

以期提高其葛根素含量,为野葛细胞培养生产葛根素的工业化提供技术支持

References

- [1] Peng J L, Ma M X, An H X, *et al.* On the research in the exploitation of *Pueraria* DC. and its synthetical utilization prospect [J]. *Resour Dev Market* (资源开发与市场), 2000, 16(2): 80-82.
- [2] Yu S H, Li L. Tissue culture of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and plantlet regeneration [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境), 1999, 8(1): 63-64.
- [3] Liu H L, Li L. Cell Cultures of *Pueraria lobata* (Willd.): growth and production of isoflavones and puerarin [J]. *South Afr J Bot*, 2002, 68: 542-544.
- [4] Ying P Q, Xu J F, Su Z G. Studies on characteristic and kinetics of *Salvia miltiorrhiza* crown gall tissue culture [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1999, 5(5): 478-482.
- [5] Mei L H, Yao S J, Lin D Q. *Technology in Biochemical Production* (生物生产工艺学) [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [6] Cui T B, Guo Y, Lin W T. The ways to enhance the production of secondary metabolites by plant cell culture [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 2001, 37(5): 479-482.
- [7] Susko D J, Mueller J P, Spears J F. An evaluation of methods for breaking seed dormancy in kudzu (*Pueraria lobata*) [J]. *Can J Bot*, 2001, 79(2): 197-203.
- [8] Verpoorte R, Heijden R, Hoopen H J G, *et al.* Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals [J]. *Biotechnol Lett*, 1999, 21: 467-479.
- [9] Yeoman M M, Yeoman C L. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells [J]. *New Phytol*, 1996, 134: 553-569.

化橘红黄酮类成分的 HPLC指纹图谱研究

陈志霞¹, 林 励², 孙冬梅^{3*}

(1. 广东省药品检验所, 广东 广州 510180; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 3. 广东省中医研究所, 广东 广州 510095)

摘要: 目的 研究不同品种和产地化橘红药材黄酮类成分的色谱指纹图谱分析方法。方法 应用 HPLC法以柚皮苷为参比,以相对保留时间和峰面积百分比为参数,建立 10个样品的 HPLC指纹图谱。结果 标示出 30多个峰,且不同品种化橘红(毛橘红和光橘红)的图谱存在较大的差异。结论 该方法准确、重现性好,适用于化橘红药材的质量控制与鉴定。

关键词: 化橘红;黄酮类成分;高效液相色谱;指纹图谱

中图分类号: R282. 710. 3 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2003)07- 0657- 05

HPLC fingerprint of flavonoids in *Exocarpium Citri Grandis*

CHEN Zhi-xia¹, LIN Li², SUN Dong-mei³

(1. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China; 2. Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 3. Guangdong Institute of Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

Abstract **Object** To establish the HPLC fingerprint of flavonoids in *Exocarpium Citri Grandis* (ECG). **Methods** HPLC fingerprint of ten samples were established. The naringin was used as standard. The relative migration time and the percentage of peak area were used as parameters. **Results** More than 30 peaks occurred on the HPLC fingerprint of flavonoids of ECG. The fingerprints of *C. grandis* 'Tomentosa' and *C. grandis* had obvious differences. **Conclusion** The method is simple and accurate with a good reproducibility. It could be used for quality control and identification of ECG.

Key words *Exocarpium Citri Grandis* (ECG); flavonoids; HPLC; fingerprint

化橘红是芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* 'Tomentosa' 或柚 *C. grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥外层果皮。具散寒、燥湿、利气、消

痰作用,临床用于治疗风寒咳嗽、喉痒痰多、食积伤酒、呕恶痞闷等症^[1]。是广东名贵特产药材。来源于植物化州柚的又名毛橘红,来源于植物柚的又名光

* 收稿日期: 2002-11-19

基金项目: 广东省科技计划项目 (A301020101)

作者简介: 陈志霞 (1975-),女,湖北省武汉市人,硕士,研究方向为中药质量标准研究。Tel: (020) 81863096

橘红。黄酮类成分是化橘红的主要有效成分之一,是较好的消炎、止咳、平喘活性成分^[2]。化橘红黄酮类成分中含有柚皮苷(naringin)及少量野漆树苷(rhoifolin)、枳属苷(poncirin)及新橙皮苷(neohesperidin)^[3]。其中柚皮苷是化橘红的主要化学成分之一。本实验对化橘红药材黄酮类成分进行指纹图谱分析,有利于该药材的质量控制。

1 仪器、试药与材料

1.1 仪器与材料: Agilent-1100型高效液相色谱仪,包括:四元泵,在线脱气机,柱温箱,DAD检测器等。BP211D电子分析天平(德国 Sartorius公司),

表 1 试验用样品来源

Table 1 Source of samples in experiment

编号	样品	直径 /cm	产地或购买地	编号	样品	直径 /cm	产地或购买地
1	化州柚	7.0	广东省化州市平定镇	6	柚	4.0	湖南(市售)
2	化州柚	4.5	广东省化州市平定镇	7	柚	7.0	广西(市售)
3	化州柚	6.8	广东省化州市平定镇	8	柚	9.2	海南(市售)
4	化州柚	5.0	广东省化州市平定镇	9	柚	11.3	北京(市售)
5	化州柚	6.8	广东省化州市平定镇	10	柚	10.5	河南(市售)

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 流动相: A(甲醇)-B(水-乙酸(61:4)),过 0.45 μm 滤膜,梯度洗脱: 0~ 60 min A 100%→ 0%。色谱柱: LiChrospher® 100(RP-18e, 5 μm, 250 mm× 4 mm, Merck) 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 283 nm;柱温: 40℃;分析时间: 70 min

2.2 样品溶液的制备: 取各药材样品 10.00 g (另取 15.00 g 测定水分)置索氏提取器中,加石油醚(60℃~ 90℃) 65 mL,水浴回流提取 2.5 h,弃去石油醚液,待样品中残存的石油醚全部挥去后,加甲醇 65 mL再置水浴中回流提取 4 h,放冷,滤过,滤液转移至 100 mL量瓶中,以甲醇少量分数次洗涤容器及滤纸,洗涤液并入同一量瓶中,甲醇定容至刻度,制得样品溶液。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称定柚皮苷、野漆树苷分别置 20 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,分别制成 0.09 mg/mL的对照品溶液

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系: 分别精密吸取柚皮苷对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL注入高效液相色谱仪,按上述条件进行测定,以柚皮苷量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线 求得柚皮苷的回归方程为 $y = 1\,625.669\,09x + 9.369\,02$, $r = 0.999\,9$ 在 0.09~ 0.9 μg 呈良好的线性关系。柚皮苷对照品色谱图见图 1

2.4.2 稳定性试验: 取同一样品溶液,分别在 0, 2,

电动恒温水浴锅(上海一恒电子仪器厂)。

1.2 试药: 柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号: 722-9004),野漆树苷工作参比品(为从化州柚中分离所得,并经光谱鉴定),甲醇(色谱纯),三蒸水,石油醚(60℃~ 90℃)、冰醋酸等均为分析纯。

1.3 试验样品: 化州柚样品均采自广东省化州市平定镇化州柚 GAP种植基地,选取不同果龄果实进行采集(果龄越小,果实直径越小)。柚样品为全国各地市售商品。以上不同产地、果龄样品可较全面地代表化橘红药材的整体特征,均经广州中医药大学中药资源研究室林励教授鉴定(表 1)

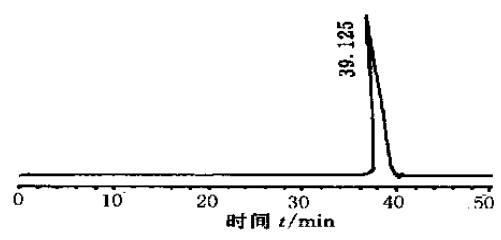


图 1 柚皮苷对照品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of naringin reference substance 4, 8, 12, 16, 20, 24 h进样,按上述条件进行测定,其相对保留时间稳定,主要共有峰面积 $RSD = 2.73\%$ ($n = 8$)

2.4.3 精密度试验: 取同一样品溶液,连续进样 5次,按上述条件进行测定,其相对保留时间稳定,主要共有峰面积 $RSD = 0.38\%$ 。

2.4.4 重现性试验: 按样品溶液制备方法处理同一批样品 5份,按上述条件进行测定,其相对保留时间稳定,主要共有峰面积 $RSD = 2.48\%$ 。

2.5 样品测定及结果: 按样品制备方法处理以上 10批样品后进行测定,得到 30余个峰,其中共同峰有 20多个,选择柚皮苷峰作为参比,采用相对保留时间对色谱峰进行鉴别。各峰相对保留时间为其绝对保留时间与柚皮苷峰的绝对保留时间之比值。各样品分析结果见表 2,3 样品 1(毛橘红 1)和样品 6(光橘红 1)的色谱图分别见图 2,3

分离得到包括柚皮苷(21)和野漆树苷(23)在内的 30多个峰,其中 20多个峰为毛橘红与光橘红的

表 2 5批毛橘红 HPLC指纹图谱分析结果

Table 2 Analytical results of HPLC fingerprint of five batches of *C. grandis* ‘*Tomentosa*’

峰号	相对保留 时间	面积百分比 %				
		样 1	样 2	样 3	样 4	样 5
1	1.060 0	0.951 0	1.417 5	0.716 6	0.331 7	2.170 5
2	0.070 5	0.473 8	0.312 9	0.473 8	0.849 2	0.588 7
3	0.081 2	0.592 3	1.280 0	0.202 3	0.331 2	0.480 6
4	0.112 8	0.720 2	0.758 8	0.331 0	0.542 3	0.685 6
5	0.184 1	1.251 7	0.256 8	0.218 3	0.371 1	0.829 1
6	0.242 9	0.198 3	0.245 4	0.277 1	0.401 4	0.229 0
7	0.279 0	0.416 4	0.266 2	0.144 4	0.166 1	—
8	0.298 2	—	0.370 7	—	—	0.317 6
9	0.341 8	0.243 2	0.242 5	0.121 5	0.137 5	0.166 9
10	0.398 9	—	0.279 5	0.284 1	0.160 5	0.344 4
11	0.542 9	0.257 6	0.400 0	0.265 7	0.187 7	0.344 8
12	0.601 2	0.178 2	0.410 8	1.149 9	—	0.431 7
13	0.635 7	0.185 8	0.343 7	0.229 7	0.471 4	0.291 8
14	0.733 6	0.668 9	0.308 8	0.931 5	0.715 7	1.407 9
15	0.797 7	0.197 8	0.995 7	1.512 3	1.896 9	0.421 9
16	0.829 4	0.190 8	1.017 8	0.284 6	0.276 2	0.830 2
17	0.880 0	1.009 9	0.835 5	0.782 8	—	0.807 0
18	0.921 7	0.602 1	0.746 1	0.367 0	—	0.225 3
19	0.949 8	0.964 8	1.583 3	0.933 8	—	0.408 6
20	0.963 9	1.153 7	—	—	—	0.369 6
21 [*]	1.0000	80.744 4	80.005 5	83.533 5	89.777 7	80.141 4
22	1.085 3	—	0.469 5	0.339 8	—	0.513 6
23 [△]	1.125 4	4.523 0	4.288 4	1.854 8	1.606 5	4.904 2
24	1.221 6	1.554 0	1.448 7	1.127 1	0.788 5	0.262 2
25	1.256 9	1.420 2	0.447 4	2.220 8	0.452 2	1.305 0
26	1.289 8	0.358 6	0.540 8	0.345 0	0.172 0	0.383 1
27	1.310 5	0.349 0	—	0.335 6	—	—
28	1.354 6	0.405 8	0.349 8	0.136 3	0.144 2	0.488 6
29	1.382 2	0.189 3	—	0.383 0	—	0.249 1
30	1.416 4	0.199 4	0.210 2	0.261 5	—	0.254 0
31	1.553 1	—	0.167 7	0.134 2	—	0.154 8
32	1.603 9	—	—	0.123 5	—	—
33	1.623 5	—	—	—	0.221 2	—

* 柚皮苷 △野漆树苷
* naringin △ rhoifolin

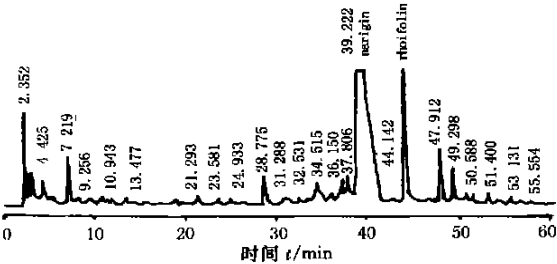


图 2 毛橘红 1 HPLC色谱指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of *C. grandis* ‘*Timentosa*’ 1
共有峰,其主要色谱峰的 DAD光谱均显示黄酮特征 (240~ 280 nm, 300~ 400 nm) 大部分光橘红样品在 51.4 min有一个含量超过 10%的峰 (26),而毛橘红则难以检测到此峰或含量极低,此外,毛橘红中柚皮苷的含量均在 80% 以上,而光橘红中柚皮苷的含量均在 70% 以下,明显低于毛橘红。市售药材

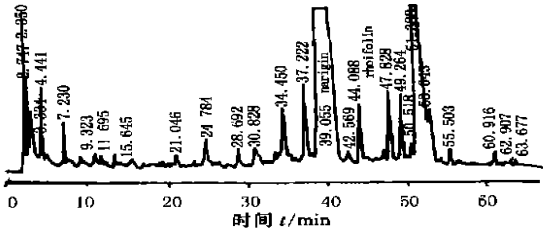


图 3 光橘红 1 HPLC色谱指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of *C. grandis* 1
毛橘红中野漆树苷的含量均大于 4%,而光橘红中野漆树苷的含量均在 2% 以下,明显低于毛橘红。故柚皮苷和野漆树苷峰所占的百分含量也可成为区分二者的另一个依据

3 讨论

3.1 由于化州柚是来源于化州市特有的树种,将其

表 3 5批光橘红 HPLC指纹图谱分析结果

Table 3 Analytical results of HPLC fingerprint of five batches of *C. grandis*

峰号	相对保留	面积百分比 %				
	时间	样 6	样 7	样 8	样 9	样 10
1	1.060 0	0.703 2	1.369 1	1.927 3	1.985 7	1.677 7
2	0.070 5	0.384 2	0.483 9	0.684 2	0.704 5	0.820 6
3	0.081 2	0.300 1	0.977 9	1.124 2	2.021 4	2.531 9
4	0.112 8	0.800 1	1.036 2	0.589 5	0.535 6	3.153 7
5	0.184 1	0.474 3	0.674 2	0.429 9	1.138 3	—
6	0.242 9	0.380 0	—	0.337 5	0.495 0	0.655 9
7	0.279 0	0.360 0	0.443 1	0.209 5	—	—
8	0.298 2	0.207 8	0.369 2	—	—	—
9	0.341 8	0.269 1	—	—	—	1.873 7
10	0.398 9	0.359 4	—	—	0.115 0	0.595 1
11	0.542 9	0.225 7	0.323 7	0.241 3	—	0.444 4
12	0.601 2	—	0.355 7	0.219 9	0.273 4	—
13	0.635 7	0.418 6	0.308 7	—	—	—
14	0.733 6	0.357 7	1.374 3	0.863 8	0.446 8	1.115 7
15	0.797 7	0.255 1	1.567 2	0.967 8	0.897 5	3.186 7
16	0.829 4	—	0.509 2	0.582 2	0.268 0	0.484 7
17	0.880 0	1.071 4	1.842 2	0.752 8	—	3.082 8
18	0.921 7	—	0.631 5	—	—	3.982 3
19	0.949 8	1.273 1	1.183 3	—	0.701 5	—
20	0.963 9	—	0.564 4	—	0.906 6	—
21 [*]	1	63.919 1	69.122 7	70.457 2	65.374 5	54.029 4
22	1.085 3	0.505 1	0.519 2	—	2.479 5	0.611 6
23 [△]	1.125 4	0.891 7	2.683 5	1.823 0	1.171 1	1.960 3
24	1.221 6	1.065 8	2.449 1	1.161 1	0.404 3	1.794 0
25	1.256 9	1.196 5	1.261 1	—	0.383 8	0.767 4
26	1.289 8	0.293 4	0.460 9	—	0.841 9	2.797 2
27	1.310 5	22.250 2	27.608 7	11.581 2	16.126 2	10.449 9
28	1.354 6	1.022 6	1.225 7	2.137 0	—	2.017 1
29	1.382 2	—	—	0.900 7	0.228 7	0.768 1
30	1.416 4	0.280 3	—	1.162 8	—	0.513 3
31	1.553 1	0.319 8	0.510 5	0.636 1	0.326 5	0.690 9
32	1.603 9	0.212 5	0.144 9	0.547 3	—	—
33	1.623 5	0.203 3	—	0.663 7	—	—

* 柚皮苷 △野漆树苷

* naringin △ rhoifolin

移栽至别处时会发生变种,因此本实验所选的 5批毛橘红样品均来自广东省化州市的 GAP基地。考虑到代表性,这 5批样品中考虑了市售药材、鲜果干果及大小果龄等因素;光橘红则来自不同产地或自不同地方购买。

3.2 在考察了多种流动相,以本实验提供的较为理想。由于化橘红药材脱脂后的甲醇液中柚皮苷的含量极高,波长为 283 nm时,可达 80%以上,而其他的成分大部分含量还不到 1%,所以必须截断柚皮苷的峰以突出其他的峰。同时必须大大提高药材的浓度,以便于一些含量更小的峰能被检测出来。经过多次试验,最后将药材的浓度确定为 0.1 g/mL。化橘红含大量的黄酮类化合物,并且他们在理化性质上很相似,为使各成分得到更好的分离效果,采取了梯度洗脱的方式,分析时间定在 70 min

3.3 化州柚已有 1 500多年种植史,其未成熟外果皮称正毛化橘红,曾列为皇室专用圣药,有“真者一片值千金”的说法,足可见其功效甚著。自古以来化橘红均以芸香科植物化州柚的外果皮入药,直到 1959年胡敏寰提出柚果皮可作为化橘红入药^[4],由于来源广泛,价格低廉,故自《中华人民共和国药典》1977年版在化橘红项下增补柚后,光橘红很快便充斥于市场。化州柚为柚的变种,传统的理化鉴别方法很难区别,而指纹图谱研究方法尤其是 HPLC指纹图谱的发展为困难品种的鉴别提供了先进有力的方法手段。本文的研究结果表明,化州柚和柚主要有效部位黄酮类成分的 HPLC指纹图谱有明显差别,应结合药效学对其内在质量进行深入研究,辨别优劣,区别应用,为进一步规范化橘红药材质量标准和安全合理的临床用药提供依据。

References

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol I .
- [2] Zhou R H *Drug Plant Chemotaxonomy* (药用植物化学分类学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1988.
- [3] Huang M S, Zhou ZC. Determination of naringin contents in pummelo (*Citrus grandis* or *C. grandis* var *toementosa*) peel [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1984, 15(5): 11.
- [4] Hu M H. About *Exocarpium Citri grandis* [J]. *J Tradit Med* (中医杂志), 1959, 6: 60.

葛根高效液相指纹图谱的研究

陈士林^{1,2}, 陈四保^{1,2}, 杨大坚¹, 陈新滋¹, 徐宏喜^{3*}

(1. 香港理工大学, 香港 红磡; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 3. 香港赛马会中药研究院, 香港 九龙)

摘要: 目的 采取高效液相色谱法建立野葛的指纹图谱, 为野葛药材质量控制提供依据。方法 Agilent 高效液相色谱仪, Zorbax XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇和水梯度洗脱, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 250 nm。结果 精密度和重复性试验中各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 符合有关规定。结论 此方法可作为控制野葛内在质量的标准。

关键词: 野葛; HPLC; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)07-0661-03

HPLC fingerprint analyses of *Radix Puerariae*CHEN Shi-lin^{1,2}, CHEN Si-bao^{1,2}, YANG Da-jian¹, Albert S. C. Chan¹, XU Hong-xi³

(1. The Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom, Hong Kong, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, CAMS& PUMC, Beijing 100094, China; 3. Hong Kong Jockey Club Institute of Chinese Medicine Limited, Kowloon, Hong Kong, China)

Key words *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; HPLC; fingerprint; quality control

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *P. thomsonii* Benth. 的干燥根。味甘、辛、凉, 归脾胃二经, 具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻之功效^[1]。其主要有效成分为异黄酮类。由于受产地、气候和生态环境等的影响, 不同葛根药材所含的有效成分差异较大^[2,3]。针对中药材或中成药的某个有效成分或指标进行定性、定量分析并不能有效控制中药材或中成药的质量, 目前, 指纹图谱已成为国际公认的控制中药和天然药物质量的最有效的手段, 其根据色谱指纹图谱的模糊属性, 着眼于宏观的规律性的特征分析。本实验通过考察安徽霍山产的野葛, 建立野葛高效液相指纹图谱, 作为评价和控制野葛原药材内在质量的标准。

1 仪器与试剂

Agilent 高效液相色谱仪, DAD 二级管阵列检测器, HP1100 色谱工作站。甲醇为 Fisher 色谱纯,

其他试剂为分析纯。水为超净水。用于指纹图谱的 10 批野葛药材采自安徽霍山县葛根基地, 其他供试样品分别为南京、西安、沈阳、广州 (粉葛) 等地药材市场所售商品药材。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Zorbax XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱: 0~10 min 甲醇由 25% 升为 30%, 20~50 min 甲醇由 30% 升为 80%, 50~60 min 甲醇由 80% 升为 100%; 流速为 0.5 mL/min; 检测波长为 250 nm; 进样量为 20 μL。

2.2 参照物溶液的制备: 采用葛根素 (外标) 为参照物, 精密称定适量, 制成 20 μg/mL 的参照物溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称定葛根粉末 (50 目) 100 mg, 置圆底烧瓶中, 精密加入 100 mL 30% 乙醇溶液, 称定重量, 加热回流 30 min, 用 30% 乙醇

* 收稿日期: 2003-01-22

作者简介: 陈士林 (1961-) 男, 博士, 湖北人, 现任香港理工大学客座教授、中国医学科学院药用植物研究所常务副所长、香港理工大学中药研究所常务副所长, 以中药资源与开发为研究方向。

Tel: 00852-27665606 (010) 62899701 E-mail: scsichen@sohu.com