

柑橘属常用中药黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究与比较

陈永刚¹, 林励^{2*}

(1. 武汉市第三医院 药学部, 湖北 武汉 430060;

2. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510006)

【摘要】 目的: 建立芸香科柑橘属毛橘红、光橘红、陈皮、青皮、枳壳、枳实 6 种临床常用理气类中药黄酮类成分的液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 分析比较其指纹特征差异性, 为柑橘属常用中药的谱效相关性研究和临床用药合理性提供科学依据。方法: 以 C₁₈ 色谱柱为分析柱, 流动相甲醇-水(含冰乙酸) 梯度洗脱, 制备同一色谱条件下 6 种药材的 HPLC 指纹图谱。结果: 6 种常用中药按照植物化学分类学方法被分为柚皮苷型和橙皮苷型。根据色谱峰保留时间, 毛橘红、光橘红共标出 15 个共有峰; 陈皮、青皮、枳壳、枳实共标出 10 个共有峰。全部药材共标出 5 个共有峰。毛橘红与光橘红色谱图与共有模式的整体相似度在 0.928 5~0.996 2, 相似度较高。陈皮、青皮、枳实三者色谱图与共有模式的整体相似度在 0.922 1~0.997 3, 相似度较高。而枳壳与共有模式的相似度仅为 0.454 7~0.773 3。结论: 建立的柑橘属 6 种常用中药黄酮类成分指纹图谱, 可以直观的比较出谱图间的差异, 同时各特征峰峰高及峰面积也存有显著区别, 与这 6 种药材在临床应用中医理气功能异同的关联尚待研究。

【关键词】 芸香科; 柑橘属; 高效液相色谱法; 指纹图谱

临床常用理气类中药陈皮、青皮、化橘红、枳壳、枳实均属芸香科柑橘属植物^[1]。该属中药主要化学成分为黄酮类物质, 具抗氧化、抗病毒、抗炎症、抗癌活性、预防动脉粥样硬化和胆固醇的增加等作用, 现代药理研究结果表明黄酮类物质是该属中药发挥临床治疗作用的主要药效物质^[2]。

目前, 国内外主要以总黄酮、橙皮苷或柚皮苷等黄酮类成分为指标鉴别和评价柑橘属药材质量优劣^[3], 其研究多集中在单一药材含量测定、化学成分及指纹图谱等方面^[4-6], 尚未见综合多种柑橘属药材进行指纹图谱差异性比较的研究。虽然上述 6 种柑橘属中药均以黄酮类成分为主, 具理气药的一般功效, 但其临床应用侧重各异, 如枳壳与枳实, 两药基源相同, 性味归经与功能主治相似, 但后者作用较强, 长于破滞气, 若非邪实之证, 用当宜慎; 而枳壳作用较缓, 长于理气宽胸, 消胀除痞^[7]。又如化橘红有 2 种基源, 其中来源于化州柚的习称为“毛橘

红”, 来源于柚的称为“光橘红”, 虽基源不同但两者功能主治均相同^[3]。因此, 各药材之间黄酮类成分 HPLC 指纹特征有何异同; 其差异性是否对临床用药有影响等问题尚未见较科学的解释。

本实验采用 HPLC 建立该属常用药材黄酮类成分 HPLC 指纹图谱, 通过比较相似度、共有峰及各药材特征峰, 分析其谱图间差异性, 探讨该属药材临床功效异同点的根源, 为柑橘属中药的谱效相关性研究提供科学依据^[8], 以期指导临床用药的合理性及准确性。

1 材料

天美高效液相色谱仪 (LC2000), KQ-500 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), BP211D 电子分析天平 (0.01 mg, 德国 Sartorius 公司)。

药材来源及鉴定结果见表 1 (其中化橘红与光橘红样品由中药学院实验管理中心提供, 全部药材经广州中医药大学中药学院林励研究员鉴定均为正品, 以上凭证标本均保存在广州中医药大学实验中心实验室)。

柚皮苷对照品 (批号 110722-200309)、橙皮苷对照品 (批号 721-8601) 购自中国药品生物制品检定所, 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 石油醚、冰乙酸等均为分析纯。

【稿件编号】 20110313002

【基金项目】 广东省科技计划项目 (A301020101)

【通信作者】 * 林励, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药资源开发利用与新药研究, Tel: (020) 39358270, E-mail: lwyl@gzhtcm.edu.cn

【作者简介】 陈永刚, 博士, 主管药师, Tel: 15102781829, E-mail:

cyg508@163.com

表 1 药材鉴定结果及来源

样品名称	基源	产地	购买地点	收集时间
陈皮	<i>Citrus reticulata</i> Blanco 的干燥成熟果皮	广东	广州市花都区	2009-02
		广东	广东省茂名市	2009-02
		广西	福建省龙岩市	2008-06
青皮	<i>C. reticulata</i> Blanco 的干燥幼果	广东	广州市花都区	2009-02
		广西	广东省茂名市	2009-02
		广东	福建省龙岩市	2008-06
毛橘红	<i>C. grandis</i> Tomentos 的未成熟干燥外层果皮	广东	化州市平定镇农中生产区	2007-06
		广东	化州市平定镇农中生产区	2004
		广东	化州市平定镇毛橘红 GAP 基地	2007-06
光橘红	<i>C. grandis</i> (L.) Osbeck 的未成熟干燥外层果皮	广东	化州市平定镇毛橘红 GAP 基地	2007-06
		广东	化州市平定镇毛橘红 GAP 基地	2007-06
		广东	云南昆明市	2005
枳壳	<i>C. aurantium</i> L. 的未成熟果皮	四川	广州市花都区	2009-02
		四川	广东省茂名市	2009-02
		四川	福建省龙岩市	2008-06
枳实	<i>C. aurantium</i> L. 的干燥幼果	四川	广州市花都区	2009-02
		四川	广东省茂名市	2009-02
		四川	福建省龙岩市	2008-06

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密量取柚皮苷、橙皮苷对照品适量 ,加甲醇分别制成 0.18 ,1.1 g · L⁻¹ 的溶液 ,作为对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取各药材样品置 60 ℃ 干燥至恒重 ,粉碎 ,过 3 号筛。再精密称取上述各粉末约 0.5 g ,置具塞锥形瓶中 ,加石油醚 (60 ~ 90 ℃) 40 mL ,超声提取 30 min ,弃去石油醚 ,药渣充分挥干石油醚 ;再加甲醇 25 mL ,精密称定 ,超声提取 45 min ,取出 ,放凉 ,用甲醇补足失重 0.45 μm 微孔滤膜滤过 ,取续滤液作供试品溶液 ,共 18 份 ,备用。

2.3 检测方法

2.3.1 色谱条件 Gracesmart RP18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm ,5 μm) ;流动相甲醇 (A) -6% 冰乙酸水溶液 (B) ,梯度洗脱 ,0 ~ 10 min ,0% ~ 10% A; 10 ~ 15 min ,10% ~ 13% A; 15 ~ 20 min ,13% ~ 25% A; 20 ~ 50 min ,25% ~ 55% A; 50 ~ 55 min ,55% ~ 62% A; 55 ~ 60 min ,62% ~ 70% A; 60 ~ 70 min ,70% ~ 100% A; 流速 1.0 mL · min⁻¹ ;柱温室温 ;检测波长 283 nm。

2.3.2 精密度试验 取柚皮苷对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪 ,重复进样 5 次 ,用相似度计算 ,所测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度均大于 0.985 ,其共有峰的保留时间 RSD 1.3% ,峰面

积 RSD 0.84% ,均小于 1.5% ,符合指纹图谱技术的要求^[9]。

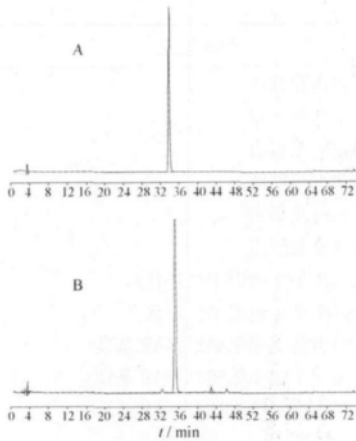
2.3.3 重复性试验 精密称取同一批化橘红药材粉末各 5 份 ,按 2.2 项下方法平行制得 5 份供试品溶液。按 2.3.1 项下条件测定。直观观察所测得的 5 份色谱指纹图谱全貌无明显变化 ;利用相似度计算 ,测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度均大于 0.98 ,各主要色谱峰保留时间的 RSD 均在 0.39% ~ 2.6% ,符合指纹图谱的技术要求^[9]。

2.3.4 稳定性试验 取同一份化橘红供试品溶液 ,于 0 ,1 ,2 ,4 ,8 ,16 ,24 h 进样检测 ,直观观察指纹图谱的全貌无明显变化 ,用相似度计算 ,测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度分均大于 0.95 ,并考察保留时间和峰面积的一致性 ,各色谱峰峰面积和保留时间的 RSD 均小于 1.8% ,表明 24 h 内供试品溶液稳定。

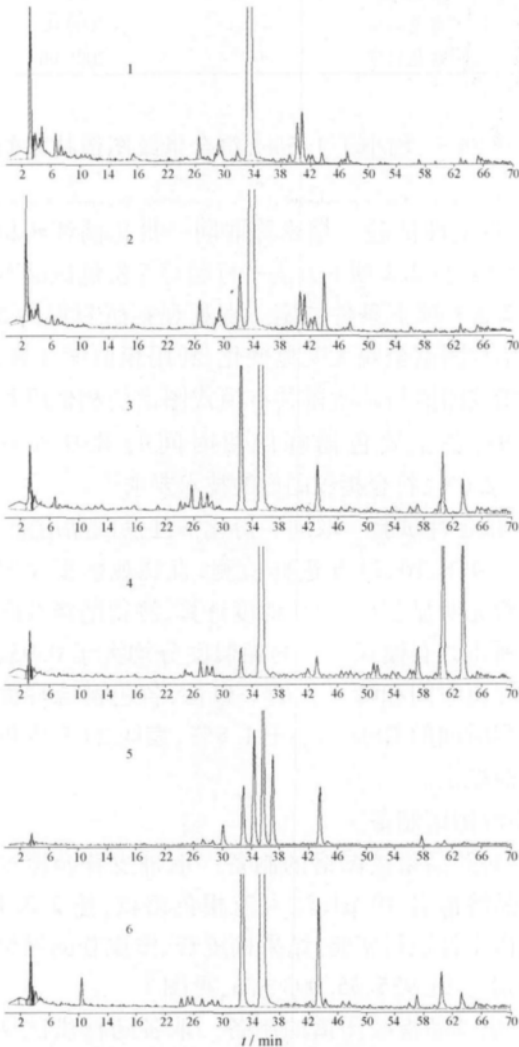
2.4 指纹图谱制备

2.4.1 对照品指纹图谱的制备 取柚皮苷及橙皮苷对照品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪 ,按 2.3.1 项下色谱条件进行实验 ,结果柚皮苷、橙皮苷的保留时间分别为 33.935 ,35.093 min ,见图 1。

2.4.2 供试品指纹图谱的制备 取各药材供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪 ,按 2.3.1 项下色谱条件进行实验 ,以柚皮苷或橙皮苷为参照物测定 18 个样品 ,并记录各色谱图 ,见图 2。



A. 柚皮苷; B. 橙皮苷。
图1 对照品溶液 HPLC 图



1. 毛橘红; 2. 光橘红; 3. 陈皮; 4. 青皮; 5. 枳壳; 6. 枳实。
图2 各药材 HPLC 指纹图谱

2.5 指纹图谱分类^[10]

分别检测所有药材共 18 个样品的指纹图谱,结果表明,各药材所有的色谱峰均在 70 min 内全部出现。按照植物化学分类学方法,依据药材中主要化学成分对所得谱图进行分为 2 类,毛橘红、光橘红药材色谱指纹图谱是以柚皮苷峰为最大峰,归为柚皮苷型;陈皮、青皮、枳壳、枳实 4 种药材的色谱指纹图谱均以橙皮苷峰为最大峰,归为橙皮苷型。

2.5.1 共有峰分组 从柚皮苷型药材谱图的全貌将整个色谱图的共有峰分成 3 组: I 组 (0.00 ~ 22.00 min)、II 组 (22.00 ~ 50.00 min)、III 组 (50.00 ~ 70.00 min)。由于第 I 组峰中含溶剂峰和许多小峰,小峰小而低,分离度不高,因而特征性极不强。第 III 组峰特征性也较弱。第 II 组峰是该型中药黄酮类成分特征指纹峰所在。

从橙皮苷型药材谱图的全貌将整个色谱图的共有峰分成 2 组: I 组 (0.00 ~ 20.00 min)、II 组 (20.00 ~ 70.00 min)。由于该型药材主要色谱峰均集中分布在第 II 组时间段内,因此,第 II 组峰是该型中药黄酮类成分特征指纹峰所在。

2.5.2 共有峰保留时间比较 对柚皮苷型药材 (毛橘红与光橘红) 的共有峰保留时间 (22 ~ 70 min) 进行比较分析,其中有 15 个共有峰保留时间的 RSD 小于 3.0%,见表 2。

对橙皮苷型药材 (陈皮、青皮、枳壳、枳实) 共有峰保留时间 (20 ~ 70 min) 进行比较,其中有 10 个共有峰保留时间的 RSD 小于 3.0%,见表 3。

对表 2、3 中 2 种类型药材的共有峰平均保留时间 (22 ~ 70 min) 综合比较,并直观对比色谱图,结果有 5 个共有峰平均保留时间的 RSD 小于 3.0%,见表 4。分析数据提示这 5 个成分可能是该科此属植物共有的黄酮类成分。

2.6 指纹图谱相似度计算

采用中国药典委员会组织编制的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件对各样品进行了相似度比较,得到柚皮苷型药材和橙皮苷型药材的指纹图谱叠加图,见图 3、4。

图 3 及相似度计算结果可见,柚皮苷型药材中毛橘红、光橘红各色谱图与共有模式图谱的相似度 (以相关系数计) 分别为 0.990 4、0.991 6、0.926 9、0.995 5、0.996 2、0.928 5,相似度较高,表明 2 药材所含黄酮类物质基本相同。

表 2 柚皮苷型药材(化橘红) 共有峰保留时间

共有峰	毛橘红 1/min	毛橘红 2/min	毛橘红 3/min	光橘红 1/min	光橘红 2/min	光橘红 3/min	RSD/%
1	26. 547	26. 532	26. 58	27. 047	27. 055	27. 384	1. 32
2	28. 808	28. 798	28. 823	29. 333	29. 351	29. 685	1. 29
3	29. 246	29. 241	29. 280	29. 771	29. 794	30. 143	1. 28
4	31. 758	31. 751	31. 861	32. 581	32. 610	32. 996	1. 66
5	33. 347	33. 316	33. 381	33. 961	34. 002	34. 600	1. 52
6	38. 810	38. 790	39. 074	39. 656	39. 696	40. 261	1. 49
7	40. 056	40. 080	40. 193	40. 867	40. 891	41. 388	1. 35
8	40. 803	40. 830	40. 863	41. 476	41. 494	41. 879	1. 1
9	41. 610	41. 628	41. 733	42. 312	42. 329	42. 703	1. 09
10	42. 123	42. 145	42. 236	42. 867	42. 887	43. 274	1. 14
11	43. 235	43. 254	43. 574	44. 168	44. 198	44. 766	1. 97
12	46. 889	46. 951	47. 112	47. 752	47. 769	48. 114	1. 08
13	56. 778	56. 841	57. 007	56. 101	56. 084	56. 394	0. 7
14	62. 623	62. 691	62. 810	62. 933	62. 940	63. 181	0. 32
15	65. 513	65. 188	65. 254	65. 309	65. 312	65. 515	0. 21

表 3 橙皮苷型药材共有峰保留时间

共有峰	陈皮 1/min	陈皮 2/min	陈皮 3/min	青皮 1/min	青皮 2/min	青皮 3/min	枳实 1/min	枳实 2/min	枳实 3/min	枳壳 1/min	枳壳 2/min	枳壳 3/min	RSD /%
1	23. 843	24. 147	24. 148	23. 879	24. 198	24. 178	23. 856	24. 250	24. 348	24. 218	24. 195	24. 276	0. 71
2	25. 417	25. 642	25. 652	25. 408	25. 682	25. 706	25. 378	25. 764	25. 880	25. 732	25. 696	25. 789	0. 62
3	26. 700	26. 902	26. 921	26. 675	26. 964	27. 019	26. 612	27. 102	27. 264	27. 042	28. 353	27. 133	1. 67
4	27. 636	27. 769	27. 781	27. 611	27. 850	27. 897	27. 985	28. 021	28. 632	29. 824	29. 776	28. 504	2. 75
5	32. 208	32. 445	32. 467	32. 160	32. 515	32. 578	32. 063	32. 661	32. 847	32. 595	32. 512	32. 701	0. 71
6	34. 917	35. 166	35. 189	34. 781	35. 237	35. 299	34. 758	35. 344	35. 709	35. 327	35. 251	35. 422	0. 77
7	42. 742	43. 048	43. 091	42. 673	43. 124	43. 144	43. 518	44. 294	43. 504	43. 235	43. 151	43. 342	0. 97
8	56. 884	56. 947	55. 963	56. 735	57. 032	57. 077	56. 733	57. 035	57. 390	57. 389	57. 198	57. 419	0. 70
9	60. 380	60. 383	60. 435	60. 300	60. 448	60. 445	60. 295	60. 475	60. 722	60. 553	60. 468	60. 603	0. 20
10	63. 209	63. 159	63. 166	63. 156	63. 204	63. 126	63. 136	63. 242	63. 455	63. 308	63. 022	63. 345	0. 17

表 4 柚皮苷型和橙皮苷型药材共有峰平均保留时间

共有峰	柚皮苷型平均保留时间/min	橙皮苷型平均保留时间/min	RSD /%
1	26. 858	27. 100	0. 63
2	32. 260	32. 439	0. 39
3	43. 227	43. 192	0. 06
4	56. 534	56. 937	0. 50
5	62. 863	63. 200	0. 38

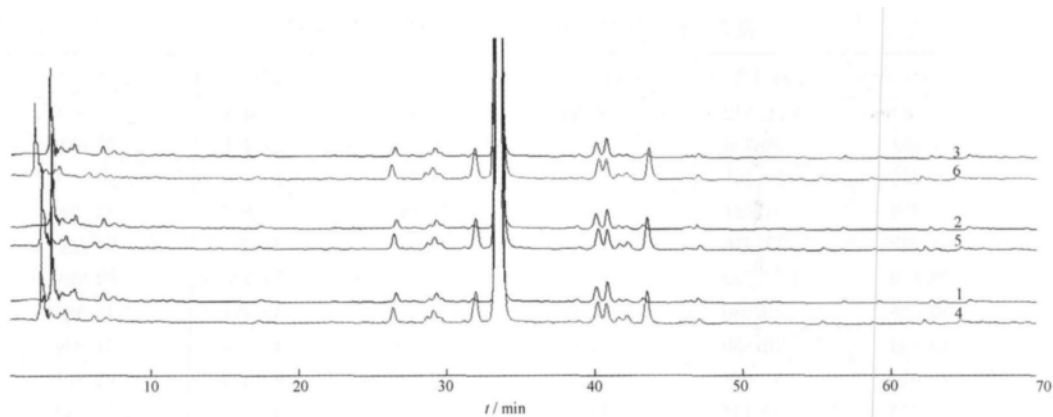
图 4 及相似度计算结果可见 ,橙皮苷型药材中陈皮、青皮、枳实各批药材色谱图与共有模式图谱的相似度(以相关系数计) 分别是 0. 997 3 ,0. 994 2 , 0. 950 1 ,0. 958 2 ,0. 975 3 ,0. 922 1 ,0. 972 2 , 0. 923 3 ,0. 932 0 ,相似程度较高。3 批枳壳药材与共有模式图谱的相似度(以相关系数计) 分别是 0. 454 7 ,0. 772 8 ,0. 773 3 ,均低于 0. 90 ,相似程度较

低。提示枳壳所含黄酮类物质与其他 3 种橙皮苷型药材有一定差异。

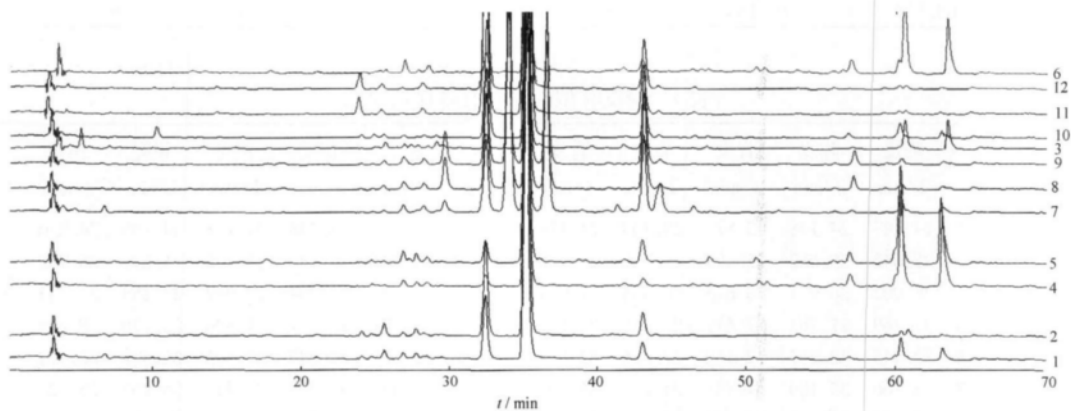
3 讨论

本实验建立了芸香科柑橘属 6 种常用中药黄酮类成分液相色谱指纹图谱 ,采用植物化学分类学方法 ,依据药材中主要化学成分将上述药材分为柚皮苷型和橙皮苷型 2 种类型。通过化学分型可较准确比较该科此属各药材黄酮类成分 HPLC 指纹谱图间的差异。

综合 6 种两型药材中共有峰保留时间数据 ,共标出了 5 个共有峰 ,并利用 DAD 检测器对每个峰做紫外光谱分析 ,均符合黄酮类光谱特征 ,可初步判别为黄酮类成分。但这 5 个共有峰是否为柑橘属常用中药发挥理气作用相类似功效的物质基础 ,仍有待于药理试验验证。因本次实验的样本数量仍较少 ,



1~3. 毛橘红;4~6. 光橘红。
图3 柚皮苷型各批药材指纹图谱叠加图



1~3. 陈皮;4~6. 青皮;7~9. 枳壳;10~12. 枳实。
图4 橙皮苷型各批药材指纹图谱叠加图

还需收集更多的样本进行深入系统研究,同时需要进一步利用液质联用技术,准确鉴定出这5个共有峰的化学结构,为后续的谱效相关性研究提供参考。

对于基源相同的药材,如毛橘红与光橘红、陈皮与青皮、枳壳与枳实,从所制备的液相色谱指纹图谱中就可直观的观察到共有峰峰高与峰面积的高低大小差异,提示各药材中化学成分含量有明显区别,推测这可能就是它们在临床应用中功能主治的差异所在。

通过指纹图谱相似度评价软件可知,柚皮苷型药材图谱相似度较高,说明这2种药材中的黄酮类成分基本类似,只是毛橘红中第2高峰均为保留时间40.8 min左右色谱峰,光橘红中此保留时间色谱峰不属于第2高峰。此研究结果与文献[11]结果一致。

相似度也较高,说明这3种药材中的黄酮类成分也基本类似。而枳壳与共有模式的相似度较低,从谱图上直观分析主要是枳壳谱图中保留时间为32.366,35.093 min的色谱峰之间、以及36.6 min左右各有2个明显的特征峰,降低了相关系数,也提示枳壳药材中的黄酮类成分与陈皮、青皮、枳实三者有一定的差异。通过直观比较各药材谱图的色谱峰及其保留时间,结合文献[3,12]中报道枳壳中含有柚皮苷,故初步推测在32.366,35.093 min之间的色谱峰可能是柚皮苷峰。对于各色谱图中主要色谱峰尚需利用质谱等分析技术鉴定出准确的结构信息。

已有大量文献报道上述6种药材指纹图谱研究结果,但均是在不同色谱条件下建立单个药材的指纹图谱^[5]。为保证试验结果的可比性及科学性,本实验中经过反复摸索,建立了一种可同时制备6种

药材 HPLC 指纹图谱的色谱条件 , 选用文献 [3-4] 中的共同波长 , 同时结合文献 [13] 中天然产物黄酮类成分紫外光谱的 2 个特征吸收带 300 ~ 400 nm 和 240 ~ 280 nm , 故本试验中的检测波长定为 283 nm , 经试验证实 , 该指纹图谱能够全部反映各药材中黄酮类化合物的信息 , 提取的色谱峰数量可满足研究的需要。

[参考文献]

[1] 杨春澍. 药用植物学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 235.
[2] 中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 874, 880, 886, 892, 901, 902.
[3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 69, 176, 182, 229, 230.
[4] 魏惠珍, 谢菲, 饶毅, 等. 内标多控法测定枳实、枳壳、青皮和陈皮中黄酮类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 74.
[5] 邵红霞, 代云桃, 秦雪梅, 等. 陈皮青皮和枳壳中黄酮类成

分的指纹图谱研究进展[J]. 山西医药杂志, 2007, 36(10): 898.
[6] 陈永刚, 刘晓涵, 林励, 等. 超声波提取法提取化橘红中黄酮类物质的工艺优选[J]. 中药材, 2009, 32(1): 138.
[7] 黄兆胜. 中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 238.
[8] 陶金华, 狄留庆, 文红梅, 等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18): 2410.
[9] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671.
[10] 周荣汉. 药用植物化学分类学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988.
[11] 陈志霞, 林励, 孙冬梅. 化橘红黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2003, 34(7): 657.
[12] 袁金斌, 魏玲, 张敏, 等. 高效液相色谱法测定枳壳中柚皮苷、新橙皮苷、川陈皮素和红橘素的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(6): 515.
[13] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.

Study and comparison on HPLC fingerprints of flavonoids of frequently used Chinese materia medica in Citrus

CHEN Yonggang¹, LIN Li^{2*}

(1. Department of Pharmacy, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430060, China;
2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of flavonoids of the six clinical frequently used Chinese materia medica for regulating Qi flow such as *Citri grandis*, *C. grands*, *Citri Reticulatae Pericarpium*, *Citri Reticulatae Pericarpium Viride*, *Aurantii Fructus*, and *Aurantii Fructus Immaturus* from *Citrus*, and analysis differences in the fingerprints to provide scientific basis for profile-effect research and clinical reasonable use. **Method:** HPLC was performed on a C₁₈ column with methanol-water (with acetic acid), to establish HPLC fingerprints of the six kinds of medicinal herbs on the same chromatograph condition. **Result:** The six frequently used Chinese materia medica were divided into naringin type and hesperidin type according to the method of phytochemotaxonomy. Based on the retention time of chromatograph peaks, *C. grandis* and *C. grands* had fifteen common peaks; *Citri Reticulatae Pericarpium*, *Citri Reticulatae Pericarpium Viride*, *Aurantii Fructus* and *Aurantii Fructus Immaturus* had ten common peaks. All herbs had five common peaks. Compared with mutual model, the holistic similarity of chromatograms of *C. grandis* and *C. grands* was in the range of 0.928 5-0.996 2. The degree of similarity was high. For *Citri Reticulatae Pericarpium*, *Citri Reticulatae Pericarpium Viride* and *Aurantii Fructus Immaturus*, it was in the range of 0.922 1-0.997 3 and high. But the similarity of *Aurantii Fructus* was only in 0.454 7-0.773 3 with the mutual model. **Conclusion:** The established fingerprints of flavonoids of the six common traditional Chinese medicines can be used to compare the differences intuitively. Meanwhile, the peak height and peak areas of characteristic peaks are different remarkably, but whether it is connected with the different function of regulating Qi flow of the six medical materials in clinical use, is still needed to be studied.

[Key words] Rutaceae; *Citrus*; HPLC; fingerprint

doi: 10.4268/cjcmm20111912