

紫背金盘的鉴别, 可为紫背金盘的开发利用、质量控制提供方法和依据。

参考文献:

- [1] 国家中药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998
- [2] 中国科学院植物研究所主编. 中国高等植物图鉴 [M]. 第三册. 北京: 科学出版社, 1980
- [3] 张树人. 白毛夏枯草与筋骨草非一物 [J]. 新疆中医药, 1996(3): 43-44
- [4] 褚小兰, 王汉章. 筋骨草的本草考证 [J]. 中药材, 1997, 20

(11): 586-587

- [5] 蔡光先主编. 湖南药物志 [M]. 第七册. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2004
- [6] 陈小霞. 闽产苦草的生物学研究 [D]. 福建: 福建中医学院, 2005
- [7] 陈真真, 聂万松, 方胜, 等. 高效液相法测定筋骨草胶囊中木犀草素的含量 [J]. 安徽医药, 2007, 11(4): 325-326
- [8] 刘斌, 石任兵, 葛小侠, 等. 筋骨草属植物化学成分与药理活性 [J]. 国外医药·植物药分册, 2001, 16(3): 96-101
- [9] 李卫文, 吴文玲, 刘守金, 等. 筋骨草属植物的化学成分 [J]. 安徽医药, 2009, 13(3): 329-336

HPLC 法同时测定不同产地广陈皮中 5 种活性黄酮成分

郑国栋^{1,2}, 蒋林^{1*}, 杨得坡¹, 周芳³, 杨雪¹, 林乐维¹

(1 中山大学药学院 生药与天然药物化学实验室, 广东 广州 510006; 2 广州医学院 基础学院药系, 广东 广州 510182; 3 湖南中医药大学药学院 天然药物化学实验室, 湖南 长沙 410208)

摘要:目的 建立 HPLC 法测定 12 批不同产地广陈皮中 5 种活性黄酮的量。方法 采用超声法提取药材, 通过对提取工艺及色谱条件进行优化建立测定方法, 同时测定不同产地广陈皮中橙皮苷(1)、川陈皮素(2)、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮(3)、橘皮素(4)和 5-羟基-6, 7, 8, 3', 4'-五甲氧基黄酮(5) 5 种活性黄酮的量。结果 12 批广陈皮中橙皮苷的量在 38.021~70.735 mg/g, 均符合药典标准(≥ 35 mg/g), 其中, 产于新会的广陈皮中橙皮苷的量低于广东其他两个产地(高要和龙门); 另外, 广陈皮中多甲氧基黄酮类成分的量以川陈皮素、橘皮素为高。结论 该方法简单、准确, 其结果可为广陈皮质量标准的制定提供一定的依据。

关键词: 广陈皮; 高效液相色谱; 橙皮苷; 多甲氧基黄酮

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)04-0652-04

广陈皮是我国岭南地区著名的道地药材, 位列十大广药之一。《中国药典》(2005 年版)记载, 陈皮为芸香科柑橘属植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮, 其药材可分为陈皮及广陈皮, 质量以广陈皮为优。目前对广陈皮药材质量控制已有报道^[1]。广陈皮药材来源较广, 正品为茶枝柑 *Citrus reticulata* 'Chachi' (当地叫大红柑)的干燥成熟果皮, 主产于广东新会, 又名新会陈皮。具有理气健脾、和胃止呕、燥湿化痰等多种功效^[2]。除挥发油外, 广陈皮主含黄酮类成分。其黄酮类成分有两大类型: 一类是黄酮苷类, 主要为二氢黄酮类成分, 如橙皮苷、柚皮苷等; 一类是多甲氧基黄酮类, 主要有川陈皮素、橘皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮等。研究结果表明, 多甲氧基黄酮类成分具有抗癌^[3]、抗氧化^[4]、抗诱变^[5]、抗炎^[6]及心血管保

护^[7]等多种作用。多甲氧基黄酮类成分广泛存在于芸香科柑橘属类植物中, 随植物来源不同, 该类植物所含多甲氧基黄酮类成分有较大差异^[8-11]。

《中国药典》2005 年版是以橙皮苷作为陈皮及广陈皮质量控制的指标成分。然而, 资料及预实验结果表明, 广陈皮中橙皮苷的量往往低于其他陈皮, 仅通过单一指标成分已无法说明广陈皮的特色。鉴于此, 除橙皮苷外, 本实验还选择了 4 个多甲氧基黄酮(川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘皮素、5-羟基-6, 7, 8, 3', 4'-五甲氧基黄酮)作为指标对来自不同产地的 12 批广陈皮样品进行了测定, 其结果可为广陈皮质量标准的研究提供一定的参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器: 高效液相色谱系统: Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪, SPD-20A 紫外-可见分光检测器,

①收稿日期: 2009-07-20

基金项目: 国家博士后特别资助项目“岭南柑橘属道地药材的 DNA 条形码研究”(200902353); 广东省自然科学基金博士科研启动项目“广陈皮及其近缘类群的 DNA 条形码研究”; 国家科技部十一五支撑项目子课题“砂仁等 5 种中药材规范化生产关键技术研究”(2006BA106A11F-02) 广陈皮子项目

作者简介: 郑国栋(1979—), 男, 湖北省宜昌市人, 博士, 讲师, 主要从事生药学与天然药物化学方向的研究与开发。

Tel: 15918518120 Fax: (020) 39943043 E-mail: gd200237@126.com

* 通讯作者 Tel: (020) 39943041 E-mail: linderson_jiang@163.com

7725i 注射阀 (20 μ L, Rheodyne, USA), LC solution 色谱工作站软件; Milli-Q plus system 超纯水仪 (Millipore, Milford, MA, USA); KUDOS SK250 LH 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); Anke TDL-5 型台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.2 材料: 广陈皮药材于 2007-10—2008-12 采自于广东省江门市新会区各镇、高要市水南镇及惠州市龙门县, 经中山大学药学院杨得坡教授、蒋林研究员鉴定为茶枝柑 *Citrus reticulata* ‘Chachi’ 的干燥成熟果皮。橙皮苷 (1)、川陈皮素 (2)、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮 (3)、橘皮素 (4)、5-羟基-6, 7, 8, 3', 4'-五甲氧基黄酮 (5) 对照品均由笔者从广陈皮药材中制备分离得到, 通过 NMR、MS 等方法对其结构进行了鉴定, HPLC 峰面积归一化法测定结果表明其质量分数均大于 98%。

1.3 试剂: 色谱纯试剂: 乙腈、甲醇 (Tedia Company, Fairfield, USA); 分析纯试剂: 石油醚、醋酸乙酯、甲醇 (天津市富宇精细化工有限公司), 甲酸、冰醋酸 (广州化学试剂厂); 怡宝纯净水 (怡宝食品饮料有限公司); 超纯水 (自制)。

2 方法与结果

2.1 HPLC 色谱条件: 色谱柱为 DIKMA Diamonsil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L; 检测波长: 283 及 330 nm 双波长检测。梯度洗脱程序: 0~15 min, 25%~50% 乙腈; 15~35 min, 50%~60% 乙腈; 35~40 min, 60%~85% 乙腈。在该条件下, 广陈皮药材及对照品色谱图见图 1。

2.2 供试品溶液的制备: 取广陈皮药材粉末 (过

140 目筛) 0.4 g, 精密称定。精密加入 40 mL 甲醇, 超声提取 30 min。4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 浓缩后定容至 25 mL。溶液经微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 对照品溶液的制备: 分别精密称取橙皮苷 (1) 31.2 mg、川陈皮素 (2) 9.6 mg、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮 (3) 8.6 mg、橘皮素 (4) 10.2 mg 和 5-羟基-6, 7, 8, 3', 4'-五甲氧基黄酮 (5) 8.9 mg 5 种自制对照品, 用甲醇溶解并定容至 25 mL, 使之质量浓度分别为 1.248、0.384、0.344、0.408、0.356 mg/mL, 并作为对照品贮备液, 冰箱 4 $^{\circ}$ C 保存、备用。临用前, 用甲醇将储备液稀释到适当浓度, 即为对照品溶液。

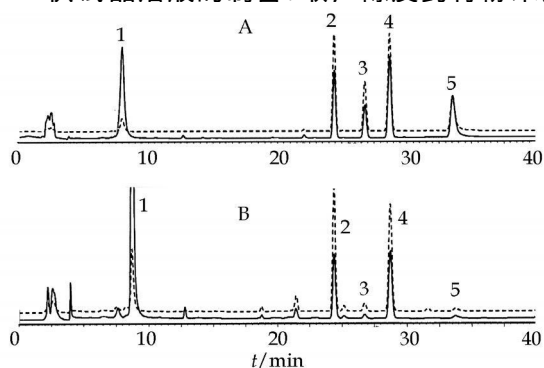
2.4 HPLC 色谱条件的优化

2.4.1 流动相组成系统的优化: 考察了甲醇-水、乙腈-水及在流动相中添加不同浓度的酸 (甲酸、乙酸) 对样品分离的影响。结果表明, 采用甲醇-水系统作为流动相时, 黄酮苷类成分有较好的分离, 但多甲氧基黄酮类成分的分离则不理想, 采用乙腈-水系统对多甲氧基黄酮类成分的分离有明显改善; 在流动相中添加不同比例的酸, 对样品各成分的分离影响不大; 采用梯度洗脱较等度洗脱, 能明显改善各特征峰的分离效果, 既能满足基线分离的要求, 又有适宜的保留时间。故实验选用乙腈-水系统作为流动相并采用梯度洗脱方式。

2.4.2 检测波长的选择: HPLC-PDA 分析结果表明, 5 个黄酮指标成分橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘皮素、5-羟基-6, 7, 8, 3', 4'-五甲氧基黄酮最大吸收波长分别为 283.7、334.4、341.5、323.7、345.1 nm。因此, 选择 283 和 330 nm 分别作为二氢黄酮类及多甲氧基黄酮类成分的检测波长, 在两个波长下, 色谱峰数量较多、表观峰度高、峰形较好且基线稳定。

2.5 药材提取方法的优化

2.5.1 提取溶剂的筛选: 采用超声法提取药材。比较了石油醚、醋酸乙酯、乙醇、甲醇 4 种不同溶剂对广陈皮黄酮类成分的提取效率。结果表明, 石油醚是一种富集多甲氧基黄酮类成分的良好溶剂, 但提取率低, 且其对橙皮苷的提取率几乎为零; 醋酸乙酯对多甲氧基黄酮类成分有较高的提取率, 对橙皮苷的提取率则较低, 且二者均小于乙醇及甲醇; 乙醇和甲醇均是提取橙皮苷及多甲氧基黄酮类成分的良好溶剂, 但甲醇对橙皮苷的提取率略大于乙醇。因此, 实验选择甲醇作为广陈皮黄酮类成分的提取溶剂。



1~5 代表黄酮指标化合物

1—5 numbers indicate flavonoids

图 1 对照品 (A) 及广陈皮药材 (B) HPLC 分析色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and *Pericarpium Citri Reticulatae* (B)

2.5.2 药材粒度的筛选: 以上述 5 个黄酮化合物为指标, 考察了不同粒度的广陈皮药材粉末 40、60、80、100、120、140、160 目对提取效率的影响。结果表明, 药材粒度为 120 目时, 药材中的橙皮苷提取效率最高, 80、100、140 目次之; 药材粒度为 140、160 目时, 多甲氧基黄酮类成分的提取率最高, 且二者大致相当, 橙皮苷的提取率则以 140 目时为大。故药材的粉碎度确定为 140 目。

2.5.3 溶剂倍量的优化: 分别用 40、60、80、100、120、150 倍甲醇超声提取药材。经分析测定, 结果表明, 采用 100 倍甲醇提取, 5 个黄酮化合物的提取率均为最高, 故选择 100 倍体积甲醇提取药材。

2.5.4 超声时间的优化: 考察不同提取时间 12、20、30、45 min 对 5 个黄酮化合物提取效率的影响。结果表明, 超声 30 min 后, 再延长提取时间并不能提高 5 个化合物的提取率, 说明提取已经基本完全, 且无必要再考察提取次数。故最终优化的提取条件为: 药材过 140 目筛, 用 100 倍甲醇溶液超声提取 30 min, 提取 1 次。

2.6 线性范围、检测限及定量限考察: 精密称取对照品储备液, 用甲醇稀释配制成 6 个质量浓度水平。按 2.1 色谱条件, 分别对不同质量浓度的对照品溶液进行分析, 每样重复测定 3 次, 取峰面积平均值。分别以对照品 1~5 的质量浓度 X ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标、峰面积值 Y 为纵坐标进行回归计算。回归方程、线性范围、相关系数见表 1。检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别是当信噪比 (S/N) 为 3 和 10 时, 化合物的质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 见表 1。

表 1 标准曲线数据表 ($n=3$)

Table 1 Calibration data ($n=3$)

化合物	回归方程 ($Y=aX+b$)	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	$Y=19.930.33 X-152.459.75$	0.999 8	19.50~1 248.0	0.54	1.87
2	$Y=83.771.88 X-42.750.37$	0.999 9	1.30~192.0	0.32	1.01
3	$Y=55.838.08 X-26.196.57$	0.999 7	2.69~86.00	0.27	0.87
4	$Y=93.661.10 X-51.701.45$	0.999 9	1.59~204.00	0.34	1.08
5	$Y=53.827.97 X-10.185.66$	0.999 9	1.39~89.00	0.22	0.72

2.7 精密度试验: 分别取低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液。精密吸取 20 μL , 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 色谱条件进行分析。每个质量浓度日内测 6 次, 连续测 6 d。经计算, 对照品中黄酮类成分 1~5 的日内及日间测定质量浓度的 RSD 均小于 5%, 同时准确度在 95.16%~104.71%, 表明测定方法的精密度符合分析要求。

2.8 重现性试验: 取同一批广陈皮药材 6 份, 按

2.2 项下方法制备供试品溶液。在 2.1 色谱条件下, 测定供试品中黄酮成分 1~5 的量。经计算, 5 个黄酮化合物的保留时间和定量测定值的 RSD 均小于 3%, 表明测定方法的重现性良好。

2.9 稳定性试验: 取同一份药材, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液。在 2.1 色谱条件下, 分别于 0、2、4、6、8、10、24、48 h 进样, 测定供试品中黄酮化合物 1~5 的量。经计算, 5 个黄酮成分的保留时间和定量测定值的 RSD 均小于 3%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.10 回收率试验: 精密称取已测定的样品 6 份, 每份 0.2 g, 精密加入混合对照品溶液, 按 2.2 项下方法制得待测溶液, 按 2.1 项下方法进样分析, 计算加样回收率。经计算, 1~5 黄酮成分的平均加样回收率依次分别为 98.27%、101.08%、97.64%、103.20%、96.91%, RSD 值均小于 5%。

2.11 样品测定: 12 批不同产地广陈皮药材, 按 2.2 项下方法处理, 按 2.1 项下方法进样, 测定峰面积, 用外标法计算药材中 5 个黄酮成分的量。计算结果见表 2。由表 2 可知, 12 批广陈皮中橙皮苷的量在 38.021~70.735 mg/g , 均符合《中国药典》标准 ($\geq 35 \text{ mg}/\text{g}$), 其中, 产于江门新会的广陈皮中橙皮苷的量低于广东其他两个产地 (高要和龙门); 广陈皮中多甲氧基黄酮类成分的量以川陈皮素、橘皮素为高, 其量明显高于 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、5-羟基-6, 7, 8, 3', 4'-五甲氧基黄酮。

3 讨论

研究结果表明, 不同产地广陈皮药材中各黄酮类成分的量相差甚大, 除生长环境不同外, 该结果还与药材采收时间、贮藏年限等因素相关。由此可知, 要全面控制药材质量就要从药材的种植、生产、采收、加工等各个环节全面实现规范化生产, 才能确保药材质量稳定。

《中国药典》(2005 年版) 采用索氏提取法, 经石油醚脱色、甲醇反复回流提取陈皮药材, 并以橙皮苷为标准, 对药材进行分析测定, 该方法繁琐、耗时。本实验采用超声法提取药材, 并对提取工艺进行了优化, 方法简单、经济。另外, 本实验采用多指标成分对广陈皮主要活性黄酮类成分进行分析测定, 较单一指标更能反映广陈皮道地性特色的物质基础。

本研究针对广陈皮中主要有效成分群, 首次采用多指标成分建立了 HPLC 定量方法对不同产地的广陈皮进行了分析测定, 方法简单、准确, 为广陈皮药材质量标准的制定提供了有益的参考。另外,

表 2 不同产地广陈皮药材中黄酮类化合物 1~ 5 的测定结果 (n= 3)

Table 2 Determination of flavonoids 1—5 in *Pericarpium Citri Reticulate* collected from different regions in China (n= 3)

样品采收地点	采收时间	化合物/(mg·g ⁻¹) ^a				
		1	2	3	4	5
广东省江门市新会区司前镇	2007-11	51.800±1.262	4.800±0.081	0.523±0.014	4.439±0.084	0.366±0.010
广东省江门市新会区崖南镇	2007-11	53.914±0.730	5.851±0.121	0.644±0.016	3.008±0.045	0.373±0.008
广东省江门市新会区大泽镇	2008-11	50.123±0.200	3.694±0.075	0.406±0.007	2.286±0.046	0.308±0.007
广东省江门市新会区会城镇	2008-10	42.817±0.496	3.281±0.088	0.381±0.008	1.976±0.037	0.277±0.008
广东省江门市新会区双水镇	2007-12	55.379±0.476	7.090±0.093	0.784±0.009	4.364±0.101	0.053±0.008
广东省江门市新会区三江镇	2007-11	38.021±0.544	2.830±0.070	0.367±0.010	1.749±0.049	0.210±0.006
广东省江门市新会区沙堆镇	2008-12	59.785±0.365	4.010±0.064	0.524±0.009	2.905±0.048	0.328±0.007
广东省江门市新会区古井镇	2008-11	51.854±0.950	9.473±0.273	1.046±0.024	5.166±0.101	0.571±0.015
广东省江门市新会区罗坑镇	2007-10	52.394±0.480	3.682±0.052	0.461±0.007	2.619±0.042	0.302±0.008
广东省江门市新会区小冈镇	2008-11	45.957±0.247	9.467±0.243	1.129±0.007	5.596±0.041	0.728±0.009
广东省高要市水南镇	2007-10	70.735±0.236	5.375±0.091	0.502±0.010	3.666±0.045	0.465±0.007
广东省惠州市龙门县	2008-09	65.470±0.958	6.786±0.063	0.520±0.005	5.519±0.040	0.541±0.008

^a表示均值±标准差

^aData are represented as $\bar{x} \pm s$

鉴于广陈皮中富含川陈皮素、橘皮素,两种成分又有丰富的药理活性,故在结合橙皮苷制定广陈皮质量标准时,建议予以充分考虑。

致谢:新会农业局、新会陈皮协会、广东省水果苗木繁育场、江门丽宫国际酒店、江门德鑫制药有限公司等单位在样品采集及基地建设方面对本项目工作的大力支持和协助。

参考文献:

[1] 黄月纯,魏刚. 广陈皮 HPLC 指纹图谱的建立及在药材鉴定中的应用研究[J]. 中草药, 2008, 39(2): 275-277.

[2] 薛芳,许占明. 中国药物大全(中药卷)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005.

[3] Walle T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? [J]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17(5): 354-362.

[4] 左锦静. 陈皮甘草抗氧化活性成份提取及抗氧化作用研究[D]. 郑州:河南工业大学, 2005.

[5] Miyazawa M, Okuno Y, Fukuyama M, et al. Antimutagenic activity of polymethoxyflavonoids from *Citrus aurantium*

[J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(12): 5239-5244.

[6] Li S M, Sang S M, Pan M H, et al. Anti-inflammatory property of the urinary metabolites of nobletin in mouse [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(18): 5177-5181.

[7] Guthrie N, Kurowska E M, Mantney J A, et al. Compositions and methods of treating, reducing and preventing cardiovascular diseases and disorders with polymethoxyflavones [P]. US: US 06987125, 2006-01-17.

[8] 何海音,凌罗庆. 佛手柑化学成分的研究[J]. 药学学报, 1985, 20(6): 433-435.

[9] 翟福东,张淑芬,王小逸,等. 广东甜橙皮黄酮类等化学成分研究[J]. 北京工业大学学报, 1997, 23(1): 39-43.

[10] Chen J, Montanari A M. Isolation and identification of new polymethoxyflavonoids from Dancy Tangerine leaves [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 1235-1238.

[11] Wang X, Li F W, Zhang H X, et al. Preparative isolation and purification of polymethoxylated flavones from Tangerine peel using high speed counter current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1090: 188-192.

天津中草药杂志社开通网上在线投稿系统

天津中草药杂志社编辑出版的 4 种期刊《中草药》、Chinese Herbal Medicines、《现代药物与临床》(原刊名《国外医药·植物药分册》)、《药物评价研究》(原刊名《中文科技资料目录·中草药》)为提高稿件处理效率,更好地为广大读者和作者服务,从 2010 年 1 月开始,中草药杂志社开通网上在线投稿系统。

1. 在线投稿请登陆天津中草药杂志社网站:[http// www. 中草药杂志社. 中国](http://www.中草药杂志社.中国)或[www. tiprpress. com](http://www.tiprpress.com)点击进入 4 刊网页,在页面左侧有“作者登录”链接,第一次登陆按操作说明注册后进行在线投稿;作者可通过点击“作者登录”进行稿件查询。

2. 原则上不再采用电子邮件、纸质投稿。

在此,对广大作者、读者和编委对本刊长期以来的支持表示深深的感谢!

天津中草药杂志社