

UPLC法同时测定橘核中7种成分含量

刘兴赋¹, 郁林娜¹, 付洋¹, 程盛勇¹, 鲁文琴², 罗喜荣¹, 杨军^{3,*}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学附属医院, 贵州 贵阳 550004;
3. 中国科学院地球化学研究所, 贵州 贵阳 550081)

摘要:建立超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)同时测定橘核中7种成分(柚皮素、橙皮素、柚皮苷、橙皮苷、柠檬苦素、诺米林和黄酮)含量。采用UHPLC Polar-AQ-C₁₈色谱柱(2.1 nm×100 mm, 1.8 μm), 以乙腈(A)-水(B)为流动相, 流速0.21 mL/min进行梯度洗脱, 柱温30℃, 检测波长为283 nm(0~20 min)、210 nm(20 min~35 min)。结果显示, 7种成分均达到基线分离, 各成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系($r \geq 0.9999$), 方法精密度、重复性、稳定性良好, 平均加样回收率在102.62%~109.18%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均<2%。16批橘核样品中7种成分含量差异较大, 其中柠檬苦素和诺米林的含量最高。

关键词:橘核; 超高效液相色谱; 含量测定; 质量控制; 波长切换

Simultaneous Determination of Seven Components in *Citri reticulatae* Semen by UPLC

LIU Xing-fu¹, YU Lin-na¹, FU Yang¹, CHENG Sheng-yong¹, LU Wen-qin², LUO Xi-rong¹, YANG Jun^{3,*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;
2. The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550081, Guizhou, China)

Abstract: To establish an ultra performance liquid chromatography(UPLC) method for the simultaneous determination of seven constituents(naringenin, hesperetin, naringin, hesperidin, limonin, nomilin, obakunone.) in *Citri reticulatae* semen. The separation was performed on a UHPLC Polar-AQ-C₁₈ (2.1 nm×100 mm, 1.8 μm) was used as the stationary phase and the mobile phase consisted of acetonitrile (A) - water (B) with gradient elution at flow rate of 0.21 mL/min, the detection wavelength at 283 nm(0-20 min) and 210 nm (20 min-35 min), and the column temperature at 30℃. The results showed that the seven components reached baseline separation all the compounds had a wide linear range and good linearity ($r \geq 0.9999$), with good precision, repeatability and stability. The average recoveries were between 102.62%~109.18% and the relative standard de-

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2013]2037号); 贵州省科技计划项目(黔科合SY字[2015]3032号、黔科合LH字[2014]7091号)

作者简介: 刘兴赋(1979—), 男(汉), 硕士, 讲师, 研究方向: 药物新剂型新技术及药代动力学研究。

* 通信作者: 杨军(1972—), 男(苗), 硕士, 副研究员, 研究方向: 从事分析化学研究。

- Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity[J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1443-1450
- [26] Li Z J, He X, Liu F, et al. A review of polysaccharides from *Schisan-dra chinensis* and *Schisandra sphenanthera*: Properties, functions and applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 184: 178-190
- [27] Maestri E, Marmiroli M, Marmiroli N. Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs [J]. Journal of Proteomics, 2016, 147:140-155
- [28] Sur S, Panda C K. Molecular aspects of *Cancer* chemopreventive and therapeutic efficacies of tea and tea polyphenols[J]. Nutrition, 2017,

- 43/44: 8-15
- [29] Mozaffarian D, Wu J H Y. Flavonoids, dairy foods, and cardiovascular and metabolic health: A review of emerging biologic pathways[J]. Circulation Research, 2018, 122(2): 369-384
- [30] Cheng H, Kong J, Underwood C, et al. Systematic review and meta-analysis of the effect of protein and amino acid supplements in older adults with acute or chronic conditions[J]. British Journal of Nutrition, 2018, 119(5): 527

收稿日期: 2019-02-24

viation (RSD) were all less than 2 %. The contents of seven components in 16 batches of *Citri reticulatae* semen were different and the contents of limonin and nomilin were the highest.

Key words: *Citri reticulatae* semen; ultra performance liquid chromatograph; content determination; quality control; switching wavelength

引文格式:

刘兴赋,郁林娜,付洋,等. UPLC法同时测定橘核中7种成分含量[J].食品研究与开发,2020,41(3):179-182,201

LIU Xingfu, YU Linna, FU Yang, et al. Simultaneous Determination of Seven Components in *Citri reticulatae* Semen by UPLC[J]. Food Research and Development, 2020,41(3):179-182,201

橘核为我国常用中药,系芸香科植物橘(*Citrus reticulata* Blanco)及其栽培变种的干燥成熟种子,具有理气、散结、止痛等功效^[1]。橘核的主要活性成分为柠檬苦素类和黄酮类化合物,具有明显的抗肿瘤、镇痛抗炎、抗氧化、杀虫等药理作用,现代临床常用于治疗急性乳腺炎、乳腺增生等疾病,其药用价值较高^[2-8]。橘核目前仍以理化鉴别为质量控制手段,缺少含量测定项,其质量标准尚不完善。依据中药整体成分发挥作用的特点,开展指纹图谱研究和多成分含量测定并建立质量标准,是保障中药质量和疗效一致性的有效方法。本试验基于前期橘核超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatograph, UPLC)指纹图谱研究^[9],首次建立了UPLC同时测定橘核中柚皮素、橙皮素、柚皮苷、橙皮苷、柠檬苦素、诺米林和黄柏酮含量的方法,为其质量标准的提高和修订提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

柑橘果实收集于贵州、湖南、广西等地,果实摘取种子,洗净后自然阴干,经贵州医科大学生药学教研室覃容贵教授鉴定为芸香科植物橘(*Citrus reticulata* Blanco)及其栽培变种的干燥种子,见表1。

表1 橘核样品来源

Table 1 *Citri reticulatae* semen samples from different production batches and areas

批号	产地	采集时间	批号	产地	采集时间
S1	广西容县	201801	S9	湖南怀化	201801
S2	贵州开阳	201801	S10	湖南怀化	201801
S3	贵州安顺	201801	S11	广西永福	201801
S4	湖南凤凰	201801	S12	四川成都	201804
S5	湖南麻阳	201801	S13	广东四会	201804
S6	贵州惠水	201801	S14	湖南吉首	201804
S7	湖南麻阳	201801	S15	浙江衢州	201801
S8	江西南丰	201801	S16	湖南怀化	201804

柚皮素、柚皮苷、黄柏酮对照品:北京索莱宝科技有限公司,批号分别为1112A024,116A022,516A21,纯度均>98%;橙皮素对照品:北京北纳创联生物技术研究院,批号130429,纯度>98%;橙皮苷对照品:中国食品药品检定研究院,批号110721-201014,纯度>95%;柠檬苦素、诺米林对照品:实验室自制,纯度均>98%;乙腈(色谱纯):德国默克公司。

1.1.2 仪器

Agilent 1290 DAD 超高效液相色谱仪:美国安捷伦科技公司;BSA224S型电子天平:赛多利斯科学仪器有限公司;UC-10H型加热超声波清洗器:上海泰坦科技股份有限公司;TGL-16G型高速台式离心机:上海安亭科学仪器厂;FW177型中草药粉碎机:天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate[®] UHPLC Polar-AQ-C₁₈ (2.1 nm×100 mm, 1.8 μm);流动相:乙腈-水(45:55,体积比);梯度洗脱(0~18 min,15%~40%A;18 min~20 min,40%A;20 min~35 min,40%~50%A);流速:0.21 mL/min;检测波长:283 nm(0~20 min),210 nm(20 min~35 min);柱温:30℃;进样量:0.8 μL。

1.2.2 对照品溶液的制备

精密称取柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮对照品适量置10 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,制得质量浓度分别为400、375、112.5、262.5、8 037.5、1 400、1 500 mg/L的混合对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备

准确称取脱脂橘核粉末(过40目筛)0.5 g,置具塞锥形瓶中,加入甲醇25 mL,密塞,摇匀,称定质量,超声提取(功率200 W,频率35 kHz)40 min,放至室温20℃,用甲醇补足减失的质量,经0.22 μm微孔滤膜滤

过,取续滤液,即得。

1.2.4 线性关系考察

取“1.2.2”项下混合对照品溶液适量,逐级稀释得系列混合对照品工作溶液,按“1.2.1”项下色谱条件进样检测。以混合对照品溶液中各指标成分的质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,分别绘制标准曲线。

1.2.5 精密度试验

精密吸取同一混合对照品溶液,按“1.2.1”项下色谱条件连续进样6次,计算柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液,室温放置,分别于0、2、4、8、12、24 h按“1.2.1”项下色谱条件进样分析,计算柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮峰面积的RSD值。

1.2.7 重复性试验

精密称取同一批次橘核药材6份,按“1.2.3”项下方法平行制备供试品溶液,按“1.2.1”项下色谱条件进样分析,计算柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮峰面积的RSD值。

1.2.8 加样回收率试验

精密称取6份已知含量的橘核药材粉末0.1 g,分别加入混合对照品溶液适量,按“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.1”项下色谱条件进样分析,计算柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的平均回收率和RSD值。

1.2.9 样品测定与数据处理

取表1样品按“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.1”项下色谱条件进样分析,测定柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的峰面积,以回归方程计算样品中各指标成分的含量。

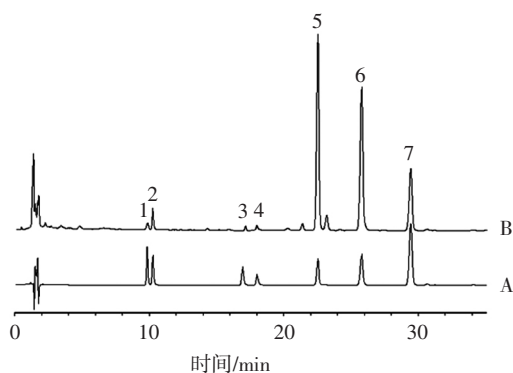
2 结果与分析

2.1 专属性

取标准品溶液和供试品溶液按“1.2.1”项下条件检测,结果7种被测成分均能达到基线分离,峰形较好,无杂质峰干扰,色谱图见图1。

2.2 标准曲线

以浓度 X (mg/L)为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,得柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的回归方程,结果见表2。



1.柚皮苷; 2.橙皮苷; 3.柚皮素; 4.橙皮素; 5.柠檬苦素; 6.诺米林; 7.黄柏酮。

图1 混合对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的UPLC色谱图
Fig.1 UPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample(B)

表2 7种成分回归方程及线性范围

Table 2 Regression equations with linear range for 7 compounds

成分	回归方程	相关系数(r)	线性范围/(mg/L)
柚皮苷	$Y=5.616 0X-3.836 3$	0.999 9	12.500~400.0
橙皮苷	$Y=6.706 2X-3.465 6$	1.000 0	11.719~375.0
柚皮素	$Y=5.220 1X-0.768 2$	0.999 9	0.352~112.50
橙皮素	$Y=7.822 7X-8.048 9$	0.999 9	0.820~262.50
柠檬苦素	$Y=2.567 8X-35.119 0$	1.000 0	25.117~8 037.50
诺米林	$Y=4.123 6X-6.146 0$	1.000 0	4.375~1 400.0
黄柏酮	$Y=6.663 6X-6.615 8$	1.000 0	4.688~1 500.0

2.3 精密度试验

精密度试验结果显示,柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮峰面积的RSD分别为1.74%、1.89%、1.87%、1.28%、1.91%、1.65%、1.55%,表明仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验

稳定性结果显示,柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮峰面积的RSD分别为1.96%、1.83%、1.93%、1.77%、1.75%、1.97%、1.29%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5 重复性试验

重复性试验结果显示,柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮峰面积的RSD分别为1.54%、1.15%、1.68%、1.89%、1.36%、1.79%、1.61%,表明方法重复性良好。

2.6 加样回收率试验

加样回收率试验结果显示,柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的平均回收率

分别为 102.93 %、108.84 %、109.18 %、106.97 %、102.62 %、103.98 %、103.19 %，RSD 分别为 1.96 %、1.82 %、1.45 %、1.71 %、1.67 %、0.86 %、1.16 %，表明方法准确度良好。

2.7 样品测定

取表 1 样品按“1.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“1.2.1”项下色谱条件进样分析，计算样品中各指标成分的含量，结果见表 3 和图 2。

表 3 橘核中 7 种成分的含量测定

Table 3 Determination of seven components in *Citri reticulatae semen*

样品	柚皮苷	橙皮苷	柚皮素	橙皮素	柠檬苦素	诺米林	黄柏酮	总量
S1	0.005	0.018	0.006	0.015	0.527	0.159	0.014	0.743
S2	0.004	0.004	-	0.009	1.121	0.706	0.171	2.016
S3	0.005	0.013	0.001	0.009	1.104	0.424	0.042	1.598
S4	0.003	0.011	0.003	0.004	1.080	0.637	0.044	1.781
S5	0.003	0.075	0.002	0.007	1.084	0.358	0.017	1.546
S6	0.009	0.063	0.001	0.024	1.444	0.476	0.114	2.131
S7	0.004	0.025	0.001	0.009	0.918	0.356	0.140	1.453
S8	0.008	0.022	-	0.029	1.172	0.277	0.479	1.987
S9	0.014	0.082	0.004	0.027	0.614	0.179	0.025	0.945
S10	0.006	0.008	0.002	0.007	0.638	0.195	0.032	0.888
S11	0.005	0.023	0.001	0.011	1.171	0.403	0.115	1.729
S12	0.002	0.033	0.001	-	0.827	0.186	0.037	1.086
S13	0.002	0.016	-	-	0.831	0.191	0.035	1.075
S14	0.003	0.019	-	-	0.728	0.329	0.072	1.150
S15	0.004	0.008	0.002	0.004	0.647	0.359	0.102	1.125
S16	0.003	0.046	-	-	0.350	0.147	0.029	0.574
平均值	0.005±0.003	0.029±0.024	0.002±0.002	0.010±0.010	0.891±0.294	0.336±0.167	0.092±0.114	1.364±0.482

注：-表示未检出。

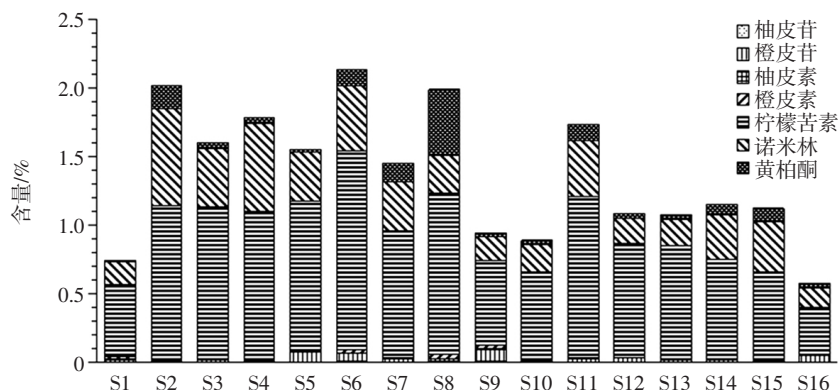


图 2 橘核中 7 种成分含量分布

Fig.2 Distribution of seven components in *Citri reticulatae semen*

3 结论

本试验考察了水、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮、甲醇、95 %乙醇、无水乙醇等提取溶剂对橘核中

7 种成分提取的影响，结果表明甲醇提取效果最佳。采用 DAD 检测器对混合对照品溶液和供试品溶液进行
(下转第 201 页)

- Toad *Bufo regularis* by Gibberellin A₃[J]. *Oncology*, 1988, 45(1): 61-64
- [11] El-Mofty M M, Sakr S A, Rizk A M, et al. Carcinogenic effect of gibberellin A₃ in Swiss Albino Mice[J]. *Nutrition and Cancer*, 1994, 21(2): 183-190
- [12] 《食品中农业化学品残留限量》编委会. 食品中农业化学品残留限量 食品卷[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006
- [13] 张倩, 贝峰, 孙欣, 等. 甜樱桃果实 GA₃ 的测定技术研究[J]. *果树学报*, 2017(10): 1294-1300
- [14] 张倩, 杜海云, 贾厚振, 等. HPLC-MS/MS 法测定设施甜樱桃果实中的赤霉素含量[J]. *山东农业科学*, 2017(10): 117-120
- [15] 韦航, 邹强, 荣杰峰, 等. 高效液相色谱-串联质谱同时测定豆芽中 8 种生长调节剂残留量[J]. *广东化工*, 2016(23): 118-120
- [16] 赵海玲, 邱宏萌, 雷琼, 等. 气相色谱串联质谱法测定果蔬中赤霉素[J]. *食品安全导刊*, 2018(24): 67-69
- [17] 李腾飞, 赵风年, 张超, 等. 高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时测定番茄中水杨酸和赤霉素[J]. *食品科学*, 2016(8): 182-186
- [18] 马桂娟, 汤丽华, 朱捷, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定豆芽中 4 种药物残留[J]. *食品研究与开发*, 2018(10): 138-142
- [19] 周纯洁, 赵博, 吴丹, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蔬菜中 6 种植物生长调节剂[J]. *食品工业科技*, 2016(10): 94-98
- [20] 王森, 金惠玉, 陈彦凤, 等. 豆芽中 6 种植物生长调节剂残留的质谱检测[J]. *食品工业*, 2018(7): 314-318
- [21] 刘艳琴, 王浩, 杨红梅, 等. 高效液相色谱-串联四极杆质谱联用测定水果和蔬菜中赤霉素残留量 [J]. *现代农业科技*, 2009(16): 330-331
- [22] Tang Z G, Zhou R Q, Duan Z T. Separation of gibberellic acid (GA₃) by macroporous adsorption resins[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2000, 75(8): 695-700
- [23] 国家卫生和计划生育委员会 农业部 国家食品药品监督管理局. 食品安全国家标准 水果中赤霉酸残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法: GB 23200.21-2016[S].北京:中国标准出版社,2016
- [24] 万凯, 丁晨红, 邓义才, 等. 蔬菜水果中赤霉素残留量 HPLC 检测方法的研究[J]. *热带农业科学*, 2014, 34(8): 91-95
- [25] 赵瑛博, 周艳明, 忻雪, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水果、蔬菜中赤霉素残留[J]. *食品科学*, 2011, 32(6): 209-212
- [26] 马亚琴, 叶兴乾, 吴厚玖, 等. 超声波辅助提取植物活性成分的研究进展[J]. *食品科学*, 2010, 31(21): 459-463
- [27] Method Validation And Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed[EB/OL]. Document No. SAN-CO/10684/2009.
- [28] 史玉琴. 赤霉素 GA₃ 的高效液相色谱检测方法及对小鼠机体的氧化损伤作用研究[D]. 保定:河北农业大学, 2011

收稿日期:2019-01-16

(上接第 182 页)

紫外全波长扫描,结果发现黄酮类成分的最大吸收波长为 283 nm,柠檬苦素类成分吸收峰在 210 nm 处响应最高,故采用波长切换法对橘核样品进行检测。

2017 年我国柑橘总产量高达 3 816 万吨,品种品系众多,橘核来源丰富^[10]。中国药典 2015 年版中橘核药材无含量测定方法及限度要求,已不适应橘核的现代应用要求。本研究建立了 UPLC 同时测定橘核中柚皮素、橙皮素、柚皮苷、橙皮苷、柠檬苦素、诺米林和黄柏酮含量的方法,该方法简便、准确、专属性强,可用于橘核药材的质量控制及评价。样品测定结果表明 16 批不同产地橘核药材中 7 种成分含量差异较大,RSD 为 32.98%~124.16%,其中柠檬苦素和诺米林分别占总量的 65.32%和 24.63%,为保证橘核药材的临床疗效,建议橘核中柠檬苦素含量不得少于 0.71%、诺米林含量不得少于 0.27%、7 种成分含量不得少于 1.09%。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-四部: 2015 年版 分辑号:四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015
- [2] 杨军, 余德顺, 范菊娣, 等. 超临界二氧化碳萃取桔核中柠檬苦素的工艺研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(4): 934-935

- [3] 罗喜荣, 范菊娣, 莫彬彬, 等. 超临界二氧化碳萃取橘核中诺米林的工艺研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(8): 74-76
- [4] 章斌, 侯小桢, 邓其海, 等. 柠檬苦素的抗氧化与抑菌效果研究[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(22): 1-5
- [5] Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the Citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models[J]. *Phytotherapy Research*, 2015, 29(3): 323-331
- [6] Kimira Y, Taniuchi Y, Nakatani S, et al. Citrus limonoid nomilin inhibits osteoclastogenesis in vitro by suppression of NFATc1 and MAPK signaling pathways[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(12): 1120-1124
- [7] Kim J, Chakraborty S, Jayaprakasha G K, et al. Citrus nomilin down-regulates TNF- α -induced proliferation of aortic smooth muscle cells via apoptosis and inhibition of I κ B[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 811: 93-100
- [8] 晏敏, 周宇, 贺肖寒, 等. 柑橘籽中柠檬苦素及类似物的生物活性研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(2): 290-296
- [9] 郁林娜, 付洋, 程盛勇, 等. 橘核 UPLC 指纹图谱研究[J]. *中药材*, 2019, 42(1): 122-125
- [10] 安亚杰. 我国柑橘主要分布区域[J]. *营销界(农资与市场)*, 2016(8): 51-59

收稿日期:2019-01-07