

HPLC 同时测定衢枳壳中 7 种指标成分的含量

黄文康¹, 岳超², 宋剑锋³, 丁国琴⁴, 张文婷^{2*}, 赵维良^{2*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 3.衢州市食品药品检验研究院, 浙江 衢州 324000; 4.杭州市中医院, 杭州 310007)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定衢枳壳中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、川陈皮素和桔皮素含量。方法 采用 Agilent Extend C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 检测波长: 330 nm, 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 30 ℃。结果 芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、川陈皮素、桔皮素分别在 23.30~1 164.80 ng, 170.84~8 541.91 ng, 17.22~861.20 ng, 156.17~7 808.64 ng, 3.13~156.48 ng, 0.90~45.23 ng, 0.85~42.27 ng 内线性关系良好($r \geq 0.999 5$, $n=6$), 平均回收率分别为 98.8%, 101.3%, 98.3%, 96.8%, 101.8%, 101.7%, 108.9%。结论 首次建立了衢枳壳中 7 个成分 HPLC 含量测定方法, 该方法简便, 结果准确, 可为综合评价衢枳壳质量提供依据。

关键词: 衢枳壳; 高效液相色谱法; 芸香柚皮苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 木犀草素; 川陈皮素; 桔皮素

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)03-0404-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.03.021

引用本文: 黄文康, 岳超, 宋剑锋, 等. HPLC 同时测定衢枳壳中 7 种指标成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 404-407.

Simultaneous Determination of Seven Constituents in *Citrus Changshanhuoyou* Y. B. Chang by HPLC

HUANG Wenkang¹, YUE Chao², SONG Jianfeng³, DING Guoqin⁴, ZHANG Wenting^{2*}, ZHAO Weiliang^{2*} (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 3.Quzhou Institute for Food and Drug Control, Quzhou 324000, China; 4.Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the simultaneous determination of the contents of narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, luteolin, nobiletin and hesperetin of *Citrus changshan-huoyou* Y.B.Chang by HPLC. **METHODS** The HPLC method was adopted with Agilent Extend C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile and 0.1% methanoic acid with gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 330 nm and column temperature was 30 ℃. **RESULTS** The linear relation of narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, luteolin, nobiletin and hesperetin was excellent within the range of 23.30~1 164.80 ng, 170.84~8 541.91 ng, 17.22~861.20 ng, 156.17~7 808.64 ng, 3.13~156.48 ng, 0.90~45.23 ng, 0.85~42.27 ng ($r \geq 0.999 5$, $n=6$), and the mean recovery was 98.8%, 101.3%, 98.3%, 96.8%, 101.8%, 101.7%, 108.9%. **CONCLUSION** It is the first time to establish the HPLC method of the simultaneous determination for the seven contents of *Citrus changshan-huoyou* Y.B.Chang. The method is simple, reliable and accurate, which provides the reference for the quality control for *Citrus changshan-huoyou* Y.B.Chang.

KEY WORDS: *Citrus changshan-huoyou* Y.B.Chang; HPLC; narirutin; naringin; hesperidin; neohesperidin; luteolin; nobiletin; hesperetin

衢枳壳为芸香科植物常山胡柚 *Citrus changshan-huoyou* Y.B.Chang 的干燥未成熟果实, 7 月果皮尚绿时采收, 主产浙江, 以常山为重点产区。现代药理研究表明胡柚主要有效成分为黄酮^[1], 具有抗菌、抗氧化、降血脂和降氧化等作用^[2-5]。胡柚青果在民间药用历史悠久, 具有镇咳化痰、清热解毒、解酒醒脑等药用价值, 但其质量评价和控制研究尚未完善, 质量控制研究报道较少,

宋剑锋等^[6]建立了胡柚花和胡柚青果中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的 HPLC 含量测定方法, 赵庆春等^[7]建立了胡柚汁中柚皮芸香苷、柚皮苷和新橙皮苷的 HPLC 含量测定方法, 郅景梅等^[8]建立了 HPLC 测定胡柚皮中桔皮素和甜橙素含量的方法, 其他成分含量分析未见报道。本实验首次建立了 HPLC 同时测定芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、桔皮素和川陈皮素 7 个成分

作者简介: 黄文康, 男, 硕士生 Tel: 1585811454 E-mail: 846087613@qq.com *通信作者: 张文婷, 女, 博士, 主任中药师 Tel: (0571)86459425 E-mail: leozhwt@163.com 赵维良, 男, 硕士, 主任中药师 Tel: (0571)86452373 E-mail: zwl@zjjy.org.cn

含量测定方法,为进一步完善衢枳壳质量评价和控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); CP225D 电子分析天平(德国赛多利斯); 4020P 超声波清洗器(韩国 JAC 公司)。

柚皮苷对照品(批号: 110722-201312; 含量按 94.7%计)、橙皮苷对照品(批号: 110721-201316; 含量按 95.3%计)、新橙皮苷对照品(批号: 111857-201102; 含量按 99.6%计)和木犀草素对照品(批号: 111520-200504; 供含量测定用)均购自中国药品生物制品检定研究院; 芸香柚皮苷对照品(批号: 131208; 含量>98%)、桔皮素对照品(批号: 130708; 含量>98%)和川陈皮素对照品(批号: 130108; 含量>98%)均购自维克奇生物科技有限公司。乙腈(色谱纯, 美国 Merck 公司), 其余试剂为分析纯, 实验用水为超纯水。

实验共收集不同产地样品 11 批, 经浙江省食品药品检验研究院郭增喜主任中药师鉴定, 均为芸香科植物常山胡柚 *Citrus changshan-huyou* Y. B. Chang 的果实, 详见表 1。

表 1 样品信息表

Tab. 1 Sample information

编号	名称	来源	产地
S1	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	常山招贤
S2	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	航埠镇
S3	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	华驻
S4	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	常山大桥
S5	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	廿里
S6	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	石梁镇
S7	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	九华
S8	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	常山溪口
S9	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	常山柑橘园
S10	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	常山
S11	衢枳壳	衢州市食品药品检验研究院	常山柑橘园

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备

取衢枳壳粗粉 0.3 g 精密称定, 加 50%甲醇适量, 超声 20 min, 放冷至室温, 加 50%甲醇定容至 25 mL 量瓶中, 摇匀, 离心, 取上清液, 即得。

2.2 对照品溶液制备

取对照品适量, 精密称定, 加 50%甲醇分别制成每 1 mL 含芸香柚皮苷 46.59 μg , 柚皮苷 360.80 μg , 橙皮苷 3.45 μg , 新橙皮苷 312.35 μg ,

木犀草素 6.26 μg , 桔皮素 1.01 μg , 川陈皮素 1.09 μg 的混合对照品溶液, 即得。

2.3 色谱条件

色谱柱: Agilent Extend C₁₈ 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)。流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)。梯度洗脱: 0~2 min, 10%A; 2~5 min, 10% $\rightarrow$ 18%A; 5~10 min, 18%A; 10~25 min, 18% $\rightarrow$ 20%A; 25~45 min, 20% $\rightarrow$ 50%A; 45~70 min, 50% $\rightarrow$ 100%A。检测波长: 330 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.4 系统适用性试验

分别精密吸取混合对照品溶液 5 μL , 供试品溶液 10 μL , 按“2.3”项下色谱条件进行测定, 结果样品中各成分达到基线分离, 理论板数按柚皮苷峰计算应 ≥ 3000 。色谱图见图 1。

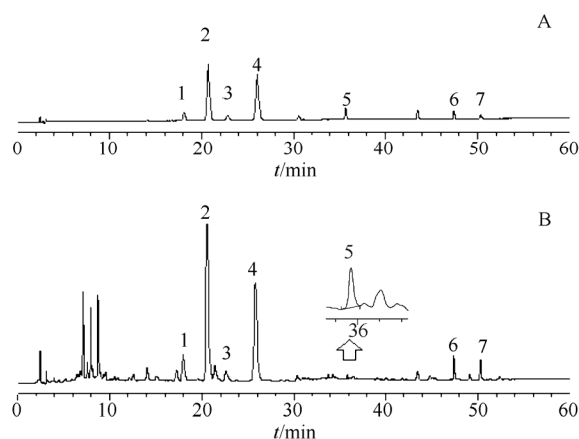


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-样品; 1-芸香柚皮苷; 2-柚皮苷; 3-橙皮苷; 4-新橙皮苷; 5-木犀草素; 6-桔皮素; 7-川陈皮素。

Fig. 1 HPLC Chromatograms

A-standards solution; B-sample; 1-narirutin; 2-naringin; 3-hesperidin; 4-neohesperidin; 5-luteolin; 6-nobiletin; 7-hesperetin.

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围考察 将“2.2”项下混合对照品溶液分别进样 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μL , 按“2.3”项下色谱条件进行测定, 以色谱峰面积(Y)对进样量(X)进行回归, 计算回归方程, 结果见表 2。

2.5.2 仪器精密度 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 5 μL , 按“2.3”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录色谱峰峰面积, 计算色谱峰面积 RSD。芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、桔皮素和川陈皮素 RSD(n=6)均 $\leq 2.0\%$, 表明仪器精密度良好。

表 2 7 种指标成分的线性关系

Tab. 2 Linearity of determination of 7 index componenes

名称	线性方程	r	线性范围/ng
芸香柚皮苷	$Y=0.315X+0.060$	1.000 0	23.30~1 164.80
柚皮苷	$Y=0.337X+0.693$	1.000 0	170.84~8 541.94
橙皮苷	$Y=0.324X+3.842$	0.999 5	17.22~861.20
新橙皮苷	$Y=0.346X+0.839$	1.000 0	156.17~7 808.64
木犀草素	$Y=1.787X-1.289$	0.999 5	3.13~156.48
川陈皮素	$Y=3.997X-0.065$	1.000 0	0.90~45.23
桔皮素	$Y=2.691X+0.769$	0.999 5	0.85~42.27

2.5.3 重复性试验 精密称量同一批号供试品(S1)6 份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进行测定并计算含量。芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、川陈皮素、桔皮素的平均含量分别为 7.318 3, 52.453 9, 4.870 5, 50.616 9, 0.129 7, 0.277 2, 0.174 7 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.21%, 0.75%, 1.15%, 0.75%, 2.69%, 0.78%, 0.53%, 表明方法的重复性良好。

2.5.4 加样回收率试验 精密称取同一批供试品(S1)6 份,分别精密加入芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、川陈皮素、桔皮素对照品,按“2.1”项下供试品制备方法制备并按“2.3”项下色谱条件进行测定,计算回收率和 RSD,结果见表 3。

2.5.5 稳定性实验 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液和重复性试验(S1)的供试品溶液,分别在 0, 6, 9, 16, 20, 25 h 进样,按“2.3”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算 RSD。芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、川陈皮素、桔皮素的对照品峰面积的 RSD(n=6)分别为 1.7%, 1.9%, 2.6%, 1.8%, 1.4%, 1.6%, 1.8%; 供试品峰面积 RSD(n=6)分别为 1.70%, 0.50%, 0.82%, 0.54%, 1.72%, 0.48%, 0.52%, 表明对照品溶液和供试品溶液在 25 h 内基本稳定。

2.6 含量测定

分别取实验收集的 11 批样品,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件对 7 个成分进行检测,计算含量,结果见表 4。

3 讨论

3.1 波长的选择

将混合对照品溶液用 HPLC-DAD 进行检测,经 DAD 光谱分析,结果在 330 nm 波长处可兼顾各成分的紫外吸收,故以 330 nm 作为检测波长。

表 3 7 种指标成分加样回收率测定结果

Tab. 3 Results of recovery test for 7 index componenes

成分	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率%	RSD/ %
芸香柚皮苷	0.150 7	1.102 9	1.164 8	2.260 4	99.4	98.8	1.7
	0.148 4	1.086 0	1.164 8	2.202 0	95.8		
	0.157 4	1.151 9	1.164 8	2.297 7	98.3		
	0.159 0	1.163 6	1.164 8	2.325 0	99.7		
	0.153 9	1.126 3	1.164 8	2.300 9	100.8		
	0.156 3	1.143 8	1.164 8	2.294 7	98.8		
柚皮苷	0.150 7	7.904 8	6.960 5	14.798 7	99.0	101.3	3
	0.148 4	7.784 1	7.320 3	14.830 2	96.3		
	0.157 4	8.308 7	7.557 1	16.017 6	102.0		
	0.159 0	8.340 1	7.509 7	16.087 3	103.2		
	0.153 9	8.072 6	7.755 9	16.113 0	103.7		
	0.156 3	8.198 5	7.585 5	16.059 5	103.6		
橙皮苷	0.150 7	0.734 0	0.861 2	1.560 0	95.9	98.3	3.3
	0.148 4	0.722 8	0.861 2	1.549 8	96.0		
	0.157 4	0.716 2	0.861 2	1.613 3	104.2		
	0.159 0	0.774 4	0.861 2	1.622 8	98.5		
	0.153 9	0.749 6	0.861 2	1.606 4	99.5		
	0.156 3	0.761 3	0.861 2	1.587 3	95.9		
新橙皮苷	0.150 7	7.628 0	7.838 5	15.189 9	96.5	96.8	1.7
	0.148 4	7.511 5	7.410 2	14.634 0	96.1		
	0.157 4	7.967 1	7.858 4	15.603 2	97.2		
	0.159 0	8.048 1	6.703 1	14.738 0	99.8		
	0.153 9	7.987 9	7.798 7	15.424 6	95.4		
	0.156 3	7.911 4	7.748 9	15.324 2	95.7		
木犀草素	0.150 7	0.019 5	0.015 6	0.036 4	107.5	101.8	4.9
	0.148 4	0.019 2	0.015 6	0.035 0	100.8		
	0.157 4	0.020 4	0.015 6	0.037 2	107.6		
	0.159 0	0.020 6	0.015 6	0.036 0	98.0		
	0.153 9	0.020 0	0.015 6	0.035 8	101.3		
	0.156 3	0.020 3	0.015 6	0.035 2	95.4		
川陈皮素	0.150 7	0.041 8	0.045 2	0.086 2	98.2	101.7	2.2
	0.148 4	0.041 1	0.045 2	0.087 0	101.3		
	0.157 4	0.043 6	0.045 2	0.091 0	104.2		
	0.159 0	0.044 1	0.045 2	0.089 6	100.6		
	0.153 9	0.042 7	0.045 2	0.089 4	103.4		
	0.156 3	0.043 3	0.045 2	0.089 5	102.0		
桔皮素	0.150 7	0.026 3	0.025 4	0.052 8	104.4	108.9	3.4
	0.148 4	0.025 9	0.025 4	0.052 2	115.6		
	0.157 4	0.027 5	0.025 4	0.055 1	108.7		
	0.159 0	0.027 8	0.025 4	0.055 1	107.6		
	0.153 9	0.026 9	0.025 4	0.054 1	107.3		
	0.156 3	0.027 3	0.025 4	0.055 1	109.7		

表 4 衢枳壳中 7 种指标成分的含量测定结果(n=2)

Tab. 4 Contents of seven componenes in *Citrus changshan-huyou* Y.B.Chang (n=2)

样品	芸香 柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙 皮苷	木犀 草素	川陈 皮素	桔皮素
S1	7.314	52.454	4.871	50.617	0.130	0.277	0.175
S2	5.239	37.810	3.909	48.231	0.177	0.231	0.134
S3	7.804	50.900	4.779	49.531	0.209	0.282	0.176
S4	5.952	43.928	4.052	49.697	0.214	0.255	0.139
S5	4.623	26.569	3.331	29.722	0.213	0.262	0.131
S6	5.149	40.881	3.437	48.796	0.195	0.292	0.166
S7	6.519	46.612	4.476	53.068	0.215	0.219	0.124
S8	7.466	53.739	4.953	56.655	0.276	0.312	0.170
S9	16.120	43.120	15.365	40.733	0.116	0.411	0.314
S10	10.150	48.920	6.381	45.850	0.176	0.273	0.175
S11	9.455	72.700	6.976	67.428	0.342	0.338	0.193

3.2 供试品提取条件的优化

实验对提取溶剂(30%甲醇、50%甲醇、80%甲醇)、提取方式(超声、回流)、提取时间(10, 20, 30 min)、取样量(0.1, 0.3, 0.5 g), 综合考虑色谱峰峰面积、分离度、峰形和供试品制备方法的简单高效, 故确定供试品制备方法: 取衢枳壳粗粉 0.3 g 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加 50%甲醇适量, 超声 20 min, 放冷至室温, 加 50%甲醇至刻度, 摇匀, 离心, 取上清液, 即得。

3.3 色谱条件的优化

实验对 Agilent Extend XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 Diamond C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)4 根色谱柱进行分析, 结果各组分均能达到有效分离; 在 25, 30, 35 °C 柱温条件下进行分析, 不同柱温下各化合物均能达到有效分离, 仅影响相对保留时间。综上表明实验色谱条件具有良好的耐用性。

芸香柚皮苷、柚皮苷和新橙皮苷成分在衢枳壳中含量相对较高, 衢枳壳中芸香柚皮苷的含量范围为 4.623~16.120 mg·g⁻¹, 柚皮苷的含量范围为 26.569~72.700 mg·g⁻¹, 新橙皮苷的含量范围为 29.722~67.428 mg·g⁻¹, 其余成分含量较低。不同采集地衢枳壳成分含量差异明显。本方法简便、高效、准确、可靠, 可为衢枳壳质量全面、准确

的评价和控制提供参考。

REFERENCES

- [1] ZHAO X M, YE X Q, XU Y F, et al. Isolation and identification of effective constituents from the peels of *Citrus paradisi* cv. *changshan-huyou* and their pharmacological activities [J]. *J Fruit Sci*(果树学报), 2006, 23(3): 458-461.
- [2] ZHAO X M, YE X Q, XU Y F, et al. Flavonoids in peels of *Citrus changshan-huyou* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2003, 34(1): 14-16.
- [3] ZHAO X M, YE X Q, XU Y F. Study on the extraction of flavonoids and antioxidation in Huyou peels [J]. *J Fruit Sci*(果树学报), 2003, 20(4): 261-265.
- [4] FANG B, RUITING Q I, ZHANG Y. Active components and antioxidant activities of different parts of *Citrus paradise* fruit [J]. *Food Sci*(食品科学), 2015, 36(10): 158-163.
- [5] WANG Y L, ZHANG J, CHU W J et al. Study on the hypoglycemic effects of Huyou fruits and the distribution of hypoglycemic components [J]. *Chin Nutr Soc*(营养学报), 2015, 37(2): 173-177.
- [6] SONG J F, FENG J Q, HU J H et al. Simultaneous determination for contents of naringin, hesperidin, and neohesperidin in flower of *Citrus changshan-huyou* by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2014, 45(6): 854-856.
- [7] ZHAO Q C, MIN P, SHI G B, et al. Simultaneous determination of contents of narirutin, naringin and neohesperidin in *Citrus changshan-huyou* Y. B. Chang by HPLC [J]. *J Shengyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2010, 27(9): 737-740.
- [8] ZHI J M, WANG M. Determination of polymethoxylated flavones in *Citrus grandis* peel by HPLC method [J]. *Inf Tradit Chin Med*(中医药信息), 2013, 30(2): 26-27.

收稿日期: 2017-07-11

(本文责编: 曹粤锋)