

广陈皮与陈皮 HPLC 指纹图谱的建立与鉴别

郭念欣, 李颖春, 谢伟桥, 余建乐, 姬生国*

(广东药学院中药学院, 广州 510006)

摘要 目的:建立广陈皮的 HPLC 指纹图谱,为其质量评价提供依据。方法:采用 HPLC 梯度洗脱技术进行分离分析,采用 ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-2% 乙酸梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,检测波长 300 nm,记录广陈皮与陈皮的 HPLC 指纹图谱。结果:广陈皮均有 8 个共有峰,多数的峰可以达到较好分离。普通的陈皮有 8 个共有峰,多数的峰可以达到较好的分离。建立的图谱有较高的重现性。从两者指纹图谱可以鉴别出广陈皮与陈皮。结论:该分析方法具有良好的精密度、稳定性和重复性,建立的指纹图谱检测标准可以作为广陈皮和陈皮质量评价的主要依据之一。

关键词 广陈皮;陈皮;指纹图谱;反相高效液相

中图分类号 R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9903(2011)07-0090-04

Studying and Distinguishing on Fingerprints of *Citrus nobilis* var. *chachikan* Wong and *Citrus reticulata* Blanco by HPLC

GUO Nian-xin, LI Ying-chun, XIE Wei-qiao, YU Jian-le, JI Sheng-guo*

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprints of *Citrus nobilis* var. *chachikan* Wong and *C. reticulata* Blanco and to provide a base for the identification of its quality. **Method:** A gradient separated method was applied. ODS-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase was methanol-water, detection wavelength was at 300 nm, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, column temperature was at 25 ℃. **Result:** Eight mutual peaks in *C. nobilis* var. *chachikan* Wong and eight mutual peaks in its preparations were separated effectively, the same as *C. reticulata* Blanco. The methodological evaluation showed that this method had a good repeatability. **Conclusion:** The results of peak areas were in accordance with the request of fingerprint. The established fingerprint can be used for the quality control and species identifying of *C. nobilis* var. *chachikan* Wong, *C. reticulata* Blanco and its preparations.

[Key words] *C. nobilis* var. *chachikan* wong; *Citrus reticulata* Blanco; fingerprint; HPLC

陈皮 *Citri Reticulatae Pericarpium* 为芸香科植物橘及其栽培变种的干燥成熟果皮,陈皮药材分为“广陈皮”(茶枝柑)、“陈皮”^[1]。陈皮一般来源于芸香科的福橘 *Citri reticulatae* ‘Tangerina’、大红袍 *C. reticulatae* ‘Dahongpao’ 和温州密柑 *C. reticulatae*

‘Unshiu’ 等的干燥成熟果皮,产于福建、四川、浙江等。而广陈皮一般来源为茶枝柑 *C. reticulata* ‘Chachi’ 和行柑的干燥成熟果皮,产于广东新会、四会。其中以“广陈皮”的质量为优,“广陈皮”中又以新会陈皮为道地药材^[1]。早在宋代就成为南北贸易“广货”之一,为广东省出口的传统道地药材和传统的调味佳品。据药典记载^[2],陈皮用于胸脘胀满,食少吐泻,咳嗽痰多。道地广陈皮与普通陈皮的药用与调味效果不同,广陈皮其市场售价也高。现于市场上的有很多以陈皮代替广陈皮以提高商家的利润,误导消费者。

收稿日期] 20101109(016)

基金项目] 广东省科技计划项目(2009B030801044);广东药学院引进人才科研基金(2007ZYX09)

通讯作者] * 姬生国,博士,教授,从事中药资源、中药质量标准及中药新药研究, Tel: 020-39352327, E-mail: shengguo_ji@yahoo. cn

陈皮和广陈皮主要的有效成分有挥发油和黄酮类物质(其中以橙皮苷为主),一般通过测定橙皮苷的含量作为评价陈皮的质量指标^[1]。但只通过测定橙皮苷无法鉴别出陈皮和广陈皮。本文在近红外判别分析技术鉴别药材来源的基础上,通过更优化的色谱条件,建立广陈皮与陈皮的 HPLC 指纹图谱^[1],对比了两者的图谱的各个特征峰,更好地鉴别两者的特征及制定其质量评价的主要依据之一。

1 材料

安捷伦 LC1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦

公司)、色谱柱为 ODS-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)(美国迪马公司)、Bp211b 电子天平(日本岛津公司)、KP3200 型超声波清洗器(上海科岛超声仪器有限公司)。

试验所用药材来自广东、湖北、安徽等省,经广东药学院中药学院姬生国副教授鉴定为芸香科植物橘及其栽培变种 *C. reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮。而且通过近红外光谱判别分析技术进行来源鉴别后,分为陈皮和广陈皮 2 种药材。见表 1。

表 1 本试验所用药材来源

No.	药材	来源	厂家	批号	采集/购买日期
1	陈皮	广东	广东康美药业股份有限公司	20100412	
2	陈皮	广东	广州市某药店	20100508	
3	陈皮	广东	广州市药材公司	20100301	
4	陈皮	广东	广东中智药业	20100302	
5	陈皮	广东	广东康美药业股份有限公司	20100208	
6	陈皮	湖北	湖北金贵中药饮片有限公司	20100428	
7	陈皮	广东	广州市致信中药饮片有限公司	20091220	
8	陈皮	安徽	安徽海鑫中药饮片有限公司		20100622
9	广陈皮	广东	广东康美药业股份有限公司	20090616	
10	广陈皮	广东	广州市某药店	20100508	
11	广陈皮	广东	广州市真和堂药店(2 年广陈皮)		20100622
12	广陈皮	广东	广州市老百姓大药房	20100318	
13	广陈皮	广东	广州市万年堂药店(8 年广陈皮)		20100622
14	广陈皮	广东	广州市万年堂药店(9 年广陈皮)		20100622
15	广陈皮	广东	广州市万年堂药店(10 年广陈皮)		20100622
16	广陈皮	广东	广州市万年堂药店(11 年广陈皮)		20100622
17	广陈皮	广东	广州市集和堂药店		20100622
19	广陈皮	广东	广州市天河宝润堂中药饮片厂	20081101	
20	广陈皮	广东	佛山紫云轩药业有限公司	20100408	
21	广陈皮	广东	佛山紫云轩药业有限公司	20100604	

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性 迪马 ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相甲醇-0.2% 乙酸的线性梯度洗脱,洗脱时间 70 min,由甲醇-0.2% 乙酸水溶液(32:74)洗脱至甲醇-0.2% 乙酸水溶液(40:60),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25℃,检测波长 300 nm,进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品 5.03 mg,加甲醇定容至 10 mL,摇匀。以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得(每 1 mL 含橙皮苷约 0.5 mg),冷藏备用。

2.3 供试品溶液的制备 精密称定广陈皮粗粉 1 g,置去锥形瓶中,精密加入甲醇溶液 50 mL,超声提取 45 min,放冷到室温后,滤过,滤液放置于旋转蒸发仪上蒸干,加甲醇溶液溶解于 10 mL 量瓶中,定

容,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后,即得。

2.4 测定方法 分别精密吸取橙皮苷对照品、广陈皮与陈皮供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,记录 70 min 色谱图。确认对照品橙皮苷的色谱法,发现在广陈皮和陈皮指纹图谱中,分别 3 号峰和 g3 号峰为橙皮苷的色谱峰。见图 1。

2.5 广陈皮和陈皮指纹图谱的方法学考察

2.5.1 精密度 各取广陈皮和陈皮的 1 号药材,按 2.3 项下制成供试品溶液,连续测定 6 次,以各特征峰的相对保留时间和相对峰面积,计算 RSD。结果表明,广陈皮和陈皮相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 3%,符合指纹图谱要求,表明仪器精密度高。

2.5.2 稳定性 分别各取广陈皮和陈皮的 1 号药材,按 2.3 项下成供试品溶液,在 0,2,4,6,12,24 h

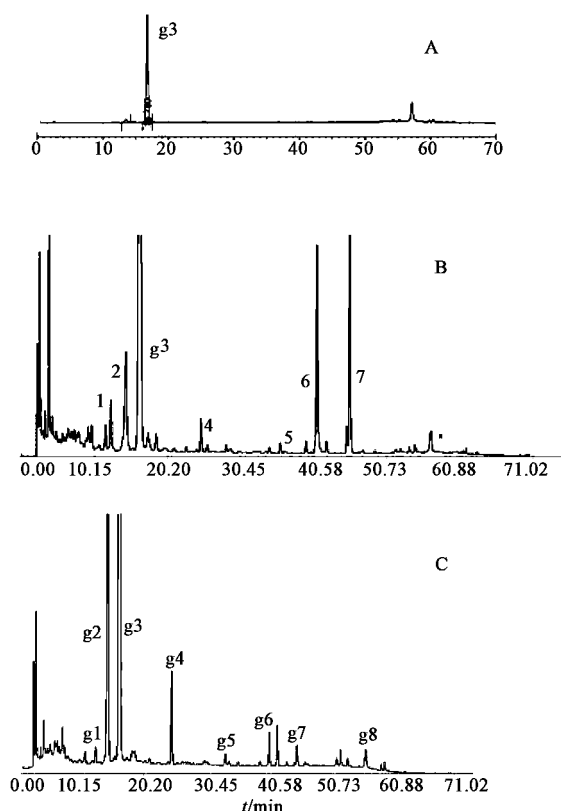


图 1 2 种陈皮指纹图谱

A. 对照品; B. 广陈皮; C. 陈皮; g3. 橙皮苷

进样测定,以各特征峰的相对保留时间和相对峰面积,计算 RSD。结果表明,广陈皮和陈皮相对保留时间和相对峰面积的 $RSD < 3\%$,符合指纹图谱要求,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.3 重复性 分别各取广陈皮和陈皮的 1 号药材,按 2.3 项下制成供试品溶液,连续测定 6 次,以各特征峰的相对保留时间和相对峰面积,计算 RSD。结果表明,广陈皮和陈皮相对保留时间和相对峰面积的 $RSD < 3\%$,符合指纹图谱要求,表明此方法的重现性良好。

2.6 广陈皮 HPLC 指纹图谱的构建

2.6.1 广陈皮与普通陈皮 HPLC 指纹图谱的共有峰的标定 将 12 批广陈皮样品和 8 批陈皮样品的 HPLC 指纹图谱分别进行匹配,利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)》对指纹图谱数据进行评价。结果可见广陈皮的 HPLC 指纹图谱中分别有 8 个共有色谱峰,陈皮的 HPLC 指纹图谱分别有 8 个共有色谱峰,分别选择指纹图谱中的 1 个色谱峰作为参照峰来计算相对保留时间和相对峰面积,其选择依据是色谱峰的峰形好,分离度高,含

量高。广陈皮和陈皮药材 HPLC 指纹图谱中 3 号色谱峰符合条件,因此选择作为各自药材指纹图谱的参照峰。见图 2,3。

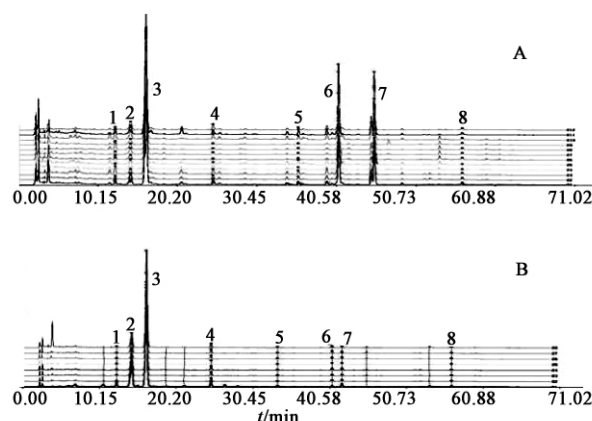


图 2 2 种陈皮 HPLC 图谱叠加

A. 广陈皮; B. 陈皮

2.6.2 共有峰保留时间和峰面积 广陈皮和陈皮各以 3 号峰的保留时间和峰面积为 1,计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间的 $RSD < 3\%$,12 批的广陈皮和 8 批陈皮样品指纹图谱的重现性较好,但各批样品之间共有指纹峰的相对峰面积存在一定的差异,证明不同批次的样品在含量上存在一定的差异。

2.6.3 相似度的计算 相似度分析的标准是由这些对照样品与共有模式之间的相似度来决定。通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)》软件计算各样品间的相似度。以 12 批广陈皮和 8 批的陈皮测定结果拟定各自的 HPLC 指纹图谱的共有模式,并以此共有模式为对照计算各批陈皮的相似度,从广陈皮药材或陈皮指纹图谱相似度结果来看,各样品间相似度达到 0.95 以上,特别陈皮的相似度达到 0.99 以上。这表明所建立的指纹图谱的技术指标稳定,重现性较好。广陈皮的相似度 $S_1 \sim S_{12}$ 分别为 0.998,0.997,0.986,0.993,0.993,0.992,0.993,0.997,0.989,0.996,0.997,0.999。陈皮的相似度 $S_1 \sim S_8$ 分别为 0.999,0.999,0.999,0.998,0.998,0.997,0.999,0.998。

2.6.4 广陈皮与陈皮指纹图谱的鉴别 采用指纹图谱对广陈皮与陈皮进行整体性的鉴别。通过二者指纹图谱的对比(图 1),其特征性相差甚远,可以马上鉴别出是否道地药材。广陈皮和陈皮指纹图谱的 3 号峰和 g3 号峰为最大吸收峰,确定为橙皮苷的吸收峰,两者的保留时间及峰面积都相差甚小,因此只

是用橙皮苷作为质量标准并不能鉴别出陈皮与广陈皮。但是从其他各个特征峰的保留时间、峰面积以及峰型上看,两者的区别是非常明显的,如两个指纹图谱中 $g_1, g_2, g_4, g_6, g_7, g_8$ 特征峰,其峰面积相差大,而且明显看出在广陈皮的指纹图谱的色谱峰数比陈皮指纹图谱要更多,这也证明两者在药性药效上存在一定的程度差异。再从由相似度结果以及广陈皮样品与其共有模式相似度的散点图(图3)可知,12批样品的色谱指纹图谱相似度的相似度基本达到了0.9,说明药材化学成分一致性较好,质量稳定。由广陈皮12批样品与陈皮8批样品相似度的散点图(图3)可知,所建立的色谱指纹图谱可以明显地区别于陈皮。从而说明,可用指纹图谱区别陈皮和广陈皮这2种药材。

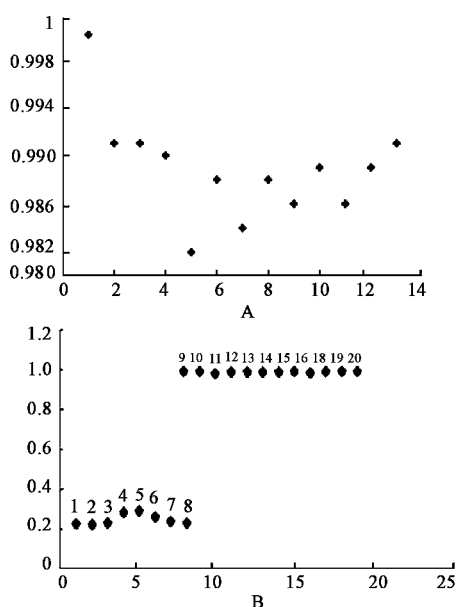


图3 2种陈皮样品相似度散点
A. 广陈皮; B. 陈皮

3 讨论

3.1 提取方法的选择 通过对不同体积分数的提取溶剂,包括对比了50%,70%的甲醇和分析纯甲醇作为提取溶剂进行提取,最后得出各个图谱,比对各个图谱后,发现用甲醇提取的样品溶出率高,峰型尖锐,肩峰出现较小,基线比较平直,因此选择分析纯甲醇作为提取溶剂。

3.2 流动相的选择 通过对不同的流动相的多次试验,根据不同组成和不同比例的流动相,其图谱有明显区别。在不同组成的流动相中,对比了水相

中在同一比例下的磷酸和乙酸的图谱。以甲醇-0.2%磷酸水的线性梯度洗脱,此条件下的峰型较矮胖,而且对色谱柱的影响较大。改用甲醇-0.2%乙酸溶液作为流动相后,峰型更尖锐,因此选择0.2%乙酸作为流动相的水相。确定甲醇-0.2%乙酸作为流动相后,对比了不同比例的流动相,尝试了等度洗脱以及多种梯度洗脱的比例,发现2.1项下的色谱条件并分离出更多色谱峰,此方法得出的图谱,其峰分离效果好,峰型尖锐,保留时间适中。

3.3 检测波长的选择 对于研究陈皮质量的文章^[6-7],多数选择的检测波长为283 nm,而根据封宇飞^[8]的研究,陈皮中5种主要的黄酮类化合物在各自最大吸收波长下和300 nm的波长检测下,其结果无方法学的显著差异,可以表明,在300 nm波长下,陈皮的主要黄酮类化合物得到较好分离。

本实验建立了12批广陈皮药材的HPLC指纹图谱,相似度在0.95以上,说明该指纹图谱可以代表广陈皮的鉴别特征。通过与普通陈皮的HPLC指纹图谱比较,可以直观的对其进行区分。因此,该方法可以从整体性、特征性等科学地判断药材或药物的真假伪劣。

参考文献

- [1] 左大动,贺善安. 中药广陈皮 [J]. 中国中药杂志,1957,5:196.
- [2] 郑小吉,詹晓如,王小平. 陈皮道地性研究 [J]. 江西中医药,2007,39(7):71.
- [3] 中国药典. 一部 [S]. 2005:214.
- [4] 刘方棨,王玫馨,吴绍彝,等. 广陈皮化学成分的比较研究 [J]. 中药材,1991,3(3):33.
- [5] 张素中,黄月纯,魏刚. 广陈皮 HPLC 指纹图谱的方法学研究 [J]. 中药材,2008,2(2):217.
- [6] 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.
- [7] 蔡萍,张水寒,肖娟,等. HPLC 测定湖南道地药材陈皮中橙皮苷的研究 [J]. 中医药导报,2006,12(4):65.
- [8] 封宇飞,张宏武,邹忠梅,等. HPLC 法同时测定陈皮饮品中5种黄酮类化合物的含量 [J]. 药物分析杂志,2009,29(1):10.

责任编辑 邹晓翠