

化橘红化学成分 HPLC-DAD-MS/MS 分析*

□刘群娣 谢春燕 闫李丽 徐新军** 杨得坡

(中山大学药学院 广州 510006)

摘 要:目的:分析化橘红中的主要化学成分,并比较这些化学成分在毛橘红与光橘红中组成和含量的异同。方法:采用 HPLC-DAD-MS/MS 对化橘红中一些主要化学成分进行定性研究。色谱柱为 Dikma Diamasil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为 0.5% 甲酸水-甲醇,流速为 350 μL·min⁻¹,进样量为 10 μL。质谱的离子源为电喷雾离子源,采用了正负离子模式两种扫描方式。结果:通过样品、对照品及文献中相应成分的质谱数据、紫外光谱信息归属了柚皮苷、野漆树苷等 13 个化合物,毛橘红中柚皮苷、野漆树苷、水合氧化前胡素和异欧前胡素的含量均明显高于光橘红。结论:HPLC-DAD-MS/MS 分析可以获得黄酮类及香豆素类化合物丰富的结构信息,为化橘红化学成分的定性提供了一种快速有效的方法,也为化橘红药材的质量控制提供更多科学依据。

关键词:化橘红 高效液相色谱-质谱联用法 化学成分

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.05.025

中国药典中规定化橘红为芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* 'Tomentosa' 或柚 *Citrus grandis* (L.) Os-berk 的未成熟或近成熟的干燥外层果皮。前者习称“毛橘红”,后者习称“光橘红”、“光七爪”、“光五爪”。具有散热,燥湿,利气,消痰之功效,用于风寒咳嗽,喉痒痰多,食积伤酒,呕恶痞闷^[1]。毛橘红是“十大广药”之一,普遍认为毛橘红疗效优于光橘红。化橘红中含有黄酮类、香豆素类和挥发油等多种成分,其中黄酮类成分柚皮苷常作为其质量控制指标成分。本文采用 HPLC-DAD-MS/MS 进行了化橘红的成分分析,确定或推测出化橘红中的一些主要成分,其中多

为黄酮类和香豆素类化合物。现代药理研究表明,化橘红中的黄酮类化合物具有抗炎、镇痛、解热之功效^[2-3],而一些香豆素类化合物具有抗氧化、抗菌抗病毒之功效^[4-5]。本文为化橘红化学成分的定性提供了一种快速有效的方法,也为化橘红药材的质量控制提供更多科学依据。

一、实验部分

1. 仪器和试剂

Waters 1525 型高效液相色谱仪(自动进样器, 2996 型二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站); Finnigan TSQ 型液相色谱-串联质谱联用仪(配有四元梯度输液泵,自动进样器,二极管阵列检测器,电喷雾

收稿日期: 2010-11-20

修回日期: 2010-12-06

* 广东省科技厅广东省部产学研项目(2010B090400533): 中药化学对照品制备关键技术及商业化运营平台的构建,负责人:徐新军;科学技术部国际科技合作项目(2009DFA31230): 基于澳洲 TGA 药材注册的南药质量评价体系研究,主持人:杨得坡。

** 通讯作者:徐新军,药物分析学博士,副教授,硕士生导师,主要研究方向:中药有效成分及质量评价研究, E-mail: xxj2702@sina.com。

离子源及 Xcalibur 1.3 数据处理系统);Mettler Toledo 电子天平;宁波新芝超声波清洗器。甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

毛橘红药材产地为广东化州,光橘红药材购自广州市药材公司,均经中山大学药学院徐新军副教授鉴定。柚皮苷、柚皮素、芹素对照品由广东省天然产物对照品研究开发中心提供,佛手内酯对照品购自迈瑞尔生物有限公司,原儿茶酸对照品购自同田生物有限公司,异橙皮内酯和水合橙皮内酯对照品均为自制。

2. 样品的制备

分别取 2 种化橘红药材粉末(20 目)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 25 mL,密塞,称定重量,浸泡一夜,超声(功率为 600 W,频率为 40 kHz)30 min,放凉后用甲醇补足减失的重量,0.22 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

分别取各种对照品适量,用甲醇溶解,混合,作为混合对照品溶液。

3. 测定条件

HPLC 条件:Diagramsil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相 A:0.5% 甲酸水溶液,流动相 B:甲醇,梯度洗脱程序:0~20 min,B 由 35%~65%;20~45 min,B 由 65%~70%;45~46 min,B 由 70%~90%;46~55 min,B 由 90%~98%;55~70 min,B 为 98%;检测波长:254、290、324 nm;柱温:室温;流速:350 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量:10 μL 。

质谱条件:离子源为电喷雾(ESI 源);原儿茶酸的检测在负离子扫描方式下进行,其他检测均在正离子扫描方式下进行;全扫描质荷比扫描范围 m/z :100~1000,MS² 质荷比扫描范围 m/z :50~600;喷雾电压:3600 V;毛细管温度:350℃;MS² 碰撞能量:25 eV。

二、结果与讨论

在 HPLC-DAD-MS/MS 测定中,

对于质谱图中显示的每种化学成分,均可以得到其保留时间、分子量、二级质谱分析和紫外扫描光谱图的信息,将这 4 个方面信息与标准品相对照,即可对化合物精确定性。

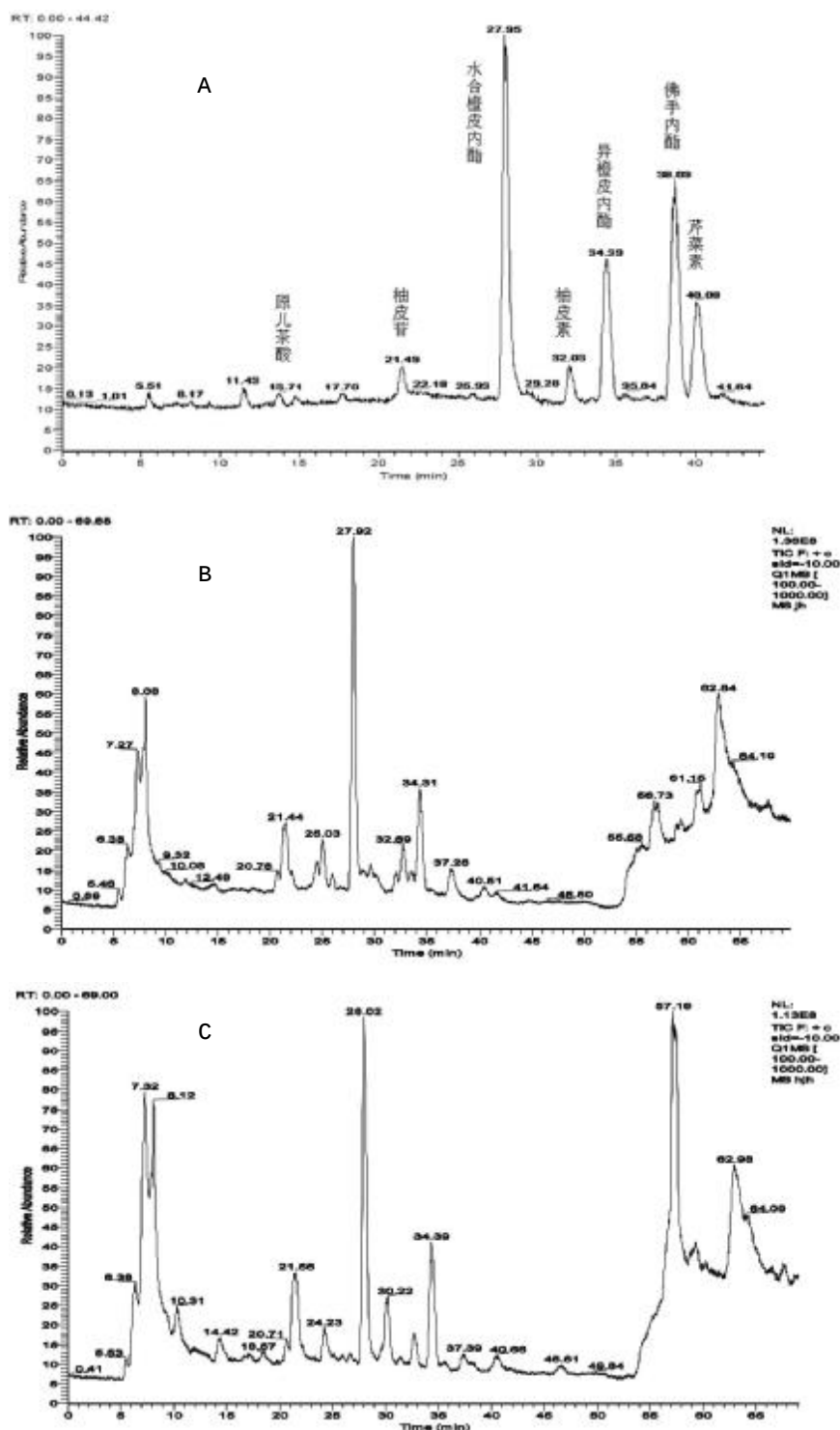


图 1 混合对照品(A)、光橘红(B)和毛橘红(C)的总离子流图

1. 光橘红与毛橘红中定性的化学成分

通过对照品定性的化学成分有:原儿茶酸、柚皮苷、水合橙皮内酯、柚皮素、异橙皮内酯、佛手内酯和芹菜素。混合对照、光橘红、毛橘红在正离子扫描方式下的总离子流图见图 1。

根据一级质谱分析,可找到各化合物的母离子,然后再进行二级质谱分析,优化条件使得能够产生表征化合物结构的子离子。根据黄酮类和香豆素类化合物的裂解规律,对应文献^[6-10]中已从化橘红中分离得到的化合物,归属出除原儿茶酸、柚皮苷、水合橙皮内酯、柚皮素、异橙皮内酯、佛手内酯、芹菜素外的柚(苷)配基-7-O-葡萄糖苷、野漆树苷、水和氧化前胡素、橙皮内酯、异欧前胡素和葡萄内酯 6 个化合物。这 13 个化合物的结构式见图 2,其一级质谱和二级质谱的结果见表 1。

其中 m/z 273 为柚皮苷与柚(苷)配基-7-O-葡萄糖苷的糖苷键断裂产生; m/z 271 为野漆树苷的糖苷键断裂产生; m/z 153 为柚皮素丢失苯酚基和一个羰基产生;在橙皮内酯、异橙皮内酯和橙皮内酯水合物中,支链断裂形成苯骈呋喃离子 m/z 189,丢失一个甲氧基产生 m/z 159,再丢失一个羰基产生 m/z 131; m/z 203 为水和氧化前胡素与异欧前胡素丢失支链

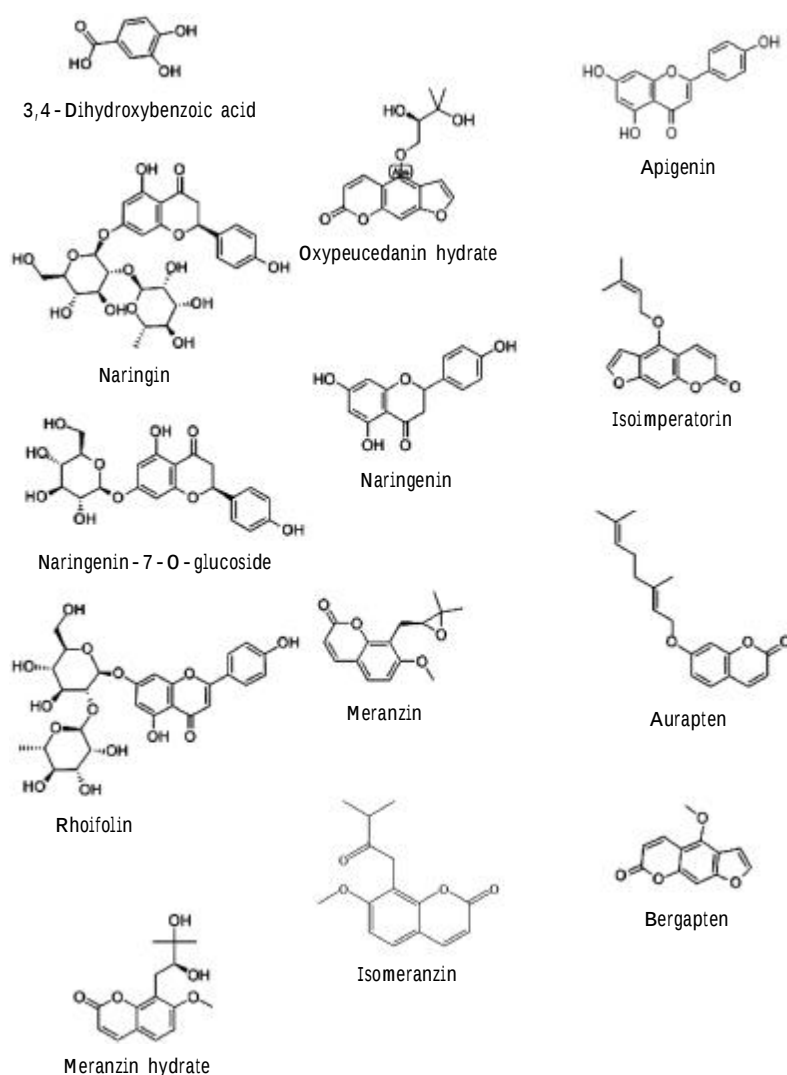


图 2 13 种化学成分的结构

表 1 归属的化学成分的质谱信息

化合物(分子量)	保留时间 min	母离子	碎片离子			分子式	
原儿茶酸 3,4-Dihydroxybenzoic acid(154.1)	13.37	153.0				C ₇ H ₆ O ₄	
柚皮苷 Naringin(580.5)	21.47	580.8	273.0	153.0	147.1	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	
柚(苷)配基-7-O-葡萄糖苷 Naringenin-7-O-glucoside(434.4)	22.25	434.9	273.0			C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	
野漆树苷 Rhoifolin(578.5)	24.27	579.2	271.0			C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	
水合橙皮内酯 Meranzin hydrate(278.3)	27.62	278.9	189.0	159.1	131.1	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	
水合氧化前胡素 Oxypeucedanin hydrate(304.3)	30.05	304.9	203.0	147.1		C ₁₆ H ₁₆ O ₆	
柚皮素 Naringenin(272.2)	31.91	272.9	153.0	147.1		C ₁₅ H ₁₂ O ₅	
橙皮内酯 Meranzin(260.3)	32.69	260.9	189.1	159.1	131.1	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	
异橙皮内酯 Isomeranzin(260.3)	34.35	261.0	203.0	159.1	147.1	131.1	C ₁₅ H ₁₆ O ₄
芹菜素 Apigenin(270.2)	40.02	271.0	131.0				C ₁₅ H ₁₀ O ₅
异欧前胡素 Isoimperatorin(270.3)	57.06	270.9	203.0	159.1	147.1	131.1	C ₁₆ H ₁₄ O ₄
葡萄内酯 Auraptin(298.4)	62.77	299.0	163.0				C ₁₉ H ₂₂ O ₃
佛手内酯 Bergapten(216.2)	38.82	216.8	203.0	147.1	131.0		C ₁₂ H ₈ O ₄

产生; m/z 163 为橙皮油内酯支链上的碳氧键断裂产生; m/z 147 和 m/z 131 为香豆素类化合物的特征离子,147 为香豆素 $[M+H]^+$, 再丢失一个氧产生 m/z 131。

2. 光橘红与毛橘红的化学成分对比

对两种化橘红的成分分析可以看出一些区别。在组成上,毛橘红中含有光橘红中所未检出的佛手内酯;在含量上,毛橘红的柚皮苷、野漆树苷、水合氧化前胡素和异欧前胡素均明显高于光橘红,在本实验的样品中($n=3$),分别是 1.5、3.7、20.1、23.8 倍。这些差距可能是毛橘红与光橘红药效差距的物质基础,需要进一步的研究。

三、结 论

HPLC-DAD-MS/MS 分析可以获得黄酮类及香豆素类化学物丰富的结构信息,为化橘红化学成分定性提供了一种快速有效的方法,也为化橘红药材的质量控制提供更多科学依据。HPLC-DAD-MS/MS 与传统的 HPLC、TLC 等方法相比,HPLC-DAD-MS/MS 不需复杂的样品制备过程,并且具有快速、精确、灵敏度高等优点,必将在中药研究中起到越来越重要的作用。

High Performance Liquid Chromatography-DAD-Mass Spectrometry Analysis of Citri Grandis Exocarpium

Liu Qundi, Xie Chunyan, Yan Lili, Xu Xinjun, Yang Depo

(School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The study is aimed to analyze components in Exocarpium citri grandis from Citrus grandis 'Tomentosa' and Citrus grandis (L.) Osbeck. HPLC-DAD-MS/MS was used to identify main components in citri grandis Exocarpium. The MS fragmentation regularity of flavonoid and coumarins were proposed. The mobile phase of HPLC was consisted of 0.5% formic acid in water and methanol. The analytical column was Dikma Diamonsil C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m). The flow rate was 350 μ L $\cdot$ min $^{-1}$. And the injection volume was 10 μ L. The ionization source was ESI in positive or negative ion mode. The result showed that naringin, rhoifolin and eleven other components were tentatively identified in chromatograms based on their retention time, reference standards, MS data and UV spectra comparison in published papers. The content of naringin, rhoifolin, oxypeucedanin hydrate and isoimperatorin in citri grandis Exocarpium from Citrus grandis 'Tomentosa' were higher than those in citri grandis Exocarpium from Citrus grandis (L.) Osbeck. It is concluded that the structural information was obtained through HPLC-DAD-MS/MS. It provides an accurate and fast method to identify components in citri grandis Exocarpium. More scientific information has been provided for quality control of citri grandis Exocarpium.

Keywords: Citri grandis Exocarpium, HPLC-DAD-MS/MS, chemical composition

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005:51.
- 2 吴宋夏. 化州橘红黄酮甙的抗炎、镇痛、解热作用研究. 广东医学院学报, 1988, 2:54-57.
- 3 李培波, 马燕, 杨宏亮, 等. 化州柚提取物的抗炎作用. 中草药, 2006, 37(2):251-253.
- 4 Luu H, Caple R, Kamperdick C, et al. Isomeranzin against Herpes simplex virus in vitro from Clausena heptaphylla (Roxb.) W. & Arn.: Isolation, structure and biological assay. Journal of Chemistry, 2007, 41(1):115-120.
- 5 Mokbel M, Suganuma T. Antioxidant and antimicrobial activities of the methanol extracts from pummelo (Citrus grandis Osbeck) fruit albedo tissues. European Food Research and Technology, 2006, 224(1):39-47.
- 6 雷海民, 孙文基, 林文翰. 化州橘红的化学成分研究. 西北药学杂志, 2000, 15(5):203-204.
- 7 陈志霞, 林励. 化橘红药材中香豆素成分的研究. 中药材, 2004, 27(8):577-578.
- 8 胡甜恬, 张晓琦, 赵慧男. 沙田柚皮中的香豆素类成分. 药学与临床研究, 2007, 15(2):121-123.
- 9 Mokbel M, Watanabe Y, Hashinaga F, et al. Purification of the antioxidant and antimicrobial substance of ethyl acetate extracts from Buntan (Citrus grandis Osbeck) fruit peel. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2006, 9(1):145-150.
- 10 袁旭江, 林励, 陈志霞. 化橘红中酚性成分的研究. 中草药, 2004, 35(5):498-500.

(责任编辑:李沙沙, 责任译审:王 晶)