品溶液(柚皮苷浓度 10.210 μg·mL<sup>-1</sup>、新橙皮苷浓度 10.220 μg·mL<sup>-1</sup>),分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 处,精密吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪,记录峰面积,

结果柚皮苷与新橙皮苷 RSD 的分别为 1.93%, 2.28%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

**2.4.11 加样回收率试验** 分别精密称取玳玳黄酮滴丸(批号 20130717, 含柚皮苷 62.03 mg·g<sup>-1</sup>、新橙皮苷 73.39 mg·g<sup>-1</sup>)约 10 mg,精密加入混合对照品(柚皮苷对照品 0.061 50 mg·mL<sup>-1</sup>、新橙皮苷对照品 0.075 10 mg·mL<sup>-1</sup>)10 mL,按“2.4.3”项下同法操作,测定,计算回收率。结果见表 3。

**2.4.12 样品含量测定** 分别取 3 批玳玳黄酮滴丸,按“2.4.3”项下方法操作,测定,计算柚皮苷、新橙皮苷含量。结果见表 4。

### 3 讨论

玳玳黄酮滴丸的 TLC 鉴别实验分别比较了展开剂乙酸乙酯-甲醇-水(100:17:13)、二甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(20:10:1:1)二次展开和三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液,最终选择斑点分离效果较佳且毒性较小的三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液作为展开剂,在该条件下,考察比较药效成分柚皮苷和新橙皮苷在高温高湿(22 ℃, RH 70%)及低温低湿(4 ℃, RH 18%)条件下同样能得到良好分量,斑点清晰。故采用三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液作为展开剂。

药物的纯度是影响药物质量的重要因素,中药制剂的杂质检查是其安全性评价的重要保证之一。3 批玳玳黄酮滴丸重金属和砷盐的限量检查结果提示,重金属限量及砷盐限量均应控制在百万分之十之内。

表 3 加样回收率试验结果

Tab. 3 Results of addition recovery test

| 名称   | 取样量/mg | 样品中含量/mg | 加入量/mg  | 测得量/mg  | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|------|--------|----------|---------|---------|-------|---------|-------|
| 柚皮苷  | 10.03  | 0.622 2  | 0.615 0 | 1.225 5 | 98.1  | 100.1   | 2.15  |
|      | 9.83   | 0.609 8  | 0.615 0 | 1.217 2 | 98.8  |         |       |
|      | 9.90   | 0.614 1  | 0.615 0 | 1.251 2 | 103.6 |         |       |
|      | 9.96   | 0.617 8  | 0.615 0 | 1.242 0 | 101.5 |         |       |
|      | 10.01  | 0.620 9  | 0.615 0 | 1.237 2 | 100.2 |         |       |
|      | 10.05  | 0.623 4  | 0.615 0 | 1.227 9 | 98.3  |         |       |
| 新橙皮苷 | 10.03  | 0.735 2  | 0.751 0 | 1.474 7 | 98.5  | 101.2   | 2.46  |
|      | 9.83   | 0.721 4  | 0.751 0 | 1.501 6 | 103.9 |         |       |
|      | 9.90   | 0.726 6  | 0.751 0 | 1.503 7 | 103.5 |         |       |
|      | 9.96   | 0.731 0  | 0.751 0 | 1.498 5 | 102.2 |         |       |
|      | 10.01  | 0.735 4  | 0.751 0 | 1.481 3 | 99.3  |         |       |
|      | 10.05  | 0.737 6  | 0.751 0 | 1.477 7 | 98.6  |         |       |

表 4 样品含量测定结果( $n=3$ )

Tab. 4 Results of the simple contents( $n=3$ )

| 批号       | 柚皮苷含量/<br>mg·g <sup>-1</sup> | 平均值/<br>mg·g <sup>-1</sup> | RSD/<br>% | 新橙皮苷<br>含量/mg·g <sup>-1</sup> | 平均值/<br>mg·g <sup>-1</sup> | RSD/<br>% |
|----------|------------------------------|----------------------------|-----------|-------------------------------|----------------------------|-----------|
| 20130716 | 62.45                        | 63.05                      | 0.85      | 76.48                         | 75.32                      | 1.81      |
|          | 63.22                        |                            |           | 73.82                         |                            |           |
|          | 63.48                        |                            |           | 75.67                         |                            |           |
| 20130717 | 62.51                        | 63.21                      | 1.48      | 74.47                         | 74.82                      | 0.95      |
|          | 64.27                        |                            |           | 75.64                         |                            |           |
|          | 62.85                        |                            |           | 74.35                         |                            |           |
| 20130718 | 62.79                        | 62.07                      | 1.94      | 74.75                         | 73.76                      | 1.62      |
|          | 62.75                        |                            |           | 74.11                         |                            |           |
|          | 60.68                        |                            |           | 72.43                         |                            |           |

柚皮苷和新橙皮苷均为二氢黄酮类成分,紫外吸收光谱显示最大吸收波长均在 284 nm,故选择 284 nm 作为 HPLC 法检测波长;阴性对照品溶液的紫外吸收光谱图及高效液相色谱图表明,基质对玳玳黄酮滴丸柚皮苷和新橙皮苷的含量测定方法无干扰。实验比较了流动相(甲醇-0.1%磷酸溶液和乙腈-0.1%磷酸溶液)及不同混合比例[(80:20)和(70:30)],结果表明 Lichrocart C<sub>18</sub> 色谱柱,选择乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78)为流动相,284 nm 波长检测新橙皮苷、柚皮苷色谱峰稳定且峰面积最大,基线平稳,色谱峰完全分离。

玳玳黄酮提取物中的主要特征成分为新橙皮苷、柚皮苷,其中新橙皮苷的含量最大,柚皮苷次之。为确保从原料来源、中间体到成品的质量,本研究建立了采用高效液相色谱法同时测定玳玳黄酮滴丸中柚皮苷、新橙皮苷的符合中药特点的多活性成分含量测定方法,经考察,方法结果准

确,精密度、稳定性和重复性良好,可用于玳玳黄酮滴丸及相关产品的质量控制在制定玳玳黄酮滴丸质量标准具有指导意义。

REFERENCES

[1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 230.

[2] XIAO P G. Modern Chinese Material Medica(新编中药志) [M]. Beijing: Chemical industry press(化学工业出版社). 2002: 446.

[3] CHEN D, LIU Y J, HUANG J J, et al. Analyses on the main chemical compositions in *Citrus aurantium* L. var daidai of Fujian province [J]. J Fujian Coll Tradit Chin Med(福建中医学院学报), 2007, 17(1): 18-20.

[4] LIU Y J, CHEN D, HUANG Q D, et al. Study on extraction techniques of flavonoids in *Citrus aurantium*[J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2009, 29(21): 1826-1828.

[5] CHEN D, LIU Y J. A preparation methods of effective parts of total flavonoids of *Citrus aurantium* L. var daidai Tanaka fruits [P]. China Patent(中国专利) CN201010556341.9, 2011-05-18.

[6] QIU H X, CHEN D, LIU Y J, et al. Optimization of processing technology of *Citrus Aurantium* L. var daidai dropping pills [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2011, 31(5): 357-361.

[7] QIU H X, CHEN D, LIU Y J, et al. Study on antiatherosclerosis effects of Daidai flavones dropping pills on hyperlipidemia rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(7): 597-601.

[8] LIU Y J, CHEN D, QIU H X, et al. In vitro antioxidant effect of the total favones of *Citrus aurantium* L. var Daidai Tanaka Fruits [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012,29(2): 97-101.

[9] QIU H X, CHEN D, WU X Q, et al. Reserch on dissolution and the fast releasing mechanism of Daidai flavones dropping pills [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2011, 31(18): 1495-1499.

收稿日期: 2013-10-14