

橙皮素标准样品的研制

宋祥云¹, 刘金宇², 耿岩玲¹, 林云良¹, 付瑞明¹, 崔莉¹, 王岱杰^{1*}

(1. 山东省分析测试中心, 山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东 济南 250014;
2. 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276006)

摘要: 建立了橙皮素标准样品的研制方法。采用硅胶柱色谱结合制备液相色谱技术对橙皮素样品进行分离制备, 通过UV、IR、MS和NMR等手段进行结构表征, 同时进行了薄层色谱鉴别和热重分析, 进行了均匀性、稳定性检验和8家实验室联合定值。结果表明, 该样品均匀性良好, 在0~4℃储存条件下12个月稳定性良好, 定值结果确定其标准值为98.78%, 置信度95%的不确定度为0.26%。该橙皮素标准样品达到了国家标准样品的技术要求, 具有溯源性, 可用于橙皮素及相关产品的质量控制和检测方法评定。

关键词: 橙皮素; 标准样品; 均匀性; 稳定性; 定值; 不确定度

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-4026(2018)01-0016-07

Preparation of certified reference materials of hesperetin

SONG Xiang-yun¹, LIU Jin-yu², GENG Yan-ling¹, LIN Yun-liang¹, FU Rui-ming¹,
CUI Li¹, WANG Dai-jie^{1*}

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of TCM Quality Control, Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China;
2. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China)

Abstract: A method for the preparation of the certified reference material (CRM) of hesperetin was established in this article. Hesperetin sample was obtained by means of silica gel chromatography combined with preparative HPLC technique, and its structure was characterized by UV, IR, MS and NMR. At the same time, the TLC identification and thermo-gravimetric analysis were carried out, and the sample was divided into bottles for further homogeneity test, stability test, and the cooperative certification by 8 laboratories. The results indicated that hesperetin samples had good homogeneity, with good stability within 12 months at 0~4℃. The certified value of the reference material of hesperetin was 98.78%, with the expanded uncertainty of 0.26% in confidence coefficient of 95%. The standard sample of hesperetin has reached the technical requirements of the national certified reference material. The CRM has traceability and can be used in the content determination, testing method validation, as well as the quality control of hesperetin and related products.

Key words: hesperetin; certified reference material; homogeneity; stability; certification; uncertainty

橙皮素(5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基-黄酮)是一种重要的黄酮类化合物, 具有独特的药理活性, 广泛应用于医学各个领域^[1]。橙皮素具有健胃、祛痰、镇咳、驱风、利尿、抗病毒、止逆和止胃痛等功效。现代药理研究

收稿日期: 2017-10-19

基金项目: 山东省重大科技创新工程(2017CXGC1308); 山东省重点研发计划(2017GSF216002)

作者简介: 宋祥云(1988—), 男, 研究实习员, 研究方向为天然产物提取分离及标准样品制备。

*通信作者: 王岱杰(1981—), 男, 副研究员, 研究方向为天然产物提取分离及标准样品制备。E-mail: wangdaijie@126.com

表明 橙皮素还具有抗氧化^[2-4]、扩张血管、降血脂^[5]、抗癌^[6-9]、抗炎^[10]、改善血脑屏障^[11-12]等多种药理活性。

橙皮素作为一种重要的药物原料,在自然界中分布广泛,同时也是多种植物产品的重要质量控制指标。目前市场上橙皮素以对照品为主,纯度参差不齐,未按照国家标准进行均匀性、稳定性和定值实验,最终结果没有不确定度评价,样品也不具有溯源性。因此,为了满足橙皮素及相关产品的检测需求,保证检测结果的准确性、可比性和溯源性,本文按照 GB/T 15000.3—2008 标准样品工作导则^[13],成功研制出了橙皮素国家标准样品(图 1)。

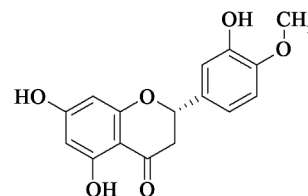


图 1 橙皮素化学结构式

Fig. 1 The chemical structure of hesperetin

1 实验部分

1.1 仪器

R-3 型旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司); SCIENTZ-10N 型冷冻干燥仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); LC-6A 型制备液相色谱仪(日本岛津公司); WRS-1B 型数字熔点仪(上海精密科学仪器有限公司); UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); INOVA 600 MHz 核磁共振波谱仪(美国瓦里安公司); 6520 Q-ToF 型液质联用仪(美国安捷伦公司); STA 449FC 同步热分析仪(德国耐驰公司)。

1.2 试剂与原料

柱层析硅胶、GF254 薄层硅胶板(青岛海洋化工厂); 高效液相色谱用甲醇为色谱纯(美国天地公司), 水为重蒸水, 其他试剂为分析纯; 橙皮素对照品(成都德思特生物技术有限公司)。

陈皮药材购自济南建联中药店,经山东省中医药大学李佳教授鉴定为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮,样本存放于山东省分析测试中心。

1.3 样品制备

1.3.1 橙皮素粗提物的提取

陈皮药材粉碎至 40 目,95%乙醇加热回流药材 3 次,每次 3 h,抽滤,减压浓缩至无醇味,加水分散,分别用石油醚和乙酸乙酯萃取,减压浓缩,分别得到石油醚和乙酸乙酯浸膏,乙酸乙酯浸膏冰箱保存备用。

1.3.2 橙皮素的富集

将乙酸乙酯浸膏进行硅胶柱色谱分离,石油醚-乙酸乙酯溶剂体系梯度洗脱,分瓶收集,薄层色谱和 HPLC 监测,橙皮素对照品比对,收集橙皮素含量较高的组分,减压浓缩。

1.3.3 制备液相色谱分离

制备条件为: Shim-pack PREP-ODS 柱(20 mm×250 mm, 15 μm), 流速 10 mL/min, 流动相为甲醇-0.2% 甲酸水溶液(55:45, V/V), 检测波长 284 nm。根据制备液相色谱图收集,合并相同组分,减压浓缩,冷冻干燥,得到高纯度橙皮素单体(图 2)。

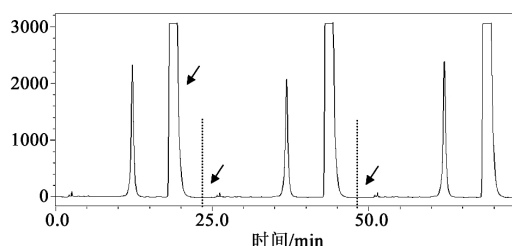


图 2 橙皮素单体的制备液相色谱图

Fig. 2 Chromatogram of hesperetin purified by preparative HPLC

1.4 纯度分析方法

1.4.1 高效液相色谱分析

采用高效液相色谱进行纯度分析, Shim-pack C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1% 甲醇水溶液(60:40, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 运行时间: 30 min; 检测波长: 284 nm; 样品浓度 0.2 mg/mL。

1.4.2 薄层鉴别

精密称取样品 5 mg, 加甲醇配制成浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液。展开剂分别为氯仿-甲醇(10:1, V/V) 和乙酸乙酯-石油醚-甲酸(10:10:0.1, V/V), 定量毛细点样管吸取 20、40、60、80、100 μg 梯度将样品点于 GF254 硅胶板, 分别展开, 取出, 晾干, 置于 254、365 nm 荧光下检测, 同时喷 10% 硫酸乙醇显色剂, 105 °C 下加热 3 min, 至斑点显色清晰。

1.4.3 热重分析

精密称取样品 5 mg, 置于热重用坩埚中, 热重条件: 初温 30 °C, 最终温度 600 °C, 升温速率 10 °C/min, 气体 N₂, 流量 100 mL/min。

1.5 结构表征

橙皮素单体的结构表征采用紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、质谱(MS)和核磁共振(NMR)等技术。UV 法的测试溶剂为甲醇, 扫描范围为 200~400 nm; IR 法采用 KBr 压片, 扫描波数为 400~4 000 cm⁻¹; MS 为电喷雾离子源, 载气温度为 300 °C, 载气流速为 10 L/min, 普氮为载气, 毛细管电压为 4.0 kV, 扫描范围 *m/z* 为 100~1000; NMR 法的氘代试剂为 CDCl₃。

1.6 均匀性检验

依据标准样品导则(均匀性研究)要求^[13], 采用顺序重复随机测量, 随机抽取分装好的橙皮素样品 10 瓶(抽样量大于 $1.5\sqrt{N}$), 3 种抽样程序(第一种 1-3-5-7-9-2-4-6-8-10; 第二种 10-9-8-7-6-5-4-3-2-1; 第三种 2-4-6-8-10-1-3-5-7-9) 样品按 1.4.1 中规定方法进行分析, 样品纯度读取采用峰面积归一化法, 采用方差分析法进行数据分析。

1.7 稳定性检验

橙皮素样品储存温度为 0~4 °C, 考察样品的 1 年稳定期, 分 5 个时间段监测, 按 1.4.1 中规定方法进行分析, 样品纯度读取采用峰面积归一化法, 每份样品测定 6 次, 统计分析采用 *t* 检验法^[13]。

1.8 定值

根据工作导则, 标准样品的定值采用 8 家实验室协作进行的方法。随机抽取样品 24 瓶, 每家定值实验室寄出样品 3 瓶, 每瓶测定 2 次, 协作实验室共出 6 个检测结果, 按 1.4.1 中规定方法进行分析, 样品纯度以峰面积归一化法读取^[13-14]。

2 结果与讨论

2.1 纯度分析

采用 DAD 全波长检测器进行色谱峰的 3D 扫描, 检测结果扣除溶剂峰, HPLC 纯度分析结果表明, 未见明显杂质峰存在, 见图 3。以氯仿-甲醇(10:1, V/V) 和乙酸乙酯-石油醚-甲酸(10:10:0.1, V/V) 为展开剂, 荧光和硫酸乙醇法检测结果表明, *R_f* 值分别为 0.66 和 0.54, 未见明显杂质斑点存在。热重结果表明, 在 21.27~217.48 °C 范围内, TG 曲线是一条水平线, 表明测试样品中吸附水和结晶水含量很低, 热稳定性好。当温度增加超过 280.12 °C 时, 样品开始分解, DTA 曲线显示温度升高到 385.37 °C, 样品迅速分解。

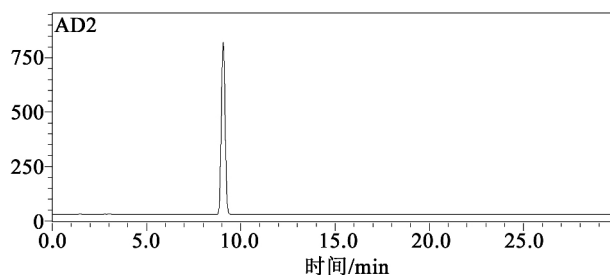


图 3 橙皮素等度洗脱 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC chromatogram of hesperetin by isocratic elution

2.2 结构表征

熔点: 216~218 °C; $UV\lambda_{\max}^{EtOH}$: 215, 284, 487 nm; $IR_{\max}^{cm^{-1}}$: 3 500, 1 638, 1 581, 1 477, 1 306, 1 593, 1 172, 816; ESI-MS: m/z 303.2 $[M+H]^+$. ^1H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.73 (1H, dd, $J=16.0$ Hz, $J=3.0$ Hz, H-3 cis), 3.21 (1H, dd, $J=16.8$ Hz, $J=12.5$ Hz, H-3 syn), 3.78 (1H, s, CH_3O-3'), 5.44 (1H, dd, $J=12.6$ Hz, $J=3.0$ Hz, H-2), 5.89 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 5.90 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.88 (1H, dd, $J=8.3$ Hz, $J=2.0$ Hz, H-6'), 6.93-6.94 (2H, m, H-2', 5'), 9.11 (1H, s, OH-4'), 10.80 (1H, s, OH-5), 12.15 (1H, s, OH-7). $^{13}C-NMR$ (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 196.1 (C-4), 166.5 (C-7), 163.4 (C-5), 162.7 (C-9), 147.8 (C-4'), 146.3 (C-3'), 131.0 (C-1'), 117.5 (C-6'), 113.9 (C-2'), 111.8 (C-5'), 101.7 (C-10), 95.7 (C-8), 94.9 (C-6), 78.1 (C-2), 55.6 (CH₃), 41.9 (C-3). 以上数据与文献 [15-16] 比较, 确定为橙皮素。

2.3 均匀性检验

将结果进行 F 检验, 进行数据统计, 确定橙皮素样品的均匀性, 结果见表 1 和表 2。

表 1 均匀性检验数据

Table 1 Results of homogeneity test

瓶号	样品纯度 / %				总平均值
	第 1 组	第 2 组	第 3 组	平均值	
1	99.12	99.05	99.07	99.08	99.06
2	98.98	99.02	99.01	99.00	
3	99.12	99.09	99.07	99.09	
4	99.05	99.05	99.11	99.07	
5	99.07	99.11	99.05	99.08	
6	99.07	99.06	99.13	99.09	
7	99.11	99.05	99.03	99.06	
8	99.02	99.06	98.94	99.01	
9	99.05	99.09	99.07	99.07	
10	99.10	99.03	99.02	99.05	

表 2 方差分析数据

Table 2 Results of variance analysis

变差源	方差 (SS)	自由度 (DF)	均方 (MS)
瓶间	2.66×10^{-2}	9	2.96×10^{-3}
瓶内	2.74×10^{-2}	20	1.37×10^{-3}
总和	5.40×10^{-2}	29	

瓶间方差的计算公式:

$$s_A^2 = \frac{MS_{\text{瓶间}} - MS_{\text{瓶内}}}{n_0}。$$

则瓶间标准偏差为:

$$s_{bb} = \sqrt{s_A^2} ,$$

$$u_{\text{均}} = s_{bb} = 0.03\% ,$$

其中 $u_{\text{均}}$ 为均匀性检验不确定度。

F 值的计算公式:

$$F = MS_{\text{瓶间}} / MS_{\text{瓶内}} = 2.16。$$

以组间自由度 $\nu_1 = 9$ 和组内自由度 $\nu_2 = 20$ 为变量查 F 临界值表, 可知 $F_{0.05}(9, 20) = 2.39$, 由于 F 值小于 F 临界值, 因此所研制的橙皮素标准样品具有良好的均匀性。

2.4 稳定性检验

采用 t 检验对稳定性结果进行统计分析, 采用直线模型, 观察斜率值变化情况, 并进行预测, 结果见表 3。

表 3 稳定性检验数据

Table 3 Results of stability test of

时间/月	样品纯度/%					平均值/%	标准偏差/%
	1	2	3	4	5		
0	99.09	99.06	99.15	99.05	99.12	99.10	0.05
3	99.05	99.08	99.11	99.01	99.09	99.06	0.06
6	99.09	98.94	98.94	98.99	98.96	98.98	0.07
9	98.90	98.99	98.95	98.99	98.85	98.94	0.07
12	98.86	98.86	98.81	98.84	98.84	98.84	0.03

斜率计算公式如下:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} ,$$

式中, X_i 为抽样的月份数, Y_i 为检测的样品纯度; $\bar{Y} = 98.98\%$; $\bar{X} = 6$ 。

截距计算公式如下:

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}。$$

直线模型的标准偏差:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} ,$$

则 $s = 0.20\%$ 。

斜率相关不确定度计算公式如下:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}。$$

查表得自由度为 $n-2$ 和 95% 置信水平 ($p=0.95$) 分布的 t 因子为 3.182。

由于斜率变化的绝对值 $|b_1| < t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1) = 3.182 \times 0.009 = 0.029$, 即: $|b_1| < 0.029$ 。

因此, 斜率变化不显著, 即橙皮素标准样品在 1 年内稳定性良好。

稳定性检验的不确定度为:

$$u_{\text{稳}} = S_b \times t = 0.11\%。$$

其中 $\mu_{\text{稳}}$ 为稳定性检验不确定度。

2.5 定值

根据各个协作实验室的反馈结果, 进行数据的统计分析, 并最终确定橙皮素标准样品的标准值和不确定度统计结果见表 4。

表 4 协作定值数据

Table 4 Results of cooperative certification

实验室序号	测得平均值/%	标准偏差/%	总平均值/%
1	98.73	0.06	98.78
2	98.84	0.02	
3	98.84	0.05	
4	98.60	0.03	
5	98.80	0.03	
6	98.84	0.03	
7	98.78	0.03	
8	98.82	0.02	

测定结果总平均值的计算公式如下:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij}}{N}。$$

实验室平均值的标准偏差为:

$$S_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}。$$

总平均值标准偏差为:

$$S_{\bar{X}} = \frac{S_{\bar{X}}}{\sqrt{n}}。$$

则多家实验室联合定值引入的不确定度为:

$$u_{\text{定}} = S_{\bar{X}} = 0.04\% ,$$

其中 $\mu_{\text{定}}$ 为定值不确定度。

橙皮素标准样品的不确定度有如下三部分组分: (1) 均匀性检验不确定度; (2) 稳定性检验不确定度; (3) 定值不确定度, 这三部分不确定度分量互不相关, 需将三种不确定度合成, 即合成不确定度 ($U_{\text{合成}}$) 为:

$$U_{\text{合成}}^2 = u_{\text{均}}^2 + u_{\text{稳}}^2 + u_{\text{定}}^2。$$

代入数据计算得 $U_{\text{合成}} = 0.13\%$ 。

置信区间 95% 时 $k=2$ 。

则橙皮素标准样品的扩展不确定度:

$$U_{\text{扩展}} = 2U_{\text{合成}} = 0.13\% \times 2 = 0.26\%。$$

3 结论

本研究针对橙皮素及相关产品缺乏国家标准样品的现状,严格按照国标规定的标样样品研制规则,成功地研制出橙皮素标准样品,并顺利通过了专家验收。研制过程中对标准样品的均匀性进行考察,并进行方差分析;稳定性检验采用直线模型,并进行了 t 检验法考察;定值采用多家实验室协作,对定值结果进行统计分析。根据三个方面引入的不确定度,进行了不确定度的合成和扩展,获得了标准值为 98.78%,置信度 95%的不确定度为 0.26%的橙皮素国家标准样品,具有样品溯源性,可用于相关产品的检测方法评定和含量测定,填补了橙皮素标准样品的国内外空白。

参考文献:

- [1]FORMICA J V, REGELSON W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids [J]. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33(12): 1061-1080.
- [2]CHO J. Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin [J]. *Arch Pharm Res*, 2006, 29(8): 699-706.
- [3]CAI Y Z, LUO Q, SUN M, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer [J]. *Life Sci*, 2004, 74(17): 2157-2184.
- [4]HEIM K E, TAGLIAFERRO A R, BOBILYA D J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships [J]. *J Nutr Biochem*, 2002, 13(10): 572-584.
- [5]ORALLO F, ÁLVAREZ E, BASARAN H, et al. Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2004, 370(6): 452-463.
- [6]ARANGANATHAN S, PANNEER SELVAM J, NALINI N. Hesperetin exerts dose dependent chemopreventive effect against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis [J]. *Invest New Drugs*, 2009, 27(3): 203-213.
- [7]ARANGANATHAN S, SELVAM J P, SANGEETHA N, et al. Modulatory efficacy of hesperetin (citrus flavanone) on xenobiotic-metabolizing enzymes during 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 180(2): 254-261.
- [8]COORAY H C, JANVILISRI T, von VEEN H W, et al. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(1): 269-275.
- [9]SO F V, GUTHRIE N, CHAMBERS A F, et al. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen [J]. *Cancer let*, 1997, 112(2): 127-133.
- [10]GARCÍA-LAFUENTE A, GUILLAMÓN E, VILLARES A, et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease [J]. *Inflamm Res*, 2009, 58(9): 537-552.
- [11]MITSUNAGA Y, TAKANAGA H, MATSUO H, et al. Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood-brain barrier [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 395(3): 193-201
- [12]YOU DIM K A, DOBBIE M S, KUHNLE G, et al. Rice-Evans, Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro study [J]. *J Neurochem*, 2003, 85(1): 180-192.
- [13]中国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 15000.3—2008/ISO Guide 35: 2006, 标准样品工作导则(3) 标准样品定值的一般原则和统计方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [14]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 8170—2008 数值修约与极限数值的表示和判定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [15]李晓强, 张培芬, 段文达, 等. 白花泡桐花的化学成分研究[J]. *中药材*, 2009, 32(8): 1227-1229.
- [16]何桂霞, 裴刚, 杜方麓, 等. 藤茶化学成分的研究[J]. *中国现代中药*, 2007, 9(12): 11-13.