

不同贮藏年限广陈皮黄酮类成分的变化规律研究

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

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006; 2. 广州医学院基础学院, 广东 广州 510182; 3. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208)

关键词: 广陈皮; 高效液相色谱; 贮藏年限; 黄酮

摘要: 目的: 研究不同贮藏年限广陈皮黄酮类成分的变化规律。方法: 应用 HPLC 法对 10 批不同贮藏年限广陈皮药材中的橙皮苷(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 种黄酮类成分的变化规律进行了定量研究。结果: 10 批不同贮藏年限广陈皮药材中橙皮苷的含量均在 35 mg/g 以上, 符合药典标准(35 mg/g); 5 种黄酮类成分的含量随贮藏年限的延长有一定增加趋势。结论: 陈皮“陈久者良”这一说法有一定的科学依据, 具体原因尚待进一步确证。

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1001-4528(2010)06-0977-04

广陈皮为我国岭南地区著名传统中药材,位列十大广药之一。《中国药典》(2005 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^[1]。广陈皮正品为茶枝柑(*Citrus reticulata* 'Chachi')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、橘皮素等。

陈皮有“陈久者良”之说,如梁代陶弘景曰“橘皮疗气大胜,须陈久者良”,宋代苏颂云“以陈久者入药良”。目前,已有一些科学研究对这一说法进行了验证。总体来看,在挥发油方面的结论比较一致,即陈皮挥发油总量随贮藏时间的延长有下降的趋势^[3,4];在黄酮类成分方面的研究,则意见不一,且多参考《中国药典》仅以橙皮苷为指标对不同贮藏年限陈皮中该类成分的含量进行了测定^[5-8]。

因此,鉴于广陈皮主含黄酮类成分,且该类成分有丰富的药理活性^[9-15],除橙皮苷外,本实验还选择了 4 个多甲氧基黄酮 (polymethoxylated flavones,

PMFs)——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 10 批不同贮藏年限广陈皮黄酮类成分的变化规律进行了进一步的研究。

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, 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 10 批不同贮藏年限广陈皮药材 (1 年到 33 年) 系从广东省江门市新会区广东省水果良种苗木繁育场及新宝堂陈皮有限公司采集,药材经中山大学药学院生药学实验室杨得坡教授及蒋林研究员鉴定为茶枝柑 (*Citrus reticulata* 'Chachi') 的干燥成熟果皮。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 5 种对照品由笔者从广陈皮药材中制备分离得到,经理化鉴别、光谱解析对其结构进行了确证, HPLC 峰面积归一化法测定结果表明其纯度均大于 98%。

收稿日期: 2009-07-49

基金项目: 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”(2006BAI06A11-02) 广陈皮子项目; 广州医学院博士启动项目“广陈皮道地性特色的物质基础及其质量标准研究”(L95118)

作者简介: 郑国栋 (1979 -), 男, 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 E-mail: gd200237@126.com

* 通讯作者: 蒋林, 男, 博士, 研究员, 主要从事中药资源学与 GAP 研究。Tel: (020) 39943041 E-mail: linderson_jiang@163.com

1.3 试剂 色谱纯试剂:乙腈(Tedia Company, Fairfield, USA);分析纯试剂:甲醇(天津市富宇精细化工有限公司);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:DIKMA Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, i. d. 5 μm);流动相:乙腈-水;流速:1 mL/min;柱温:25 °C;进样量:20 μL;检测波长:283 nm(橙皮苷)及 330 nm(多甲氧基黄酮)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分离色谱图见图1。

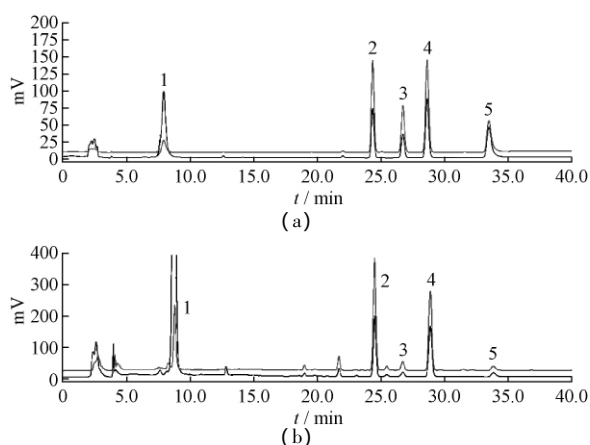


图1 对照品(a)及广陈皮药材(b)HPLC分析色谱图
(1~5代表黄酮对照品1~5)

2.2 供试品溶液的制备 取广陈皮药材,打粉、过140目筛,取0.4 g精密称定。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量瓶中。溶液经微孔滤膜过滤,即得。

2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取橙皮苷(1 hes)、川陈皮素(2 nob)、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮(3 hep)、橘皮素(4 tan)和5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮(5 pen)5种自制对照品,用适量甲醇溶解并定容,使之浓度分别为1.248、0.384、0.344、0.408、0.356 mg/mL,并作为标准贮备液,4 °C保存、备用。临用前,用甲醇将贮备液稀释到适当浓度,即为对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围、检测限及定量限考察 精密称取对照品贮备液,用甲醇稀释配制成6个浓度水平。按建立的色谱条件,分别对不同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的浓度X(μg/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,化合物的浓度(μg/mL)结果见表1。

2.4.2 精密度试验 分别取高、中、低3个浓度的混合对照品溶液。进样分析,每个浓度日内测6次,连续测6 d。经计算,对照品中黄酮类成分1~5的

表1

标准曲线数据表(n=3)

Tab. 1

Calibration data for flavonoids 1~5 (n=3)

成分	回归方程	R ²	线性范围/(μg/mL)	LOD/(μg/mL)	LOQ/(μg/mL)
1	$Y = 19\,930.33X - 152\,459.75$	0.999 8	19.50~1 248.00	0.54	1.87
2	$Y = 83\,771.88X - 42\,750.37$	0.999 9	1.50~192.00	0.32	1.01
3	$Y = 55\,858.03X - 26\,196.57$	0.999 7	2.69~86.00	0.27	0.87
4	$Y = 93\,661.10X - 51\,701.45$	0.999 9	1.59~204.00	0.34	1.08
5	$Y = 53\,827.97X - 10\,185.66$	0.999 9	1.39~89.00	0.22	0.72

日内及日间测定浓度的RSD均小于5%,同时准确度在95.16%~104.71%之间,表明测定方法的精密度符合分析要求。

2.4.3 重复性试验 取同一批广陈皮药材6份,按供试品溶液的制备方法制备,测定供试品中黄酮化合物1~5的含量。经计算,5个黄酮化合物的保留时间和含量测定值的RSD均小于3%,表明测定方法的重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一份药材,按供试品溶液的制备方法制备,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的含量。经计

算,5个黄酮化合物的保留时间和含量测定值的RSD均小于3%,表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.4.5 回收率试验 精密称取已知含量的样品6份,每份0.2 g,加入混合对照品溶液适量,按供试品溶液的制备方法制备,进样分析,计算加样回收率。经计算,5个黄酮化合物的平均加样回收率在96.91%~103.20%之间,RSD值均小于5%,表明方法的准确度良好。

2.5 样品含量测定 10批不同贮藏年限广陈皮药材,按供试品溶液的制备方法制备,进样分析,平行3次,用外标法计算药材中5个黄酮化合物的含量。

10批药材含量测定结果见表2。药材黄酮类成分含量变化趋势见图2。

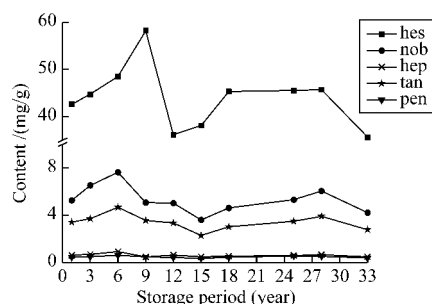


图2 不同贮藏年限广陈皮中主要黄酮类成分含量变化趋势图

表2 不同贮藏年限广陈皮药材中主要黄酮类成分的含量($n=3$)

编号	药材来源	贮藏年限 /年	化合物1		化合物2		化合物3		化合物4		化合物5	
			含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
			I (mg/g)	I %	I (mg/g)	I %	I (mg/g)	I %	I (mg/g)	I %	I (mg/g)	I %
S1	广东省水果良种苗木繁育场	1	42.584	1.94	5.246	2.11	0.621	1.41	3.402	2.79	0.438	2.80
S2	广东省水果良种苗木繁育场	3	44.767	1.07	6.511	1.72	0.684	1.32	3.689	0.92	0.477	2.74
S3	广东省水果良种苗木繁育场	6	48.462	2.81	7.634	2.91	0.910	2.85	4.658	2.01	0.608	2.31
S4	新宝堂陈皮有限公司(市售商品)	9	58.176	1.77	5.063	2.35	0.474	2.80	3.555	2.27	0.469	1.79
S5	新宝堂陈皮有限公司(市售商品)	12	36.187	2.51	5.019	1.94	0.614	2.13	3.335	1.56	0.415	2.94
S6	新宝堂陈皮有限公司(市售商品)	15	38.097	1.20	3.595	2.58	0.479	1.36	2.272	2.68	0.340	2.19
S7	新宝堂陈皮有限公司(市售商品)	18	45.299	0.72	4.605	2.85	0.521	2.73	3.001	1.70	0.433	2.43
S8	新宝堂陈皮有限公司(市售商品)	25	45.536	2.24	5.300	2.50	0.579	2.66	3.488	2.17	0.544	2.89
S9	新宝堂陈皮有限公司(市售商品)	28	45.701	1.15	6.038	2.96	0.650	2.05	3.902	1.73	0.518	2.93
S10	新宝堂陈皮有限公司(市售商品)	33	35.619	2.72	4.206	2.05	0.466	2.36	2.762	2.94	0.382	2.86

致。从药材采样情况来看,前3批为同一产地,贮藏时间明确,药材质量较为统一;后7批为药店市售药材,由于受到采样时间、采样地点、果树树龄、加工方式、贮藏条件及商品流通等因素的影响,药材质量难以统一。

在以黄酮类成分为指标探讨陈皮“陈久者良”方面,曹臣等^[5]认为橙皮苷是一种黄酮类苷,由芸香糖基与橙皮苷元组成,存放时间越长,陈皮内含的芸香糖与橙皮苷元结合形成的橙皮苷越多,故含量越高;林林等^[6]认为,不同年份新会陈皮贮存期越长,总黄酮含量和橙皮苷含量越高;而易仑朝等^[7]及丁春光等^[8]则认为,不同贮存年限陈皮黄酮类化合物含量随贮存时间变化较小。

因此,结合前人的研究工作,笔者认为,随贮藏时间的延长,广陈皮黄酮类成分的含量有一定增高趋势;含量增高的原因比较复杂,既有可能与药材贮藏过程中相关酶的活性变化有关,又有可能与药材所含挥发性成分的散失有关,另外,大量文献资料表明^[16-18]植物本身所含的内生菌可以产生并促进药材活性成分的累积。因此,陈皮“陈久者良”这一说法有一定的科学依据,可能是各种原因综合导致其

由表2可知,10批不同贮藏年限广陈皮药材中橙皮苷的含量均在35 mg/g以上,符合《中国药典》(2005版)规定的标准(以百分含量计,3.5%);除橙皮苷外,广陈皮黄酮类成分的含量以川陈皮素及橘皮素为高,3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮和5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮含量较低。

3 结论与讨论

由图2可知,广陈皮中5个主要活性黄酮成分的含量随贮藏年限的不同,存在一定的变化,其变化趋势基本一致;开始时,黄酮类成分的含量随贮藏年限的延长有一定增加趋势,随后出现一定反复,但出现反复的现象更可能是由于药材质量难以统一所

致。活性成分在贮存过程中累积增加所致,具体原因尚待进一步验证。

4 致谢

衷心感谢新会农业局、新会陈皮协会、广东省水果苗木繁育场、新宝堂陈皮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] 中国药典[S]. 一部. 2005:132.
- [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] 罗琼. 贮存时间及炮制方法对陈皮质量的影响[J]. 中医药学报, 2003, 31(1):27.
- [4] 严寒静. 不同贮存时间广陈皮挥发油的成分分析[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(3):218.
- [5] 曹臣,袁梦石,黄开颜. “陈皮须用隔年陈”之探讨[J]. 中医药导报, 2006, 12(6):92.
- [6] 林林,林子夏,莫云燕,等. 不同年份新会陈皮总黄酮及橙皮苷含量动态分析[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6):1432.
- [7] 易仑朝,谢培山,梁逸曾,等. GC/MS和HPLC对陈皮“陈久者良”的验证[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(21):1610.
- [8] 丁春光,孙素琴,周群,等. 应用HPLC-DAD及HPLC-MS/MS

- 技术研究不同贮存年限陈皮的指纹图谱[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(11):927.
- [9] Yeh C C, Kao S J, Lin C C *et al.* The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin *in vivo* and *in vitro* [J]. *Life Sci* 2007 80(20):1821.
- [10] Guardia T, Rotelli A E, Juarez A O *et al.* Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat [J]. *Farmacologia* 2001 56(96):683.
- [11] Kaur G, Tirkey N, Chopra K. Beneficial effect of hesperidin on lipopolysaccharide induced hepatotoxicity [J]. *Toxicology* 2006, 226(2-3):152.
- [12] Walle T. Methoxylated flavones: a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? [J]. *Semin Cancer Biol* 2007, 17(5):354.
- [13] 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]. 河南:河南工业大学, 2005.
- [14] Miyazawa M, Okuno Y, Fukuyama M *et al.* Antimutagenic activity of polymethoxyflavonoids from *Citrus aurantium* [J]. *J Agric Food Chem* 1999 47(12):5239.
- [15] 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.
- [16] 江 曙, 钱大玮, 段金彪, 等. 植物内生菌与道地药材的相关性研究[J]. 中草药, 2008, 39(8):1268.
- [17] 王利国, 潘超美, 贺 红, 等. 抗肿瘤药用植物及其内生菌活性代谢产物研究进展[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(2):183.
- [18] 陈雪英, 都晓伟, 李 滨, 等. 内生菌与药用植物活性成分相关性研究进展[J]. 国外医药(植物药分册), 2008, 23(2):47.

HPLC 测定茜草炭饮片中 1,3-二羟基蒽醌含量

康 辉¹, 张振凌^{2*}, 周 艳³, 王一硕²

(1. 郑州市食品药品检验所, 河南 郑州 450000; 2. 河南中医学院, 河南 郑州 450008; 3. 河南农业大学, 河南 郑州 450003)

关键词: 茜草; 1,3-二羟基蒽醌; HPLC

摘要: 目的: 确定 1,3-二羟基蒽醌含量测定方法, 建立茜草炭饮片质量标准。方法: 高效液相法。波长: 250 nm, 温度: 25℃, 流动相: 乙腈-水(60:40)。结果: 不同产地、不同批次茜草炭饮片 1,3-二羟基蒽醌含量高于 0.15%。结论: 测定 1,3-二羟基蒽醌含量可以作为茜草炭饮片的质量标准。

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1001-4528(2010)06-0980-03

中药茜草为茜草科植物茜草(*Rubia Cordifolia* L.)的干燥根及根茎, 临床常生用或炒炭用, 生品偏于凉血, 祛瘀通经, 炒炭增强止血作用。2005年版《中国药典》仅规定茜草炭炮制方法: "取茜草片或段, 置炒制容器内, 用武火炒至表面焦黑色, 内部焦褐色, 取出晾凉"。但尚未有严格的质量控制标准。前期研究发现茜草炒炭后大叶茜草素、总蒽醌含量降低^[1,2], 但同时 1,3-二羟基蒽醌含量明显增加^[3], 且与其止血作用增强有密切相关, 认为是茜草炒炭后止血作用增强的有效成分^[4], 但其含量测定方法以及限度标准等尚未进行研究。本研究采用优选的工艺中试 13 批样品, 对其 1,3-二羟基蒽醌含量进行测定, 在此基础上确定茜草炭饮片中 1,3-二羟基蒽

醌含量最低限度, 为茜草炭饮片质量标准的制定提供合理依据。方法和结果报告如下。

1 仪器与试剂

1.1 高效液相色谱仪 日本岛津 SPD-40A, Shim-Pack CLC-ODS 柱(6.0 mmID × 15 cm)(日本岛津)。

1.2 样品 茜草炭饮片分别由河南中医学院、安徽亳州沪谕中药饮片厂采购陕西、河南、山东当年产茜草药材, 请河南中医学院生药教研室陈随清博士进行生药鉴定, 均为茜草科植物茜草(*Rubia Cordifolia* L.)的干燥根及根茎, 按照优选工艺在亳州沪谕中药饮片厂中试生产。

1.3 对照品 1,3-二羟基蒽醌 由本实验室分离提取精制, 经鉴定为 1,3-二羟基蒽醌^[3], 高效液相法

收稿日期: 2009-06-15

基金项目: 国家十五科技攻关课题茜草饮片炮制工艺和质量标准研究(2001BA701A55-8)

作者简介: 康 辉(1963-)男, 副主任药师, 从事药品检验。

* 通讯作者: 张振凌(1957-)女, 教授, 从事中药炮制教学与研究。Tel: (0371)65680970 E-mail: zhangz16758@163.com