

HPLC 法同时测定枳壳中伞形花内酯等 9 种成分的量

张金莲^{1,2}, 罗雪晴¹, 颜冬梅¹, 朱培林³, 任洪民¹, 刘艳菊^{2*}, 叶柏柏¹, 吴彤彤¹

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065

3. 江西省林业科学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 建立同时测定枳壳中伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素、橙皮油素的 HPLC 方法, 测定和比较不同周长大小枳壳中的 9 种化学成分的量。方法 采用 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(A)-水(用磷酸调 pH 至 3.0); 梯度洗脱为 0~25 min, 30%~50% A; 25~35 min, 50%~70% A; 35~40 min, 70%~75% A; 40~55 min, 75%~100% A。体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 320 nm; 进样量 20 μL。结果 伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素和橙皮油素分别在 0.002 18~0.07 μg ($r=0.999\ 8$)、0.021 8~0.70 μg ($r=0.999\ 9$)、0.242 5~7.76 μg ($r=0.999\ 8$)、0.024 38~0.78 μg ($r=0.999\ 4$)、0.523 76~16.76 μg ($r=0.999\ 3$)、0.004 13~0.132 μg ($r=0.999\ 6$)、0.003 13~0.10 μg ($r=0.999\ 3$)、0.002 75~0.088 μg ($r=0.999\ 6$) 和 0.000 93~0.03 μg ($r=0.999\ 3$) 呈良好的线性关系; 其平均回收率 ($n=6$) 分别为 98.50%、98.80%、99.51%、98.43%、99.64%、99.21%、100.03%、98.75% 和 101.11%。结论 该法简便, 重复性好, 可用于枳壳中伞形花内酯、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮等成分的含量测定。

关键词: 枳壳; 伞形花内酯; 芸香柚皮苷; 新橙皮苷; 川陈皮素; 3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮; 橘红素; 橙皮油素

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)14-3406-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.029

Simultaneous quantitative determination of nine active compounds from *Aurantii Fructus* by HPLC

ZHANG Jin-lian^{1, 2}, LUO Xue-qing¹, YAN Dong-mei¹, ZHU Pei-lin³, REN Hong-min¹, LIU Yan-ju², YE Bai-bai¹, WU Tong-tong¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

3. Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of 7-hydroxycoumarin, narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, nobiletin, 3,5,6,7,8,(3,4)-heptamethoxyflavone, tangeretin, and auraptene from *Aurantii Fructus*, determinate and compare the content of various chemical components from *Aurantii Fructus* with different perimeters. **Methods** The HPLC system consisted of a diamon C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol (A)-water (adjusted pH 3.0 with phosphorous acid). The gradient elution conditions: 0—25 min, 30%—50% A; 25—35 min, 50%—70% A; 35—40 min, 70%—75% A; 40—55 min, 75%—100% A. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 30 °C. The detection wavelength was 320 nm and the injection volume was 20 μL. **Results** The calibration curves of 7-hydroxycoumarin, narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, 3,5,6,7,8,(3,4)-heptamethoxyflavone, nobiletin, tangeretin, and auraptene had good linear relationship in the ranges of 0.002 18—0.07 μg ($r=0.999\ 8$), 0.021 8—0.70 μg ($r=0.999\ 9$), 0.242 5—7.76 μg ($r=0.999\ 8$), 0.024 38—0.78 μg ($r=0.999\ 4$), 0.523 76—16.76 μg ($r=0.999\ 3$), 0.003 13—0.10 μg ($r=0.999\ 3$), 0.004 13—0.132 μg ($r=0.999\ 6$), 0.002 75—0.088 μg ($r=0.999\ 6$), and 0.000 93—0.03 μg ($r=0.999\ 3$); And the average recoveries ($n=6$) of the nine components were 98.50%, 98.80%, 99.51%, 98.43%, 99.64%, 99.21%, 100.03%, 98.75%, and 101.11%, respectively. **Conclusion** This method can be applied to determinating the components from *Aurantii Fructus*, including 7-hydroxycoumarin and 3,5,6,7,8,(3,4)-heptamethoxyflavone, etc.

Key words: *Aurantii Fructus*; 7-hydroxycoumarin; hesperidin; neohesperidin; nobiletin; 3,5,6,7,8,(3,4)-heptamethoxyflavone; tangeretin; auraptene

收稿日期: 2018-01-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81560651); 国家中医药管理局公益性科研专项 (201507002-2); 江西省卫生计生委课题 (2016A011)

作者简介: 张金莲 (1969—), 女, 博士研究生, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药学教学与研究。Tel: (0791)87118995 E-mail: jxjzzl@163.com

*通信作者 刘艳菊, 教授。Tel: (027)68890231 E-mail: lyj1965954@sohu.com

枳壳是经方常用药，也是江西的道地药材，其为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实，具有理气宽中、行滞消胀的作用^[1]。枳壳中的活性成分除了《中国药典》的指标成分柚皮苷和新橙皮苷，还有伞形花内酯、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮等，有文献报道称伞形花内酯具有降压、抗癌、解痉、镇静及抗菌的作用^[2]，且对植物病原真菌有抑制作用^[3]，而 3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮有明显的抑制肿瘤的作用^[4]。然而目前虽已有许多枳壳成分含量测定的研究^[5-10]，但对其所含的伞形花内酯和 3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮的含量测定却未见文献报道。故本研究建立了 HPLC 法同时测定枳壳中伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、橘红素、橙皮苷、川陈皮素、橙皮油素和 3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮 9 个化学成分含量的方法，为揭示枳壳的药效物质基础研究及其药材与饮片的质量评价提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

戴安 U-3000 高效液相色谱仪（赛默飞世尔科技有限公司）；PHS-3E 型精密 pH 计（上海仪电科学仪器股份有限公司）；GZX-9070 MBE 数显鼓风干燥箱（上海博讯实业有限公司医疗设备厂）；DFY-400 型摇摆式高速中药粉碎机（温岭市林大机械有限公司）；HH-6 数显恒温水浴锅（国华电器有限公司）；SQP 型电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；AE240 十万分之一电子天平（美国 Mettler 公司）。

1.2 试药

样品于江西省南城县和武宁县采摘的新鲜枳壳，经江西中医药大学中药资源学科组赖学文教授鉴定为芸香科植物香橙 *Citrus aurantium* L. ‘xiangcheng’及臭橙 *Citrus aurantium* L. ‘choucheng’干燥未成熟果实。样品信息见表 1。伞形花内酯（批号 wkq16072703）、芸香柚皮苷（批号 wkq15122005）、柚皮苷（批号 wkq16051305）、橙皮苷（批号 wkq15123105）、新橙皮苷（批号 wkq16041804）、川陈皮素（批号 wkq16061904）、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮（批号 wkq16013103）、橘红素（批号 wkq16011401）、橙皮油素（批号 wkq16060205）对照品由四川省维克奇生物科技有限公司提供，质量分数均≥98%，水为娃哈哈纯净水（娃哈哈集团有限公司），甲醇（色谱级，西

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples		
编号	品种	产地
1	香橙	江西省南城县
2	香橙	江西省南城县
3	香橙	江西省南城县
4	臭橙	江西省南城县
5	臭橙	江西省南城县
6	臭橙	江西省南城县
7	香橙	江西省武宁县
8	香橙	江西省武宁县
9	香橙	江西省武宁县
10	臭橙	江西省武宁县
11	臭橙	江西省武宁县
12	臭橙	江西省武宁县

陇科学股份有限公司），磷酸（西陇化工股份有限公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，流动相为甲醇 (A)-水 (用磷酸调 pH 至 3.0)；梯度洗脱：0~25 min, 30%~50% A；25~35 min, 50%~70% A；35~40 min, 70%~75% A；40~55 min, 75%~100% A。体积流量为 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 320 nm；进样量 20 μL。色谱图见图 1。

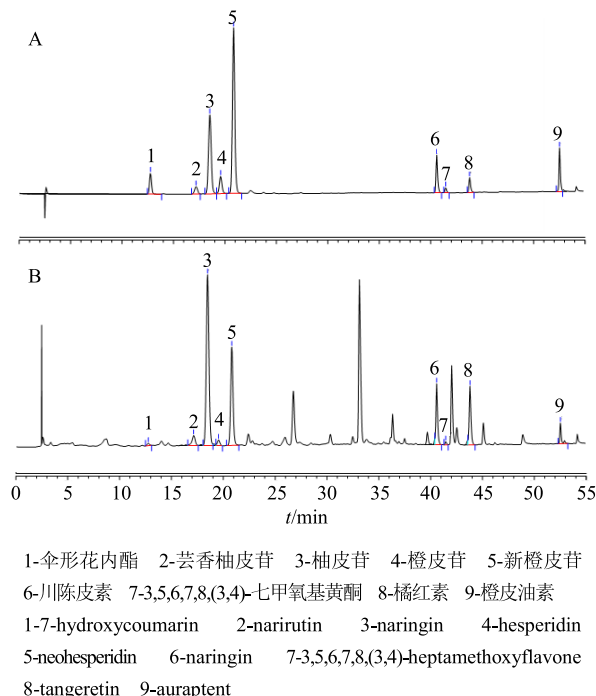


图 1 混合对照品 (A) 与样品 (B) HPLC 图
Fig. 1 HPLC of reference substance (A) and sample (B)

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素和橙皮油素对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为 3.5、35.0、388.0、39.0、838.0、6.6、5.0、4.4、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取枳壳饮片粗粉 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，用甲醇补足缺失的质量，摇匀，滤过。精密量

取续滤液 10 mL，置于 25 mL 量瓶中，用甲醇定容，摇匀，取适量过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。

2.3 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液，分别用甲醇稀释 1、2、4、8、16、32 倍，得到系列质量浓度的混合对照品溶液，进样 20 μL ，进行测定。以对照品的质量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，得伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、橘红素、橙皮苷、川陈皮素、橙皮油素和 3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮的回归方程。其线性范围、回归方程和相关系数结果见表 2。

表 2 线性关系考察结果
Table 2 Results of linear relationship

成分	线性范围/ μg	标准曲线	r
伞形花内酯	0.002 18~ 0.070 00	$Y=816.18 X-0.213 6$	0.999 8
芸香柚皮苷	0.021 80~ 0.700 00	$Y=69.011 X-0.048 4$	0.999 9
柚皮苷	0.242 50~ 7.760 00	$Y=63.287 X-0.355 7$	0.999 8
橙皮苷	0.024 38~ 0.780 00	$Y=64.595 X-0.129 9$	0.999 4
新橙皮苷	0.523 76~ 16.760 00	$Y=77.198 X-0.324$	0.999 3
川陈皮素	0.004 13~ 0.132 00	$Y=1 303.6 X-0.175 7$	0.999 6
3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮	0.003 13~ 0.100 00	$Y=382.16 X-0.024 7$	0.999 3
橘红素	0.002 75~ 0.088 00	$Y=617.47 X-0.033 9$	0.999 6
橙皮油素	0.000 93~ 0.030 00	$Y=1 149 X-0.160 8$	0.999 3

2.4 定量限和检测限

因样品中伞形花内酯、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素和橙皮油素 5 个成分的含量相对较低，故对其检测限和最低定量限进行考察。按“2.1”项下色谱条件，采用对照品溶液稀释，进样测定。结果当信噪比 (S/N) = 3 时，伞形花内酯、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素和橙皮油素的检测限分别为 0.29、0.31、0.37、0.29、0.27 ng；当 $S/N=10$ 时，定量限分别为 0.99、1.08、1.25、0.99、0.87 ng。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次，测定峰面积。伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素和橙皮油素峰面积的 RSD 分别为 2.0%、1.7%、0.6%、0.9%、0.7%、1.1%、1.5%、1.2%、1.9%。说明仪器的精密度良好。

2.6 重复性试验

称取枳壳饮片粗粉 6 份，按“2.2.2”项下方法

制备供试品，按“2.1”项下色谱条件进行测定，结果伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素和橙皮油素质量分数的 RSD 分别为 2.5%、1.1%、1.6%、2.1%、1.5%、1.4%、0.1%、0.2%、0.2%，说明该方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

取枳壳饮片粗粉，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样，按“2.1”项下色谱条件测定峰面积。伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素和橙皮油素峰面积的 RSD 分别为 2.7%、2.5%、1.3%、1.8%、1.5%、2.2%、2.5%、1.9%、2.0%。结果表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已测定含量[伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素、橙皮油素 9 个化合物的质量分

数分别为 0.019%、0.20%、2.44%、0.24%、2.30%、0.12%、0.065%、0.02%、0.024%] 的 1 号枳壳样品共 6 份, 每份约 0.1 g, 精确称量, 分别加入 1 mL 混合对照品溶液[伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素和橙皮油素的质量浓度分别为 0.019、0.20、2.44、0.24、2.30、0.12、0.065、0.02、0.024 mg/mL], 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 测得伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮、橘红素和橙皮油素的平均回收率分别为 98.50%、98.80%、99.51%、98.43%、99.64%、99.21%、100.03%、98.75%、101.11%, 其 RSD 分别为 2.8%、2.5%、1.9%、2.7%、1.7%、2.0%、1.1%、1.3%、2.6%。

2.9 样品的测定

取样品 1~12, 按照“2.2.2”项制备供试品溶

液, 进样, 按照“2.1”项色谱条件分析, 根据表 2 中各成分的线性方程计算 12 批样品中各成分的量, 见表 3。

表 3 含量测定结果显示南城产不同周长枳壳中伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和橘红素的质量分数与果实平均周长呈反比, 香橙中橙皮油素的质量分数同样随周长变大而降低。而分别对各组数据进行显著性检验, 结果显示香橙中除川陈皮素外其他化合物的 3 个样品数据之间均具有显著性 ($P < 0.05$), 臭橙中伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的 3 个样品数据之间亦有显著性 ($P < 0.05$); 以香橙与臭橙各为一组相比得到伞形花内酯、橙皮苷和橙皮油素之间亦具有差异。武宁产枳壳因同一品种之间周长的差异不大, 故未做比较。

表 3 枳壳 9 个活性成分的含量 ($n = 6$)

Table 3 Contents of nine active components from *Aurantii Fructus* ($n = 6$)

编号	果实周 长/cm	质量分数/%								
		伞形花内酯	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	川陈皮素	3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮	橘红素	橙皮油素
1	17.2	0.019	0.20	2.44	0.24	2.30	0.12	0.065	0.02	0.024
2	13.6	0.025*	0.64*	9.28*	0.39*	4.10*	0.11	0.020*	0.22*	0.038*
3	14.4	0.021* [△]	0.38* [△]	3.49* [△]	0.32* [△]	3.07* [△]	0.17*	0.007* [△]	0.04* [△]	0.031* [△]
4	18.6	0.017	0.20	2.99	0.29	2.44	0.08	0.018	0.17	0.015
5	16.6	0.027*	0.39*	6.75*	0.38*	4.10*	0.09	0.021*	0.23*	0.015
6	17.5	0.020* [△]	0.22* [△]	3.50* [△]	0.32* [△]	2.84* [△]	0.08	0.020*	0.18 [△]	0.016
7	17.5	0.022	0.45	5.19	0.44	3.65	0.06	0.010	0.10	0.016
8	17.9	0.021	0.46	5.65	0.41	3.36	0.05	0.080	0.08	0.016
9	17.8	0.023	0.49	6.35	0.37	3.55	0.07	0.010	0.14	0.025
10	14.6	0.022	0.29	7.02	0.39	5.32	0.07	0.020	0.13	0.015
11	14.8	0.021	0.41	10.51	0.49	6.93	0.07	0.030	0.14	0.014
12	14.9	0.020	0.30	8.93	0.45	6.44	0.08	0.030	0.17	0.017

2、3 号样品与 1 号样品, 5、6 号样品与 4 号样品比较: * $P < 0.05$; 3 号样品与 2 号样品, 6 号样品与 5 号样品比较: [△] $P < 0.05$

Compared samples 2, 3 with sample 1, samples 5, 6 with sample 4: * $P < 0.05$; Compared sample 3 with sample 2, sample 6 with sample 5: [△] $P < 0.05$

3 讨论

本实验对甲醇-水 (用磷酸调 pH 至 3.0)、乙腈-水 (用磷酸调 pH 至 3.0) 2 种流动相体系进行了考察, 结果甲醇-水 (用磷酸调 pH 至 3.0) 流动相对样品分离的效果稍好, 且峰形也更好, 因此本实验选用甲醇-水 (用磷酸调 pH 至 3.0) 作为流动相。

本实验采用 HPLC 法测定枳壳中伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、橘红素、橙皮苷、

川陈皮素、橙皮油素和 3,5,6,7,8,(3,4)-七甲氧基黄酮的含量, 方法简便, 重复性好, 可用于快速测定上述 9 种成分的含量, 为枳壳药材的药效物质基础研究和饮片的质量标准提供新的参考依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Liao J N, Pan Y. Determination of umbelliferone in *Dichondra repens* of traditional Zhuang medicine [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2013, 19(5): 149-151.

- [3] 白雪娜, 卜春亚, 谷继成, 等. 伞形花内酯对植物病原真菌的抑制作用 [J]. 植物保护, 2012, 38(2): 42-45.
- [4] 胡燕飞, 王长海. 微波法提取陈皮中 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮及其含量测定 [J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2005(1): 45-49.
- [5] 许姗姗, 许 浚, 张笑敏, 等. 常用中药陈皮、枳实和枳壳的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 35-44.
- [6] 胡源祥, 谭舒舒, 陈海芳, 等. HPLC 法同时测定绿衣枳壳中水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏和葡萄内酯的含量 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(10): 1200-1203.
- [7] 张金莲, 曾昭君, 李志强, 等. HPLC 法测定枳壳不同炮制品中活性成分 [J]. 中成药, 2014, 36(11): 2355-2358.
- [8] 李正红, 夏放高, 陈海芳, 等. 枳壳麸炒前、后主要活性成分的含量变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 18-21.
- [9] 郭增喜, 李文庭, 李兆奎. 不同产地枳壳中柚皮苷和新橙皮苷的测定 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1347-1348.
- [10] 陈海芳, 魏 玲, 袁金斌, 等. RP-HPLC 法测定枳壳中 5 个脂溶性成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1610-1614.