

曾利, 李雪敏, 杨欢, 等. HPLC-DAD-CAD 法同时测定川佛手中 5 个成分的含量[J]. 环境化学, 2022, 41(6): 2143-2145.

ZENG Li, LI Xuemin, YANG Huan, et al. Simultaneous determination of five constituents in citri sarcodactylis fructus by HPLC-DAD-CAD[J]. Environmental Chemistry, 2022, 41(6): 2143-2145.

HPLC-DAD-CAD 法同时测定川佛手中 5 个成分的含量*

曾利 李雪敏 杨欢 龚倩倩 刘欣 韦佳依 邓放**

(西南特色中药资源国家重点实验室, 成都中医药大学药学院, 成都, 611137)

摘要 建立高效液相色谱-二极管阵列检测器-电雾式检测器(HPLC-DAD-CAD)法同时测定川佛手中香叶木苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素和诺米林等 5 个成分含量的方法. 研究结果表明, 川佛手中香叶木苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素和诺米林分别在 106.6—533 ng ($r=0.9998$)、102.4—512 ng ($r=0.9999$)、103.0—515 ng ($r=0.9999$)、82.2—411 ng ($r=0.9996$)、127.6—638 ng ($r=0.9994$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 105.04%、107.19%、98.39%、105.01%、94.33%, RSD 值分别为 1.96%、1.67%、2.72%、2.39%、0.45%. 8 批样品中橙皮苷、香叶木苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素和诺米林的百分含量分别为 0.026%—0.168%、0.036%—0.081%、0.064%—0.256%、0.016%—0.084%、0.068%—0.116%. 建立的 HPLC-DAD-CAD 测定 5 个成分含量的方法稳定可靠, 重复性好, 可为川佛手的质量控制方法研究提供参考.

关键词 佛手, 高效液相色谱-二极管阵列检测器-电雾式检测器, 香叶木苷, 橙皮苷, 5,7-二甲氧基香豆素, 柠檬苦素, 诺米林.

Simultaneous determination of five constituents in citri sarcodactylis fructus by HPLC-DAD-CAD

ZENG Li LI Xuemin YANG Huan GONG Qianqian LIU Xin
WEI Jiayi DENG Fang**

(State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 611137, China)

Abstract To establish a method for the simultaneous determination of diosmin, hesperidin, 5,7-dimethoxycoumarin, limonin and nomilin in Citri Sarcodactylis Fructus by high performance liquid chromatography coupled with diode array and charged aerosol detector (HPLC-DAD-CAD). Results: The concentrations of diosmin, hesperidin, 5,7-dimethoxycoumarin, limonin and normilin were 106.6—533 ng ($r=0.9998$), 102.4—512 ng ($r=0.9999$), 103.0—515 ng ($r=0.9999$) and 82.2—411 ng ($r=0.9996$), 127.6—638 ng ($r=0.9994$), respectively. The average recoveries were 105.04%, 107.19%, 98.39%, 105.01% and 94.33%, respectively. The average recoveries were 105.04%, 107.19%, 98.39%, 105.01% and 94.33%, respectively. RSD values were 1.96%, 1.67%, 2.72%, 2.39% and 0.45%, respectively. The contents of hesperidin, diosmin, 5,7-dimethoxycoumarin, limonin and nomilin in 8 batches of samples were 0.026%—0.168%、0.036%—0.081%、0.064%—0.256%、0.016%—0.084% and 0.068%—0.116%, respectively. Conclusion: The established HPLC-DAD-CAD method is stable, reliable and reproducible, which can provide a reference for the study of quality control methods of Citri Sarcodactylis Fructus.

* 四川省科技厅重点研发项目(2022YFN0068)。

Supported by Key R&D Projects of Sichuan Science and Technology Department (2022YFN0068)。

** 通信联系人 Corresponding author, E-mail: dengf99@163.com

Keywords citri sarcodactylis fructus, HPLC-DAD-CAD, diosmin, hesperidin, 5,7-dimethoxycoumarin, limonin, nomilin.

佛手为芸香科植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实, 主要含有黄酮类、香豆素类、挥发油类和柠檬苦素类化学成分^[1-3]。电雾式检测器(CAD)是近年来发展起来的一种新型通用检测器, 其响应值依赖于分析物的初始质量浓度而与分析物的化学性质无关, 尤其适用于皂苷类、糖类化合物等无紫外吸收或弱紫外吸收成分的分析与检测^[4-5]。本研究拟建立 HPLC-DAD-CAD 法同时测定川佛手中黄酮类、香豆素类和柠檬苦素类化合物含量的方法, 可为川佛手药材的质量控制方法的研究提供进一步的参考。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

Thermo Ultimate 3000 高效液相色谱仪、DAD-3000RS 检测器和 Corona Veo 电雾式检测器(赛默飞世尔科技有限公司); BS124S 万分之一分析天平和 BT25S 十万分之一分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); KQ3200E 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品香叶木苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素和柠檬苦素(四川恒诚致远生物科技有限公司, 批号分别为 2201009801、2201186901、1211325801、1211010301), 诺米林(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号 wq21051013), 纯度均 $\geq 98\%$ 。甲醇(分析纯, 成都市科隆化学品公司), 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司), 乙腈(色谱级, 美国 Fisher 公司), 甲酸(色谱级, 成都市科隆化学品公司), 二甲基亚砜(分析纯, 成都市科隆化学品公司), 怡宝纯净水。

川佛手药材共 8 批, 分别采集于四川省眉山市仁寿县(3 批)、四川省雅安市石棉县(4 批)及四川省内江市威远县(1 批), 经成都中医药大学龙飞副教授鉴定为芸香科植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实。

对照品溶液的制备 分别精密称取香叶木苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素、诺米林对照品适量, 其中香叶木苷加二甲基亚砜溶解, 其余对照品加甲醇溶解, 分别定容至 10 mL, 摇匀, 即得浓度分别为 533、512、515、411、638 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。分别精密吸取各对照品储备液适量制得不同浓度的混合对照品溶液。香叶木苷浓度分别为 53.30、26.65、21.32、13.33、10.66 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 橙皮苷浓度分别为 51.20、25.60、20.48、12.80、10.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5,7-二甲氧基香豆素浓度分别为 51.50、25.75、20.60、12.88、10.30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 柠檬苦素浓度分别为 41.10、20.55、16.44、10.28、8.22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 诺米林浓度分别为 63.80、31.90、25.52、15.95、12.76 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

供试品溶液的制备 精密称取川佛手粉末(过 2 号筛)约 1.0 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 30 mL, 称定重量, 超声处理(功率 150 W, 频率 40 kHz)30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

1.2 分析方法

色谱柱: Thermo Hypersil GOLD C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈为流动相 A, 0.1% 甲酸水溶液为流动相 B, 梯度洗脱(0—8 min, 20%A; 8—10 min, 20% \rightarrow 30%A; 10—15 min, 30%A; 15—17 min, 30% \rightarrow 53%A, 17—25 min, 53%A); 流速: 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL ; 检测波长: 254 nm; CAD 检测器雾化温度 35 $^{\circ}\text{C}$, 采集频率 10 Hz, 过滤常数 5.0 s。

2 结果与讨论

2.1 系统适应性

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪, 按照上述色谱条件进行检测, 混合对照品和供试品溶液的色谱图见图 1。

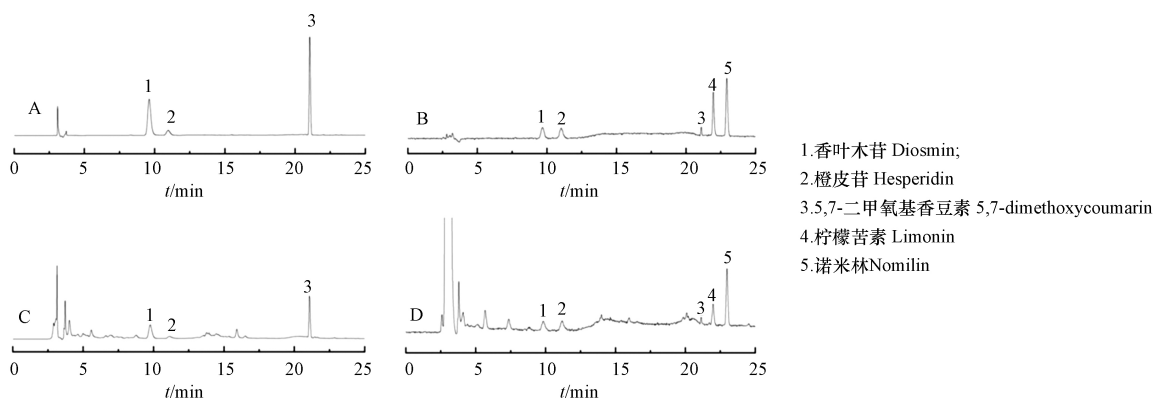


图 1 混合对照品和供试品溶液 HPLC 图

对照品(A: DAD 检测器 254 nm; B: CAD 检测器); 供试品(C: DAD 检测器 254 nm; D: CAD 检测器);

Fig.1 HPLC diagram of mixed reference substance and test substance solution

Reference solution (A: DAD detector 254 nm; B: CAD detector); Extraction solution (C: DAD detector 254 nm; D: CAD detector)

2.2 线性关系考察

分别精密吸取上述混合对照品溶液各 10 μL 按上述色谱条件进样测定, 以进样量为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 结果见表 1, r 均大于 0.999, 呈良好线性关系。

表 1 川佛手中 5 个成分的线性关系
Table 1 Linear relationship of the five components in Citri Sarcodactylis Fructus

成分	回归方程	r	线性范围/ ng
香叶木苷	$Y=26.892X+0.0712$	0.9998	106.6—533
橙皮苷	$Y=4.3514X+0.0081$	0.9999	102.4—512
5,7-二甲氧基香豆素	$Y=29.943X+0.1032$	0.9999	103.0—515
柠檬苦素	$Y=3.7400X+0.1339$	0.9996	82.2—411
诺米林	$Y=3.6195X+0.1970$	0.9994	127.6—638

2.3 精密性、稳定性、重复性试验

同一混合对照品溶液, 连续测定 6 次, 测得香叶木苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素、诺米林的 RSD 值分别为 0.51%、0.48%、0.29%、0.98%、1.61%, 表明仪器精密性良好。

精密称取川佛手粉末, 制备供试品溶液, 分别于 0、1、2、8、10、12 h 进行测定, 记录峰面积并计算 RSD 值。结果香叶木苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素、诺米林峰面积的 RSD 值分别为 1.90%、2.05%、1.65%、2.20%、0.82%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

精密称取取样品粉末 1.0 g, 制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 测得香叶木苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素、诺米林的平均含量分别为 0.8242、1.2044、0.9526、0.2358、1.1366 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 值分别为 1.62%、2.63%、0.98%、2.58%、1.81%, 表明方法重复性良好。

2.4 加样回收率试验

精密称取川佛手样品粉末 0.5 g, 平行 6 份, 分别加入 5 种成分对照品适量, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 结果香叶木苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素、诺米林的平均回收率分别为 105.04%、107.19%、98.39%、105.01%、94.33%, RSD 值分别为 1.96%、1.67%、2.72%、2.39%、0.45%。

2.5 样品测定

分别精密称取 8 批川佛手药材的粉末, 制备供试品溶液, 进行测定, 记录峰面积, 采用外标法计算香叶木苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素和诺米林的含量。结果显示, 8 批川佛手中橙皮苷、香叶木苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素和诺米林百分含量的范围分别为 0.026%—0.168%、0.036%—0.081%、0.064%—0.256%、0.016%—0.084%、0.068%—0.116%, 除一批样品外, 实验所测样品橙皮苷含量均合格, 5 个成分总含量为 0.31%—0.65%。

香叶木苷、橙皮苷和 5,7-二甲氧基香豆素等 3 个成分在紫外检测器下吸收较强, 254 nm 波长下色谱图基线平稳, 与 CAD 检测器相比响应更好, 灵敏度更高; 柠檬苦素和诺米林在 254 nm 波长下吸光度较弱, 在 210 nm 波长下吸光度强, 但色谱图基线漂移较大, 而在 CAD 检测器下信号较强, 灵敏度远大于 DAD 检测器, 故本实验采用 DAD 检测器在 254 nm 波长处对香叶木苷、橙皮苷和 5,7-二甲氧基香豆素进行检测, 采用 CAD 检测器对柠檬苦素和诺米林进行检测。各成分在不同检测条件下定量限(按 $S/N=10$ 计算)如表 2 所示。

表 2 定量限测定结果

Table 2 Limits of quantitation results

定量限/ ng	香叶木苷	橙皮苷	5,7-二甲氧基香豆素	柠檬苦素	诺米林
DAD检测器	26.65(254 nm)	102.4(254 nm)	1.03(254 nm)	978.6(210 nm)	671.6(210 nm)
CAD检测器	339.5	1506	572.2	82.2	63.8

3 结论

本实验采用 HPLC-DAD-CAD 技术建立同时测定川佛手中香叶木苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素、柠檬苦素和诺米林 5 种成分含量的方法, 操作简单、快速准确、重复性好, 为多指标控制川佛手药材质量奠定了实验基础。

参考文献 (References)

- [1] 胡瀚文, 赵永艳, 杨天龙, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 的川佛手化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 148-155.
- [2] 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.
- [3] 区耿华, 让一峰, 黄卓权, 等. 佛手提取物的化学成分和生物活性研究进展 [J]. 食品科技, 2021, 46(9): 169-174.
- [4] 斯乐婷, 倪鸿飞, 李倩, 等. HPLC-CAD 法同时测定腰痹通胶囊中 5 种皂苷含量 [J]. 药学学报, 2020, 55(10): 2449-2453.
- [5] 袁明昊, 魏蕊玲, 刘红梅, 等. 电雾式检测器在中药分析中的应用 [J]. 中成药, 2021, 43(7): 1852-1857.