

HPLC法同时测定不同采集地衢枳壳中12种黄酮类成分的含量[△]

冯敬骞^{1*}, 胡卫南², 徐礼萍², 李姜言³, 王思为⁴, 宋剑锋²(1.衢州职业技术学院医学院, 浙江衢州 324000; 2.衢州市食品药品检验研究院, 浙江衢州 324002; 3.衢州市中医医院药学部, 浙江衢州 324022; 4.衢州市人民医院药学部, 浙江衢州 324000)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)05-0571-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.05.13

摘要 目的:建立同时测定衢枳壳中12种黄酮类成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Extend C₁₈, 流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为35℃,检测波长为330 nm,进样量为10 μL。测定不同采集地的10批衢枳壳样品中12种黄酮类成分(圣草次苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、木犀草素、橙皮内酯、川陈皮素、桔皮素、橙皮油内酯)的含量。结果:圣草次苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、木犀草素、橙皮内酯、川陈皮素、桔皮素、橙皮油内酯检测的质量浓度线性范围分别为1.65~16.51、4.50~45.02、35.41~354.12、4.11~41.12、2.29~22.86、34.96~349.56、1.42~14.15、1.50~15.04、1.83~18.28、1.51~15.08、1.61~16.12、1.28~12.84 μg/mL(*r*均大于0.999 7);检测限分别为0.165 1、0.450 2、3.541 2、0.411 2、0.228 6、3.495 6、0.141 5、0.150 4、0.182 8、0.150 8、0.161 2、0.128 4 μg/mL;定量限分别为0.547 8、1.487 4、11.663 3、1.360 3、0.758 3、11.594 9、0.466 3、0.497 1、0.601 2、0.499 9、0.532 3、0.424 6 μg/mL;精密度(*n*=6)、重复性(*n*=6)、稳定性(24 h, *n*=7)试验的RSD均小于3%;平均加样回收率分别为99.50%、99.61%、98.18%、98.85%、98.48%、98.50%、98.25%、99.91%、103.13%、98.82%、98.44%、100.29%(RSD=1.49%~2.38%, *n*=6)。10批不同采集地衢枳壳样品中,上述12个成分的含量分别为1.995 5~2.648 8、4.317 7~5.005 1、33.215 5~34.054 6、3.140 4~3.471 5、3.221 2~3.748 8、42.746 6~44.026 6、0.202 7~0.239 4、0.191 2~0.208 8、0.080 3~0.097 9、0.291 9~0.307 1、0.119 9~0.149 1、0.082 7~0.089 8 mg/g。结论:建立的含量测定方法准确、可靠、简便、高效,可用于同时测定衢枳壳中12个黄酮类成分的含量,并为衢枳壳质量控制标准的建立提供了参考依据。

关键词 衢枳壳;黄酮类成分;柚皮苷;新橙皮苷;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of the Contents of 12 Flavonoids in Quzhiqiao from Different Collection Places by HPLC

FENG Jingqian¹, HU Weinan², XU Liping², LI Jiangyan³, WANG Siwei⁴, SONG Jianfeng²(1.School of Medicine, Quzhou College of Technology, Zhejiang Quzhou 324000, China; 2.Quzhou Institute for Food and Drug Control, Zhejiang Quzhou 324002, China; 3.Dept. of Pharmacy, Quzhou Hospital of TCM, Zhejiang Quzhou 324022, China; 4.Dept. of Pharmacy, Quzhou Municipal People's Hospital, Zhejiang Quzhou 324000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of the contents of 12 flavonoids in Quzhiqiao. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Extend C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 35 °C. The detection wavelength was set at 330 nm, and sample size was 10 μL. The contents of 12 components (such as eriocitrin, narirutin, naringin, naringenin, hesperidin, neohesperidin, hesperide hydrate, luteolin, hesperide, nobiletin, hesperetin and hesperidolactone) in 10 batches of Quzhiqiao from different collection places were determined. RESULTS: The linear range of eriocitrin, narirutin, naringin, naringenin, hesperidin, neohesperidin, hesperide hydrate, luteolin, hesperide, nobiletin, hesperetin and hesperidolactone were 1.65-16.51, 4.50-45.02, 35.41-354.12, 4.11-41.12, 2.29-22.86, 34.96-349.56, 1.42-14.15, 1.50-15.04, 1.83-18.28, 1.51-15.08, 1.61-16.12, 1.28-12.84 μg/mL, respectively (all *r*>0.999 7). The detection limits were 0.165 1, 0.450 2, 3.541 2, 0.411 2, 0.228 6, 3.495 6, 0.141 5, 0.150 4, 0.182 8, 0.150 8, 0.161 2, 0.128 4 μg/mL, respectively. The limits of quantitation were 0.547 8, 1.487 4, 11.663 3, 1.360 3, 0.758 3, 11.594 9, 0.466 3, 0.497 1, 0.601 2, 0.499 9, 0.532 3, 0.424 6 μg/mL, respectively. RSDs of precision (*n*=6), reproducibility (*n*=6) and stability (24 h, *n*=7) tests were all lower than 3%. The average recoveries were 99.50%, 99.61%, 98.18%, 98.85%, 98.48%, 98.50%, 98.25%, 99.91%, 103.13%, 98.82%, 98.44%, 100.29% (RSD=1.49%~2.38%, *n*=6). The contents of the above 12 components in 10 batches of samples from different collection places were 1.995 5-2.648 8, 4.317 7-5.005 1, 33.215 5-34.054 6, 3.140 4-3.471 5, 3.221 2-3.748 8, 42.746 6-44.026 6, 0.202 7-0.239 4, 0.191 2-0.208 8, 0.080 3-0.097 9, 0.291 9-0.307 1, 0.119 9-0.149 1, 0.082 7-0.089 8 mg/g.

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81903873);浙江省食品药品监管系统科技计划项目(No.2014006);浙江省衢州市科技计划项目(No.2014Y021)

*讲师,硕士。研究方向:中药药效物质基础与质量控制。
E-mail: fengjingqian@126.com

0.097 9, 0.291 9-0.307 1, 0.119 9-0.149 1, 0.082 7-0.089 8 mg/g. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable, simple and efficient, which can be used to simultaneous determination of the contents of 12 flavonoids in Quzhiqiao, and to provide reference for the establishment of quality control standards of Quzhiqiao.

KEYWORDS Quzhiqiao; Flavonoids; Naringin; Neohesperidin; Content determination; HPLC

衢枳壳俗称“胡柚片”,为芸香科植物常山胡柚(*Citrus changshan-huyou* Y.B.Chang)的未成熟果实,主产于浙江衢州,一般于每年的6-7月采收。常山胡柚的未成熟果实作为药用在浙江有很长的历史,已于2015年作为地方习用药材收入了《浙江省中药炮制规范》(2015年版)中,命名为“衢枳壳”^[1-2],为“新浙八味”和“衢六味”的品种之一。衢枳壳在浙江资源丰富、产量高,药材中主要含有挥发油和黄酮类等成分。衢枳壳具有镇咳化痰、清热解毒、调节胃肠道功能、降血糖、降血脂和降血压等功效,具有较高的开发利用价值^[3-5]。

据文献报道,衢枳壳中的黄酮类成分是其发挥理气宽中等作用的重要成分,也是评价衢枳壳质量的指标性成分^[4,6-8]。前期课题组采用高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(HPLC-Q-TOF-MS)并结合相关成分数据库初步分析了衢枳壳中的化学成分,显示其含有多种黄酮类成分。而目前对衢枳壳中多个成分同时检测的文献报道较少,虽有采用HPLC法同时测定衢枳壳中7个指标成分含量的文献报道^[9-11],但尚不能涵盖衢枳壳中其他指标成分。而中药一般通过多成分、多靶点发挥协同增效的作用,如能同时测定出其中更多的黄酮类成分的含量,对衢枳壳的质量控制、谱效关系分析和阐明其中的药效物质基础都具有重要意义。

为了更好地控制衢枳壳的质量,本研究选择衢枳壳中具有主要活性的12个黄酮类成分(圣草次苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、木犀草素、橙皮内酯、川陈皮素、桔皮素和橙皮油内酯)作为定量检测指标,建立HPLC法同时测定其含量,并应用于来自10个不同采集地的衢枳壳样品检测中,以期完善衢枳壳的质量控制标准提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括G1316B型柱温箱、G1312B型泵系统[美国Agilent科技(中国)有限公司];PA2251型电子分析天平[赛多利斯(上海)贸易有限公司];KQ5200E型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);HYJD-T型实验室超纯水机(杭州永洁达净化科技有限公司);KA-1000C型台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

衢枳壳药材分别于2019年6月采自浙江衢州市10个不同的常山胡柚标准化种植基地,在每个基地的东、南、西、北、中5个方位分别采集样本(于2019年6月下旬采集后对半切开,50℃烘干,封口包装,备用),由衢州市食品药品检验研究院宋剑锋主任中药师鉴定均为常山

胡柚的未成熟果实;圣草次苷对照品(批号:CDGB-89194,纯度:98.56%)、橙皮油内酯对照品(批号:CDAA-281288,纯度:98.72%)均来源于上海安谱实验科技股份有限公司;芸香柚皮苷对照品(批号:131208,纯度:98.56%)、柚皮素对照品(批号:130908,纯度:98.48%)、桔皮素对照品(批号:130708,纯度:98.86%)、川陈皮素对照品(批号:130108,纯度:98.75%)均来源于四川省维克奇生物科技有限公司;柚皮苷对照品(批号:110722-201312,纯度:98.96%)、橙皮苷对照品(批号:110721-201316,纯度:98.88%)、新橙皮苷对照品(批号:111857-201102,纯度:98.84%)、木犀草素对照品(批号:111520-201006,纯度:98.98%)均来源于中国食品药品检定研究院;水合橙皮内酯对照品(批号:BBP00486,纯度:98.50%)、橙皮内酯对照品(批号:BBP00392,纯度:99.10%)均来源于云南西力生物技术有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸、甲酸、乙酸为分析纯,均来源于中国医药集团上海化学试剂公司;水为超纯水(自制)。衢枳壳样品来源信息见表1。

表1 衢枳壳样品来源信息

Tab 1 Sample information of Quzhiqiao

编号	采集地	采集时间	单个直径($\bar{x} \pm s$),cm	单个质量($\bar{x} \pm s$),g
S1	常山县大宝山	2019-06-23	4.38±0.45	16.46±2.36
S2	常山县太公山	2019-06-23	4.25±0.38	16.33±2.40
S3	常山县鸢山	2019-06-23	4.09±0.39	16.21±2.34
S4	常山县小翠山	2019-06-23	4.11±0.36	16.25±2.95
S5	江山市上余镇	2019-06-25	3.96±0.47	16.07±2.40
S6	江山市湖珠村	2019-06-25	3.99±0.51	16.14±3.57
S7	柯城区曹门村	2019-06-25	4.21±0.49	16.39±2.34
S8	衢江区莲花镇	2019-06-25	4.02±0.42	16.23±2.32
S9	龙游县中埠村	2019-06-23	4.17±0.46	16.38±2.23
S10	龙游县下章村	2019-06-23	4.13±0.44	16.29±2.34

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Extend C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:A相为0.1%甲酸水溶液,B相为乙腈溶液,梯度洗脱;流速:1.0 mL/min;柱温:35℃;检测波长:330 nm;进样量:10 μL。梯度洗脱程序见表2。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure

时间,min	A,%	B,%
0	90	10
2	90	10
5	82	18
10	82	18
25	80	20
45	50	50
70	0	100

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取圣草次苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、木犀草素、橙皮内酯、川陈皮素、桔皮素、橙皮油内酯12个对照品适量,精密称定,置于不同量瓶中,加70%甲醇使之溶解并制成质量浓度均为1.0 mg/mL的单一对照品贮备液;精密移取12种对照品贮备液适量,混合,制成含圣草次苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、木犀草素、橙皮内酯、川陈皮素、桔皮素、橙皮油内酯质量浓度分别为16.51、45.02、354.12、41.12、22.86、349.56、14.15、15.04、18.28、15.08、16.12、12.84 μg/mL的混合对照品溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液 取薊积壳样品,粉碎,过3号筛;取粉末约0.2 g,精密称定,置于100 mL具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,密塞,称定质量;超声(功率:200 W,频率:40 kHz)提取30 min,放冷至室温,密塞;再次称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取混合对照品溶液和供试品溶液(S6)适量,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,详见图1。结果,各待测成分峰与相邻峰间的分离度良好,分离度均大于1.5,理论板数以柚皮苷峰计大于4 000,对称因子为0.95~1.05。

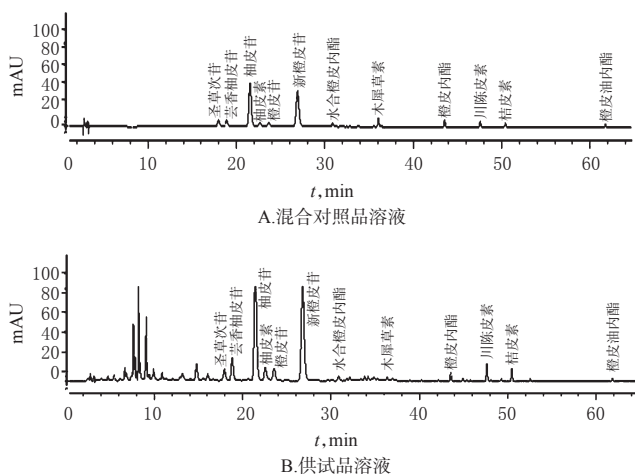


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3.2 线性关系考察 分别取“2.2.1”项下混合对照品溶液1.0、2.0、3.0、5.0、8.0、10.0 mL,置于10 mL量瓶中,用70%甲醇定容至刻度,制成系列质量浓度混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以峰面积为纵坐标(y)、各成分质量浓度为横坐标(x)进行线性回归。结果,12个成分在各自检测质量浓度范围内线性关系均良好,结果详见表3。

表3 12个成分的线性关系考察结果

Tab 3 Linear relationship results of 12 components

编号	成分	回归方程	线性范围, μg/mL	r
1	圣草次苷	$y=3.771x+0.380$	1.65~16.51	0.999 7
2	芸香柚皮苷	$y=9.011x+0.238$	4.50~45.02	0.999 8
3	柚皮苷	$y=29.321x+0.152$	35.41~354.12	0.999 8
4	柚皮素	$y=8.101x+0.665$	4.11~41.12	0.999 7
5	橙皮苷	$y=5.411x+0.677$	2.29~22.86	0.999 7
6	新橙皮苷	$y=27.251x+0.334$	34.96~349.56	0.999 9
7	水合橙皮内酯	$y=2.931x+0.160$	1.42~14.15	0.999 7
8	木犀草素	$y=3.671x-0.436$	1.50~15.04	0.999 7
9	橙皮内酯	$y=3.661x+0.670$	1.83~18.28	0.999 8
10	川陈皮素	$y=3.221x-0.687$	1.51~15.08	0.999 7
11	桔皮素	$y=3.541x-0.380$	1.61~16.12	0.999 7
12	橙皮油内酯	$y=3.201x+0.602$	1.28~12.84	0.999 7

2.3.3 检测限与定量限试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,加70%甲醇逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。当信噪比为3:1时得检测限,信噪比为10:1时得定量限,结果见表4。

表4 12个成分的检测限与定量限测定结果

Tab 4 Detection limit and quantitative limit of 12 components

编号	成分	检测限, μg/mL	定量限, μg/mL
1	圣草次苷	0.165 1	0.547 8
2	芸香柚皮苷	0.450 2	1.487 4
3	柚皮苷	3.541 2	11.663 3
4	柚皮素	0.411 2	1.360 3
5	橙皮苷	0.228 6	0.758 3
6	新橙皮苷	3.495 6	11.594 9
7	水合橙皮内酯	0.141 5	0.466 3
8	木犀草素	0.150 4	0.497 1
9	橙皮内酯	0.182 8	0.601 2
10	川陈皮素	0.150 8	0.499 9
11	桔皮素	0.161 2	0.532 3
12	橙皮油内酯	0.128 4	0.424 6

2.3.4 精密度的试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录各成分的保留时间和峰面积。结果,各色谱峰峰面积的RSD为1.68%~2.78%(n=6),表明仪器的精密度良好,详见表5。

2.3.5 重复性试验 精密称取同一批供试品(S6),平行取样6份,按“2.2.2”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,记录各成分的保留时间和峰面积,并按外标法计算各成分含量。结果,各成分含量的RSD为1.77%~2.98%(n=6),表明该方法的重复性良好,详见表5。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(S6),分别在室温下放置0、2、4、8、12、18、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录各成分的保留时间和峰面积。结果,各色谱峰峰面积的RSD为1.77%~2.86%(n=7),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好,详见表5。

表5 12个成分的精密性、重复性和稳定性试验结果

Tab 5 Results of precision, repeatability and stability tests of 12 components

编号	成分	精密性试验(n=6)		重复性试验(n=6)		稳定性试验(n=7)	
		保留时间 RSD, %	峰面积 RSD, %	保留时间 RSD, %	含量 RSD, %	保留时间 RSD, %	峰面积 RSD, %
1	圣草次苷	0.78	1.68	0.32	2.79	1.59	2.34
2	芸香柚皮苷	1.15	2.49	0.37	2.46	1.45	1.77
3	柚皮苷	1.08	2.26	1.20	1.79	1.47	2.41
4	柚皮素	0.90	2.78	1.06	2.70	0.91	2.86
5	橙皮苷	0.40	2.08	1.87	2.51	1.05	2.74
6	新橙皮苷	1.56	2.07	1.26	2.09	0.95	1.82
7	水合橙皮内酯	0.78	2.56	0.55	1.87	1.28	2.40
8	木犀草素	0.89	2.25	0.63	2.65	1.37	2.22
9	橙皮内酯	0.52	2.06	0.81	2.85	0.88	2.10
10	川陈皮素	1.36	2.57	0.56	2.75	1.21	2.81
11	桔皮素	1.29	2.06	0.45	1.77	0.81	1.93
12	橙皮油内酯	1.52	2.06	0.76	2.98	0.45	1.96

2.3.7 加样回收率试验 取已知含量的衢枳壳样品(S2)粉末6份,精密称定适量,分别按各成分已知含量的100%加入混合对照品溶液,按“2.2.2”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,以外标法计算各待测成分含量并计算加样回收率。结果,12种成分的平均加样回收率在98.18%~103.13%之间,RSD在1.49%~2.38%之间,表明本方法的准确度良好,详见表6。

表6 12个成分的回收率试验结果

Tab 6 Results of recovery tests of 12 components

编号	成分	取样量, g	样品含有 量,mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收 率, %	平均加样回 收率, %	RSD, %				
1	圣草次苷	0.197 3	0.522 7	0.526 8	1.030 0	96.30	99.50	2.10				
		0.200 8	0.531 9	0.526 8	1.068 2	101.80						
		0.197 4	0.522 9	0.526 8	1.047 9	99.66						
		0.200 6	0.531 3	0.526 8	1.058 1	100.00						
		0.197 9	0.524 1	0.526 8	1.039 8	97.89						
		0.199 4	0.528 1	0.526 8	1.061 9	101.33						
		2	芸香柚皮苷	0.197 3	0.956 1	0.963 2			1.938 8	102.02	99.61	2.11
				0.200 8	0.973 1	0.963 2			1.907 3	96.99		
				0.197 4	0.956 6	0.963 2			1.936 5	101.73		
				0.200 6	0.971 9	0.963 2			1.911 1	97.51		
				0.197 9	0.958 8	0.963 2			1.924 0	100.21		
				0.199 4	0.966 1	0.963 2			1.921 4	99.18		
3	柚皮苷	0.197 3	6.719 7	6.773 5	13.287 0	96.96	98.18	1.84				
		0.200 8	6.838 8	6.773 5	13.624 6	100.18						
		0.197 4	6.723 1	6.773 5	13.281 0	96.82						
		0.200 6	6.830 3	6.773 5	13.619 7	100.23						
		0.197 9	6.738 4	6.773 5	13.248 4	96.11						
		0.199 4	6.789 8	6.773 5	13.480 6	98.78						
		4	柚皮素	0.197 3	0.685 0	0.689 9			1.347 2	95.98	98.85	2.36
				0.200 8	0.697 1	0.689 9			1.390 8	100.55		
				0.197 4	0.685 3	0.689 9			1.384 5	101.35		
				0.200 6	0.696 3	0.689 9			1.385 2	99.86		
				0.197 9	0.686 9	0.689 9			1.373 0	99.45		
				0.199 4	0.692 1	0.689 9			1.353 9	95.93		
5	橙皮苷	0.197 3	0.724 9	0.730 2	1.428 1	96.30	98.48	1.98				
		0.200 8	0.737 7	0.730 2	1.441 2	96.34						
		0.197 4	0.725 2	0.730 2	1.449 0	99.12						

续表6

Continued tab 6

编号	成分	取样量, g	样品含有 量,mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收 率, %	平均加样回 收率, %	RSD, %				
6	新橙皮苷	0.200 6	0.736 8	0.730 2	1.452 4	98.00	98.50	2.21				
		0.197 9	0.726 9	0.730 2	1.457 9	100.11						
		0.199 4	0.732 4	0.730 2	1.470 0	101.01						
		0.197 3	8.625 3	8.659 8	17.315 6	100.35						
		0.200 8	8.778 3	8.659 8	17.165 7	96.85						
		0.197 4	8.629 7	8.659 8	16.990 6	96.55						
		0.200 6	8.767 4	8.659 8	17.537 4	101.27						
		0.197 9	8.649 4	8.659 8	17.276 9	99.63						
		0.199 4	8.715 4	8.659 8	17.056 4	96.32						
		7	水合橙皮内酯	0.197 3	0.047 2	0.045 8			0.092 4	98.69	98.25	2.38
				0.200 8	0.048 1	0.045 8			0.092 0	95.85		
				0.197 4	0.047 3	0.045 8			0.091 1	95.63		
0.200 6	0.048 0			0.045 8	0.094 0	100.44						
0.197 9	0.047 4			0.045 8	0.092 1	97.60						
0.199 4	0.047 7			0.045 8	0.094 1	101.31						
0.197 3	0.040 5			0.040 5	0.080 3	98.17	99.91	1.49				
0.200 8	0.041 2			0.040 5	0.081 2	98.64						
0.197 4	0.040 5			0.040 5	0.081 8	102.00						
0.200 6	0.041 2			0.040 5	0.081 5	99.63						
0.197 9	0.040 6			0.040 5	0.081 0	99.68						
0.199 4	0.040 9			0.040 5	0.082 0	101.33						
9	橙皮内酯	0.197 3	0.018 6	0.018 5	0.037 8	103.62			103.13	1.71		
		0.200 8	0.018 9	0.018 5	0.037 7	101.62						
		0.197 4	0.018 6	0.018 5	0.037 8	103.89						
		0.200 6	0.018 9	0.018 5	0.037 5	100.32						
		0.197 9	0.018 6	0.018 5	0.038 0	104.54						
		0.199 4	0.018 8	0.018 5	0.038 2	104.76						
10	川陈皮素	0.197 3	0.060 6	0.061 2	0.121 6	99.75	98.82	2.18				
		0.200 8	0.061 7	0.061 2	0.121 7	98.12						
		0.197 4	0.060 6	0.061 2	0.122 4	100.98						
		0.200 6	0.061 6	0.061 2	0.121 5	97.94						
		0.197 9	0.060 8	0.061 2	0.122 5	100.83						
		0.199 4	0.061 2	0.061 2	0.119 5	95.29						
11	桔皮素	0.197 3	0.029 4	0.029 5	0.058 6	98.93	98.44	1.51				
		0.200 8	0.029 9	0.029 5	0.059 0	98.41						
		0.197 4	0.029 4	0.029 5	0.058 3	97.69						
		0.200 6	0.029 9	0.029 5	0.058 7	97.59						
		0.197 9	0.029 5	0.029 5	0.058 1	96.88						
		0.199 4	0.029 7	0.029 5	0.059 6	101.12						
12	橙皮油内酯	0.197 3	0.017 6	0.017 8	0.035 8	102.22	100.29	2.18				
		0.200 8	0.017 9	0.017 8	0.035 7	99.84						
		0.197 4	0.017 6	0.017 8	0.035 5	100.64						
		0.200 6	0.017 9	0.017 8	0.036 1	102.57						
		0.197 9	0.017 6	0.017 8	0.034 8	96.47						
		0.199 4	0.017 8	0.017 8	0.035 6	100.00						

2.3.8 样品的含量测定 取不同采集地的10批衢枳壳样品粉末各约0.2 g,精密称定,按“2.2.2”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,记录峰面积并按外标法计算各成分含量,每批样品平行3份测定,取平均值,结果详见表7。

从表7可知,圣草次苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、木犀草素、橙皮内酯、川陈皮素、桔皮素、橙皮油内酯等12个黄酮类成分的含量分别为1.995 5~2.648 8、4.317 7~5.005 1、33.215 5~

表7 不同采集地10批样品中12个成分的含量测定结果($n=3$, mg/g)Tab 7 Results of content determination of 12 components in 10 batches of samples from different collection places ($n=3$, mg/g)

编号	采集地	圣草苣荬	芸香柚皮苷	柚皮苷	柚皮素	橙皮苷	新橙皮苷	水合橙皮内酯	木犀草素	橙皮内酯	川陈皮素	桔皮素	橙皮油内酯
S1	常山县大宝山	2.478 4	5.005 1	33.768 1	3.414 3	3.748 8	43.878 8	0.223 1	0.196 1	0.097 9	0.303 3	0.144 2	0.089 5
S2	常山县太公山	2.648 8	4.845 5	34.054 6	3.471 5	3.673 5	43.712 4	0.239 4	0.205 3	0.094 2	0.307 1	0.149 1	0.089 1
S3	常山县鸺山	2.129 3	4.714 1	33.855 7	3.400 1	3.678 4	43.967 6	0.222 7	0.195 1	0.097 2	0.302 8	0.142 8	0.089 8
S4	常山县小翠山	2.122 5	4.928 5	33.777 5	3.430 6	3.621 8	44.026 6	0.237 2	0.197 5	0.097 6	0.303 9	0.143 9	0.089 2
S5	江山市上余	2.013 1	4.767 1	33.377 7	3.170 2	3.242 4	43.103 3	0.205 1	0.208 2	0.085 2	0.291 9	0.133 0	0.082 9
S6	江山市湖珠	2.026 1	4.618 8	33.552 5	3.140 4	3.295 4	42.949 7	0.202 7	0.201 3	0.086 0	0.297 6	0.121 8	0.083 4
S7	柯城区曹门	2.146 1	4.680 5	33.215 5	3.195 0	3.373 5	42.746 6	0.216 7	0.208 8	0.086 8	0.297 0	0.138 5	0.083 7
S8	衢江区莲花	2.099 8	4.376 4	33.429 3	3.161 4	3.331 5	43.225 5	0.219 6	0.191 2	0.090 1	0.296 5	0.125 7	0.083 2
S9	龙游县中埠	2.116 7	4.501 5	33.470 6	3.144 0	3.272 6	42.879 4	0.218 1	0.199 0	0.083 7	0.297 2	0.119 9	0.082 9
S10	龙游县下章	1.995 5	4.317 7	33.380 3	3.169 3	3.221 2	43.287 4	0.218 3	0.191 5	0.080 3	0.294 3	0.122 3	0.082 7

34.054 6、3.140 4~3.471 5、3.221 2~3.748 8、42.746 6~44.026 6、0.202 7~0.239 4、0.191 2~0.208 8、0.080 3~0.097 9、0.291 9~0.307 1、0.119 9~0.149 1、0.082 7~0.089 8 mg/g。其中,常山县所产的衢枳壳样品(S1~S4)各成分的含量均高于江山、柯城、衢江和龙游所产样品(S5~S10)。常山作为衢枳壳的原产地和道地产区,表现出一定的地域优势,值得进一步研究和开发。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

笔者在前期试验中采用HPLC-二级管阵列检测器对12个成分对照品分别进行光谱综合分析,结果发现在330 nm波长处各成分均有较强紫外吸收,且均无末端吸收,因此选择以330 nm作为检测波长。

3.2 提取参数的选择

在供试品溶液的提取中,笔者对提取溶剂(50%甲醇、70%甲醇、90%甲醇)、提取方式(超声、回流)、提取时间(10、20、30 min)、取样量(0.1、0.2、0.3 g)进行了筛选。综合考虑所得色谱峰的峰面积、分离度、峰形和供试品制备方法的简单、高效、易操作等因素,最终确定取样量为0.2 g,提取溶剂为70%甲醇50 mL,提取方式为超声,提取时间为30 min。

3.3 色谱条件的考察

在色谱条件的优化中,笔者考察了实验室常见的几种色谱柱,即Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Extend C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Diamond C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。从保留时间、对称因子和分离度等方面对供试品溶液的色谱分离效果进行综合评价,结果各组分均能达到有效分离,其中Agilent Extend C₁₈分离得到的色谱峰峰形良好,分析时间较短,且能在较低的柱压下实现快速、高效地分离。另外,在25、30、35 ℃的柱温条件下进行分析发现,不同柱温下各化合物均能达到有效分离,35 ℃下分离最佳且保留时间较短。

综上所述,本文建立的方法准确可靠、简便、高效,可全

面、准确地同时测定衢枳壳中12个指标性成分的含量,从而为衢枳壳质量控制标准的完善提供了参考依据,并为其他枳壳类相关药材及其炮制品的多指标成分含量的同时测定提供了参考。

参考文献

- [1] 浙江植物志编辑委员会.浙江植物志[M].杭州:浙江科学技术出版社,1993:438.
- [2] 浙江省食品药品监督管理局.浙江省中药炮制规范[S].北京:中国医药科技出版社,2015:180-182.
- [3] 徐小忠,赵四清,汪丽霞,等.常山胡柚果皮中所含功能性成分与作用[J].浙江柑橘,2014,31(1):10-12.
- [4] 徐礼萍,宋剑锋,赵四清,等.常山胡柚与不同来源枳壳对理气宽中功能的药效差异比较[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(7):156-160.
- [5] 陆胜民,张俊,郑美瑜,等.常山胡柚营养成分及其保健功能研究进展[J].浙江柑橘,2015,32(1):2-7.
- [6] 徐霄,汪洋,王思为,等.衢枳壳黄酮组分抑制脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症反应的作用机制研究[J].中国中医药科技,2019,26(4):529-532.
- [7] 王笑笑,王思为,方月娟,等.衢枳壳不同组分体外降糖活性研究及4种黄酮组分含量分析[J].中国现代应用药学,2017,34(10):1418-1423.
- [8] 郑雪良,刘春荣,王登亮,等.胡柚小青果的黄酮类化合物及抗氧化活性研究[J].浙江农业学报,2015,27(7):1185-1191.
- [9] 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.
- [10] 宋剑锋,冯敬骞,胡建华,等.常山胡柚不同生长期果实中3种成分含量的动态变化[J].中国现代应用药学,2014,31(12):1474-1478.
- [11] 宋剑锋,冯敬骞,徐礼萍,等.枳壳与常山胡柚及其多个炮制品的质量评价[J].中国药房,2015,26(30):4258-4261.

(收稿日期:2019-09-25 修回日期:2019-11-04)

(编辑:刘萍)