

化橘红黄酮类成分 UPLC 与 HPLC 指纹图谱的比较研究

邓少东, 王莲婧, 林 励*, 肖凤霞, 帅 欧

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 比较超高效液相色谱(UPLC)法与 HPLC 法分析化橘红总黄酮指纹图谱的效果。方法 分别采用 UPLC 法与 HPLC 法对 17 批化橘红药材的黄酮类成分进行指纹图谱分析。结果 分别建立了化橘红黄酮类成分的 UPLC 与 HPLC 指纹图谱共有模式。其中 UPLC 法标识出 21 个共有峰, HPLC 法标识出 17 个共有峰, 17 批样品的相似度均大于 0.9。结论 2 种方法均可用于化橘红的质量控制, UPLC 法较 HPLC 法更高效、快速、灵敏。

关键词: 化橘红; 黄酮; 指纹图谱; 超高效液相色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)09-1195-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.09.025

Comparison on UPLC and HPLC fingerprints of flavonoids in *Citri Grandis Exocarpium*

DENG Shao-dong, WANG Lian-jing, LIN Li, XIAO Feng-xia, SHUAI Ou

School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To compare the UPLC and HPLC fingerprints of flavonoids in *Citri Grandis Exocarpium* (CGE). **Methods** The HPLC and UPLC methods for analyzing the fingerprint of 17 samples were established respectively. **Results** There were 21 mutual peaks selected from UPLC chromatography and 17 mutual peaks selected from HPLC chromatography. The similarity of 17 samples was over 0.9. **Conclusion** Both the UPLC and HPLC methods could be used for the quality control of CGE. Compared to HPLC, the UPLC method is efficient, quickly, and sensitive.

Key words: *Citri Grandis Exocarpium*; flavonoids; fingerprint; UPLC; HPLC

化橘红为芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* ‘Tomentosa’ 或柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥外层果皮, 临床用于治疗风寒咳嗽、喉痒痰多等症^[1]。化橘红主要含柚皮苷、野漆树苷、柚皮素等黄酮类有效成分^[2-3], 以往多采用柚皮苷量为指标评价化橘红的质量^[4-5], 难以科学地评价其真伪优劣; 尽管 HPLC 指纹图谱法的应用^[6-7]改进了化橘红质控标准, 但却存在耗时长、洗脱条件复杂、色谱峰漂移明显等缺陷, 为此本课题组开展了本研究。

1 仪器与材料

美国 Waters Acquity UPLC 系统(QSM 四元溶剂管理系统、FTN 样品管理系统自动进样器、CH—A 型柱温箱、UPLC 专用二极管阵列检测器、真空脱气机、Empower3 色谱工作站), 美国 Waters Alliance

HPLC 系统(E2695 型四元泵、自动进样器、柱温箱、2998 型二极管阵列检测器、真空脱气机、Empower3 色谱工作站), BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司), KQ—500 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

乙腈、甲醇色谱纯, 德国默克公司; 冰醋酸购于天津市科密欧; 石油醚分析纯, 广东光华有限公司; 水为实验室自制超纯水; 柚皮苷、野漆树苷、柚皮素对照品均为自制, 质量分数分别为 98.21%、99.32%、98.68%, 芹菜素(北京恒元启天化工技术研究院, 批号 520-36-5), 质量分数大于 98%; 17 批化橘红样品(S1~S17)于 2011 年 5 月采自化州市化橘红 GAP 基地, 经广州中医药大学中药学院林励研究员鉴定, 其原植物均为化州柚 *Citrus grandis* ‘Tomentosa’。

收稿日期: 2012-07-15

基金项目: 国家科技部“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI01B02); 广东省科技计划项目(2012A030100005)

作者简介: 邓少东(1986—), 男, 在读博士, 研究方向为中药资源开发利用与中药新药研究。E-mail: 59543177@qq.com

*通信作者 林 励 Tel: (020)39358270 E-mail: LL76611@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.1121.010.html>

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 UPLC 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 以甲醇 (A) - 0.1% 乙酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0~1 min, 5%~25% A; 1~5 min, 25%~55% A; 5~8 min, 55%~70% A; 梯度曲线均为直线。体积流量 0.5 mL/min; 柱温 40 °C; 检测波长 315 nm; 进样量 1 μL。

2.1.2 HPLC 色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇 (A) - 醋酸水溶液 (61:4) (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0~10 min, 2%~10% A; 10~12 min, 10%~13% A; 12~15 min, 13%~25% A; 15~60 min, 25%~55% A; 60~65 min, 55%~62% A; 65~68 min, 62%~70% A; 68~70 min, 70%~100% A; 70~75 min, 100% A; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 315 nm; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取经 105 °C 干燥至恒质量的柚皮苷、野漆树苷、柚皮素、芹菜素对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 1.382、1.215、1.375、0.517 mg/mL 的混合对照品溶液, 冷藏备用。

2.3 供试品溶液的制备

取已干燥至恒定质量的化橘红粉末 (过 4 号筛) 0.4 g, 精密称定。置具塞锥形瓶中, 加石油醚 50 mL, 超声提取 30 min, 弃去石油醚液, 待样品中残存的石油醚全部挥去后, 加入甲醇 20 mL 后称定质量, 超声提取 30 min, 取出, 放凉, 称其质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.22 μm 有机系微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份供试样品溶液, 分别按“2.1.1”及“2.1.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 在 UPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别在 0.01%~0.39%、0.78%~2.12%, 在 HPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别在 0.11%~1.24%、1.39%~4.32%, 均符合指纹图谱的要求。表明 UPLC 和 HPLC 仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批样品 6 份, 按“2.3”项下操作平行制备供试品溶液, 分别按“2.1.1”及“2.1.2”项下色谱条件进样, 在 UPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的

RSD 分别在 0.02%~0.41%、0.05%~3.41%, 在 HPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0.08%~0.89%、0.54%~4.38%, 均符合指纹图谱的要求。表明本方法的重复性良好, 适用于化橘红 UPLC 和 HPLC 指纹图谱的分析。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试样品溶液, 按“2.1.1”及“2.1.2”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样测定, 在 UPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0.13%~0.86%、0.25%~4.01%, 在 HPLC 色谱条件下测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0.32%~1.25%、0.73%~4.84%, 均符合指纹图谱的要求。表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 指纹图谱的绘制 取 17 批化橘红样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 记录 UPLC 与 HPLC 色图谱。将药材指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (国家药典委员会发布, 2004A 版), 设定匹配模板, 进行谱峰自动匹配, 并生成对照指纹图谱, 结果见图 1~4。

2.5.2 共有峰的确定 17 批化橘红药材生成的 UPLC 对照指纹图谱, 有 21 个共有峰, 通过与对照品对照, 分别指认 9 号峰为柚皮苷, 10 号峰为野漆树苷, 15 号峰为柚皮素, 17 号峰为芹菜素。17 批化橘红药材生成的 HPLC 对照指纹图谱, 有 17 个共有峰, 通

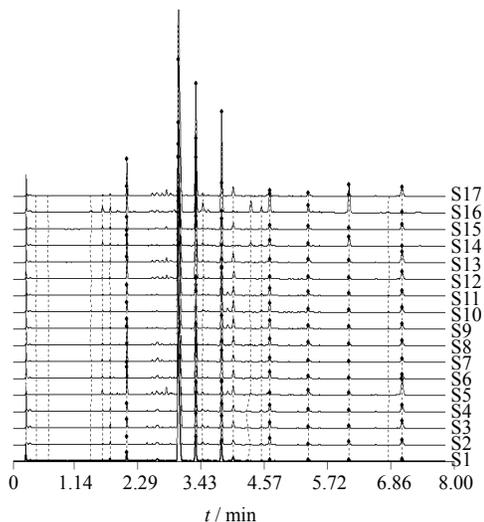
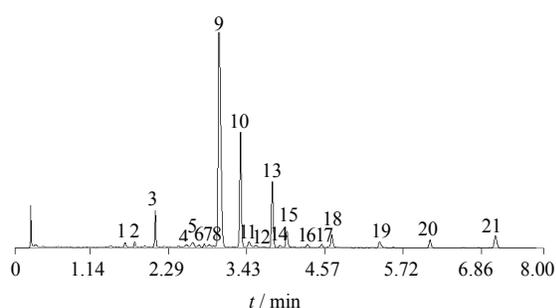


图 1 17 批化橘红药材的 UPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 1 UPLC overlapped fingerprint of 17 samples of CGE



9-柚皮苷 10-野漆树苷 15-柚皮素 17-芹菜素
9-naringin 10-rhoifolin 15-naringenin 17-apigenin

图2 17批化橘红药材的UPLC对照指纹图谱

Fig. 2 UPLC reference fingerprint of 17 samples of CGE

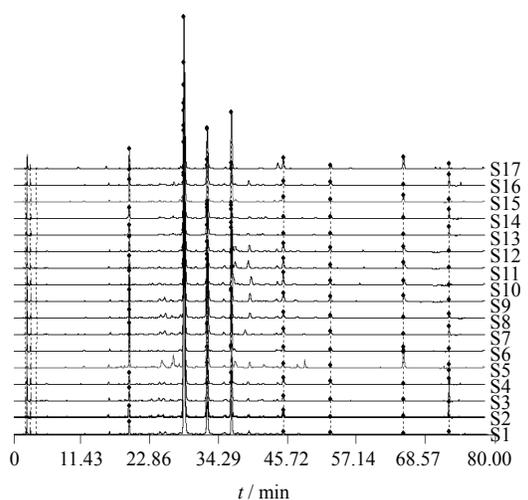
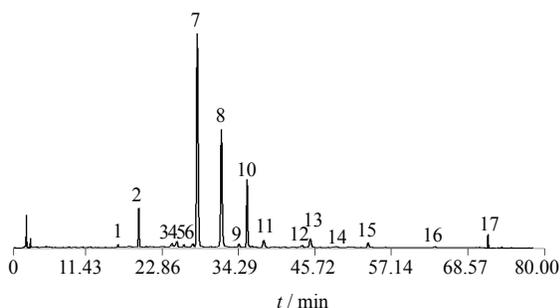


图3 17批化橘红药材的HPLC指纹图谱叠加图

Fig. 3 HPLC overlapped fingerprint of 17 samples of CGE



7-柚皮苷 8-野漆树苷 13-柚皮素 14-芹菜素
7-naringin 8-rhoifolin 13-naringenin 14-apigenin

图4 17批化橘红药材的HPLC对照指纹图谱

Fig. 4 HPLC reference fingerprint of 17 samples of CGE

过与对照品对照, 分别指认7号峰为柚皮苷, 8号峰为野漆树苷, 13号峰为柚皮素, 14号峰为芹菜素。

2.5.3 相似度评价 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(国家药典委员会发布, 2004A版)对化橘红药材指纹图谱进行相似度计算。结果表明,

17批化橘红样品与相应对照图谱的相似度均在0.9以上, 见表1。

表1 17批化橘红药材的相似度

Table 1 Similarity of 17 samples of CGE

编号	相似度	
	UPLC	HPLC
S1	0.985	0.986
S2	0.998	0.997
S3	0.998	0.999
S4	0.998	0.998
S5	0.912	0.923
S6	0.956	0.974
S7	0.949	0.943
S8	0.936	0.936
S9	0.986	0.917
S10	0.978	0.982
S11	0.986	0.982
S12	0.943	0.987
S13	0.924	0.939
S14	0.982	0.905
S15	0.973	0.984
S16	0.977	0.969
S17	0.956	0.975

3 讨论

3.1 流动相的选择

本实验考察了不同比例的甲醇-乙酸水溶液、乙腈-乙酸水溶液2个流动相系统, 结果显示以甲醇-乙酸水溶液作为流动相系统时, 各峰分离度及峰型良好; 以乙腈-乙酸水溶液作为流动相系统时, 柚皮苷与野漆树苷的分离效果较差。因此, 最终采用甲醇-乙酸水溶液作为流动相系统。

3.2 测定波长的选择

由于柚皮苷的最大吸收波长为283 nm, 因此参考文献方法^[6-7]中均以283 nm为检测波长。本实验使用Waters-PDA检测器进行紫外全波长扫描(200~800 nm), 分别对254、283、300、315、337、345 nm等多个波长进行考察, 结果显示在283 nm波长下柚皮苷的响应值最高, 但色谱峰个数最少, 综合比较基线噪音、共有峰响应值、色谱峰个数后, 选择315 nm作为本实验的检测波长。

3.3 柱温的选择

本实验将柱温分别控制在30、35、40、45℃进行实验, 发现在UPLC条件下随温度的升高, 各色谱峰的分离度变大, 分析时间缩短; 在HPLC条件下随温度的升高, 各色谱峰的分离度与分析时间

均无明显变化。在满足测定的情况下,为提高色谱柱的使用寿命,分别选择 30 ℃ (HPLC)、40 ℃ (UPLC)。

3.4 供试品中黄酮类成分的确定

通过对供试品进行紫外全波长扫描(200~800 nm),各共有峰的紫外吸收光谱均显示黄酮特征(240~280 nm, 300~400 nm)。

3.5 UPLC 法与 HPLC 法的比较

实验结果显示,UPLC 法可标示出 21 个共有峰,HPLC 法标示出 17 个共有峰,说明 UPLC 的色谱分离效果更好、灵敏度更高;UPLC 法色谱峰保留时间全部在 8 min 内,HPLC 法谱峰保留时间全部在 80 min 内,说明 UPLC 的分析效率更高,可显著缩短分析时间,减少流动相的消耗;与 HPLC 比较 UPLC 洗脱条件更简单,色谱峰的漂移时间较短,色谱峰易于匹配;从相似度评价中分析,UPLC 法与 HPLC 法结果基本一致,说明两种方法均可用于化橘红药材的质量控制与评价。

与 HPLC 法相比,UPLC 法具有高效、快速、灵敏、节省溶剂等优点。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 关骏良, 吴钊华, 吴万征. 化橘红提取物对豚鼠离体气管平滑肌收缩功能的影响 [J]. 中药材, 2004, 27(7): 5152-5171.
- [3] 庞瑞, 杨中林. 不同产地不同品种柚皮中总黄酮和柚皮苷的含量比较 [J]. 药学与临床研究, 2007, 15(3): 2052-2071.
- [4] 黄兰珍, 梁照恒, 林励. 不同炮制方法对化橘红中柚皮苷含量的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(1): 59-61.
- [5] 陈永刚, 林励, 魏燕华. 超声波提取法与索氏提取法提取化橘红柚皮苷的比较研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2008, (19)4: 309-311.
- [6] 陈志霞, 林励, 孙冬梅. 化橘红黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2003, 34(7): 657-661.
- [7] 袁旭江. 化橘红药材指纹图谱及其质量研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2003.