

化橘红中香豆素类物质的高效液相色谱法测定

肖维强¹, 张超洪², 谢路斯², 戴宏芬¹, 黄炳雄¹, 王晓容^{1,*}

(1.广东省农业科学院果树研究所, 广东 广州 510640; 2.茂名市质量计量监督检测所, 广东 茂名 525011)

摘要:采用高效液相色谱(HPLC)法测定化橘红中的多种香豆素成分,并建立10种香豆素混合标准品的分离方法。这10种香豆素标准品是羟甲香豆素、香豆素、7-甲氧基香豆素、呋喃香豆素、6-甲基香豆素、5,7-二甲氧基香豆素、佛手内酯、欧前胡素、异欧前胡素和香柠檬素。10种香豆素的分离条件:分离柱 Nucleosil C₁₈反相柱(150mm×4.6mm, 3μm),流动相水-甲醇-乙腈,三元梯度洗脱,起始流速0.3ml/min,流速0.3~1ml/min,柱温35℃,分离波长315nm。标准品质量浓度范围为0.078~15.000μg/ml,回归方程的相关系数为0.999~1.000,线性关系极好。标准品连续5次进样和在48h内多次进样,保留时间和峰面积的相对标准偏差均不高于3.466%。对采自广东省茂名市化州市10个不同栽培地点的化橘红样品分析,除6-甲基香豆素和5,7-二甲氧基香豆素未在样品分离中出现外,化橘红样品含有其余的香豆素成分。10个样品间在香豆素含量上存在显著差异,其中7号样品含量最高,香豆素达1380μg/g干粉,异欧前胡素为1226μg/g干粉,分别达0.138%和0.123%。各样品中基本以香豆素和异欧前胡素这两种香豆素含量为主。

关键词:高效液相色谱(HPLC);化橘红;香豆素

Determination of Coumarins in Tomentose Pummelo Peel by HPLC

XIAO Wei-qiang¹, ZHANG Chao-hong², XIE Lu-si², DAI Hong-fen¹, HUANG Bing-xiong¹, WANG Xiao-rong^{1,*}

(1. Institute of Pomology, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. Maoming Supervision Testing Institute of Quality and Metrology, Maoming 525011, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography (HPLC) method for separating and determining 10 standard coumarins was developed, and was used to determine coumarins in Tomentose Pummelo Peel (*Exocarpium Citri Grandis*) collected from ten areas in Huazhou County. Ten standard coumarins were as follows: hymecromone, coumarin, 7-hydroxycoumarin, psoralen, 6-methylcoumarin, 5,7-dimethoxycoumarin, bergapten, imperatorin, isoimperatorin and bergamottin. Samples were chromatographed using reversed-phase Nucleosil C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 3μm), and the mobile phases A, B, C were water, methanol and acetonitrile respectively. Triple gradient elution started at 0.3 ml/min and proceeded at 0.3–1.0 ml/min. Operation conditions were set as follows: column temperature 35 °C, detection at 315 nm. Results showed that linear calibration of ten standard samples were within 0.078–15.000 μg/ml with correlation (*r*) 0.999–1.000. Relative standard deviation (RSD) of retention time and peak area were both below 3.466% in five consecutive tests or repeated tests during 48 h. Except 6-methylcoumarin and 5,7-dimethoxycoumarin, totally 8 coumarins were detected in all of the ten Tomentose Pummelo Peel samples with significant difference. No.7 sample was the richest in coumarins with coumarin content at 0.138% dried mass (DM) and isoimperatorin content at 0.123% DM. It indicated that coumarin and isoimperatorin were main coumarins in Tomentose Pummelo Peel.

Key words: HPLC; Tomentose Pummelo Peel; coumarin

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)24-0320-04

化橘红(*Exocarpium citri Grandis*, ECG)又名化州橘红,是芸香科(Rutaceae)柑橘属(*Citrus*)植物化州柚(*C. grandis* var. *Tanentosa* ahaort.)或柚(*C. grandis* Osbeck)的

栽培变种,生产于广东化州市,是广东名贵的药材^[1]。化州柚的未成熟或近成熟的干燥外层果皮经加工即为中药化橘红,具有化痰、理气、健胃消食作用,临床

收稿日期: 2008-12-17

基金项目: 广东省科技厅农业攻关项目(2006B20201045)

作者简介: 肖维强(1968—),男,高级农艺师,硕士,研究方向为果品加工及水果中保健成分的分析。E-mail: xwq6817@126.com

* 通讯作者: 王晓容(1954—),女,研究员,学士,研究方向为仪器分析。E-mail: wang999983@126.com

用于治疗风寒咳嗽、喉痒痰多、食积酒伤、呕恶痞闷等症^[2]。据研究报道,化橘红中的主要有效成分是黄酮类化合物、挥发油、香豆素类化合物和多糖,这些有效成分的分析方法主要是应用紫外光谱、核磁共振、气相-质谱联用、薄层扫描、HPLC和毛细管电泳等方法^[3]。香豆素是一类药理作用显著的化学成分,是化橘红的有效成分之一。国外对它们的药理有效成分的报道极少。Dugo等^[4]应用HPLC/API/MS技术,鉴定了甜橙、苦橙、香柠檬和柚子中的香豆素(coumarins)、补骨脂素(psoralens)和甲氧基黄酮(polymethoxylated flavones);植泽芳广^[5]报道用反相HPLC法可测定出葡萄柚果汁中的香柠檬亭、呋喃香豆素等物质。应用HPLC法分离测定样品中的香豆素,国内仅见一种^[6-7]或少数几种^[8-10]的研究报道。陈志霞等^[11]用薄层色谱法,测定出了化橘红样品中含有佛手内酯和异欧前胡素。应用HPLC法测定化橘红中多种香豆素的种类和含量,国内未见相关报道,本实验采用HPLC法,对采自广东化州市的10个不同生长地域的化橘红中的10种香豆素成分进行定性定量分析,建立用HPLC同时测定10种香豆素的方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

羟甲香豆素(hymecromone)、欧前胡素(imperatorin)、异欧前胡素(isoimperatorin)香豆素类标准品 中国药品生物制品检定所;香豆素(coumarin)、7-甲氧基香豆素(7-hydroxycoumarin)、6-甲基香豆素(6-Methylcoumarin)、5,7-二甲氧基香豆素(5,7-dimethoxycoumarin)、香柠檬亭(bergamottin) 美国Sigma公司;佛手内酯(bergapten) 上海友思生物技术有限公司;呋喃香豆素(psoralen) 美国IL公司;甲醇(色谱纯) 美国Fisher公司;蒸馏水(经Millipore纯水器过滤);其他试剂均为国产分析纯。

1100型高效液相色谱仪(配Agilent化学工作站和VWD检测器、手动进样器、20 μ l定量管) 美国Agilent公司;分离柱[填料为Nucleosil C₁₈反相柱(150mm \times 4.6mm, 3 μ m),卡套柱] 德国MACHEREY-NAGEL公司;Lambda 35型紫外-可见分光光度计 美国PE公司。

1.2 分离条件的确定

1.2.1 标准品吸收波长的确定

分别称取上述10种标准品,用甲醇溶解,90%的甲醇水溶液定容,配制成100 μ g/ml的标准品溶液,在分光光度计上扫描,扫描波长为190~400nm。

1.2.2 10种香豆素类物质的HPLC条件的确定

采用外标法。综合参考文献中几种香豆素的测定方法^[4-10],将各标准品配制成5 μ g/ml的标准溶液,根据各标准品的波长扫描结果,选择不同的流动相和波长,对单个标准品逐个分离,以得到最佳的分离效果。然后配制10种香豆素的混合标准品溶液,进行混合样品的分离,根据每次的分离结果调整色谱条件(流动相配比和波长),以期得到10种标准品的最佳分离度和峰型。

1.3 线性关系实验方法

将10种标准品按不同的最高质量浓度配制成混合标准品溶液,其中6-甲基香豆素最高质量浓度为15.000 μ g/ml,羟甲香豆素、香豆素、呋喃香豆素、5,7-二甲氧基香豆素和欧前胡素最高质量浓度为10.000 μ g/ml,香柠檬亭最高质量浓度为9.600 μ g/ml,异欧前胡素最高质量浓度为8.000 μ g/ml,7-甲基香豆素和佛手内酯最高质量浓度为5.000 μ g/ml。将上述最高质量浓度的混合标准溶液用90%的甲醇水溶液稀释定容,按2倍稀释,分别稀释2、4、8、16、32、64倍,共设7个浓度梯度。按确定好的分离条件进样分析,根据各标准品的浓度和峰面积,经化学工作站和Excel软件计算,得线性回归方程和相关系数(R^2)。

1.4 样品的采集和处理

将化州柚整个切成片状,用开水烫1min,在65 $^{\circ}$ C条件下烘干打成粉,60%以上过60目筛。在65 $^{\circ}$ C烘至恒重,分别称0.200g于25ml容量瓶中,加30%的乙醇10ml浸泡过夜,超声波提取20min,停止10min,再超声波提取20min后,甲醇定容,静止后取上清液经0.5 μ m的微孔膜过滤进样。根据峰面积计算各样品中多种香豆素的含量。以上各样品均重复3次以上。

1.5 精密度及标准品稳定性实验

选择混合标准品的一个浓度,连续5次进样,并在0~48h内多次进样,选0、1、2、4、8、12、24、36、48h共9个点的分析结果,计算各标准品峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD,%)。

1.6 精密度实验

参照文献[12-13]的方法进行回收实验,计算回收率及其相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 标准品扫描结果及分离波长的选择

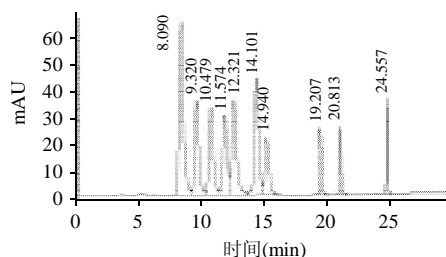
10种标准品在波长210~220nm和280~330nm之间有多个吸收峰,扫描结果见表1。根据10种标准品的扫描结果,选择所有标准品的分离波长为315nm。

表1 10种香豆素类物质190~400nm扫描结果
Table 1 UV absorbing peaks of ten standard coumarins

标准品名称	标准品的多个吸收峰位置(nm)
羟甲香豆素	221、308、330、340
香豆素	211.2、275.2、310
7-甲氧基香豆素	204.8、218、321.7、329.1
呋喃香豆素	208.5、245.5、292.1、327
6-甲基香豆素	205.3、215.9、277.3、321.7
5,7-二甲氧基香豆素	210.1、255.1、325.9
佛手内酯	21、269、300、321
欧前胡素	229、260、301
异欧前胡素	225、249、309
香柠檬亭	202.1、220.7、249.8、267.8、310.6

2.2 色谱条件

流动相A为水、B为甲醇、C为乙腈,三元梯度洗脱,起始流速0.3ml/min,梯度洗脱顺序是:50% B + 15% C/13min(流速0.3ml/min)、50% B + 20% C/2.5min(流速0.6ml/min)、50% B + 30% C/4.5min(流速0.8ml/min)、50% B + 45% C/2min(流速1ml/min)、50% B + 50% C/3min(流速1ml/min)、50% B + 50% C/5min(流速0.8ml/min)、50% B + 30% C/2min(流速0.6ml/min)、50% B + 15% C/3min(流速0.3ml/min);柱温35℃。在所选定的色谱条件下,10种标准品分离图见图1。



保留时间先后顺序为羟甲香豆素、香豆素、7-甲氧基香豆素、呋喃香豆素、6-甲基香豆素、5,7-二甲氧基香豆素、佛手内酯、欧前胡素、异欧前胡素、香柠檬亭;质量浓度为稀释2倍的混合标准品。

图1 10种混合标准品HPLC图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixture of hymecromone, coumarin, 7-hydroxycoumarin, psoralen, 6-methylcoumarin, 5,7-dimethoxycoumarin, bergapten, imperatorin, isomerimperatorin and bergamottin

2.3 10种标准品的线性关系

根据仪器分析结果,10种混合标准品的峰面积(Y)对质量浓度(X)作图,得到相应的回归方程及相关系数(表2)。10种标准品在所选定的色谱条件下和质量浓度范围内,线性关系良好。

表2 10种混合标准品回归方程及相关系数
Table 2 Regression equation and correlation coefficient of 10 standard coumarines

标准品名称	回归方程	相关系数
羟甲香豆素	$Y=297.560X + 24.295$	0.999
香豆素	$Y=156.140X + 7.087$	0.999
7-甲氧基香豆素	$Y=299.690X + 9.875$	0.999
呋喃香豆素	$Y=138.830X + 7.574$	0.999
6-甲基香豆素	$Y=126.000X + 6.740$	0.999
5,7-二甲氧基香豆素	$Y=213.260X + 2.366$	0.999
佛手内酯	$Y=207.090X - 3.857$	1.000
欧前胡素	$Y=48.200X + 8.220$	0.999
异欧前胡素	$Y=82.526X + 8.324$	0.999
香柠檬亭	$Y=42.165X + 3.451$	0.999

2.4 样品的分离结果

按1.4节中的方法处理样品和所选择的色谱条件进行样分析,10个不同生长地点的化州柚中,均含有8种香豆素成分,结果见图2、表3。

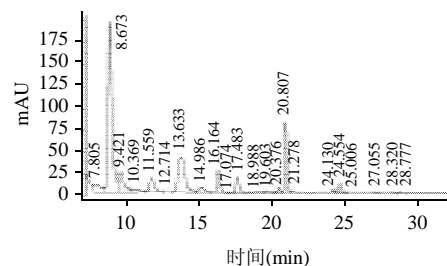


图2 化州柚3号样品的HPLC图

Fig.2 HPLC chromatogram of coumarins in No.3 Tomentose Pummelo Peel

在所选择的色谱条件下,化州柚30%的乙醇提取物得到了良好的分离(图2)。采自3个不同地域的样品中含

表3 10个不同产地化州柚中香豆素的含量

Table 3 Average coumarins contents in Tomentose Pummelo Peel collected from ten areas of Huazhou County

样品号	羟甲香豆素	香豆素	7-甲氧基香豆素	呋喃香豆素	佛手内酯	欧前胡素	异欧前胡素	香柠檬亭
1	30.640 ^b	378.143 ^s	48.046 ^d	212.363 ^e	47.216 ^f	43.862 ^c	590.431 ^b	19.414 ^b
2	106.073 ^d	555.228 ^d	40.719 ^e	186.132 ^f	74.438 ^d		797.288 ^f	7.161 ^{cd}
3	127.413 ^b	555.682 ^d	73.447 ^b	412.278 ^a	95.242 ^b		1185.499 ^c	178.116 ^a
4	97.867 ^e	446.111 ^f	41.957 ^e	244.537 ^d	63.734 ^e		1195.597 ^{bc}	1.034 ^e
5	79.622 ^s	503.618 ^e	36.646 ^f	240.875 ^d	82.044 ^e		1108.402 ^d	1.924 ^e
6	120.846 ^e	363.920 ^b	41.178 ^e	121.995 ^s	41.401 ^s		878.071 ^e	
7	385.176 ^a	1380.076 ^a	110.958 ^a	380.855 ^b	155.683 ^a	50.778 ^a	1226.547 ^a	15.808 ^b
8	104.841 ^d	863.819 ^b		185.322 ^f	38.685 ^s	47.493 ^b	415.792 ⁱ	11.015 ^c
9	92.238 ^f	676.941 ^c	54.219 ^c	296.009 ^c	71.501 ^d	34.699 ^d	1207.361 ^b	
10	78.908 ^s	441.255 ^f	35.200 ^f	224.068 ^e	64.6208 ^e	45.159 ^{bc}	775.931 ^s	4.987 ^{de}

注:同一列中肩标不同字母者表示差异显著($P < 0.05$)。

有8种香豆素成分,其余为6~7种(表2)。在所选择的10种香豆素标准品中,6-甲基香豆素和5,7-二甲氧基香豆素未在样品分离中出现。经统计分析和对各样品中香豆素含量的多重比较,各样品间在含量上存在显著差异,其中7号样品含量最高,香豆素达1380 $\mu\text{g/g}$ 干粉、异欧前胡素为1226 $\mu\text{g/g}$ 干粉,分别达0.138%和0.123%。各样品中基本以香豆素和异欧前胡素这两种香豆素含量为主。

2.5 精密度及标准品稳定性实验

取混合标准品的一个质量浓度连续5次进样、在48h内不同时间多次进样,对其保留时间和峰面积进行统计分析,并计算相对标准偏差,列于表4。上述保留时间的相对标准偏差最高值为1.212%,说明仪器稳定且精密度高;标准品峰面积的相对标准偏差最高值为3.466%,说明混合标准品中除佛手内酯稳定性稍差外,其他样品在48h内稳定,所有标准品均能满足实验要求。

表4 10种标准品不同进样时间的保留时间和峰面积相对标准偏差

Table 4 RSD of retention time (RT) and peak area of ten standards samples analyzed at different time

标准品	连续5次进样		0~48h内9次进样	
	保留时间(min)	峰面积相对标准偏差(%)	保留时间(min)	峰面积相对标准偏差(%)
羟甲香豆素	0.841	3.185	0.860	2.745
香豆素	0.748	0.235	0.742	0.574
7-甲氧基香豆素	0.894	0.171	0.900	0.511
呋喃香豆素	1.015	0.247	1.001	0.697
6-甲基香豆素	1.041	0.142	1.020	0.511
5,7-二甲氧基香豆素	1.031	2.120	1.035	2.281
佛手内酯	1.212	3.112	1.123	3.466
欧前胡素	0.232	0.807	0.278	1.229
异欧前胡素	0.189	0.739	0.270	1.184
香柠檬亭	0.028	0.436	0.064	1.101

2.6 精密度实验

在所选择的分析条件下,10种标准品均能得到良好的回收效果(表5),分析条件能满足实验要求,方法稳定、结果可靠。

表5 标准品回收率及回收率的相对标准偏差

Table 5 Recovery and RSD of ten standard coumarins

标准品	回收率(%)	相对标准偏差(%)
羟甲香豆素	102.97	3.137
香豆素	101.35	4.247
7-甲氧基香豆素	105.72	1.596
呋喃香豆素	98.17	3.912
6-甲基香豆素	102.72	2.121
5,7-二甲氧基香豆素	102.89	1.596
佛手内酯	102.91	1.581
欧前胡素	100.96	1.414
异欧前胡素	97.42	3.190
香柠檬亭	99.94	2.116

3 结 论

本实验应用HPLC技术,建立了同时测定多种香豆素的方法,并对化州橘红香豆素的种类进行了定性定量测定,结果表明:化州橘红中含有8种香豆素,以香豆素和异欧前胡素为主,弥补了以往研究的不足。另外,对于化州市不同地域和标准化栽培模式下,化橘红中香豆素的含量、化橘红在生长过程中香豆素含量的动态变化等,还需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 古淑仪,宋晓虹,苏薇薇.化州柚中香豆素成分研究[J].中草药,2005,36(3): 341-343.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中国药典:一部[M].2000版.北京:化学工业出版社,2000.
- [3] 黄飞龙,马三梅.化橘红主要有效成分的分析方法[J].安徽农业通报,2007,13(3): 26-28.
- [4] DUGO P, MONDELLO L, DUGO L, et al. LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000, 24(1): 147-154.
- [5] 植泽芳广.用HPLC全面检测柑橘果汁中的呋喃香豆素衍生物[J].杜旭,摘.国际中医中药杂志,2006,28(3): 175.
- [6] 张芳,黎定标. HPLC法测定羌活提取物中的异欧前胡素含量[J].南昌高专学报,2007(3): 107-108.
- [7] 高幼衡,刁远明,彭新生,等. HPLC法测定广佛手中5,7-二甲氧基香豆素的含量[J].中药新药与临床药理,2003,14(4): 250-251.
- [8] 钟镜金,刘占强,曾元儿,等. HPLC法测定五指毛桃药材中的补骨脂素和佛手柑内酯的含量[J].中药新药与临床药理,2007,18(2): 126-128.
- [9] 杨宪,杨水平,张雪.蛇床子药材的高效液相色谱指纹图谱[J].药学学报,2007,42(8): 877-881.
- [10] 邓捷圆,高广慧,赵春杰,等. HPLC法同时测定不同产地白芷中2种香豆素的含量[J].沈阳药科大学学报,2004,21(5): 354-357.
- [11] 陈志霞,林励,孙冬梅.化橘红中香豆素类成分薄层色谱指纹图谱研究[J].中南药学,2005,28(1): 234-237.
- [12] 肖维强,黄炳雄,王晓容,等. HPLC法测定龙眼肉中的几种核苷类物质[J].食品科学,2007,28(1): 9-11.
- [13] 戴宏芬,赖志勇,李建光,等.黄皮和杨梅果肉中绿原酸、表儿茶素及芦丁含量的HPLC测定[J].华中农业大学学报,2008,27(3): 445-449.