

一测多评法同时测定陈皮中 6 个黄酮类成分的含量

刘懋¹, 郑昊², 杨一荻^{3,4,5}, 胡楠¹, 张清波^{3,4,5}, 笔雪艳^{1,2,3,4,5*}

(1. 黑龙江省中医药科学院中药研究所, 哈尔滨 150036; 2. 哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076;
3. 黑龙江省药品检验研究院, 哈尔滨 150088; 4. 国家药品监督管理局中药质量研究与评价重点实验室,
黑龙江 哈尔滨 150088; 5. 黑龙江省中药质量研究与评价重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150088)

摘要 目的:建立一测多评法同时测定陈皮中 6 个黄酮类成分的含量。**方法:**采用 OSAKA CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 330 nm。以橙皮苷为内参物, 计算橙皮苷与芸香柚皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素之间的相对校正因子, 分别采用一测多评法和外标法对 15 批陈皮中 6 个黄酮类成分的含量进行测定并比较结果。**结果:**6 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999\ 9$); 平均加样回收率 99.95%~102.97%, RSD 0.81%~2.03%。一测多评法与外标法的含量测定结果无显著性差异($P > 0.05$)。**结论:**本法可对陈皮的质量控制和评价提供科学参考。

关键词:陈皮; 一测多评; 相对校正因子; 橙皮苷; 含量测定; 香蜂草苷; 川陈皮素; 橘皮素

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2023)02-0000-00

doi: 10.19778/j.chp.2023.02.00?

Simultaneous determination of the contents of 6 flavonoids in dried tangerine peel by quantitative analysis of multi-components by single-marker

LIU Mao¹, ZHENG Hao², YANG Yidi^{3,4,5}, HU Nan¹, ZHANG Qingbo^{3,4,5}, BI Xueyan^{1,2,3,4,5*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Heilongjiang Academy of Chinese Medicine Sciences, Harbin 150036, China; 2. College of Pharmacy, Harbin Commercial University of Harbin 150028, China; 3. Heilongjiang Institute for Drug Control, Harbin 150088, China; 4. NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150088, China; 5. Heilongjiang Provincial Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150088, China)

Abstract Objective: To establish a multi-assessment method for simultaneous determination of 6 flavonoids in dried tangerine peel. **Methods:** OSAKA CAPCELL PAK C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid solution, gradient elution; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was 330 nm. Taking hesperidin as the internal reference, the calculation of hesperidin and rutnaringin, melissa officin, tangerine peelin, 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, orange. The relative correction factor between corticosteroids, the content of 6 flavonoids in 15 batches of dried tangerine peel was determined by one-measurement-multiple-evaluation method and external standard method respectively, and the results were compared. **Results:** The six components have good linear relationship in

第一作者简介: 刘懋, 硕士研究生; 研究方向: 中药质量标准化。Tel: 18313991649; E-mail: 2787797448@qq.com

* 通讯作者简介: 笔雪艳; 研究方向: 中药质量标准化。Tel: 0451-53638792; E-mail: 65554629@qq.com

their respective ranges ($r \geq 0.999\ 9$); the average sample recovery rate was 99.95% – 102.97%, and the RSD was 0.81%–2.03%. There was no significant difference between the content determination results of the one-test multiple-assessment method and the external standard method ($P > 0.05$). **Conclusions:** This method can provide scientific reference for the quality control and evaluation of tangerine peel.

Key words: tangerine peel; quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS); relative correction factors (RCFs); hesperidin; content determination; vanillin; pericarpin; tangeretin

陈皮为芸香科植物橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 及其栽培变种的干燥成熟果皮, 药材分为“陈皮”和“广陈皮”, 具有理气健脾, 燥湿化痰的功效, 用于治疗脘腹胀满, 食少吐泻, 咳嗽痰多等症^[1-3]。陈皮化学成分复杂, 近年来有学者从陈皮中分离出多种化合物^[4-5], 除含有生物碱和挥发油等^[6], 最主要为黄酮类化合物, 对疾病的预防和治疗有独特效果^[7], 如橙皮苷、芸香柚皮苷以及其他多甲氧基黄酮(川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮和橘皮素等)^[8]。目前, 对陈皮中黄酮类成分多指标定量的方法多为外标法 (external standard method, ESM)^[9,10], 常常存在对照品不易获得, 检测成本高等问题。

2006年, 中国中医科学院王智民等^[11]率先提出了一测多评 (quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS) 作为多指标质量控制方法, QAMS 基于在一定的线性范围内, 待测成分的量与检测器的响应值呈正比例, 通过各个待测成分间的内在函数关系, 选取一种性质稳定、价廉易得的成分作为内参物, 进而实现对其他多个成分的同时测定, 最终达到控制中药整体质量的目的^[12]。QAMS 具有检测成本低、分析效率高等优点, 在国内外引起巨大反响, 目前已经在众多中药的质量控制中得到应用^[13,14]。

本研究基于高效液相色谱技术, 以橙皮苷为内参物, 建立 QAMS 法同时测定不同产地陈皮中橙皮苷、芸香柚皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素 6 个黄酮类成分的含量, 并对 QAMS 法用于陈皮质量控制的可行性、准确性、科学性进行验证。

1 材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-2010C HT 高效液相色谱仪, Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪; Agilent 1100 高效液相色谱仪; ML104T/02 型电子天平 (万分之一)、XSR205DU/A 型电子天平 (十万分之一, 梅特勒-托

利多公司); KQ-800KDB 型超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

芸香柚皮苷 (批号 RFS-Y071005009, 纯度 $\geq 98\%$)、橙皮苷 (批号 RFS-C00601910011, 纯度 $\geq 98\%$)、香蜂草苷 (批号 RFS-X03401911009, 纯度 $\geq 98\%$)、川陈皮素 (批号 RFS-C01502004003, 纯度 $\geq 98\%$)、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 (批号 RFS-Q07102005009, 纯度 $\geq 98\%$)、橘皮素 (批号 RFS-J02211807014, 纯度 $\geq 98\%$) 对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。乙腈为色谱纯, 购自德国默克公司; 水为屈臣氏蒸馏水; 其余试剂均为分析纯, 购自中国医药 (集团) 上海化学试剂公司。

1.3 药材

15 批陈皮经黑龙江省药品检验研究院笔雪艳主任药师根据《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 2020 年版项下对陈皮和广陈皮的鉴别描述最终确定本品为陈皮。信息详见表 1。

表 1 陈皮样品信息

Tab. 1 Tangerine peel sample information

编号 (No.)	批号 (lot No.)	产地 (place of origin)
S1	17112111	湖北随州 (Suizhou, Hubei)
S2	17112112	
S3	17112113	
S4	17112114	
S5	17112115	
S6	180311-2	
S7	180312-2	
S8	180313-2	
S9	180314-2	
S10	180315-2	
S11	20191101	江西兴国 (Xingguo, Jiangxi)
S12	20191102	
S13	20191103	
S14	20191104	
S15	20191105	

2 方法与结果

2.1 溶液制备

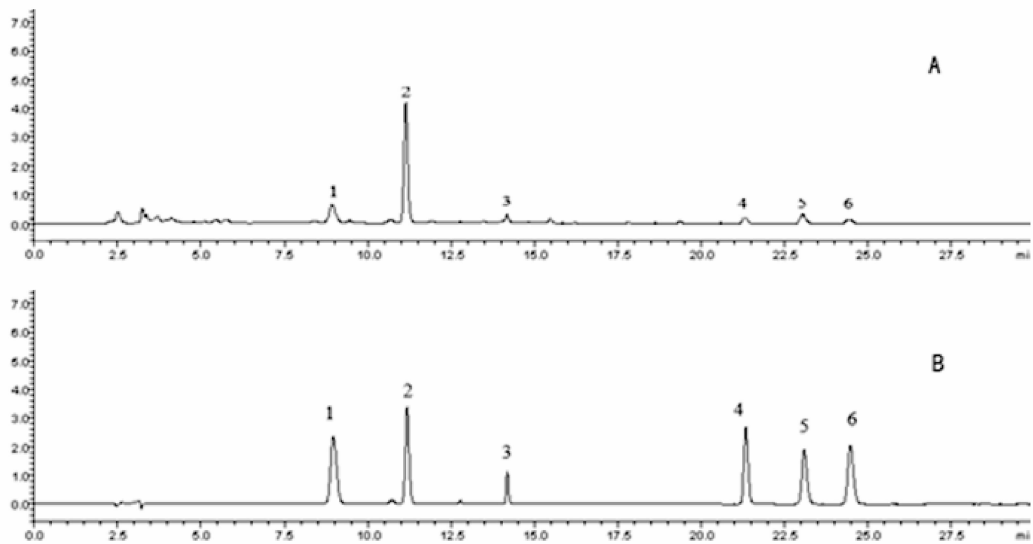
2.1.1 对照品溶液 精密称取芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素对照品适量,加甲醇制成浓度分别为92.76、91.75、17.50、6.31、7.06、5.99 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取陈皮粉末(过四号筛)约0.2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声(功率? 频率?)处理30 min,放冷,用甲醇补足减失的重量,摇匀,用微孔滤膜

(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件

采用 OSAKA CAPCELL PKA C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.1%甲酸(B),梯度洗脱(0~6 min,21% A;6~15 min,21% A $\rightarrow$ 50% A;15~30 min,50% A);流速为1.0 mL $\cdot$ min⁻¹;柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长330 nm;进样量10 μL 。分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液各10 μL ,按上述色谱条件进样测定,结果见图1。由图1可知,6个黄酮类成分之间分离良好。各色谱峰理论塔板数、分离度及拖尾因子均符合要求。



1. 芸香柚皮苷(narirutin) 2. 橙皮苷(hesperidin) 3. 香蜂草苷(didymin) 4. 川陈皮素(nobiletin) 5. 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮(3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxy flavone) 6. 橘皮素(tangeretin)

图1 陈皮样品(A)、混合对照品(B)HPLC图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of dried tangerine peel sample (A) and mixed reference substance (B)

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液1、3、5、10、15、20 μL ,按“2.2”项下的色谱条件

进样测定,记录色谱图,以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,结果(表2)表明,各成分在各自范围内线性关系良好。

表2 线性关系结果

Tab. 2 Linear relationship results

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
芸香柚皮苷(narirutin)	$Y = 3\,172\,580.29X + 3\,258.46$	1.000 0	26.30~420.80
橙皮苷(hesperidin)	$Y = 3\,024\,796.28X + 6\,919.23$	0.999 9	24.91~398.60
香蜂草苷(didymin)	$Y = 3\,283\,260.61X + 356.09$	1.000 0	6.31~202.00
川陈皮素(nobiletin)	$Y = 38\,210\,074.17X - 1\,087.54$	1.000 0	1.30~20.76
3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮(3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxy flavone)	$Y = 29\,221\,463.89X - 1\,027.69$	1.000 0	1.21~19.44
橘皮素(tangeretin)	$Y = 40\,384\,675.70X + 738.65$	1.000 0	1.37~21.90

2.3.2 精密度 精密吸取“2.1.1”项下的对照品溶液 10 μL ,按“2.2”项下的色谱条件,连续进样 6 次,测定峰面积。芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素峰面积的平均值分别为 295556、279488、57630、241480、206540、242324。其 RSD ($n = 6$) 分别为 0.17%、0.21%、0.45%、0.14%、0.17%、0.11%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性 取 S6 样品(批号:180311-2),按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.2”项下条件进样测定,计算芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素的平均含量分别为 21.09、86.36、3.41、0.36、0.79、0.20 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.24%、0.20%、0.29%、0.38%、0.50%、0.27%,结果表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性 取 S6 样品(批号:180311-2),按

“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、10、12、24 h 进样测定,记录峰面积。芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素峰面积的平均值分别为 518074、2018603、104694、107237、180869、73063。其 RSD ($n = 7$) 分别为 1.18%、0.31%、0.67%、0.52%、0.41%、0.36%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收率 取已知含量的 S6 样品(批号:180311-2)6 份,每份约 0.1 g,精密称定,分别置锥形瓶中,再精密加入适量的对照品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下条件进样测定,计算得到芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素的平均加样回收率分别为 99.95%、101.95%、100.36%、102.97%、99.98%、102.21%,RSD 分别为 2.03%、0.90%、1.40%、0.81%、2.03%、1.25%。结果见表 3。

表 3 6 个成分加样回收率试验结果($n=6$)

Tab. 3 Six component sample recovery test results

成分 (component)	称样量 (weighed)/ g	样品含量 (content of the sample)/mg	加入量 (adding amount)/ mg	测得总量 (total measured)/ mg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
芸香柚皮苷(narirutin)	0.100 1	2.112 4	2.104 0	4.145 2	96.62	99.95	2.04
	0.098 9	2.087 1	2.104 0	4.182 1	99.57		
	0.100 7	2.125 0	2.104 0	4.284 8	102.65		
	0.099 1	2.091 3	2.104 0	4.182 3	99.38		
	0.100 1	2.112 4	2.104 0	4.220 2	100.18		
	0.101 9	2.150 4	2.104 0	4.281 4	101.28		
橙皮苷(hesperidin)	0.100 1	8.679 9	8.646 4	17.596 4	103.12	101.95	0.90
	0.098 9	8.836 0	8.646 4	17.519 0	100.42		
	0.100 7	8.679 9	8.646 4	17.543 2	102.51		
	0.099 1	8.662 6	8.646 4	17.481 4	101.99		
	0.100 1	8.705 9	8.646 4	17.531 2	102.07		
	0.101 9	8.784 0	8.646 4	17.566 5	101.57		
香蜂草苷(didymnin)	0.100 1	0.341 3	0.404 0	0.749 6	101.06	100.36	1.40
	0.098 9	0.342 7	0.404 0	0.752 7	101.49		
	0.100 7	0.343 1	0.404 0	0.742 7	98.91		
	0.099 1	0.341 3	0.404 0	0.754 3	102.23		
	0.100 1	0.342 0	0.404 0	0.742 2	99.06		
	0.101 9	0.341 0	0.404 0	0.742 7	99.43		
川陈皮素(nobiletin)	0.100 1	0.036 2	0.041 5	0.079 4	104.10	102.97	0.81
	0.098 9	0.036 5	0.041 5	0.079 2	102.89		
	0.100 7	0.036 4	0.041 5	0.078 8	102.17		
	0.099 1	0.036 3	0.041 5	0.079 1	103.13		
	0.100 1	0.036 4	0.041 5	0.078 7	101.93		

续表 3(Tab. 3 continued)

成分 (component)	称样量 (weighed)/ g	样品含量 (content of the sample)/mg	加入量 (adding amount)/ mg	测得总量 (total measured)/ mg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 (3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxy flavone)	0.101 9	0.036 7	0.041 5	0.079 7	103.61		
	0.100 1	0.080 4	0.077 8	0.160 4	102.83	99.98	2.03
	0.098 9	0.079 5	0.077 8	0.156 1	98.46		
	0.100 7	0.079 2	0.077 8	0.158 1	101.41		
	0.099 1	0.080 2	0.077 8	0.158 7	100.90		
	0.100 1	0.079 1	0.077 8	0.155 1	97.69		
橘皮素(tangeretin)	0.101 9	0.079 3	0.077 8	0.156 0	98.59		
	0.100 1	0.020 0	0.021 9	0.042 4	102.28	102.21	1.25
	0.098 9	0.019 8	0.021 9	0.042 1	101.83		
	0.100 7	0.019 7	0.021 9	0.042 6	104.57		
	0.099 1	0.019 9	0.021 9	0.042 1	101.37		
	0.100 1	0.020 0	0.021 9	0.042 1	100.91		
	0.101 9	0.020 0	0.021 9	0.042 4	102.28		

2.4 相对校正因子

2.4.1 相对校正因子(f)的计算 采用标准曲线斜率比值法^[15]计算相对校正因子(relative correction factor,RCF)。精密吸取“2.1.1”项下的对照品溶液1、3、5、10、15、20 μL ,按“2.2”项下的色谱条件,注入液相色谱仪,记录峰面积,用最小二乘法以浓度对峰面积进行线性回归,通过内参物橙皮苷与其余待测成分的标准曲线斜率比值计算相对校正因子。以橙皮苷为内参物,测得芸香柚皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素的相对校正因子分别为0.954 9、0.923 5、0.079 4、0.103 9、0.075 1。

2.5 耐用性

2.5.1 不同仪器考察 取“2.1.1”项下的对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件,考察了不同高效液相色谱仪(Shimadzu LC-2010CHT、Shimadzu LC-20A、Agilent 1100)对相对校正因子的影响,结果见表4。结果表明,所建立的相对校正因子在3台不同仪器上耐用性良好。

2.5.2 不同色谱柱考察 取“2.1.1”项下的对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件,考察了不同色谱柱对相对校正因子的影响,结果见表5。结果表明,不同色谱柱对相对校正因子无明显影响。

2.5.3 不同色谱条件考察 取“2.1.1”项下的对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件,分别考察了不同流速(0.9、1.0、1.1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)、不同柱温(25、30、35 $^{\circ}\text{C}$)、不同检测波长(328、330、332 nm)对橙皮苷

表 4 不同仪器对相对校正因子的影响

Tab. 4 Effects of different instruments on relative correction factors

仪器 (instrument)	相对校正因子(RCF)				
	$f_{a/b}$	$f_{a/c}$	$f_{a/d}$	$f_{a/e}$	$f_{a/f}$
SHIMADZU LC-2010CHT	0.954 9	0.923 5	0.079 4	0.103 9	0.075 1
SHIMADZU LC-20A	0.946 5	0.905 4	0.080 4	0.104 3	0.074 5
Agilent 1100	0.954 4	0.913 0	0.079 3	0.103 7	0.074 8
平均值(mean)	0.951 9	0.914 0	0.079 7	0.104 0	0.074 8
RSD/%	0.49	0.99	0.76	0.29	0.40

注(note):a. 橙皮苷(hesperidin),b. 芸香柚皮苷(narirutin),c. 香蜂草苷(didymnin),d. 川陈皮素(nobiletin),e. 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮(3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxy flavone),f. 橘皮素(tangeretin)

表 5 不同色谱柱对相对校正因子的影响

Tab. 5 Effects of different columns on relative correction factors

色谱柱 (column)	相对校正因子(RCF)				
	$f_{a/b}$	$f_{a/c}$	$f_{a/d}$	$f_{a/e}$	$f_{a/f}$
OSAKA CAPCELL PAK C ₁₈	0.954 9	0.923 5	0.079 4	0.103 9	0.075 1
Exmere Exsil Mono C ₁₈ -ST	0.959 6	0.924 9	0.077 1	0.103 9	0.073 9
GL Inertsil ODS-3	0.961 3	0.927 6	0.078 4	0.103 5	0.074 2
Phenomenex Luna C ₁₈ (2)	0.962 0	0.923 9	0.077 7	0.105 0	0.074 7
Agilent TC-C ₁₈	0.957 5	0.926 8	0.079 0	0.103 9	0.073 3
平均值(mean)	0.959 1	0.925 3	0.078 3	0.104 0	0.074 2
RSD/%	0.30	0.19	1.20	0.54	0.94

注(note):a~f,同表4

与芸香柚皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素之间相对校正因子的影

响,结果见表 6~8。结果表明,不同流速、不同柱温、不同检测波长对所建立的相对校正因子的影响没有明显差异。

表 6 不同流速对相对校正因子的影响

Tab. 6 Effects of different flow rates on relative correction factors (RCF)

流速(flow rate)/ (mL · min ⁻¹)	相对校正因子(RCF)				
	$f_{a/b}$	$f_{a/c}$	$f_{a/d}$	$f_{a/e}$	$f_{a/f}$
0.9	0.958 7	0.924 8	0.076 4	0.106 5	0.075
1.0	0.954 9	0.923 5	0.079 4	0.103 9	0.075 1
1.0	0.962 3	0.926 6	0.077 5	0.106 9	0.075 2
平均值(mean)	0.958 6	0.925 0	0.077 8	0.105 8	0.075 1
RSD/%	0.39	0.17	1.95	1.54	0.13

注(note): a~f, 同表 4

表 7 不同柱温对相对校正因子的影响

Tab. 7 Effects of different column temperature on relative correction factors

温度(column temperature)/°C	相对校正因子(RCF)				
	$f_{a/b}$	$f_{a/c}$	$f_{a/d}$	$f_{a/e}$	$f_{a/f}$
25	0.962 6	0.927 3	0.078 9	0.104 2	0.073 6
30	0.954 9	0.923 5	0.079 4	0.103 9	0.075 1
35	0.958 4	0.926 8	0.078 2	0.103 8	0.073 1
平均值(mean)	0.958 6	0.925 9	0.078 8	0.104 0	0.073 9
RSD/%	0.40	0.22	0.76	0.20	1.41

注(note): a~f, 同表 4

表 8 不同检测波长对相对校正因子的影响

Tab. 8 Effects of different detection wavelength on relative correction factors

波长(detection wavelength)/nm	相对校正因子(RCF)				
	$f_{a/b}$	$f_{a/c}$	$f_{a/d}$	$f_{a/e}$	$f_{a/f}$
328	0.957 8	0.926 7	0.079 7	0.106 3	0.073 9
330	0.954 9	0.923 5	0.079 4	0.103 9	0.075 1
332	0.961 0	0.922 8	0.078 8	0.102 9	0.075 8
平均值(mean)	0.957 9	0.924 3	0.079 3	0.104 4	0.074 9
RSD/%	0.32	0.22	0.58	1.67	1.28

注(note): a~f, 同表 4

2.6 色谱峰定位

对待测组分色谱峰进行准确定位是一测多评法需要解决的关键问题^[15]。本实验以橙皮苷为内参物,同时考察了保留时间差和相对保留时间(relative retention time, RRT) 2 种色谱峰定位方法。结果表明,保留时间差法所得结果差异较大,不宜作为本实

验的色谱峰定位方法。而所得芸香柚皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素与橙皮苷之间的相对保留时间的 RSD 均小于 3.0%,且不同仪器、不同色谱柱对相对保留时间的影响较小,因此选用相对保留时间法作为色谱峰定位方法,结果见表 9~10。

表 9 不同仪器对相对保留时间的影响

Tab. 9 Effects of different instruments on relative retention time

仪器 (instrument)	相对保留时间(RRT)				
	$t_{b/a}$	$t_{c/a}$	$t_{d/a}$	$t_{e/a}$	$t_{f/a}$
SHIMADZU LC-2010CHT	0.897	1.218	1.862	2.038	2.180
SHIMADZU LC-20A	0.901	1.217	1.855	2.086	2.167
Agilent 1100	0.912	1.231	1.834	2.015	2.157
平均值(mean)	0.903	1.222	1.850	2.046	2.168
RSD/%	0.86	0.64	0.79	1.77	0.53

注(note): a~f, 同表 4

表 10 不同色谱柱对相对保留时间的影响

Tab. 10 Effects of different columns on relative retention time

色谱柱 (column)	相对保留时间(RRT)				
	$t_{b/a}$	$t_{c/a}$	$t_{d/a}$	$t_{e/a}$	$t_{f/a}$
OSAKA CAPCELL PAK C ₁₈	0.897	1.218	1.862	2.038	2.180
Exmere Exsil Mono C ₁₈ -ST	0.914	1.204	1.941	2.152	2.329
GL Inertsil ODS-3	0.928	1.193	1.888	2.088	2.247
Phenomenex Luna C ₁₈ (2)	0.899	1.217	1.864	2.049	2.186
Agilent TC-C ₁₈	0.901	1.211	1.873	2.094	2.262
平均值(mean)	0.908	1.209	1.886	2.084	2.241
RSD/%	1.44	0.86	1.73	2.16	2.73

注(note): a~f, 同表 4

2.7 QAMS 法与 ESM 法的比较

精密称取 15 批陈皮粉末约 0.2 g,按“2.1.2”项方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图及峰面积,分别采用 QAMS 法与 ESM 计算各成分含量,结果见表 11,对 2 种方法的含量测定结果进行 *t* 检验,结果表明,2 种方法测得的各成分含量结果无显著性差异($P > 0.05$),表明采用 QAMS 法测定陈皮中黄酮类成分的含量可行、可靠。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的考察

分别考察了提取方法(振摇、超声、回流提取)、提取溶剂(50% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、95% 乙醇)、

提取时间(30、45、60 min)及溶剂体积(10、25、50 mL)对陈皮各成分提取效果的影响,对各个不同提取条件下芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素的含量进行测定。结果发现超声提取时各成分提取率最高;甲

醇作为提取溶剂时,对各成分提取最充分;甲醇超声30 min即可基本提取完全,用时最短;采用25 mL与50 mL甲醇的提取效率几乎无差别,考虑节省溶剂,故提取溶剂体积为25 mL。因此,选用25 mL甲醇超声提取30 min作为陈皮的提取条件。

表 11 ESM 与 QASM 法测定的 15 批陈皮中 6 种黄酮的含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab. 11 Contents of 6 kinds of flavonoids in 15 batches of dried tangerine peel by ESM and QASM methods ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

编号 (No.)	橙皮苷 (hesperidin)	芸香柚皮苷 (narirutin)		香蜂草苷 (didymin)		川陈皮素 (nobiletin)		3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 (3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxy flavone)		橘皮素 (tangeretin)	
	ESM	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
S1	84.618 8	15.853 6	15.847 3	3.790 9	3.786 0	1.035 0	1.035 5	0.602 9	0.602 9	0.693 4	0.693 8
S2	84.173 9	15.768 9	15.762 6	3.903 7	3.898 7	1.328 2	1.328 8	0.615 7	0.615 7	0.874 9	0.875 4
S3	85.425 5	17.056 5	17.049 8	4.011 0	4.005 9	0.788 6	0.788 9	0.677 6	0.677 6	0.482 6	0.482 9
S4	84.363 6	17.021 8	17.015 0	3.851 1	3.846 1	0.682 1	0.682 4	0.648 0	0.648 0	0.422 7	0.423 0
S5	85.361 5	17.045 6	17.038 8	3.925 0	3.919 9	0.730 3	0.730 6	0.669 6	0.669 6	0.464 3	0.464 6
S6	86.431 7	21.092 1	21.083 7	3.405 0	3.400 6	0.359 7	0.359 9	0.789 8	0.789 8	0.196 3	0.196 4
S7	86.079 7	20.144 7	20.136 7	3.384 9	3.380 5	0.310 1	0.310 3	0.782 1	0.782 0	0.183 0	0.183 1
S8	86.032 2	20.163 6	20.155 6	3.448 3	3.443 9	0.327 8	0.327 9	0.761 1	0.761 1	0.182 6	0.182 7
S9	86.032 2	20.163 6	20.155 6	3.448 3	3.443 9	0.327 8	0.327 9	0.761 1	0.761 1	0.182 6	0.182 7
S10	87.745 8	21.041 7	21.033 3	3.482 4	3.477 9	0.330 4	0.330 5	0.788 1	0.788 1	0.183 0	0.183 1
S11	70.352 1	17.914 4	17.907 3	2.979 8	2.976 0	0.377 0	0.377 1	0.587 1	0.587 1	0.195 4	0.195 6
S12	75.512 1	17.514 9	17.507 9	2.983 1	2.979 3	0.354 2	0.354 3	0.587 2	0.587 2	0.183 1	0.183 2
S13	78.728 5	20.364 3	20.356 2	3.193 1	3.188 9	0.429 0	0.429 1	0.699 4	0.699 4	0.219 5	0.219 6
S14	81.839 0	19.168 1	19.160 5	3.086 6	3.082 6	0.448 2	0.448 4	0.731 6	0.731 6	0.229 9	0.230 0
S15	74.796 4	17.885 1	17.878 0	2.804 3	2.800 7	0.370 5	0.370 7	0.625 9	0.625 9	0.190 4	0.190 5

3.2 色谱条件的优化

本实验分别考察了不同体系的流动相(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液),结果表明,采用乙腈-0.1%甲酸溶液作为流动相进行梯度洗脱时,出峰效果最好,各峰分离度及峰形均较好。对本研究的6个黄酮类成分进行紫外扫描,可得6个黄酮类成分在283 nm和330 nm处有最大吸收,由于在330 nm波长下,各个色谱峰均有较大响应,且峰高比例相对适中,故最终以330 nm作为检测波长。此外,在柱温考察(25、30、35 $^{\circ}\text{C}$)方面,发现柱温的影响波动较小,确定柱温为30 $^{\circ}\text{C}$ 。因此,确定了“2.2”项下的色谱条件。

3.3 内参物的选择

《中国药典》2020年版一部以橙皮苷作为陈皮含量测定的指标性成分。在陈皮中橙皮苷含量最高、性质稳定、价廉易得,保留时间适中,有利于其他成分色谱峰的识别以及相对保留时间的计算,因此橙皮苷符合内参物的选择要求。

3.4 小结

在15批陈皮样品中,湖北随州的6个黄酮类成分总量均值为129.955 4 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,四川南部的为136.948 0 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,江西兴国的为121.883 5 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。四川南部产地的陈皮中6个黄酮类成分总含量明显高于湖北随州和江西兴国,可见不同产地的陈皮中黄酮类成分的含量差异较大,究其原因可能与产地的自然环境,如水土,温湿度等因素有关。因此,在临床使用等过程中应注意明确药材产地,从根源上对质量进行把控,进而确保药材的有效性。本研究首次建立了同时测定陈皮中6个黄酮类成分含量的QAMS法,该法操作简便、专属性强,线性及范围、精密度、重复性、稳定性、加样回收率均符合要求。各待测成分在不同品牌仪器、色谱柱及不同色谱条件下,相对校正因子的耐用性良好($\text{RSD} < 3.0\%$),符合相关要求。采用QAMS法与ESM法对15批陈皮中6个黄酮类成分进行含量测定,测定结果无显著性差异($P > 0.05$)。因此,可以在缺少芸

香柚皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、橘皮素对照品的情况下,以橙皮苷为内参物,通过相对校正因子计算含量,降低检测成本,节省检测时间。目前《中国药典》2020 版一部对于陈皮的含量测定仅以橙皮苷作为单一指标,不能较为全面地反映陈皮药材的总体质量。本研究中的 6 个黄酮类成分的生物活性均与陈皮传统功效相关^[5,7],本法可对陈皮的质量控制和评价提供科学参考。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020:199
ChP 2020. Vol 1[S]. 2020:199
- [2] 邓锋, 梁蔚阳. 陈皮质量研究进展[J]. 今日药学, 2012, 22(10):638
DENG F, LIANG WY. Research progress in chemical components of Citri Reticulate and its quality control methods[J]. Pharm Today, 2012, 22(10):638
- [3] 李占芳, 许伟, 宋建建, 等. HPLC-QAMS 法测定金果含片中哈巴苷、哈巴俄苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘红素、麦冬甲基黄烷酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B[J]. 药物评价研究, 2021, 44(9):1916
LI ZF, XU W, SONG JJ, *et al.* Determination of harpagide, harpagoside, narirutin, hesperidin, nobiletin, tangeretin, methyllophopogonanone A and methyllophopogonanone B in Jinguo Hanpian by HPLC-QAMS [J]. Drug Evaluat Res, 2021, 44(9):1916
- [4] 张珂, 许霞, 李婷, 等. 利用 UHPLC-IT-TOF-MS 分析陈皮的化学成分组[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(4):899
ZHANG K, XU X, LI T, *et al.* Profiling of Citri Reticulatae Pericarpium using UHPLC-IT-TOF-MS[J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(4):899
- [5] 郑昊. 一测多评及双标多测法对陈皮中黄酮类成分测定的研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨商业大学, 2021
ZHENG H. Study on the Determination of Flavonoids in Citri Reticulatae Pericarpium Quantitative Analysis of Multi-components by Single-marker and Two Reference Substances for Determination of Multiple Components [D]. Harbin: College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, 2021
- [6] 李思琦, 李华. 陈皮主要化学成分及质量控制研究进展[J]. 今日药学, 2020, 30(12):861
LI SQ, LI H. Advance of main chemical components and quality control of Citri Reticulatae Pericarpium [J]. Pharm Today, 2020, 30(12):861
- [7] 李柯柯, 任顺成. 陈皮中黄酮类化合物的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(17):221
LI KK, REN SC. The development of flavonoids in dried orange peel[J]. Food Res Dev, 2017, 38(17):221
- [8] 刘龙婵, 王星宇, 李林楠, 等. 青皮与陈皮化学成分及分析方法研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(11):2866
LIU LC, WANG XY, LI LN, *et al.* Research advances of chemical constituents and analytical methods of Citri Reticulatae Pericarpium Viride and Citri Reticulatae Pericarpium [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(11):2866
- [9] 王文昌, 徐猛, 赵益菲, 等. 超高效液相色谱法快速测定陈皮及其提取物中 4 种黄酮类化合物的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2022, 58(2):235
WANG WC, XU M, ZHAO YF, *et al.* Rapid determination of 4 flavonoids in dried tangerine peel and its extracts by ultra-high performance liquid chromatography [J]. Phys Test Chem Anal (Part B:Chem Anal), 2022, 58(2):235
- [10] 张婷婷, 梁燕, 彭灿. 不同方法提取陈皮中黄酮类有效成分含量比较[J]. 中国药业, 2021, 30(13):40
ZHANG TT, LIANG Y, PENG C. Comparison of flavonoids content in Pericarpium Citri Reticulatae extracted by different methods [J]. China Pharm, 2021, 30(13):40
- [11] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23):1925
WANG ZM, GAO HM, FU XT, *et al.* Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine[J]. China J Chin Mater Med, 2006, 31(23):1925
- [12] 秦昆明, 杨冰, 胡静, 等. 一测多评法在中药多组分质量控制中的应用现状与思考[J]. 中草药, 2018, 49(3):725
QIN KM, YANG B, HU J, *et al.* Application status and thinking of quantitative analysis of multi-components by single marker in quality control of multi-components traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(3):725
- [13] WANG CQ, JIA XH, ZHU S, *et al.* A systematic study on the influencing parameters and improvement of quantitative analysis of multi-component with single marker method using notoginseng as research subject [J]. Talanta, 2015, 134(1):587
- [14] PENG Y, ZHANG F, TAO H, *et al.* Simultaneous determination of multiple platycosides with a single reference standard in Platycodi Radix by high performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection [J]. J Sep Sci, 2015, 38(21):3712
- [15] 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, 50(9):2548
GAO XM, CHI YM, ZHANG W, *et al.* Application of fingerprint combined with QAMS in quality evaluation of Aurantii Immaturus Fructus. [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 50(9):2548

(收稿日期:2022-07-05)