

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.13.008

高效液相色谱法测定不同品种来源陈皮中多甲氧基黄酮含量*

李文东¹, 魏莹², 赵玉玺², 张世鹏², 刘福¹, 杨兰^{2△}

(1. 川北医学院附属医院药剂科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院药学院药物研究所, 四川南充 637000)

摘要:目的 测定19个品种来源陈皮中多甲氧基黄酮川陈皮素和桔皮素的含量。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为水(A)-甲醇(B)二元梯度洗脱(0~6 min 时 60% B, 6~18 min 时 60% B→100% B), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25℃, 检测波长为 326 nm。结果 川陈皮素和桔皮素进样量分别在 27.04~1 352.01 ng($r=0.999\ 9$)和 14.286~714.320 ng($r=0.999\ 6$)范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为 98.02%和 98.60%, RSD 为 1.59%和 2.75% ($n=6$); 19批陈皮样品中川陈皮素和桔皮素含量测定结果分别为 0.031%~0.968%, 0.011%~0.546%, 表明不同品种来源陈皮中多甲氧基黄酮含量有明显差异, 江西南丰蜜桔、四川红橘和重庆江津大红袍含量较高, 川陈皮素均在 0.4% 以上, 桔皮素均在 0.2% 以上。结论 经方法学验证, 该方法可用于陈皮药材中川陈皮素和桔皮素的含量测定。

关键词: 陈皮; 多甲氧基黄酮; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)13-0030-03

Content Determination of Polymethoxylated Flavones in *Pericarpium Citri Reticulatae* from Different Cultivar Origins by HPLC

LI Wendong¹, WEI Ying², ZHAO Yuxi², ZHANG Shipeng², LIU Fu¹, YANG Lan²

(1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China 637000; 2. Institute of Medicine, School of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China 637000)

Abstract: Objective To determine the content of polymethoxylated flavones(nobiletin and tangeretin) in *Pericarpium Citri Reticulatae* from 19 cultivar origins. **Methods** The chromatographic column was Diamonsil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was water(A)-methanol(B) with binary gradient elution(0-6 min, 60% B; 6-18 min, 60% B→100% B), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25℃ and the detection wavelength was 326 nm. **Results** The nobiletin and tangeretin showed good linear relationship with peak area in the ranges of 27.04-1 352.01 ng($r=0.999\ 9$) and 14.286-714.320 ng($r=0.999\ 6$), and the average recoveries were 98.02% with RSD of 1.59% and 98.60% with RSD of 2.75% ($n=6$). The contents of nobiletin and tangeretin in the 19 batches of *Pericarpium Citri Reticulatae* were 0.031%-0.968% and 0.011%-0.546%. The results showed that the contents of polymethoxylated flavones had obvious differences among samples from different cultivar origins, which were relatively high from *Citrus reticulata* Blanco Kinokuni in Jiangxi, *Citrus reticulata* Zhuhong in Sichuan and *Citrus reticulata* Dahongpao in Jiangjin District of Chongqing(more than 0.4% of nobiletin and 0.2% of tangeretin). **Conclusion** According to the methodology validation, this method can be used for the content determination of nobiletin and tangeretin in *Pericarpium Citri Reticulatae*.

Key words: *Pericarpium Citri Reticulatae*; polymethoxylated flavones; HPLC; content determination

*基金项目: 国家自然科学基金[81460575]。

第一作者: 李文东, 男, 大学本科, 中药师, 研究方向为中药质量, (电子信箱)853900926@qq.com。

△通信作者: 杨兰, 女, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为生药的鉴定和品质评价, (电子信箱)orchid090112@hotmail.com。

- [10] 胡珍, 陈景瑞, 魏静, 等. 冠状动脉结扎制备大鼠心肌梗死模型及评价实验研究[J]. 天津中医药, 2016, 33(2): 90-95.
- [11] 杨涛, 费振海, 钟兴明. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展[J]. 浙江医学, 2018, 40(18): 2083-2087.
- [12] LIU X, SHI F, LI Y, et al. Post-translational modifications as key regulators of TNF-induced necroptosis[J]. Cell Death Dis, 2016, 6(7): 1-9.
- [13] CADENAS S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection[J]. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2018, 1859(9): 940-950.
- [14] 徐盟. 心肌缺血再灌注损伤的主要机制与相关药物治疗的研究进展[J]. 实用药物与临床, 2014, 17(8): 1052-1056.
- [15] 王大安, 蔺志华. 血府逐瘀汤干预急性心肌缺血心肌细胞凋亡与 Bcl-2、Bax 表达的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(1): 44-45.
- [16] MINAMINO T, KITAKAZE M. ER stress in cardiovascular disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(6): 1105-1110.
- [17] 张怀民, 杨虹, 郑海洲. 天然黄酮类化合物防治心脑血管疾病的研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35(10): 704-708.
- [18] 黄家林, 田代雄. 三七总皂苷抗炎免疫药理研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4657-4660.
- [19] 程果, 徐国兵. 香豆素类化合物的药理作用研究进展[J]. 中成药, 2013, 35(6): 1288-1291.

(收稿日期: 2018-11-20)

陈皮来源于芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮,药材分为陈皮和广陈皮,具有理气健脾、燥湿化痰功效^[1],主产于广东、福建、四川、浙江、江西。陈皮主要含黄酮类、挥发油类和生物碱类等活性成分^[2-4]。其中黄酮类有黄酮苷类(如橙皮苷)和多甲氧基黄酮类(如川陈皮素^[5]和桔皮素^[6])。现代研究表明,多甲氧基黄酮类成分(川陈皮素、桔皮素)有平喘、抗癌、抗真菌、抗动脉粥样硬化、治疗神经退行性疾病^[7-11]等药理作用。中药陈皮的质量主要决定于其活性成分的含量,此外,中药材质量还与产地、品种和采收期等因素相关^[3,6,12]。不同产地、不同采收季节和基源陈皮中橙皮苷成分含量存在显著差异^[13-14]。为此,本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法测定不同产地、不同品种来源陈皮中多甲氧基黄酮的含量,为评价陈皮药材的质量提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(包括四元泵、在线脱气机、紫外检测器,美国安捷伦公司);Sartoris BT224S 型电子天平(万分之一,赛多利斯科学仪器公司);Mettler AE240 型电子天平(十万分之一,梅特勒公司)。

1.2 试剂

川陈皮素和桔皮素对照品(自制,¹H-NMR、¹³C-NMR,ESI-MS 鉴定,含量采用 HPLC 峰面积归一化法计算且不低于 98%);甲醇(色谱级,赛默飞世尔科技有限公司,批号为 152836),水为纯化水(Millipore 水纯化仪,自制);其他试剂均为分析纯。不同品种来源陈皮均由川北医学院生药教研室杨兰讲师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

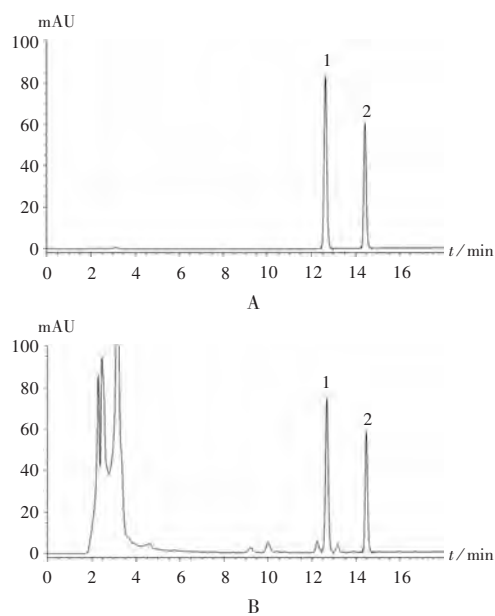
色谱柱:Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(B)-水(A),二元梯度洗脱(0~6 min、60% B,6~18 min、60% B→100% B);流速:1.0 mL/min;检测波长:326 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下的色谱图见图 1。

2.2 溶液制备

称取减压干燥至恒重的川陈皮素对照品和桔皮素对照品适量,精密称定,置同一 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得含川陈皮素 19.408 μg/mL 和桔皮素 9.968 μg/mL 的混合对照品溶液。取样品粗粉约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加甲醇 80 mL,称定质量,水浴加热回流 1.5 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:取混合对照品溶液(含川陈皮素



1. 川陈皮素 2. 桔皮素
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液
图 1 高效液相色谱图

135.201 μg/mL 和桔皮素 71.432 μg/mL)适量,按比例稀释 2,5,10,35,50 倍,即得系列对照品溶液。按拟订色谱条件进样测定。以对照品质量(X , ng)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得川陈皮素、桔皮素回归方程分别为 $Y_{川} = 2.608X_{川} - 10.210$ ($r = 0.9999$), $Y_{桔} = 3.816X_{桔} - 7.206$ ($r = 0.9996$)。结果表明,川陈皮素和桔皮素进样量分别在 27.04~1352.01 ng 和 14.286~714.320 ng 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.2 项下混合对照品溶液适量,按拟订色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果川陈皮素、桔皮素峰面积的 RSD 分别为 1.95% 和 1.74% ($n = 6$),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:按 2.2 项下方法制备供试品溶液(12 号广东新会),按拟订色谱条件分别在 0,2,4,8,12,24 h 时进样测定。结果川陈皮素、桔皮素峰面积的 RSD 分别为 1.73% 和 1.51% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:精密称取同一批样品(12 号广东新会),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,共 6 份,按拟订色谱条件进样测定,按外标法计算含量。结果川陈皮素、桔皮素含量的 RSD 分别为 1.16% 和 2.64% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量(川陈皮素为 0.176%,桔皮素为 0.095%)的 12 号陈皮样品,共 6 份,精密称定,每份约 0.5 g,分别精密加入混合对照品溶液(川陈皮素和桔皮素的质量浓度分别为 0.1765,0.0953 g/L)各 5 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表 1。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.864	0.467	0.882	0.476	1.740	0.940	99.26	99.27				
0.882	0.476	0.882	0.476	1.751	0.951	98.47	99.69				
0.885	0.478	0.882	0.476	1.767	0.967	99.94	102.62	98.02	98.60	1.59	2.75
0.884	0.477	0.882	0.476	1.738	0.938	96.77	96.75				
0.882	0.476	0.882	0.476	1.727	0.927	95.75	94.65				
0.881	0.475	0.882	0.476	1.745	0.945	97.90	98.64				

注:A为川陈皮素,B为桔皮素。下表同。

2.4 样品含量测定

按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定陈皮中川陈皮素和桔皮素的含量。结果见表2。

表2 不同来源陈皮中川陈皮素和桔皮素的含量($n=3$)

序号	产地	含量(%)		品种
		A	B	
1	江西南昌	0.034	0.013	九月黄 <i>Citrus reticulata</i> Erythrosa
2	江西南昌	0.033	0.011	九月黄 <i>Citrus reticulata</i> Erythrosa
3	江西南昌	0.034	0.012	九月黄 <i>Citrus reticulata</i> Erythrosa
4	江西	0.031	0.012	红橘 <i>Citrus reticulata</i> Zhuhong
5	江西	0.038	0.015	红橘 <i>Citrus reticulata</i> Zhuhong
6	江西	0.055	0.019	红橘 <i>Citrus reticulata</i> Zhuhong
7	江西赣州	0.031	0.013	红橘 <i>Citrus reticulata</i> Zhuhong
8	江西赣州	0.032	0.013	红橘 <i>Citrus reticulata</i> Zhuhong
9	江西吉安	0.280	0.117	红橘 <i>Citrus reticulata</i> Zhuhong
10	江西南丰县	0.526	0.274	南丰蜜桔 <i>Citrus reticulata</i> Blanco Kinokuni
11	江西南丰县	0.442	0.231	南丰蜜桔 <i>Citrus reticulata</i> Blanco Kinokuni
12	广东新会	0.176	0.095	茶枝柑 <i>Citrus reticulata</i> Blanco Chachiensis
13	江西新干三湖	0.394	0.214	大红袍 <i>Citrus reticulata</i> Dahongpao
14	四川安岳	0.968	0.546	红橘 <i>Citrus reticulata</i> Zhuhong
15	四川达县	0.707	0.291	红橘 <i>Citrus reticulata</i> Zhuhong
16	四川眉山	0.701	0.254	红橘 <i>Citrus reticulata</i> Zhuhong
17	四川宜宾	0.630	0.297	红橘 <i>Citrus reticulata</i> Zhuhong
18	重庆江津	0.721	0.259	大红袍 <i>Citrus reticulata</i> Dahongpao
19	浙江金华	0.080	0.032	温州蜜柑 <i>Citrus reticulata</i> Blanco Unshiu

3 讨论

检测波长选择:取川陈皮素和桔皮素的对照品溶液置UV-1750型紫外可见分光光度计下,于200~700 nm波长范围内进行扫描,结果川陈皮素和桔皮素在326 nm波长处有最大吸收,故将检测波长设定为326 nm。

色谱条件选择:样品中所含川陈皮素和桔皮素结构相近、极性类似,等度洗脱难以实现同时分离,故采用梯度洗脱,试验考察了多种流动相系统(乙腈-0.1%醋酸水、甲醇-0.1%醋酸水、甲醇-水)。结果显示,甲醇-水能达到分离度的要求,分离时间合适,最后确定流动相为甲醇(B)-水(A),二元梯度洗脱(0~6 min、60% B, 6~18 min、60% B→100% B)。

提取条件选择:曾考察了超声提取法和水浴加热回流法在不同提取时间(0.5, 1, 1.5 h)的提取效果,结果表明,在相同时间超声提取回收率低于水浴加热回流提取回收率;随时间的增加,水浴加热回流提取回收率越高,提取1.5 h后,提取回收率在98%,故本试验中采用水浴加热回流法提取。

不同来源样品的含量测定:化学成分是中药中医临床产生药效的物质基础,由于药材种植产地、基源的不同,内、外界因素导致中药材中的化学成分发生变化,成分的变化必将引起药效的变化。由表2可见,从多甲氧基黄酮的含量角度分析,江西南丰蜜桔、四川红橘、重庆大红袍质量可与新会茶枝柑媲美,可结合生药研究报道^[15]进行开发利用。目前,对于江西陈皮的研究甚少,柑橘类植物品种多、栽培广,每年产出大量的柑橘水果,果皮也被大量废弃,仅有少部分柑橘品种的果皮被利用。应加强江西陈皮的研究力度,可结合药效,以扩大陈皮的药用资源。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 191.
- [2] 韦正, 陈鸿平, 杨丽, 等. 不同贮藏年限广陈皮中辛弗林及总黄酮含量变化规律研究[J]. 辽宁中医药, 2013, 40(5): 982-985.
- [3] 郑国栋, 蒋林, 杨得坡, 等. HPLC法同时测定不同产地广陈皮中5种活性黄酮成分[J]. 中草药, 2010, 41(4): 652-655.
- [4] 王坚, 韦正, 陈鸿平, 等. 源于同一植株陈皮挥发油成分动态变化规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 73-78.
- [5] 封宇飞, 张宏武, 邹忠梅, 等. 陈皮饮片高效液相指纹图谱研究[J]. 中国药业, 2012, 21(24): 28-31.
- [6] 罗璇捷, 杨宜婷, 李晓伟, 等. 11个品种来源陈皮中多甲氧基黄酮的测定[J]. 中成药, 2017, 39(3): 565-569.
- [7] KANG JY, SHIN JW, KIM YR, et al. Nobiletin improves emotional and novelty recognition memory but not spatial referential memory[J]. J Nat Med, 2017, 71: 181-189.
- [8] 杨爽, 于波, 张耀方, 等. 川陈皮素对囊性纤维化跨膜传导调节因子的激活作用[J]. 药学报, 2013, 48(6): 848-854.
- [9] 李兰英, 彭蕴汝, 钱士辉, 等. 陈皮多甲氧基黄酮类成分对肝癌 SMMC-7721、HepG2 细胞株增殖的影响[J]. 中药材, 2007, 30(3): 324-326.
- [10] 宋玉鹏, 刘凯洋, 陈海芳, 等. 多溶剂萃取法分离制备陈皮中的川陈皮素和桔皮素[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(8): 952-956.
- [11] 王秀琪, 丁晓波, 曾明. 川陈皮素对阿尔茨海默病的神经保护作用[J]. 重庆医学, 2014, 43(22): 2948-2951.
- [12] 林乐维, 蒋林, 郑国栋. 不同产地和采收期广陈皮中三种黄酮类成分的含量测定[J]. 中药材, 2010, 33(2): 173-176.
- [13] 孙冬梅, 毕晓黎, 胥爱丽, 等. HPLC法测定不同产地陈皮药材中橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 1-3.
- [14] 胡志军, 陈建秋. HPLC测定不同基原陈皮药材中橙皮苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 95-98.
- [15] 范崔生, 王爱素. 江西樟头红和南丰橘皮的生药学研究[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(10): 581-583.

(收稿日期: 2018-09-22)