

香橼、佛手中黄酮类成分含量测定及 HPLC 特征图谱研究

姜艳艳¹, 张乐¹, 刘娟¹, 孟祥娟¹, 周海燕², 刘斌^{1*}, 李军祥³

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 亚宝北中大(北京)制药有限公司, 北京 101300;
3. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

[摘要] 目的:建立香橼、佛手药材中黄酮类成分的含量测定方法及 HPLC 特征图谱。方法:采用高效液相色谱法对特征图谱进行研究,并对橙皮苷和柚皮苷进行含量测定,色谱柱为 Waters SunFire™ C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱,检测波长 284 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。结果:所建立的特征图谱可同时用于含量测定,香橼、佛手黄酮类成分分离度良好,柚皮苷线性范围为 0.190 4 ~ 1.142 4 μg ($r=0.999\ 5$),平均加样回收率为 102.98% ($n=6$);橙皮苷线性范围为 0.173 6 ~ 1.215 2 μg ($r=0.999\ 5$),枸橼中橙皮苷平均加样回收率为 101.19% ($n=6$),佛手中橙皮苷平均回收率为 99.11% ($n=6$)。结论:所建立的特征图谱及含量测定方法快速、准确、可靠,为香橼、佛手药材的质量控制方法提供科学依据,可用于香橼、佛手质量的科学评价。

[关键词] 香橼; 佛手; 特征图谱; 含量测定; 橙皮苷; 柚皮苷
[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0103-05
[doi] 10.11653/syjf2013200103
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130808.1523.005.html>
[网络出版时间] 2013-08-08 15:23

Determinnaiton of Flavonoids and Study on HPLC Characteristic Spectrum of Citrus Fructus and Citrus Sarcodactylis Fructus

JIANG Yan-yan¹, ZHANG Le¹, LIU Juan¹, MENG Xiang-juan¹, ZHOU Hai-yan², LIU Bin^{1*}, LI Jun-xiang³

(1. School of Chinese Pharmacy of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Yabao Beizhongda (Beijing) Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing 101300, China;
3. Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination and characteristic spectrum of flavonoids in Citrus Fructus and Citri Sarcodactylis Fructus. **Method:** Chromatographic analysis was carried on the coloumn of Waters SunFire™ C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was set at 284 nm and the coloumn temperature was 30 ℃. **Result:** The flavonoids compounds were base-isolated in HPLC characteristic spectrum. The linear range of hesperidin was 0.173 6-1.215 2 μg ($r=0.999\ 5$), the average recovery was 101.19% ($n=6$) in *Citrus medica*, and the average recovery was 99.11% ($n=6$) in Citri Sarcodactylis Fructus. The linear range of naringin was 0.190 4-1.142 4 μg ($r=0.999\ 5$), the average recovery was 102.98% ($n=6$). **Conclusion:** The method is rapid, accurate and reliable, and can be applied to the quality control of Citrus Fructus and Citri Sarcodactylis Fructus.

[Key words] Citrus Fructus; Citrus Sarcodactylis Fructus; characteristic spectrum; determination; hesperidin; naringin

[收稿日期] 20130514(020)
[基金项目] 国家重大新药创制项目(2010ZX09102-211)
[第一作者] 姜艳艳, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel:010-84738628, E-mail: jyyjm1129@163.com
[通讯作者] * 刘斌, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础与质量控制研究, Tel:010-84738629, E-mail: liubinyn67@163.com

香橼为芸香科植物枸橼或香圆的干燥成熟果实,味辛、微苦、酸,温,归肝、脾、胃、肺经,具有疏肝解郁、理气和中、燥湿化痰的功效^[1]。佛手为芸香科植物佛手的干燥果实,为枸橼的变种,味辛、苦,温,归肝、脾、胃、肺经,具有疏肝理气、和胃止痛、燥湿化痰的功效^[2]。已有研究表明,香圆和枸橼虽同称为香橼,但二者所含主要化学成分不同,香圆含有柚皮苷而不含橙皮苷,枸橼含橙皮苷而不含柚皮苷^[3-6],《中国药典》(2010 年版,一部)香橼药材含量测定项下^[1],以香圆中柚皮苷作为指标成分,而未提及另一品种枸橼的质量控制指标。佛手中主要化学成分与枸橼相同,含有橙皮苷而不含柚皮苷,《中国药典》2010 年版佛手药材含量测定项下以橙皮苷作为质量控制指标^[1]。市场上香橼药材的主要流通品种为香圆,枸橼较为少用。在临床应用方面,广东一带临床上常以枸橼的变种佛手代替枸橼用药^[7-10]。鉴于香圆、枸橼、佛手 3 种药材在品种来源、化学成分、市场流通及临床应用方面的异同,为规范香橼的品种来源,完善质量标准,本文建立了三者黄酮类化合物的 HPLC 特征图谱,并采用特征图谱测定方法,对主要指标成分橙皮苷和柚皮苷进行含量测定^[11],为科学评价三者质量和临床正确使用提供科学依据。

1 仪器与试药

Waters 高效液相色谱仪,包括 1525 型二元高压梯度泵系统,2998 型 PDA 检测器,2414 型柱温控制系统,2707 型自动进样系统(美国 Waters 公司)。Sartorius BT 25S 型 1/10 万电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司),KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

柚皮苷、橙皮苷对照品均购自中国药品生物制品检定所(批号 柚皮苷 110722-200309,橙皮苷 110721-200613),乙腈(Merck 公司,色谱纯);屈臣氏重蒸水(液相用水);其他为分析纯,均购自北京北化精细化学品有限责任公司。

香圆 *Citrus wilsonii* Tanaka、枸橼 *Citrus medica* L.、佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 药材购自各地药材市场及药店,由北京中医药大学陈玉婷教授鉴定。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液

2.1.1 柚皮苷 精密称取柚皮苷对照品适量,用甲醇配制成每 1 mL 含柚皮苷 0.095 2 mg 的对照品溶液。

2.1.2 橙皮苷 精密称取橙皮苷对照品适量,用甲醇配制成每 1 mL 含橙皮苷 0.086 8 mg 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液

2.2.1 香圆 取香圆粉末(过 80 目筛)约 30 mg,精密称定,置锥形瓶中,加 50% 甲醇 50 mL,称定质量,加热回流提取 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.2.2 枸橼 取枸橼粉末(过 80 目筛)约 0.5 g,精密称定,置锥形瓶中,加 50% 甲醇 25 mL,称定质量,加热回流提取 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液 15 mL,蒸干,残渣加 50% 甲醇溶解并转溶至 10 mL 量瓶中,即得。临用前滤过。

2.2.3 佛手 取佛手粉末(过 80 目筛)约 1.0 g,精密称定,置锥形瓶中,加 50% 甲醇 25 mL,称定质量,加热回流提取 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,即得。临用前滤过。

3 色谱条件与系统适应性试验

Waters SunFireTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱(表 1),检测波长 284 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 2~20 μL。在上述色谱条件下,橙皮苷和柚皮苷与其他成分达到基线分离,各色谱峰分离良好。对照品及样品色谱图见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

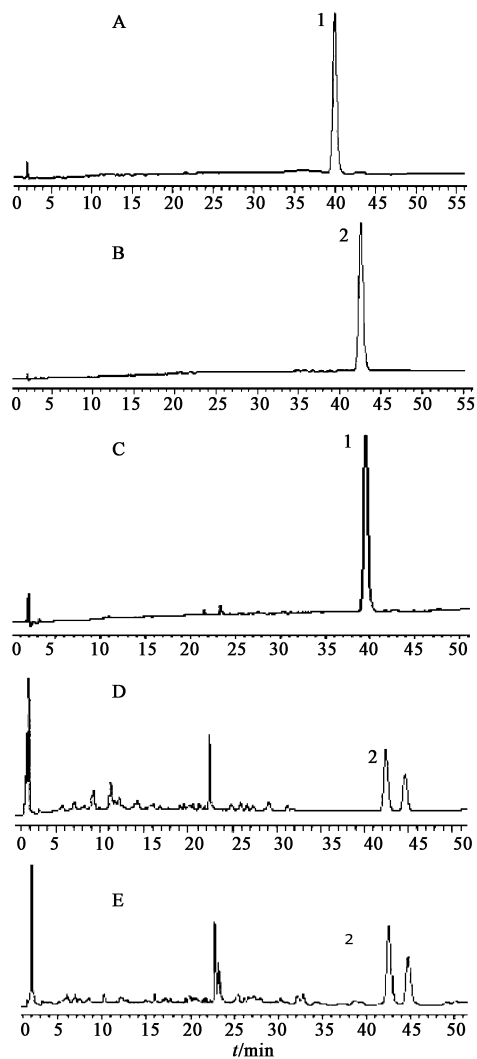
t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸/%
0	1	99
20	17	83
25	17	83
45	18	82
70	70	30

4 橙皮苷和柚皮苷的含量测定

4.1 线性关系考察

4.1.1 柚皮苷 精密吸取柚皮苷对照品溶液(0.095 2 g·L⁻¹)2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,12.0 μL,注入液相色谱仪,测定柚皮苷色谱峰峰面积。以对照品进样量为横坐标,以色谱峰峰面积为纵坐标,进行线性回归分析,得回归方程 $Y=200\,821X-40\,139$ ($r=0.999\,5$)。结果表明,柚皮苷在 0.190 4~1.142 4 μg 与色谱峰面积呈良好线性关系。

4.1.2 橙皮苷 精密吸取橙皮苷对照品溶液(0.086 8 g·L⁻¹)2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,14.0 μL,注入液相色谱仪,测定橙皮苷色谱峰峰面积。以对照



1. 柚皮苷;2. 橙皮苷;A. 柚皮苷对照品溶液;
B. 橙皮苷对照品溶液;C. 香圆供试品溶液;
D. 枸橼供试品溶液;E. 佛手供试品溶液
图 1 对照品及药材 HPLC 色谱

品进样量为横坐标,以色谱峰峰面积为纵坐标,进行线性回归分析,得回归方程为 $Y=162\,579X-37\,540$ ($r=0.999\,5$)。结果表明,橙皮苷在 $0.173\,6\sim1.215\,2\,\mu\text{g}$ 与色谱峰面积呈良好线性关系。

4.2 精密度试验

4.2.1 柚皮苷 精密吸取香圆同一供试品溶液 $20\,\mu\text{L}$,注入液相色谱仪,连续测定 6 次,测定柚皮苷色谱峰峰面积,计算得柚皮苷峰面积 RSD 为 0.80% 。

4.2.2 橙皮苷 精密吸取枸橼同一供试品溶液 $20\,\mu\text{L}$,注入液相色谱仪,连续测定 6 次,测定橙皮苷色谱峰峰面积,计算得橙皮苷峰面积 RSD 为 1.10% 。

4.3 稳定性试验

4.3.1 柚皮苷 精密吸取香圆同一供试品溶液,分

别于制备后 $0,2,4,8,12\,\text{h}$ 后进样,每次 $20\,\mu\text{L}$,测定柚皮苷色谱峰峰面积,计算柚皮苷色谱峰峰面积 RSD 为 0.66% 。结果表明供试品溶液在 $12\,\text{h}$ 内稳定。

4.3.2 橙皮苷 精密吸取枸橼同一供试品溶液,分别于制备后 $0,2,4,8,12\,\text{h}$ 后进样,每次 $20\,\mu\text{L}$,测定橙皮苷色谱峰峰面积,计算橙皮苷色谱峰峰面积 RSD 为 0.91% 。结果表明供试品溶液在 $12\,\text{h}$ 内稳定。

4.4 重复性试验

4.4.1 柚皮苷 精密称取香圆同一批样品 6 份,每份 $30\,\text{mg}$,按照 2.2.1 项下方法,分别制成供试品溶液。精密吸取各供试品溶液 $20\,\mu\text{L}$,注入液相色谱仪,测定柚皮苷色谱峰面积,计算含量, RSD 为 1.35% 。

4.4.2 橙皮苷 精密称取枸橼同一批样品 6 份,每份约 $0.5\,\text{g}$,按照 2.2.2 项下方法,分别制成供试品溶液。精密吸取各供试品溶液 $20\,\mu\text{L}$,注入液相色谱仪,测定橙皮苷色谱峰面积,计算含量, RSD 为 1.90% 。

4.5 加样回收率试验

4.5.1 香圆 精密称取香圆同一批样品 6 份,每份约 $15\,\text{mg}$,置 $50\,\text{mL}$ 锥形瓶中,各精密加入柚皮苷对照品溶液 $8.2\,\text{mL}$,按照 2.2.1 项下方法,制备样品溶液。精密吸取精密吸取各供试品溶液 $20\,\mu\text{L}$,注入液相色谱仪,测定柚皮苷色谱峰面积,计算回收率及 RSD,结果见表 2。

表 2 香圆中柚皮苷加样回收考察($n=6$)

取样量 /mg	样品中 含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
15.02	0.787 0	0.794 5	100.42	102.98	1.28
15.04	0.788 1	0.802 0	102.75		
14.99	0.785 5	0.809 4	103.6 9		
15.01	0.785 6	0.809 7	103.73		
15.02	0.787 0	0.811 3	103.94		
15.04	0.788 1	0.806 7	103.35		

注:加入量均为 $0.780\,6\,\text{mg}$ 。

4.5.2 枸橼 精密称取枸橼同一批样品 6 份,每份约 $0.25\,\text{g}$,置于 $50\,\text{mL}$ 锥形瓶中,各精密加入橙皮苷对照品溶液 $3.5\,\text{mL}$,按照 2.2.2 项下方法制备样品溶液。精密吸取各供试品溶液 $20\,\mu\text{L}$,注入液相色谱仪,测定橙皮苷色谱峰面积,计算回收率及 RSD,结果见表 3。

4.5.3 佛手 精密称取佛手同一批样品 6 份,每份

表 3 枸橼中橙皮苷加样回收考察(*n* = 6)

取样量 /g	样品中 含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.250 1	0.325 1	0.312 4	102.83	101.19	1.71
0.249 9	0.324 9	0.308 6	101.58		
0.250 2	0.325 3	0.301 4	99.21		
0.250 0	0.325 0	0.314 3	103.46		
0.250 1	0.325 1	0.305 2	100.46		
0.249 8	0.324 7	0.302 6	99.61		

注:加入量均为 0.303 8 mg。

约 0.5 g,置于 50 mL 锥形瓶中,各精密加入橙皮苷对照品溶液 2.5 mL。按照 2.2.3 项下方法,制备供试品溶液。精密吸取各供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,测定橙皮苷色谱峰面积,计算回收率及 RSD,结果见表 4。

表 4 佛手中橙皮苷加样回收考察(*n* = 6)

取样量 /g	样品中 含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.500 2	0.235 1	0.210 4	96.96	99.11	1.33
0.500 0	0.235 0	0.215 1	99.13		
0.499 8	0.234 9	0.217 6	100.29		
0.499 9	0.235 0	0.216 1	99.57		
0.500 1	0.235 0	0.217 9	100.43		
0.499 8	0.234 9	0.213 2	98.27		

注:加入量均为 0.217 0 mg。

4.6 样品含量测定 将 10 份不同购买地的香圆、枸橼和佛手样品,按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液 20 μL,香圆供试品溶液 20 μL,枸橼供试品溶液 2~20 μL,佛手供试品溶液 2~20 μL,分别注入液相色谱仪测定,计算含量,结果见表 5。

5 HPLC 特征图谱

5.1 精密度试验 精密吸取 2.2.1 项下香圆供试品溶液 20 μL,连续进样 6 次,测定特征图谱。结果表明,各特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,RSD 均 <3%,表明仪器精密度良好。

5.2 稳定性试验 精密吸取 2.2.1 项下香圆供试品溶液 20 μL,分别于制备后 0,2,4,6,8,12 h 进样。结果表明,各特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,RSD 均 <3%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

表 5 10 批药材中柚皮苷、橙皮苷含量测定

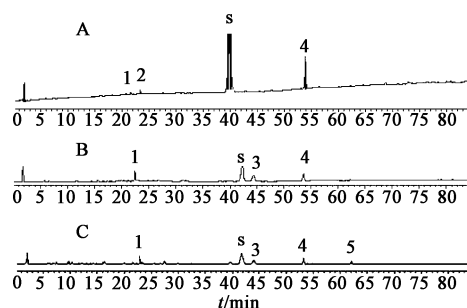
No.	香圆		枸橼		佛手	
	样品 来源	柚皮苷 /%	样品 来源	橙皮苷 /%	样品 来源	橙皮苷 /%
1	北京	4.64	郑州	0.083	北京	0.079
2	北京	3.68	河北	0.130	北京	0.047
3	北京	3.93	北京	0.163	成都	1.16
4	武汉	4.90	运城	0.116	北京	1.16
5	北京	4.20	昆明	0.095	成都	0.072
6	北京	2.98	安国	0.109	北京	0.030
7	北京	5.24	宜昌	0.184	北京	0.032
8	唐山	3.02	安国	0.116	北京	0.034
9	临沂	2.52	沈阳	0.081	北京	0.031
10	承德	2.88	杭州	0.148	北京	0.043

5.3 重复性试验 精密吸取 2.2.1 项下香圆供试品溶液 20 μL,重复进样 6 次。结果表明,各特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,RSD 均 <2%,说明该方法重复性良好。

5.4 特征图谱的建立及相似度评价 取 10 批香圆、枸橼、佛手药材粉末(80 目),精密称定,按供试品溶液的制备方法,制备成供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,测定特征图谱。其中香圆选择柚皮苷峰作为参照峰、枸橼和佛手选择橙皮苷峰作为参照峰。选择图谱中稳定性好、特征明显的色谱峰作为共有峰,其中香圆和枸橼共标定了 4 个共有特征色谱峰,佛手共标定了 5 个共有特征色谱峰。分别计算其他各特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值。将 10 批香圆、佛手药材 HPLC 特征图谱数据文件导入国家药典委员会开发的《中药指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)》,计算相似度,生成特征图谱(图 2)。对 10 批药材图谱进行匹配,相似度范围分别在 0.9~1.0,0.8~1.0,0.8~1.0。结果表明,因所购香圆、枸橼、佛手 10 批药材来源于不同产地,同一药材不同产地、不同市场来源之间存在一定差异,但药材整体相似度较高。

6 讨论

6.1 供试品溶液制备方法考察 对提取溶剂、提取方式、提取时间等因素进行了考察。提取溶剂是对实验结果影响较大的因素之一,试验中分别考察了 50% 甲醇、75% 甲醇、甲醇 3 种溶剂。分析比较所得图谱,香圆、枸橼、佛手 3 种药材均采用 50% 甲醇为提取溶剂时,成分提取最完全,图谱提供的信息量



A. 香圆; B. 枸橼; C. 佛手

图2 香橼、佛手药材 HPLC 特征图谱

最大。

提取方式也是对结果影响较大的因素。考察了加热回流提取和超声波振荡提取,分析比较所得的香圆、枸橼和佛手药材图谱,加热回流提取和超声波振荡提取所得的图谱信息量基本一致,因为加热回流对柚皮苷和橙皮苷的提取更完全,故采用加热回流。

6.2 检测波长选择 在 210 ~ 300 nm 对由二极管阵列检测器所得的色谱图中每 10 nm 波长的图谱进行分析比较,以色谱峰所代表的化学成分的信息量多少为指标,考虑香圆、枸橼、佛手中黄酮类成分的最大吸收波长,最终确定 284 nm 作为特征图谱和含量测定的检测波长。

6.3 流动相及梯度洗脱程度各溶剂比例选择 曾选择甲醇、乙腈、水、0.05% 磷酸和 0.1% 磷酸进行洗脱,结果发现用乙腈和 0.1% 磷酸洗脱时,各色谱峰分离度及峰形均较好。

7 结果分析

7.1 特征图谱分析 在 10 批药材的特征图谱分析测定中,香圆和枸橼中分别生成了 4 个峰面积相对较大的共有特征色谱峰,佛手中生成了 5 个共有特征色谱峰。其中枸橼的 4 个共有特征色谱峰与佛手相吻合,且均以橙皮苷为参照峰,二者与香圆并无共同共有特征峰。

7.2 含量测定结果分析 香圆以柚皮苷为含量测定指标成分,枸橼和佛手则以橙皮苷作为指标成分。从 10 批药材的含量测定结果可知,不同市场来源的药材含量差别较大。推测药材的质量受到产地、运输、储存等因素影响较大。

本实验结果表明,从所含化学成分物质基础及其含量角度分析,《中国药典》将香圆和枸橼作为香橼项下品种来源,以及将枸橼的变种佛手与枸橼分列有待商榷。本文的研究结果为 3 种药材的规范应用及质量标准的完善提供科学依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:242,167.
- [3] 李先端,朱景宁,顾雪竹,等. 枸橼药材质量研究[J]. 北京中医药大学学报,2007,30(10):703.
- [4] 朱景宁,毛淑杰,顾雪竹,等. HPLC 测定香橼中柚皮苷的含量[J]. 中国中药杂志,2007,32(3):265.
- [5] 朱景宁. 香橼药材化学成分及质量标准研究[D]. 北京:中国中医科学院,2007.
- [6] 毛淑杰,朱景宁,顾雪竹,等. 香橼药材高效液相指纹图谱研究[J]. 中药材,2007,30(8):933.
- [7] 王玉生,严振,汪小根,等. HPLC 法广佛手橙皮甙的含量[J]. 中药材,2003,26(8):564.
- [8] 尹锋,楼凤昌. 佛手化学成分的研究[J]. 中国药学杂志,2004,39(1):20.
- [9] 林乐维,蒋林,郝大庆,等. 不同产地广佛手药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中成药,2009,31(12):1805.
- [10] 张瑞芳,高幼衡,崔红花,等. 广佛手药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中草药,2007,38(7):1075.
- [11] 许栋明,程可建. RP-HPLC 同时测定温胆汤中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷和甘草酸[J]. 中国中药杂志,2011,36(1):45.

[责任编辑 邹晓翠]