

- [3] Xiao H, Lu Y, Chen Z N, *et al.* New xanthones from *Swertia decora* [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2001, 36(5): 302-304.
- [4] Xiao H, Lu Y, Chen Z N, *et al.* A new xanthone from *Swertia decora* [J]. *Molecules*, 2000, 5: 181.
- [5] Harborne J B. *Phytochemical Methods* [M]. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1984.
- [6] Sun H F, Hu B L, Ding J Y, *et al.* The glucosides from *Swertia mussotii* Franch. [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1991, 33(1): 31-37.
- [7] Silveira E R, Falcão A J C, Jr A M, *et al.* Penta-oxygenated xanthones from *Bredemeyeria floribunda* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(6): 1433-1436.
- [8] Marston A, Hamburger M, Sordat D, *et al.* Xanthones from *Polygala nyikensis* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 33(4): 809-812.
- [9] Cong P Z. *The Application of Mass Spectrometry in Natural Organic Chemistry* [M]. Beijing: Science Press, 1987.
- [10] Sultanbawa M U S. Xanthonoids of tropical plants [J]. *Tetrahedron*, 1980, 36: 1465-1506.
- [11] Wang Y, Yang J S. Review of studies of *Swertia* L. [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1992, 4(1): 99-113.
- [12] Atta-ur-Rahman, Pervin A, Feroz M, *et al.* Phytochemical studies on *Swertia cordata* [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57(1): 134-137.
- [13] Li J S, Zhao Y Y, Wang B, *et al.* Separation and identification of the flavonoids from *Buddleia officinalis* Maxim. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1996, 31(11): 849-854.
- [14] Jia S S, Liu D, Zheng X P, *et al.* Two new isoprenyl flavonoids from the leaves of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1993, 28(1): 28-31.

枳壳和枳实化学成分的 HPLC-ESI-MS 分析

贾 强, 白 杨, 马 燕, 彭 维, 苏薇薇*

(中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘要: 目的 分析比较枳壳、枳实的化学成分。方法 采用 HPLC-ESI-MS 法, Symmetry Shield™ RP₁₈ 色谱柱 (150 mm×3.9 mm, 5 μm) (Waters, Milford, MA, USA)。流动相: A 为 0.6% 醋酸水溶液, pH=2.5; B 为甲醇。采用梯度洗脱: 20%~40% B (0~48 min), 40% B (48~54 min), 40%~55% B (54~60 min), 55%~95% B (60~75 min), 95% B (75~85 min), 95%~20% B (85~90 min)。体积流量: 0.7 mL/min。温度为室温, 检测波长为 283 nm。Surveg 质谱检测器。结果 鉴定了柚皮苷、柚皮苷元、新橙皮苷、橙皮苷、辛弗林等成分, 并测定了它们在枳壳、枳实中的含量。枳壳、枳实药材的主要化学成分种类相同, 但含量不同。结论 HPLC-ESI-MS 法可用于枳壳和枳实的研究。

关键词: 枳壳; 枳实; HPLC-ESI-MS; 黄酮

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)02-0169-04

Chemical constituents of *Fructus Aurantii* and *Fructus Aurantii Immaturus* by HPLC-ESI-MS

JIA Qiang, BAI Yang, MA Yan, PENG Wei, SU Wei-wei

(College of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Objective To analyze the chemical components of *Fructus Aurantii* (FA) and *Fructus Aurantii Immaturus* (FAI). **Methods** HPLC-ESI-MS with Surveg mass spectrometer was used in the study. Chromatographic column: Symmetry Shield™ RP₁₈ (150 mm×3.9 mm, 5 μm) (Waters, Milford, MA, USA); mobile phase: (A) water (0.6% HAc, pH=2.5), (B) methanol. Gradient elutions: 20%—40% B (0—48 min); 40% B (48-54 min); 40%—55% B (54—60 min); 55%—95% B (60—75 min); 95% B (75—85 min); 95%—20% B (85—90 min). Flow rate and wavelength were 0.7 mL/min and 283 nm at room temperature, respectively. **Results** Four kinds of flavonoids were identified as naringin, neohesperidin, naringenin, and hesperidin, synephrine was also identified in FA and FAI. Furthermore, the contents of them were determined individually. The results showed that the chemical constituents in FA and FAI were the same but the contents were different. **Conclusion** HPLC-ESI-MS method can be effi-

收稿日期: 2004-09-06

基金项目: 广东省“千百十工程”优秀人才培养基金资助项目(Q02037)

作者简介: 苏薇薇(1959—), 女, 药理学博士, 教授, 主要从事药物分析和中药质量标准化研究工作。

Tel: (020)84110808 E-mail: lssww@zsu.edu.cn

ciently used to study FA and FAI.

Key words: *Fructus Aurantii* (FA); *Furctus Aurantii Immaturus* (FAI); HPLC-ESI-MS; flavonoids

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的未成熟果实^[1],具有理气宽中、行滞消胀的功效;主治胸胁气滞、胀满疼痛、食积不化、痰饮内停,胃下垂、脱肛、子宫脱垂等^[2]。枳实为芸香科植物酸橙 *C. aurantium* L. 及其栽培变种的干燥幼果,具有活血化瘀、祛痰、消滞的功效^[2]。两者来源相同,但由于采摘期不同,其功效有所不同。枳壳、枳实主要活性成分为黄酮类和生物碱类。其中黄酮类的含量较高,约占 5%~28%^[3],远远高于生物碱类的含量。到目前为止,在枳壳和枳实中发现的黄酮类主要是二氢黄酮类。除此之外,枳壳和枳实还含有生物碱辛弗林。

近年来随着分析仪器的普及,HPLC-MS 在中药成分分析中的应用越来越多。HPLC-MS 由光电二极管阵列检测器和电子喷雾质谱检测器组成,可以提供更多的化合物结构信息,更加准确地识别各个峰。到目前为止,尚无有关枳壳和枳实化学成分区别的研究报道,为此,笔者采用 HPLC-ESI-MS 法^[4]对二者化学成分进行了分析,以找出二者化学成分的区别,为其临床应用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂:LCQ DECA XP (Thermo Finnigen, USA) HPLC-MS 色谱仪, Survey 紫外检测器, Survey 质谱检测器。柚皮苷苷元、新橙皮苷、橙皮苷、辛弗林对照品购自 Sigma (St. Louis, MO, USA); 柚皮苷对照品购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯,醋酸为分析纯。

1.2 实验样品:枳实药材和枳壳 1 号药材购自中国药品生物制品检定所,枳壳 2 号药材由广州中药一厂提供,经中山大学生命科学学院廖文波教授鉴定。

1.3 HPLC 分析条件:采用 Symmetry Shield™ RP₁₈ 色谱柱 (150 mm × 3.9 mm, 5 μm) (Waters, Milford, MA, USA)。流动相:A 为 0.6% 醋酸水溶液, pH=2.5; B 为甲醇。采用梯度洗脱:20%~40% B (0~48 min), 40% B (48~54 min), 40%~55% B (54~60 min), 55%~95% B (60~75 min), 95% B (75~85 min), 95%~20% B (85~90 min)。体积流量:0.7 mL/min。温度为室温,检测波长为 283 nm,进样量 20 μL。

1.4 MS 分析条件:采用 ESI 法。质谱检测范围:150~900 amu;毛细管温度:270 °C;毛细管电压:

24.0 V; The Sheath Gas Flow Rate: 30 arb; Aux Gas Flow Rate: 0.0 arb; I Spray Voltage: 4.0 kV; Tube lens offset: 35.0 m; 干燥 N₂, 温度 360 °C, 40 mL/min; nebulizing N₂, 5.5 × 10⁵ Pa。

1.5 溶液的制备

1.5.1 对照品溶液的制备:精密称取已减压干燥至恒重的对照品柚皮苷 5.00 mg、柚皮苷苷元 6.53 mg、橙皮苷 2.01 mg、新橙皮苷 4.94 mg 和辛弗林 5.01 mg, 分别加甲醇定容于 5 mL, 即得。

1.5.2 供试品溶液的制备:分别称取枳壳 1 号药材、枳壳 2 号药材和枳实药材粉末 (过 4 号筛) 各 1 g, 精密称定, 置锥形瓶中。分别精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 冷浸 1 h, 超声 20 min, 静置, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 回收溶剂, 残渣用甲醇溶解, 定容至 5 mL, 即得。

1.6 测定方法:分别取各对照品溶液进样, 确定各个对照品在 HPLC 中峰的保留时间。然后分别取枳壳 1 号药材、枳壳 2 号药材和枳实药材的供试品溶液, 进样分析 (进样量为 20 μL)。

2 结果

2.1 5 种对照品的 HPLC-ESI-MS: 同时比较了黄酮类化合物在 ESI“+”离子和“-”离子条件下的信息情况, 结果在“-”离子条件下有稳定的苯酚离子形成; 而在“+”离子条件下, 噪音的水平相对较高, 且有些片断在“+”离子条件下消失, 这是由于黄酮类不能容纳氮原子, 在液相中表现为低碱性, 因而在“+”离子条件下, 黄酮类的阳离子片断信号相对较少。而辛弗林在 ESI(+) 产生较多的信息。所以对黄酮类的使用条件为 ESI(-), 而辛弗林采用的条件是 ESI(+). 表 1 是 5 种对照品各自的保留时间 (*t_R*), UV 检测波长, 裂解碎片峰。

表 1 5 个对照品的裂解碎片峰的分析

Table 1 Fragmentation peaks of five reference substances

化合物	<i>t_R</i> /min	[M±H] [±] /(<i>m/z</i>)	[M(-2H)+Na] /(<i>m/z</i>)	[A-H] ⁻ /(<i>m/z</i>)	其他离子 /(<i>m/z</i>)	λ /nm
辛弗林	7.6	168	—	—	—	283
柚皮苷	47.5	579	601	271	580, 661 etc.	283
橙皮苷	50.6	609	631	301	463, 610, 302 etc.	283
新橙皮苷	53.2	609	631	301	323, 610, 608 etc.	283
柚皮苷苷元	65.1	271	—	—	272, 543, 699 etc.	283

辛弗林在 *m/z* 168 有一个强的裂解碎片峰 [M+H]⁺。

柚皮苷有2个较强的裂解碎片峰, $[M-H]^-$ 在 m/z 579, $[A-H]^-$ 在 m/z 271, 其中, m/z 271 来源于糖基的解离。除此之外, 还有其他的裂解碎片峰, 例如 $[M+H-H]$ 在 m/z 580, $[M-2H+Na]^-$ 在 m/z 601, 还有一个比较强的裂解碎片峰 m/z 661 和一些小的裂解碎片峰是由 M、A、H、H₂O、CH₃OH 等许多裂解碎片组合而成的。

橙皮苷有一个强的裂解碎片峰 $[M-H]^-$ 在 m/z 609, 一个弱的加合物峰 $[M-2H+Na]^-$ 在 m/z 631, 一个糖苷配基峰 $[A-H]^-$ 在 m/z 301。除此之外, 还有 m/z 463, 是由 C₁-C₂ 键和 C₃-C₄ 键同时裂解而产生的, 即 $[M-146-H]^-$; $[M+H-H]$ 在 m/z 610, $[A+H-H]$ 在 m/z 302, 还有一些其他的小裂解碎片峰片段是由 M、A、H、H₂O、CH₃OH 等许多裂解碎片组合而成的。

新橙皮苷有一个强的裂解碎片峰 $[M-H]^-$ 在 m/z 609, 一个弱的加合物峰 $[M-2H+Na]^-$ 在 m/z 631 和一个糖苷配基峰 $[A-H]^-$ 在 m/z 301。还有一些其他的裂解碎片峰, $[A+Na-2H]^-$ 在 m/z 323, $[M-2H]^{2-}$ 在 m/z 608, $[M+H-H]$ 在 m/z 610, 还有一些小裂解碎片峰是由 M、A、H、H₂O、CH₃OH 等许多裂解碎片组合而成的。

柚皮苷元有一个强的裂解碎片峰 $[M-H]^-$ 在 m/z 271, 还有一个较弱的裂解碎片峰 $[2A-H]^-$ 在 m/z 543, $[M+H-H]$ 在 m/z 272。还有其他小的裂解碎片峰是由 M、A、H、H₂O、CH₃OH 等许多裂解碎片络合而成的。

2.2 枳壳和枳实药材的 HPLC-ESI-MS: 分别取枳实和枳壳供试品溶液, 进样 20 μ L, 得到其 HPLC-ESI-MS 谱图。对枳实和枳壳中辛弗林、柚皮苷、新橙皮苷、橙皮苷和柚皮苷元的裂解碎片各个峰的鉴别见表2。峰2~5根据裂解碎片谱图鉴别, 分别为柚皮苷、新橙皮苷、橙皮苷和柚皮苷元。辛弗林是易溶于水的生物碱, 在本实验的 HPLC 条件下, 很难在 HPLC 图谱中得到它的吸收峰。而用 HPLC-ESI-MS 则可以在提取物中检测到它的存在。质谱中的 m/z 168 有裂解碎片峰的峰1就是辛弗林。

2.3 测定结果: 采用外标一点法^[5]测定辛弗林、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柚皮苷元在枳壳和枳实中的质量分数, 结果见表3。可见辛弗林、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷元在枳实中的质量分数均比在枳壳中的高, 尤其辛弗林在枳实药材中是枳壳1号药材的30倍, 是枳壳2号药材的60倍; 辛弗林

表2 枳壳和枳实提取物裂解碎片峰的分析

Table 2 Analysis of fragmentation peaks of FA and FAI extracts

化合物	tr /min	$[M\pm H]^\pm$ /(m/z)	$[M(-2H)+Na]$ /(m/z)	$[A-H]^-$ /(m/z)	其他离子 /(m/z)	λ /nm
辛弗林	7.1	168	—	—	—	283
柚皮苷	47.8	579	601	271	433, 272, 580 etc.	283
橙皮苷	50.6	609	631	301	463, 631, 302 etc.	283
新橙皮苷	53.1	609	631	301	579, 447, 611 etc.	283
柚皮苷元	65.1	271	—	—	531, 635, 543 etc.	283

表3 枳壳和枳实提取物中各化合物的质量分数 ($n=3$)

Table 3 Content of compounds in FA and FAI extracts ($n=3$)

化合物	对照品质量浓度 /($mg \cdot mL^{-1}$)	质量分数/($mg \cdot g^{-1}$)		
		枳壳1	枳壳2	枳实
辛弗林	0.20	1.09 $\pm$ 0.43	0.47 $\pm$ 0.21	31.32 $\pm$ 5.62
柚皮苷	0.20	54.61 $\pm$ 6.35	57.30 $\pm$ 10.25	117.50 $\pm$ 24.31
橙皮苷	0.08	8.29 $\pm$ 2.45	3.79 $\pm$ 0.59	11.65 $\pm$ 4.32
新橙皮苷	0.20	6.28 $\pm$ 2.13	3.48 $\pm$ 1.05	7.12 $\pm$ 3.25
柚皮苷元	0.26	2.11 $\pm$ 0.73	1.37 $\pm$ 0.42	3.15 $\pm$ 0.56

的测定结果表明 HPLC-MS 方法比 HPLC 法更精密^[6], 测定的结果更准确; 枳壳1号药材中除柚皮苷外, 其余各成分的质量分数均高于枳壳2号药材, 说明中国药品生物制品检定所提供的药材优于市场流通的药材; 实验结果表明枳实、枳壳的区别不在于化学成分的种类, 而是化学成分的质量分数不同。

3 讨论

结果表明, HPLC-ESI-MS 方法可以用于微量植物提取物快速、准确的鉴别。由于使用一般电子轰击技术很难得到黄酮类糖配基的裂解碎片峰, 但 Electrospray MS (ESI) 是一种软电离技术, 能够直接得到黄酮类糖配基的裂解碎片峰, 主要形成 $[M+H]^+$ 或 $[M-H]^-$ 裂解碎片峰, 因此在本实验中选用 ESI 法。

本实验中的 MS 条件中, 笔者对毛细管温度进行了优化, 对柚皮苷溶液采用直接进样, 温度在 200~340 $^{\circ}$ C 进行试验。发现整个过程中, 质谱信息量并没有随着温度的变化有很大的改变, 但是在 270 $^{\circ}$ C 以下时, 会有一些络合物的信息出现, 干扰实验, 例如在“+”离子条件有 Na⁺ 离子的络合物产生, 在“-”离子条件下, 有醋酸根离子的络合物产生。因此设定毛细管的温度为 270 $^{\circ}$ C; 同样其他的实验条件也进行了优化处理。

在生物碱辛弗林的测定中, 采用 HPLC 法测定时, 峰面积较小, 很难把枳实、枳壳区别开来, 而采用 HPLC-MS 法则很容易检测出辛弗林, 将枳实与枳壳区分开来。

References:

- [1] Xu G J. *China Pharmacognosy* (中国药材学) [M]. Shanghai: Shanghai Far East Publishers, 1994.
- [2] Cai Y P, Cao L, Fan C S. Investigation of original plants and identification of the commercial herbal of *Fructus Aurantii*, *Fructus Aurantii Immaturus* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(5): 259.
- [3] Cai Y P, Chen Y G, Fan C S. Briefing study on chemisry components of *Fructus Aurantii* species [J]. *Jiangxi J Tradit Chin Med* (江西中医药), 1998, 29(6): 46.
- [4] He X G, Lian L Z, Lin L Z, et al. High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium* L.) [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 791: 127-134.
- [5] Jin Z Z, Zhu M, Wang Z Y. Discussion on superseding working curve method using one-point external standard method in quantitative analysis [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2002, 19(1): 57-59.
- [6] Zeng X Y, Chen X H, Xiao W, et al. Identify the content of synephrine and *N*-methyltyramine in Zhi Shi and Zhi Qiao by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(5): 362-363.

不同产地枳壳饮片炮制前后挥发油成分的 GC-MS 分析

曹 君¹, 王少军², 龚千锋¹, 杨世林², 段 启¹, 张小娟²

(1. 江西中医学院, 江西 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330077)

摘要:目的 气相色谱-质谱法对枳壳饮片挥发油进行化学成分的分析。方法 采用水蒸气蒸馏法从枳壳中提取挥发油。用归一化法测定各组分的体积分数,并用气相色谱-质谱法对其化学成分进行鉴定。结果 共鉴定了186个成分,占挥发油总成分的90%以上,不同产地及炮制前后对枳壳饮片挥发油含量影响较大。结论 此方法稳定可靠,重现性好,适用于枳壳挥发油的化学成分分析,为枳壳饮片的质量进一步评价提供了一定的科学依据。

关键词:枳壳;挥发油;气相色谱-质谱;炮制

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)02-0172-06

Analysis of volatile oil in pre- and post-processed pieces of *Fructus Aurantii* from different habitats by GC-MSCAO Jun¹, WANG Shao-jun², GONG Qian-feng¹, YANG Shi-lin², DUAN Qi¹, ZHANG Xiao-juan²

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330077, China)

Abstract: Objective To analyze the chemical components of the volatile oil in processed pieces of *Fructus Aurantii* (PPFA) by GC-MS. **Methods** The volatile oil was obtained from PPFA by steam distillation. The amount of the components from the volatile oil were determined by area normalization method. The separated components were identified by GC-MS. **Results** Composed of the total volatile oil over 90%, 186 components were separated and identified. The effect on the content of PPFA from different habitats is remarkable. **Conclusion** The method is reliable, stable and has good repeatability. This method can be applied to the analysis of volatile oil components in PPFA. It will provide the certain scientific methods for further evaluating of PPFA quality.

Key words: *Fructus Aurantii*; volatile oil; GC-MS; processing

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实,具有理气宽中、行滞消胀功效^[1]。枳壳生饮片偏于行气除胀,麸炒后偏于理气健胃消食^[2]。挥发油是枳壳中活性成分之一。目前我国市场上主流枳壳饮片商品为“江枳壳”、“湘

枳壳”、“川枳壳”,分别产于江西、湖南、四川,其所含挥发油成分较复杂,而现已报道的成分较少。本实验以水蒸气蒸馏法蒸出枳壳饮片挥发油,经无水硫酸钠干燥后,进行毛细管气相色谱分析,共分离出100多个峰,以归一化法计算了各个峰的体积分数,用气