

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)02-0075-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.02.018



高效液相色谱法同时检测枳实及枳壳药材中 12 种黄酮苷类成分*

曾 辉, 黄玉兰[△], 税丕容, 吕 谦

(四川省泸州市市场检验检测中心, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 建立同时检测枳实、枳壳药材中 12 种黄酮苷类成分的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 284 nm(圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷、柚皮素、橙皮素)、330 nm(橙皮内酯、川陈皮素、橘红素), 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL。结果 上述成分质量浓度分别在 0.19~46.61 μg/mL、0.17~43.27 μg/mL、0.20~51.07 μg/mL、11.34~756.01 μg/mL、0.41~101.28 μg/mL、20.58~1 028.79 μg/mL、0.20~50.49 μg/mL、0.10~25.25 μg/mL、0.10~26.63 μg/mL、0.24~11.96 μg/mL、0.21~52.64 μg/mL、0.55~27.51 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好; 检测限均不大于 0.10 μg/mL, 定量限均不大于 0.41 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率为 92.90%~114.33%, RSD 为 0.30%~1.98% (n=9)。结论 所建立的方法简便、可靠, 可用于同时检测枳实、枳壳药材中 12 种黄酮苷类成分。

关键词: 高效液相色谱法; 枳实; 枳壳; 黄酮苷; 含量测定

Simultaneous Detection of 12 Flavonoid Glycosides in Aurantii Fructus Immaturus and Aurantii Fructus by HPLC

ZENG Hui, HUANG Yulan, SHUI Pirong, LYU Qian

(Luzhou Market Inspection and Testing Center, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography method for simultaneous detection of 12 flavonoid glycosides in Aurantii Fructus Immaturus and Aurantii Fructus. **Methods** The chromatographic column was Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 284 nm (eriocitrin, neoeriocitrin, narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, poncirin, naringenin, hesperetin), 330 nm (meranzin, nobiletin, tangeretin), the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of the above components were 0.19-46.61 μg/mL, 0.17-43.27 μg/mL, 0.20-51.07 μg/mL, 11.34-756.01 μg/mL, 0.41-101.28 μg/mL, 20.58-1 028.79 μg/mL, 0.20-50.49 μg/mL, 0.10-25.25 μg/mL, 0.10-26.63 μg/mL, 0.24-11.96 μg/mL, 0.21-52.64 μg/mL, 0.55-27.51 μg/mL, respectively. The limit of detection (LOD) was not greater than 0.10 μg/mL, and the limit of quantification (LOQ) was not greater than 0.41 μg/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of above components were in the range of 92.90% to 114.33%, with the RSDs of 0.30% to 1.98% (n=9). **Conclusion** The established method is simple and reliable, which can be used for the simultaneous detection of 12 flavonoid glycosides in Aurantii Fructus Immaturus and Aurantii Fructus.

Key words: HPLC; Aurantii Fructus Immaturus; Aurantii Fructus; flavonoid glycoside; content determination

中药枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果, 具有破气消积、化痰散痞之效, 用于积滞内停、痞满胀痛、泻痢后重、大便不通、痰滞气阻、胸痹、结胸、脏器下垂等证的治疗; 中药枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实, 具有理气宽中、行滞消胀之效, 用于胸胁气滞、胀满疼痛、食积不化、痰饮内停、脏器下垂等证的治疗^[1]。枳实、枳壳药材主要含黄酮苷类^[2]、生物碱类^[3]、挥发油类^[2,4]、香豆素

类^[2,5]、柠檬苦素类^[2]等成分, 且含多种微量元素^[6]、酚酸类化合物及β-谷甾醇^[7]等。黄酮苷类活性成分对心脑血管缺血损伤、肝损伤、心律失常有改善作用, 还具有镇痛、抗自由基和抗肿瘤等作用^[8-12]。目前, 大量文献对枳实、枳壳药材所含活性成分种类、分离提取工艺和定性定量检测等方面进行了报道^[13-16]。但现有测定方法均较复杂, 本研究中建立了高效液相色谱(HPLC)法同时检测枳实、枳壳药材中 12 种黄酮苷类成分含量, 旨在简化检测方法, 提高操作效率, 为 2 种药材的深入开发与

*基金项目: 四川省药品监督管理局科技计划项目[2021007]。

第一作者: 曾辉, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药品质量控制与评价, (电子信箱)704127476@qq.com。

[△]通信作者: 黄玉兰, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品质量控制与评价, (电子信箱)329601883@qq.com。

利用提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2030C 3D Plus 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技 < 中国 > 有限公司);XS205 型电子分析天平(德国 Mettler Toledo 公司,精度为 0.01 mg);MJ-300 型超声清洗器(无锡市美极超声设备有限公司);ULUP-TEZ 型超纯水仪(四川优普超纯科技有限公司)。

1.2 试药

橙皮苷对照品(批号为 110721-202220,含量 97.2%),新橙皮苷对照品(批号为 111857-201804,含量 99.4%),川陈皮素(批号为 112055-202102,含量 99.7%),均购自中国食品药品检定研究院;枸橼苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为 M25HB179212,含量 99.2%);圣草次苷对照品(批号为 PCS-220714,含量 98.13%),新北美圣草苷对照品(批号为 22051001,含量 98.33%),芸香柚皮苷对照品(批号为 PCS-210309,含量 98.60%),柚皮苷对照品(批号为 PCS-210913,含量 98.89%),柚皮素对照品(批号为 PCS-210224,含量 99.21%),橙皮素对照品(批号为 PCS-200811,含量 98.45%),橙皮内酯对照品(批号为 PCS-220718,含量 98.05%),橘红素对照品(批号为 PCS-210123,含量 98.78%),均购自北京中科质检生物有限公司;乙腈为色谱纯,甲酸、甲醇均为分析纯,水为纯化水。枳实药材样品 27 批、枳壳药材样品 15 批,均经四川省食品药品检验检测院黎跃成主任药师鉴定为芸香科植物酸橙及其栽培变种的幼果或未成熟果实。药材信息见表 1(S 为枳实、Q 为枳壳,以 S27 及 Q15 为对照药材;中检院即中国食品药品检定研究院)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1% 甲酸水溶液-乙腈,梯度洗脱(0~25 min 时 18%B, 25~65 min 时 62%B, 65~81 min 时 18%B);流速:1.0 mL/min;检测波长:284 nm(圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷、柚皮素、橙皮素)、330 nm(橙皮内酯、川陈皮素、橘红素);柱温:35 °C;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:依次取 12 种对照品(按 2.1 项中顺序)9.50, 8.80, 10.36, 15.29, 10.42, 10.35, 10.18, 5.09, 5.41, 4.88, 10.56, 5.57 mg, 置 10 mL 容量瓶中,加甲醇制成单一对照品溶液。各取适量,置同一 20 mL 容量瓶中,加甲醇定容,即得混合对照品溶液。

表 1 药材样品信息

Tab. 1 Information of medicinal samples

| 编号 | 采收期 | 产地 | 编号 | 采收期 | 产地 |
|-----|-------|------|-----|-------|------|
| S1 | 2020年 | 泸州王湾 | S22 | 2022年 | 内江洛丰 |
| S2 | 2020年 | 泸州王湾 | S23 | 2022年 | 江津沿河 |
| S3 | 2020年 | 泸州王湾 | S24 | 2022年 | 江津沿河 |
| S4 | 2021年 | 泸州王湾 | S25 | 2022年 | 江津沿河 |
| S5 | 2021年 | 泸州王湾 | S26 | 2022年 | 江西 |
| S6 | 2021年 | 泸州王湾 | S27 | 2022年 | 中检院 |
| S7 | 2021年 | 泸州王湾 | Q1 | 2021年 | 泸州王湾 |
| S8 | 2021年 | 泸州王湾 | Q2 | 2021年 | 泸州王湾 |
| S9 | 2021年 | 泸州王湾 | Q3 | 2021年 | 泸州王湾 |
| S10 | 2021年 | 泸州王湾 | Q4 | 2021年 | 泸州王湾 |
| S11 | 2021年 | 泸州王湾 | Q5 | 2021年 | 泸州王湾 |
| S12 | 2021年 | 泸州王湾 | Q6 | 2021年 | 泸州王湾 |
| S13 | 2021年 | 泸州王湾 | Q7 | 2022年 | 泸州王湾 |
| S14 | 2021年 | 泸州王湾 | Q8 | 2022年 | 泸州王湾 |
| S15 | 2021年 | 泸州王湾 | Q9 | 2022年 | 泸州王湾 |
| S16 | 2021年 | 泸州王湾 | Q10 | 2022年 | 资阳建松 |
| S17 | 2022年 | 资阳建松 | Q11 | 2022年 | 江津沿河 |
| S18 | 2022年 | 资阳建松 | Q12 | 2022年 | 江津沿河 |
| S19 | 2022年 | 资阳建松 | Q13 | 2022年 | 江津沿河 |
| S20 | 2022年 | 内江洛丰 | Q14 | 2022年 | 江西 |
| S21 | 2022年 | 内江洛丰 | Q15 | 2022年 | 中检院 |

供试品溶液:取枳实药材样品粉末 0.05 g 和枳壳药材样品粉末 0.1 g(均过 4 号筛),精密称定,置 20 mL 容量瓶中,加甲醇适量,室温下超声(功率 600 W、频率 50 kHz)处理 30 min,用甲醇定容,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得枳实及枳壳药材样品溶液,分别记为供试品溶液 I、II。

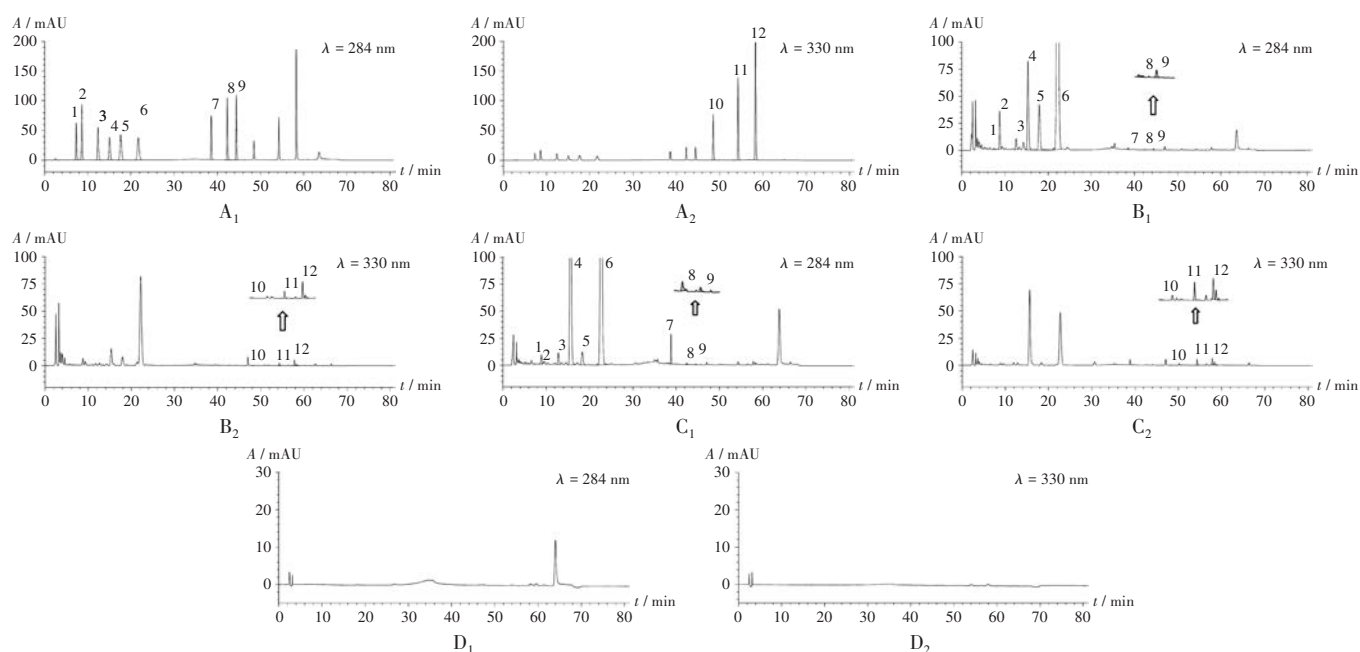
阴性对照品溶液:以甲醇作为阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性与专属性试验:取 2.2 项下混合对照品溶液,供试品溶液(I、II),阴性对照品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数按柚皮苷峰计应不低于 3 000;分离度均大于 1.5,基线分离良好;阴性对照无干扰,表明专属性良好。详见图 1。

线性关系考察:分别精密量取 2.2 项下单一对照品溶液适量,倍比稀释,制成系列对照品溶液。精密量取 10 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程。结果见表 2。

检测限与定量限考察:分别精密量取 2.2 项下单一对照品溶液适量,倍比稀释,并按 2.1 项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为 3:1、10:1 时的质量浓度分别作为检测限、定量限。结果见表 2。



1. 圣草次苷 2. 新北美圣草苷 3. 芸香柚皮苷 4. 柚皮苷 5. 橙皮苷 6. 新橙皮苷 7. 枸橼苷 8. 柚皮素 9. 橙皮素
10. 橙皮内酯 11. 川陈皮素 12. 橘红素
A₁, A₂. 混合对照品溶液 B₁, B₂. 供试品溶液 I C₁, C₂. 供试品溶液 II D₁, D₂. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Eriocitrin 2. Neoeriocitrin 3. Narirutin 4. Naringin 5. Hesperidin 6. Neohesperidin 7. Poncirin 8. Naringenin 9. Hesperetin 10. Meranzin
11. Nobiletin 12. Tangeretin
A₁, A₂. Mixed reference solution B₁, B₂. Test solution I C₁, C₂. Test solution II D₁, D₂. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表2 线性关系及检测限、定量限考察结果

Tab. 2 Results of the linear relation test, LOD and LOQ investigation

| 待测成分 | 回归方程 | r | 线性范围 ($\mu\text{g/mL}$) | 检测限 ($\mu\text{g/mL}$) | 定量限 ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------|--|---------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 圣草次苷 | $Y_1 = 18\,596.5X_1 + 146.385$ | 0.99971 | 0.19~46.61 | 0.04 | 0.17 |
| 新北美圣草苷 | $Y_2 = 18\,877.7X_2 + 143.114$ | 0.99967 | 0.17~43.27 | 0.04 | 0.17 |
| 芸香柚皮苷 | $Y_3 = 15\,698.2X_3 + 1\,687.55$ | 0.99972 | 0.20~51.07 | 0.06 | 0.20 |
| 柚皮苷 | $Y_4 = 16\,456.8X_4 - 6\,948.44$ | 0.99965 | 11.34~756.01 | 0.09 | 0.21 |
| 橙皮苷 | $Y_5 = 18\,373.8X_5 + 3\,500.41$ | 0.99970 | 0.41~101.28 | 0.08 | 0.41 |
| 新橙皮苷 | $Y_6 = 18\,611.3X_6 + 59\,027.8$ | 0.99991 | 20.58~1\,028.79 | 0.05 | 0.11 |
| 枸橼苷 | $Y_7 = 16\,577.1X_7 + 2\,813.28$ | 0.99972 | 0.20~50.49 | 0.03 | 0.15 |
| 柚皮素 | $Y_8 = 36\,669.8X_8 + 2\,006.56$ | 0.99967 | 0.10~25.25 | 0.01 | 0.10 |
| 橙皮素 | $Y_9 = 38\,167.0X_9 + 2\,303.21$ | 0.99969 | 0.10~26.63 | 0.01 | 0.03 |
| 橙皮内酯 | $Y_{10} = 27\,852.5X_{10} - 878.305$ | 0.99955 | 0.24~11.96 | 0.05 | 0.07 |
| 川陈皮素 | $Y_{11} = 40\,129.2X_{11} + 13\,505.7$ | 0.99965 | 0.21~52.64 | 0.03 | 0.21 |
| 橘红素 | $Y_{12} = 39\,216.7X_{12} + 122.396$ | 0.99964 | 0.55~27.51 | 0.10 | 0.13 |

精密度试验:取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果药材样品中12种成分峰面积的RSD,枳实依次为0.68%,0.69%,1.03%,1.22%,1.38%,0.60%,0.30%,0.32%,0.22%,0.16%,0.29%,0.18%(n=6),枳壳依次为0.68%,0.69%,1.03%,1.22%,1.38%,0.60%,0.30%,0.32%,0.22%,0.16%,0.29%,0.18%(n=6),表明

仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0,4,8,12,16,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果药材样品中12种成分峰面积的RSD,枳实依次为1.10%,1.40%,0.31%,1.96%,1.52%,1.43%,0.74%,0.83%,0.92%,1.01%,1.74%,0.59%(n=6),枳壳依次为1.57%,0.96%,0.24%,0.26%,0.50%,0.34%,1.17%,1.23%,1.30%,1.38%,0.34%,1.69%(n=6),表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:分别称取枳实、枳壳药材样品适量,各6份,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果药材样品中12种成分峰面积的RSD,枳实依次为0.95%,1.68%,1.99%,0.98%,0.40%,0.23%,1.59%,1.62%,1.76%,1.81%,1.40%,1.25%(n=6),枳壳依次为1.04%,0.96%,0.83%,0.77%,1.27%,0.70%,1.39%,1.61%,0.16%,1.78%,1.58%,0.78%(n=6),表明方法重复性良好。

重现性试验:分别取枳实、枳壳药材样品适量,各6份,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,在不同实验室内以不同仪器,按2.1项下色谱条件进样测定,记

录峰面积。结果药材样品中12种成分峰面积2次结果的比值,枳实依次为100.20%,100.21%,101.04%,100.20%,100.20%,100.20%,100.21%,100.22%,100.22%,100.22%,100.20%(n=6),枳壳依次为99.79%,100.13%,99.93%,99.83%,100.01%,99.70%,99.64%,99.89%,99.83%,100.12%,99.38%,99.49%(n=6),表明方法重现性良好。

加样回收试验:取已知含量的枳实、枳壳药材样品适量,各9份,分别加入一定质量浓度的对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收试验结果(% , n = 9)

Tab. 3 Results of the recovery test (% , n = 9)

| 待测成分 | 枳实 | | 枳壳 | | 待测成分 | 枳实 | | 枳壳 | |
|--------|-----------|------|-----------|------|------|-----------|------|-----------|------|
| | \bar{X} | RSD | \bar{X} | RSD | | \bar{X} | RSD | \bar{X} | RSD |
| 圣草次苷 | 100.83 | 1.01 | 102.96 | 1.18 | 枸橼苷 | 104.24 | 0.54 | 102.41 | 0.65 |
| 新北美圣草苷 | 98.18 | 1.37 | 95.67 | 1.98 | 柚皮素 | 101.56 | 0.47 | 101.05 | 0.54 |
| 芸香柚皮苷 | 98.83 | 1.85 | 93.39 | 0.74 | 橙皮素 | 100.45 | 0.46 | 100.63 | 0.58 |
| 柚皮苷 | 96.52 | 0.85 | 99.92 | 1.28 | 橙皮内酯 | 97.09 | 0.30 | 94.30 | 0.68 |
| 橙皮苷 | 100.19 | 1.57 | 92.90 | 1.46 | 川陈皮素 | 99.26 | 0.37 | 97.85 | 0.35 |
| 新橙皮苷 | 103.18 | 0.88 | 114.33 | 0.50 | 橘红素 | 100.92 | 0.44 | 97.75 | 0.32 |

2.4 样品含量测定

取42批药材样品各适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积,并计算药材样品含量,结果见表4。

表4 药材样品含量测定结果(mg / g , n = 3)

Tab. 4 Results of content determination of 12 flavonoid glycosides in medicinal samples (mg / g , n = 3)

| 编号 | 圣草次苷 | 新北美圣草苷 | 芸香柚皮苷 | 柚皮苷 | 橙皮苷 | 新橙皮苷 | 枸橼苷 | 柚皮素 | 橙皮素 | 橙皮内酯 | 川陈皮素 | 橘红素 |
|-----|------|--------|-------|--------|-------|--------|------|------|------|------|------|------|
| S1 | 0.19 | 5.69 | 3.83 | 71.94 | 11.53 | 203.53 | 0.97 | 0.21 | 0.30 | 0.02 | 0.60 | 0.29 |
| S2 | 0.19 | 6.19 | 4.19 | 98.40 | 10.36 | 201.26 | 1.23 | 0.28 | 0.24 | 0.01 | 0.63 | 0.29 |
| S3 | 0.20 | 6.20 | 3.89 | 83.96 | 10.93 | 209.17 | 1.01 | 0.24 | 0.31 | 0.01 | 0.78 | 0.34 |
| S4 | 0.18 | 9.59 | 3.05 | 110.96 | 8.22 | 246.43 | 2.10 | 0.37 | 0.33 | 0.02 | 0.55 | 0.19 |
| S5 | 0.17 | 2.44 | 2.81 | 83.50 | 4.36 | 98.30 | 2.40 | 0.21 | 0.17 | 0.01 | 0.27 | 0.13 |
| S6 | 0.25 | 4.49 | 3.89 | 133.15 | 6.98 | 177.13 | 2.69 | 0.47 | 0.29 | 0.02 | 0.52 | 0.19 |
| S7 | 0.27 | 6.10 | 3.14 | 129.48 | 6.87 | 239.75 | 2.61 | 0.59 | 0.42 | 0.01 | 0.45 | 0.15 |
| S8 | 0.18 | 2.61 | 2.83 | 95.19 | 3.91 | 89.37 | 1.71 | 0.23 | 0.13 | 0.01 | 0.25 | 0.22 |
| S9 | 0.10 | 2.59 | 3.01 | 114.18 | 4.46 | 114.14 | 2.43 | 0.20 | 0.10 | 0.13 | 0.51 | 0.23 |
| S10 | 0.08 | 2.59 | 2.94 | 98.79 | 4.09 | 92.70 | 2.42 | 0.04 | 0.04 | 0.27 | 0.37 | 0.16 |
| S11 | 0.27 | 5.56 | 3.55 | 138.04 | 7.20 | 222.42 | 2.46 | 0.47 | 0.35 | 0.01 | 0.48 | 0.18 |
| S12 | 0.16 | 8.86 | 2.20 | 109.28 | 6.82 | 276.63 | 2.40 | 0.49 | 0.43 | 0.01 | 0.46 | 0.14 |
| S13 | 0.31 | 3.08 | 3.65 | 134.76 | 5.71 | 157.22 | 2.45 | 0.44 | 0.29 | 0.01 | 0.44 | 0.23 |
| S14 | 0.23 | 4.42 | 3.89 | 133.99 | 5.92 | 143.72 | 2.41 | 0.36 | 0.21 | 0.02 | 0.46 | 0.21 |
| S15 | 0.25 | 2.75 | 3.63 | 124.65 | 4.63 | 109.78 | 2.21 | 0.31 | 0.18 | 0.01 | 0.33 | 0.15 |
| S16 | 0.13 | 7.40 | 2.29 | 73.55 | 8.92 | 337.42 | 1.05 | 0.31 | 0.71 | 0.02 | 0.35 | 0.36 |
| S17 | 0.32 | 10.00 | 3.61 | 50.94 | 18.00 | 291.43 | 0.71 | 0.26 | 0.56 | 0.10 | 3.13 | 3.37 |
| S18 | 0.20 | 3.17 | 3.29 | 102.94 | 6.91 | 165.73 | 1.45 | 0.49 | 0.40 | 0.00 | 1.18 | 0.76 |
| S19 | 0.30 | 7.70 | 3.63 | 72.09 | 13.36 | 202.53 | 0.64 | 0.26 | 0.27 | 0.00 | 1.23 | 0.68 |
| S20 | 0.27 | 9.00 | 3.29 | 56.26 | 15.28 | 331.89 | 0.40 | 0.26 | 0.67 | 0.00 | 1.45 | 0.77 |
| S21 | 0.20 | 7.31 | 3.68 | 84.79 | 12.06 | 269.67 | 0.96 | 0.38 | 0.52 | 0.00 | 0.53 | 0.50 |
| S22 | 0.17 | 3.45 | 3.76 | 96.20 | 8.20 | 161.97 | 1.30 | 0.32 | 0.20 | 0.00 | 0.47 | 0.30 |
| S23 | 0.21 | 6.30 | 3.59 | 80.72 | 12.26 | 241.03 | 1.23 | 0.38 | 0.53 | 0.00 | 0.54 | 0.30 |
| S24 | 0.16 | 3.55 | 3.45 | 105.29 | 7.07 | 162.07 | 1.71 | 0.28 | 0.20 | 0.00 | 0.43 | 0.25 |
| S25 | 0.17 | 1.84 | 3.25 | 98.39 | 5.29 | 110.25 | 1.72 | 0.22 | 0.11 | 0.00 | 0.34 | 0.21 |
| S26 | 1.14 | 5.79 | 6.88 | 120.68 | 8.49 | 131.77 | 3.55 | 0.50 | 0.23 | 0.05 | 0.85 | 0.76 |
| S27 | 1.44 | 7.76 | 7.39 | 102.55 | 12.72 | 98.10 | 3.29 | 1.34 | 0.62 | 0.38 | 0.85 | 0.72 |
| Q1 | 0.06 | 1.30 | 2.00 | 71.02 | 2.29 | 55.12 | 2.06 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.31 | 0.16 |
| Q2 | 0.05 | 1.16 | 1.56 | 46.86 | 1.88 | 39.00 | 1.31 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.23 | 0.12 |
| Q3 | 0.04 | 2.08 | 2.05 | 86.30 | 2.73 | 74.76 | 2.75 | 0.02 | 0.02 | 0.25 | 0.38 | 0.16 |
| Q4 | 0.03 | 1.56 | 1.96 | 70.64 | 2.14 | 52.46 | 2.00 | 0.08 | 0.07 | 0.17 | 0.31 | 0.15 |

续表4 药材样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Continued Tab. 4 Results of content determination of 12 flavonoid glycosides in medicinal samples (mg/g, n=3)

| 编号 | 圣草次苷 | 新北美圣草苷 | 芸香柚皮苷 | 柚皮苷 | 橙皮苷 | 新橙皮苷 | 枸橼苷 | 柚皮素 | 橙皮素 | 橙皮内酯 | 川陈皮素 | 橘红素 |
|-----|------|--------|-------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|------|
| Q5 | 0.04 | 1.55 | 2.03 | 67.08 | 2.34 | 52.36 | 1.91 | 0.02 | 0.03 | 0.31 | 0.41 | 0.19 |
| Q6 | 0.30 | 6.89 | 0.41 | 43.89 | 1.04 | 47.55 | 1.28 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.51 | 0.17 |
| Q7 | 0.12 | 0.93 | 1.28 | 37.62 | 1.59 | 34.38 | 0.97 | 0.06 | 0.04 | 0.02 | 0.66 | 0.44 |
| Q8 | 0.08 | 0.98 | 1.25 | 41.64 | 1.48 | 36.54 | 1.08 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.55 | 0.41 |
| Q9 | 0.09 | 1.01 | 1.38 | 48.97 | 1.70 | 43.23 | 1.59 | 0.04 | 0.03 | 0.08 | 0.75 | 0.45 |
| Q10 | 0.12 | 1.34 | 1.31 | 44.98 | 2.54 | 65.99 | 1.46 | 0.08 | 0.08 | 0.00 | 0.63 | 0.32 |
| Q11 | 0.10 | 1.18 | 1.62 | 52.52 | 2.12 | 52.88 | 1.84 | 0.06 | 0.04 | 0.04 | 0.21 | 0.13 |
| Q12 | 0.15 | 1.21 | 1.64 | 51.98 | 2.06 | 49.50 | 1.88 | 0.08 | 0.05 | 0.04 | 0.26 | 0.21 |
| Q13 | 0.09 | 0.87 | 1.23 | 40.40 | 1.72 | 39.91 | 1.52 | 0.05 | 0.04 | 0.03 | 0.19 | 0.12 |
| Q14 | 0.31 | 1.22 | 4.35 | 72.97 | 1.87 | 31.24 | 3.31 | 0.18 | 0.04 | 0.12 | 0.43 | 0.39 |
| Q15 | 0.36 | 1.62 | 2.40 | 38.78 | 1.61 | 26.52 | 2.22 | 0.07 | 0.04 | 0.10 | 0.58 | 0.48 |

3 讨论

预试验中,比较了不同品牌的色谱柱,最终选择分离效果较好的Agilent Zorbax SB-C₁₈柱;选择流动相时比较了甲醇、乙腈分别与甲酸、磷酸组合,结果乙腈洗脱效果较好、甲酸的pH更适合;洗脱方法比较了匀速梯度和等度,前者减少了梯度段,方法简便、稳定;进行紫外吸收光谱扫描时,分取2个测定点,除橙皮内酯、川陈皮素和橘红素选取330 nm外其余成分均选用284 nm为吸收波长。

对比粉碎至不同粗细程度的枳实、枳壳药材发现,药材样品越细提取越完全,但越细粉碎越困难,综合条件后选取过4号筛的粉末。观察了提取溶剂甲醇、乙醇、乙酸乙酯及提取溶剂的体积分数,考虑到要尽可能提取完12种黄酮苷类成分,选取了纯甲醇作提取溶剂;对比超声与回流提取方式及提取时间15, 30, 45, 60 min,发现超声30 min时,方法简便且基本能提取完全;对比超声时的温度(低于室温、室温、高于室温及60℃)的提取效果,发现室温的提取效率高且适用于高温易分解的成分。预试验中还发现,样品中加入50 mL甲醇可保证提取效率,采用适当的方法浓缩供试品溶液可保证含量较少的成分能被定量测定。

由药材样品含量测定结果可见,整体上枳实药材中各成分含量高于枳壳药材;枳实、枳壳药材中含量较多的成分为柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷,然后为川陈皮素、芸香柚皮苷、新北美圣草苷和枸橼苷;且药材样品中可能无橙皮内酯,橘红素的含量可能低于定量限,但能被检出;个别药材样品中圣草次苷含量可能低于定量限,但具有偶然性。

综上所述,所建立的方法简便、可靠,可用于同时检测枳实、枳壳药材中12种黄酮苷类成分。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:

中国医药科技出版社, 2020: 257-258.

- [2] 曾鸿莲. 枳实和枳壳中活性化合物的富集检测与PAMPA快速筛选研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [3] 吕小刚. 高生物碱含量酸橙种质资源筛选及其候选基因挖掘[D]. 汉中: 陕西理工大学, 2023.
- [4] 杨思雨, 史汶龙, 路平, 等. 枳实化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药, 2023, 45(7): 2292-2299.
- [5] 岳超, 赵维良, 郭增喜, 等. 高效液相色谱法同时测定不同来源柑橘类果实中10种黄酮类化合物和香豆素类化合物[J]. 理化检验: 化学分册, 2021, 57(1): 52-56.
- [6] 高萌. 中药枳壳“道地性”研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2022.
- [7] 陈明瑞. 基于网络药理学研究枳实薤白桂枝汤组方对治疗冠心病的作用机制[D]. 济宁: 济宁医学院, 2023.
- [8] 张瑛煜, 申光焯, 崔琳琳, 等. 黄酮类化合物结构修饰及抗肿瘤活性研究进展[J]. 化学通报, 2023, 86(12): 1467-1474.
- [9] 高喜梅, 池玉梅, 张雯, 等. 指纹图谱结合一测多评法评价酸橙枳实质量的研究[J]. 中草药, 2020, 51(9): 2548-2556.
- [10] 金芳多. 黄酮类化合物对肝细胞氧化损伤的保护作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2022, 43(3): 222-225.
- [11] 白鹭, 李鸿, 覃琴, 等. 黄酮类化合物对血管内皮细胞损伤的保护作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12): 203-211.
- [12] 冯柏林, 覃琴, 白鹭, 等. 黄酮类化合物通过炎症途径对心肌细胞的保护作用及机制的研究进展[J]. 环球中医药, 2022, 15(2): 349-356.
- [13] 陈鑫, 陈玉宇. 枳实药材的色谱-质谱联用指纹图谱[J]. 广州化工, 2020, 48(17): 57-61.
- [14] 何英杰. 湘枳壳有效成分指纹图谱构建及活性分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.
- [15] 王章伟, 王振, 邱小燕, 等. HPLC法同时测定枳实总黄酮提取物中3个香豆素类成分含量[J]. 江西中医药, 2018, 49(11): 55-58.
- [16] 施学骏. 酸橙果实不同采收期化学成分动态变化及枳实、枳壳药材质量评价研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

(收稿日期: 2023-02-22; 修回日期: 2023-08-23)