

引用本文:魏莹,肖莉,杨兰,等.不同产地佛手的香叶木苷及橙皮苷含量同时测定法[J].安徽医药,2021,25(1):32-34.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.01.008.

◇ 药物分析 ◇



不同产地佛手的香叶木苷及橙皮苷含量同时测定法

魏莹¹,肖莉²,杨兰¹,廖思维¹,李艳平¹,张建武¹

作者单位:¹川北医学院药学院药物研究所,四川 南充 637000;

²四川大学华西基础医学与法医学院,四川 成都 610041

通信作者:张建武,男,副教授,硕士生导师,研究方向为心脑血管疾病和抗肿瘤方面,E-mail:jnzw25@qq.com

基金项目:南充市校科技战略合作专项(19SXHZ0231);川北医学院2015年校级科研发展项目(CBY15-A-YB22)

摘要: 目的 佛手药材中香叶木苷和橙皮苷含量测定方法的建立。方法 2015年9月至2018年6月,以Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,乙腈(A)-0.1%醋酸水(B)(20:80)等度洗脱为流动相,285 nm为检测波长,1.0 mL/min的流速,25 ℃的柱温,10 μL的进样量。结果 香叶木苷、橙皮苷进样量分别在12.32~616 ng($r=0.999\ 8$),8.128~1 016 ng($r=0.999\ 9$)范围内与峰面积呈良好线性关系,平均回收率($n=6$)分别为99.32%、100.87%;相对标准偏差(RSD)分别为2.29%、2.24%。结论 该法简便、准确、可靠,可作为佛手药材中香叶木苷、橙皮苷含量测定的有效方法。

关键词: 色谱法,高压液相; 芸香科; 含量测定; 佛手; 香叶木苷; 橙皮苷

Simultaneous determination of diosmin and hesperidin in bergamot from different areas

WEI Ying¹, XIAO Li², YANG Lan¹, LIAO Siwei¹, LI Yanping¹, ZHANG Jianwu¹

Author Affiliations: ¹College of Pharmacy, Institute of Medicine, North Sichuan Medical University, Nanchong, Sichuan 637000, China; ²West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: **Objective** Establishment of a method for determination of diosmin and hesperidin in bergamot medicinal materials. **Methods** From September 2015 to June 2018, the chromatographic column was Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was acetonitrile (A)-0.1% acetic acid water (B) in isometric elution (20:80). The detection wavelength was 285 nm and the flow rate was 1.0 mL min⁻¹ at 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The contents of diosmin and hesperidin had good linear relationship with the peak area in the ranges of 12.32~616 ng ($r=0.999\ 8$) and 8.128~1 016 ng ($r=0.999\ 9$) respectively, and the average recoverie rate ($n=6$) of five components was 99.32% with RSD of 2.29% and 100.87% with RSD of 2.24% respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable, and can be used as an effective method for the determination of diosmin and hesperidin in bergamot.

Key words: Chromatography, high pressure liquid; Rutaceae; Content determination; Bergamot; Diosmin; Hesperidin

佛手为临床常用理气药,具有疏肝理气,和胃止痛,燥湿化痰的作用,来源于芸香科植物佛手的干燥果实;常用于治疗肝胃气滞、胸胁胀痛、咳嗽痰多、胃脘痞满等症^[1]。佛手主要含有多糖类^[2]、挥发油类^[3-5]、香豆素类^[6]、酚酸类^[7]和黄酮类^[8]等多种生理活性物质。佛手中黄酮类成分除了橙皮苷外,还包括香叶木苷、胡萝卜苷、3,5,6-三羟基-3',4',7-三甲氧基黄酮、3,5,6-三羟基-4',7-二甲氧基黄酮等。文献报道,香叶木苷具有良好的生物学活性,有促进细胞生长^[9-10];诱导大鼠肝微粒体P450酶^[11];抗凝血和抗静脉血栓形成^[12-13];抗肿瘤等作用^[14-15]。中国药典

以黄酮中的橙皮苷含量作为质量控制指标。但尚未见对佛手香叶木苷、橙皮苷同时测定方法的相关报道。本研究于2015年9月至2018年6月建立同时测定佛手药材中香叶木苷、橙皮苷的含量测定方法,可为更好地控制佛手药材的质量提供方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器 昆山市超声仪器有限公司的超声波清洗器(KQ-500);赛多利斯科学仪器有限公司的十万分之一电子天平(BT25S);安捷伦科技有限公司的高效液相色谱仪(Agilent-1260)。

1.2 试药 佛手药材,经生药学杨兰老师鉴定其

来源于芸香科植物佛手的干燥果实;对照品:香叶木苷(购于成都瑞芬思生物科技有限公司,批号D-005-161010),纯度 $\geq 98.5\%$,橙皮苷(自制,采用核磁共振碳谱,氢谱和电喷雾电离质谱鉴定,含量采用HPLC峰面积归一化法测定 $\geq 98\%$);水为纯水(自制, pinchengPCJ-10纯化仪);乙腈HPLC级;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备 取香叶木苷、橙皮苷对照品适量,精密称定,分别置10 mL容量瓶中,香叶木苷先用少量的二甲基亚砜(DMSO)将对照品完全溶解再加甲醇定容,制成香叶木苷对照品母液;橙皮苷用甲醇溶解,定容至刻度线,即得橙皮苷对照品母液。分别各取对照品母液1 mL,置同一10 mL容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液(香叶木苷、橙皮苷30.80、20.32 $\mu\text{g/mL}$)。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取佛手粉末(过五号筛)约1 g,于锥形瓶中,精密移取25 mL甲醇,称定重量,以500 W,40 kHz频率超声提取1.5 h,放冷,再称定重量,甲醇补重,摇匀,过0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液为供试品溶液。

2.3 色谱条件 DiamonsilC₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)的色谱柱;乙腈(A)-0.1%醋酸水(B)(20:80)的等度洗脱,1.0 mL/min的流速;285 nm的检测波长;25 $^{\circ}\text{C}$ 的柱温;10 μL 的进样量。色谱图见图1。

2.4 线性关系考察 精密称取对照品适量,加甲醇定容至刻度,摇匀,制得混合对照品母液(香叶木苷、橙皮苷分别为61.60,101.60 $\mu\text{g/mL}$)。然后稀释成香叶木苷、橙皮苷含量分别为46.20,50.80;30.80,20.32;15.40,10.16;1.23,0.81 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品。按上述色谱条件进行测定,以进样量(ng)为横坐标(X),色谱峰峰面积为纵坐标(Y),得香叶木苷和橙皮苷的线性方程分别为 $Y=0.824X+3.56$ ($r=0.999\ 7$), $Y=1.537X+5.16$ ($r=0.999\ 8$),线性范围分别为12.32~616.00,8.12~1 016.00 ng。

2.5 精密度试验 取香叶木苷、橙皮苷混合对照品

溶液10 μL (香叶木苷、橙皮苷质量浓度分别为32.24,21.16 $\mu\text{g/mL}$),在上述相同色谱条件下重复进样6次,测定香叶木苷、橙皮苷的峰面积,计算峰面积RSD值分别为0.68%,1.12%,表明精密度良好。

2.6 重复性试验 称取川佛手(2号)样品共6份,各约1 g,精密称定,按上述方法制备供试品溶液,进行含量测定,外标法计算含量,结果香叶木苷的平均含量为0.07%,RSD为2.20%;橙皮苷的平均含量为0.08%,RSD为2.60%;结果表明重复性良好。

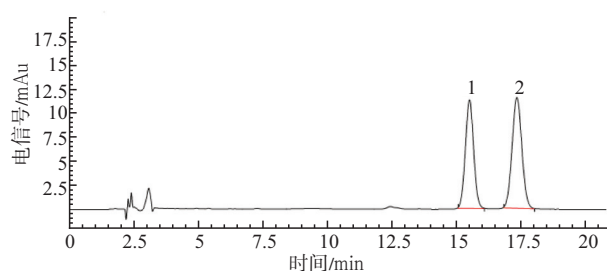
2.7 稳定性试验 取川佛手(2号)样品约1 g,精密称定,按上述方法制供试品溶液,分别在0,2,4,6,8,12 h进样10 μL ,测定其峰面积,香叶木苷、橙皮苷的峰面积的RSD分别为2.41%、2.88%,结果表明供试品溶液在室温下12 h内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取(9号)佛手样品共6份(9号药材中香叶木苷、橙皮苷的含量分别为0.053%、0.029%),每份约0.5 g,分别精密加入含香叶木苷、橙皮苷浓度分别为0.264、0.145 mg/mL的混合对照品溶液1 mL,参照上述方法制备样品溶液,再按上述色谱条件进行含量测定,结果见表1。

表1 准确度试验结果($n=6$)

待测成分	取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
香叶木苷	0.499 7	0.251 3	0.264	0.505 4	96.25	99.32	2.29
	0.499 3	0.251 1	0.264	0.515 7	100.24		
	0.497 4	0.250 1	0.264	0.505 2	96.62		
	0.495 8	0.249 3	0.264	0.516 1	101.04		
	0.497 9	0.250 4	0.264	0.518 4	101.54		
	0.500 0	0.251 5	0.264	0.516 1	100.25		
橙皮苷	0.499 7	0.144 6	0.145	0.286 9	98.13	100.87	2.24
	0.499 3	0.144 4	0.145	0.292 9	102.36		
	0.497 4	0.143 9	0.145	0.290 7	101.23		
	0.495 8	0.143 4	0.145	0.285 6	98.02		
	0.497 9	0.144 0	0.145	0.293 5	103.04		
	0.500 0	0.144 7	0.145	0.293 2	102.47		

2.9 样品含量测定 取14批佛手样品各1 g,精密称定,分别制备供试品溶液,测定其含量,外标法计算含量,见表2。



注:1—香叶木苷;2—橙皮苷

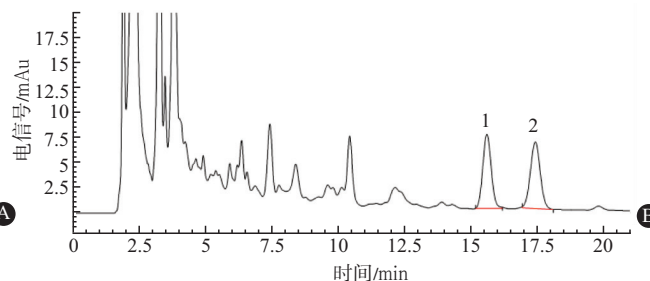


图1 HPLC法测定佛手药材香叶木苷和橙皮苷的含量的色谱图:A为混合对照品;B为样品

表2 不同产地佛手中香叶木苷、橙皮苷含量($n=4$)

编号	品种	采集/采购方式	香叶木 苷/%	橙皮 苷/%
1	川佛手	自采,四川南充市五星金方佛手GAP基地	0.077	0.096
2	川佛手	自采,四川南充市五星金方佛手GAP基地	0.070	0.064
3	川佛手	自采,四川南充市五星金方佛手GAP基地	0.079	0.075
4	川佛手	购于四川南充药业有限公司	0.119	0.157
5	建佛手	购于福建福州	0.036	0.038
6	佛手	购于云南	0.088	0.112
7	广西佛手	购于广西玉林药材市场	0.083	0.074
8	广西佛手	购于亳州	0.068	0.034
9	广东佛手	购于南宁毛源	0.053	0.029
10	广东佛手	广东一方药业,批号:120901	0.045	0.044
11	广东佛手	购于亳州市永刚饮片有限公司	0.028	0.018
12	广东佛手	购于广东肇庆	0.106	0.087
13	广东佛手	购于广东德庆批号:20150401	0.087	0.283
14	佛手	购于浙江杭州华东中药饮片有限公司	0.071	0.149

3 讨论

现今,关于佛手质量控制的报道很多^[16-19],但未见其香叶木苷、橙皮苷同时测定的方法的文献报道。橙皮苷和香叶木苷均为黄酮类成分,具有良好的生物学活性。本研究建立两成分同时测定的方法,并用于不同产地佛手香叶木苷、橙皮苷的含量测定,结果表明,不同产地佛手中两者含量相差较大,且其中有两个批次广佛手(9号,11号)中橙皮苷含量低于2020年版《中国药典》的规定值0.03%,未达到药典标准。文献报道香叶木苷对照品用甲醇溶解^[20],本研究参照文献采用超声和加热都不能使其完全溶解,故先加少量DMSO待香叶木苷溶解后慢慢加入甲醇,超声制得香叶木苷对照品母液。在供试品溶液制备中,考察了加热回流和超声提取法分别在1.0、1.5、2.0 h提取时间的提取率,结果表明,水浴加热和超声提取1.5和2.0 h,提取回收率均在95%(提取1.0 h回收率在80%左右)。超声提取操作简便,最终采用超声提取的方法提取1.5 h。流动相组成考察了甲醇-水,甲醇-0.1%醋酸水,乙腈-水,乙腈-0.1%醋酸水,发现采用乙腈-0.1%醋酸水(20:80)等度洗脱,两成分达到基线分离,且在20 min内完成分析。波长的选择方面,采用UV-1750紫外可见分光光度计,于200~700 nm波长范围内扫描香叶木苷、橙皮苷的对照品溶液,结果香叶木苷275 nm处有最大吸收;橙皮苷在283 nm处有最大吸收,由于两者洗脱时间接近,故不采用波长变化法进行测定。两者在285 nm处吸收均强,综合考虑选择285 nm为检测波长。

综上所述,本研究建立HPLC法同时测定佛手药材中香叶木苷、橙皮苷的含量,方法操作简便、准确可靠和重复性好,可快速准确测定佛手药材中这两种成分的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2020年版一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:185.
- [2] WU Z, LI H, TU D, et al. Extraction optimization, preliminary characterization, and in vitro antioxidant activities of crude polysaccharides from finger citron [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 44: 145-151.
- [3] 杨慧, 周爱梅, 林敏浩, 等. 佛手挥发精油提取及其药理研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(5): 1347-1352.
- [4] KIM KN, KO YJ, YANG HM, et al. Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) through blocking JNK, ERK and NF- κ B signaling pathways in LPS-activated RAW 264.7 cells [J]. Food and Chem Toxicol, 2013, 57: 126-131.
- [5] WU Z, LI H, YANG Y, et al. Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 46: 311-316.
- [6] 崔广林, 李隆云, 谭均, 等. 不同产地川佛手中8种化学成分的分析与评价[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(2): 250-260, 324.
- [7] BRUNO A, PANDOLFO G, CRUCITTI M, et al. Metabolic outcomes of bergamot polyphenolic fraction administration in patients treated with second-generation antipsychotics: a pilot study [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2017, 40: 32-35.
- [8] 钟艳梅, 冯毅凡, 郭姣. 基于UPLC-Q-TOF-MS的广佛手化学成分快速鉴定研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(12): 1965-1970.
- [9] 苏秀莉, 卢卫红, 张浩, 等. MTT法检测香叶木苷对脐静脉内皮细胞增殖抑制的影响[J]. 中医药信息, 2012, 29(6): 101-104.
- [10] 苏秀莉. 香叶木苷调控血栓靶蛋白的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012.
- [11] 崔明宇, 王美薇, 杨柳, 等. 蓬子菜香叶木苷对大鼠细胞色素P450酶活性影响[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2016, 32(4): 406-408.
- [12] 董坤, 寇韩旭, 宁馨, 等. 蓬子菜中香叶木苷对急性血瘀及血管内皮功能影响的实验研究[J]. 中医药信息, 2015, 32(6): 20-22.
- [13] 万晓晨, 董坤, 寇韩旭, 等. 蓬子菜中香叶木苷抗血栓形成作用的实验研究[J]. 中医药信息, 2014, 31(6): 4-7.
- [14] 张红, 周英钰, 卢卫红, 等. 香叶木苷抗肿瘤作用及机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 376-379.
- [15] 崔明宇, 崔铁琼, 刘媛媛, 等. 香叶木苷对人肝癌HepG₂细胞凋亡及Bcl-2/Bax基因表达的影响[J]. 药物评价研究, 2018, 41(11): 1958-1962.
- [16] 曾建伟, 吴锦忠, 林忠宁, 等. HPLC测定不同产地佛手中橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 97-99.
- [17] 林乐维, 蒋林, 郝大庆, 等. 不同采收期广佛手中5, 7-二甲氧基香豆素的含量测定[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(6): 15-17.
- [18] 孙全, 徐冲, 刘霞, 等. HPLC同时测定川佛手中的橙皮苷与5, 7-二甲氧基香豆素[J]. 华西药学杂志, 2017, 32(6): 646-648.
- [19] 魏莹, 陈珍, 杨兰, 等. HPLC法同时测定不同产地佛手中5个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(12): 2180-2184.
- [20] 徐晶晶, 徐超, 刘斌. 不同采收期薄荷中4个黄酮苷的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2077-2081.

(收稿日期: 2019-10-29, 修回日期: 2020-07-27)