

· 化学与分析 ·

“一测多评”法测定陈皮中 3 种黄酮类成分

杨秀梅, 王瑾*, 黄勤挽, 欧小群, 谭茂兰, 钱玫

(成都中医药大学, 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 目的: 建立陈皮中橙皮苷、川陈皮素、桔皮素“一测多评”的方法, 并验证该方法的准确度及可行性。方法: 以橙皮苷为指标, 计算川陈皮素、桔皮素与橙皮苷的相对校正因子。采用外标法测定陈皮中橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的含量, 并利用相对校正因子计算川陈皮素和桔皮素的含量, 比较外标法与“一测多评”的结果, 以验证“一测多评”法的准确度及可行性。结果: “一测多评”法与外标法共测定 22 批样品, 川陈皮素与桔皮素测定结果 RSD 均 < 2.9%, 结果无显著差异。结论: “一测多评”法测定陈皮中的橙皮苷、川陈皮素、桔皮素是准确可行的。

[关键词] 陈皮; 橙皮苷; 一测多评; 川陈皮素; 桔皮素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0045-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110045

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140324.1610.025.html>

[网络出版时间] 2014-03-24 16:10

Simultaneous Quantitative Analysis of Three Flavonoids in Pericarpium Citri Reticulatae by Multi-components Assay by Single Marker

YANG Xiu-mei, WANG Jin*, HUANG Qin-wan, OU Xiao-qun, TAN Mao-lan, QIAN Mei

(Research on Chinese Medicine Resources System of Chengdu University of Traditional Chinese, Development and Utilization Sichuan Province Work Together for a Base of Cultivation of State Key Laboratory, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of hesperidin, nobiletin and tangeretin in Pericarpium Citri Reticulatae. And to verify the accuracy and feasibility of the method. **Method:** Using hesperidin as standard substance, the relative correction factor of the other two flavonoids were determined by HPLC. Using the external standard method and the relative correction factor calculated the content of the three flavonoids, then comparing the results. **Result:** The results of external standard method and quantitative analysis of multi-components by one marker (QAMS) have no significant difference. **Conclusion:** Determination of hesperidin, nobiletin and tangeretin by QAMS is a accurate and feasible method.

[Key words] Pericarpium Citri Reticulatae; hesperidin; quantitative analysis of multi-components by single-marker; nobiletin; tangeretin

[收稿日期] 20130730(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102804); 四川省教育厅课题(10ZC051)

[第一作者] 杨秀梅, 硕士, 从事中药新制剂新技术的研究, Tel:13568997942, E-mail:564004232@qq.com

[通讯作者] *王瑾, 助理研究员, 从事中药学研究, Tel:13880900787, E-mail:158227258@qq.com

陈皮具有理气健脾、燥湿化痰等功效, 在心血管系统、消化系统、抗氧化、抗衰老方面均有一定药理作用^[1], 其化学成分主要分为挥发油和黄酮类。黄酮类成分主要包括橙皮苷、川陈皮素、桔皮素、柚皮苷等, 其中前 3 种黄酮类成分在陈皮中含量较高, 同时均具有较强的抗氧化和抗癌活性^[2-4], 是陈皮重要的活性成分。

陈皮所含成分复杂,功效多样,《中国药典》2010 年版一部陈皮以含量较高的橙皮苷单一成分作为检测指标,难以体现陈皮多成分、多功效的特点,且仅以单一成分控制质量,不能较好的说明陈皮的内在质量。因此,多指标的测定显得更为科学可靠。王智民^[5]提出的“一测多评”用于多指标的测定,近年来已经用于黄连、补骨脂、虎杖、干姜等中药的质量评价^[6-9],其中黄连“一测多评”的含量测定方法已收入《中国药典》2010 年版,具有重要的指导意义。本文采用“一测多评”法实现陈皮多指标的质量控制,以橙皮苷作为指标,计算出川陈皮素、桔皮素与橙皮苷的相对校正因子,从而计算得出川陈皮素和桔皮素的含量。并采用外标法和“一测多评”法同时测定 22 批陈皮样品中 3 种黄酮的含量,比较其结果进行验证,最终建立陈皮中 3 种黄酮类物质“一测多评”的方法。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津),1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent),BP211D AG 型电子天平(德国赛多利斯)。陈皮药材购于广州市新会市多个产区及荷花池中药材市场,由成都中医药大学中药鉴定教研室成都中医药大学中药标本中心卢先明教授鉴定为正品 *Citrus reticulata* Blanco。橙皮苷(批号 110902)、川陈皮素(批号 120719)、桔皮素(批号 120912)对照品均由四川省维克奇生物科技有限公司提供,3 种对照品均供含量测定用,纯度 $\geq 98\%$ 。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

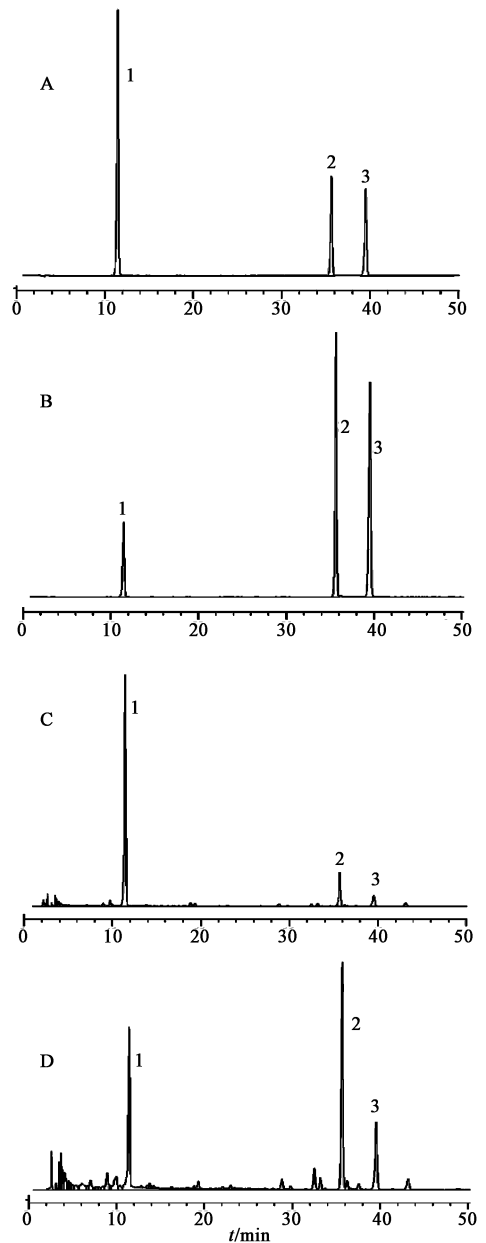
2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷、川陈皮素、桔皮素对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,即得质量浓度分别为 0.398,0.101,0.106 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取陈皮粉末约 0.5 g,置于具塞锥形瓶中,精密加甲醇 40 mL,密塞,称定质量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-2% 乙酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 25 min,20% ~ 40% A;25 ~ 30 min,40% ~ 50% A;30 ~ 50 min,50% ~ 60% A),流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,检查波长 283 nm(橙皮苷),326 nm(橙皮苷、川陈皮素、桔皮素)。该色谱条件

下,各检测组分分离度良好,见图 1。



A. 混合对照品(283 nm); B. 混合对照品(326 nm);
C. 供试品(283 nm); D. 供试品(326 nm);
1. 橙皮苷; 2. 川陈皮素; 3. 桔皮素

图 1 陈皮 HPLC

2.4 线性范围 精密吸取 2.1 项下的混合对照品溶液 2,4,8,12,16,20 μL ,进样分析,以进样量对峰面积积分值进行线性回归,结果表明各成分在相应的范围内,线性关系良好,见表 1。

表 1 橙皮苷、川陈皮素和桔皮素的线性范围($n=3$)

化合物	回归方程	r	线性范围/ μg
橙皮苷	$Y=1\ 776\ 867.37X-77\ 195.48$	0.999 5	0.796 ~ 7.960
川陈皮素	$Y=4\ 176\ 138.72X+112\ 523.55$	0.999 7	0.202 ~ 2.020
桔皮素	$Y=4\ 077\ 247.00X+72\ 098.95$	0.999 6	0.212 ~ 2.120

2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10

μL ,连续进样6次,记录橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的峰面积,其峰面积的RSD分别为0.52%,0.67%,1.02%,表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批陈皮粉末约0.5 g,精密称定,按2.2项下操作,平行制备6份供试品溶液,测得橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的平均含量分别为3.97%,0.42%,0.46%,RSD分别为1.21%,1.46%,1.28%,表明重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液

10 μL ,分别于0,2,4,6,8,12,24,36 h进样,测定橙皮苷、川陈皮素、桔皮素峰面积,其峰面积的RSD分别为1.21%,1.36%,2.01%,表明供试品溶液在36 h内稳定性良好。

2.8 加样回收试验 取同一批已知含量的陈皮粉末0.5 g,精密称定,平行6份,分别精密加入橙皮苷、川陈皮素、桔皮素对照品,按2.2项下制备供试液,测定,计算橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的加样回收率,见表2。

表2 陈皮中橙皮苷、川陈皮素和桔皮素加样回收率试验

化合物	取样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
橙皮苷	0.501	19.932 8	19.85	39.781 6	99.99	99.98	1.56
	0.499	19.853 2	19.85	40.102 2	102.01		
	0.503	20.012 4	19.85	39.961 4	100.50		
	0.501	19.932 8	19.85	39.399 4	98.07		
	0.502	19.972 6	19.85	40.113 7	101.47		
	0.501	19.932 8	19.85	39.362 9	97.88		
川陈皮素	0.501	2.183 9	2.14	4.364 3	101.89	100.02	2.13
	0.499	2.175 1	2.14	4.387 2	103.37		
	0.503	2.192 6	2.14	4.265 1	96.85		
	0.501	2.183 9	2.14	4.323 4	99.98		
	0.502	2.188 2	2.14	4.316 2	99.44		
	0.501	2.183 9	2.14	4.293 3	98.57		
桔皮素	0.501	2.339 7	2.26	4.549 8	97.79	99.06	1.22
	0.499	2.330 3	2.26	4.613 2	101.01		
	0.503	2.349 0	2.26	4.566 1	98.10		
	0.501	2.339 7	2.26	4.556 2	98.08		
	0.502	2.344 3	2.26	4.583 0	99.06		
	0.501	2.339 7	2.26	4.607 1	100.33		

2.9 相对校正因子的计算 精密吸取混合对照品溶液10 μL ,连续进样6次,以326 nm检测波长下所测得3种成分的峰面积计算川陈皮素、桔皮素与

橙皮苷的相对校正因子,计算公式: $f_w = \frac{f_i}{f_s} = \frac{m_i \cdot A_s^{[7]}}{m_s \cdot A_i}$,结果见表3。

2.10 待测组分色谱峰的定位 “一测多评”仅利用一种对照品作为内标物质,在没有其他对照品的情况下,通过相对校正因子计算多种成分的含量。因此,准确地定位各成分的色谱峰是计算各成分含量的必要前提。据文献报道,可通过保留时间差和相对保留值进行峰定位,结果见表4。据结果可知,

两种定位方法的RSD < 3%,说明这两种定位方法均能准确判断川陈皮素、桔皮素色谱峰的位置。

2.11 相对校正因子重复性的考察

2.11.1 不同液相色谱仪及色谱柱对相对校正因子的影响 精密吸取2.1项下的混合对照品溶液各10 μL ,利用不同的液相色谱仪和色谱柱,按2.3项下的色谱条件进样分析,计算相对校正因子,结果见表5。结果表明不同的液相色谱仪和色谱柱对相对校正因子没有显著影响。

2.11.2 不同流速对相对校正因子的影响 精密吸取2.1项下的混合对照品溶液各10 μL ,计算流速分别为1,1.1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时的相对校正因子,结果见表6。表明不同流速时对相对校正因子没有显著影响。

表 3 川陈皮素、桔皮素与橙皮苷的相对校正因子 ($n=3$)

No.	$f_{\text{川陈皮素/橙皮苷}}$	$f_{\text{桔皮素/橙皮苷}}$
1	0.399 6	0.412 6
2	0.403 2	0.418 3
3	0.400 1	0.406 8
4	0.410 2	0.422 5
5	0.402 7	0.410 2
6	0.412 2	0.427 6
均值	0.404 6	0.416 4
RSD	1.19%	1.74%

表 4 “一测多评”待测成分色谱峰的定位 ($n=3$)

色谱柱	相对保留值		保留时间差	
	$r_{\text{川陈皮素/橙皮苷}}$	$r_{\text{桔皮素/橙皮苷}}$	$\Delta t_{\text{川陈皮素/橙皮苷}}$	$\Delta t_{\text{桔皮素/橙皮苷}}$
Diamonsil	3.121 9	24.109	3.459 6	28.162
Phenomenex	3.212 1	24.986	3.518 8	28.941
Agilent	3.236 8	25.005	3.586 1	29.263
RSD	1.54%	1.69%	1.47%	1.61%

2.11.3 不同柱温对相对校正因子的影响 精密吸取 2.1 项下的混合对照品溶液各 10 μL , 计算柱温分别为 25, 30 $^{\circ}\text{C}$ 时的相对校正因子, 结果见表 7。

表明不同的柱温对相对校正因子没有显著影响。

2.12 “一测多评”法与外标法测定结果的比较 精密吸取供试品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积。分别采用外标法和“一测多评”法计

表 5 不同色谱柱对相对校正因子的影响 ($n=3$)

色谱仪	色谱柱	$f_{\text{川陈皮素/橙皮苷}}$	$f_{\text{桔皮素/橙皮苷}}$
Agilent	Diamonsil	0.402 7	0.417 6
	Phenomenex	0.410 2	0.418 7
	Agilent	0.406 7	0.416 5
Shimadzu	Diamonsil	0.403 2	0.418 3
	Phenomenex	0.412 6	0.421 6
	Agilent	0.404 6	0.419 8
RSD		0.89%	0.39%

表 6 不同流速对相对校正因子的影响 ($n=3$)

流速/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	$f_{\text{川陈皮素/橙皮苷}}$	$f_{\text{桔皮素/橙皮苷}}$
1.0	0.403 3	0.417 6
1.1	0.408 8	0.412 5
RSD	0.67%	0.63%

表 7 不同柱温对相对校正因子的影响 ($n=3$)

柱温	$f_{\text{川陈皮素/橙皮苷}}$	$f_{\text{桔皮素/橙皮苷}}$
25 $^{\circ}\text{C}$	0.413 3	0.427 6
30 $^{\circ}\text{C}$	0.413 4	0.416 2
RSD	0.01%	1.36%

算陈皮中橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的含量, 结果见表 8。据结果可知, 两种方法测得的各成分含量间没有显著差异, 说明该“一测多评”法测定陈皮中的陈皮苷、川陈皮素、桔皮素准确可靠。

表 8 “一测多评”法与外标法同步测定陈皮中的 3 种黄酮的含量 ($n=3$)

No.	来源	橙皮苷		川陈皮素		桔皮素		%
		外标法	外标法	QAMS	RSD	外标法	QAMS	
1	司前二红皮	2.809 4	0.299 5	0.301 9	0.40	0.219 0	0.220 3	0.29
2	司前绀青皮	3.120 5	0.244 2	0.249 7	1.13	0.115 7	0.122 6	2.90
3	司前大红皮	3.049 2	0.363 5	0.361 9	0.21	0.334 0	0.328 9	0.78
4	古井二红皮	4.335 6	0.350 4	0.349 8	0.10	0.345 8	0.340 0	0.84
5	古井大红皮	3.978 6	0.435 9	0.430 0	0.68	0.467 0	0.454 5	1.36
6	会城苏记陈皮商行 1 年大红皮	2.202 9	0.301 2	0.303 4	0.35	0.016 6	0.016 2	1.24
7	新会陈皮特产店 1 年大红皮	2.417 6	0.212 0	0.219 5	1.73	0.217 9	0.219 1	0.28
8	会城苏记陈皮商行 3 年大红皮	3.955 4	0.471 5	0.463 6	0.85	0.476 4	0.463 4	1.38
9	会城苏记陈皮商行 5 年大红皮	3.852 6	0.339 2	0.339 1	0.02	0.374 7	0.367 3	1.00
10	会城苏记陈皮商行 11 年大红皮	3.402 4	0.381 2	0.378 6	0.34	0.025 6	0.027 0	2.58
11	会城苏记陈皮商行 15 年大红皮	2.782 0	0.351 9	0.351 1	0.12	0.347 0	0.341 1	0.85
12	新会陈皮特产店 3 年大红皮	5.000 8	0.642 4	0.624 1	1.44	0.672 1	0.648 2	1.81
13	新会陈皮特产店 5 年大红皮	4.000 8	0.776 3	0.750 2	1.71	0.652 3	0.629 6	1.77
14	新会陈皮特产店 10 年大红皮	3.390 9	0.350 1	0.349 3	0.11	0.317 1	0.312 8	0.67

续表8

No.	来源	橙皮苷		川陈皮素		桔皮素		
		外标法	外标法	QAMS	RSD	外标法	QAMS	RSD
15	新会陈皮特产店15年大红皮	3.101 8	0.369 7	0.367 9	0.25	0.413 3	0.403 8	1.16
16	福琪堂10年陈皮	4.050 0	0.390 3	0.387 1	0.41	0.410 3	0.400 9	1.16
17	四川1年大红皮	7.021 9	0.540 8	0.528 7	1.13	0.228 2	0.228 9	0.16
18	四川2年大红皮	5.777 1	0.077 5	0.078 1	0.36	0.067 5	0.068 0	0.40
19	四川3年大红皮	4.934 6	0.542 3	0.529 9	1.16	0.288 4	0.285 6	0.48
20	四川纯红桔1年烤货	5.610 9	0.581 9	0.567 4	1.26	0.249 7	0.249 3	0.08
21	四川纯红桔3年晒货	5.337 7	0.625 4	0.608 2	1.39	0.303 9	0.300 4	0.57
22	湖南陈皮3年烤货	5.218 9	0.104 3	0.109 1	2.27	0.068 7	0.070 6	1.38

3 讨论

陈皮饮片的品种多样,据以上试验数据可知,各品种间除橙皮苷含量差异较大外,其余两种成分含量差异也很大。橙皮苷是陈皮中含量最高的黄酮类成分,也是《中国药典》2010年版规定的指标检测成分,其对照品也容易获得,因此选其作为“一测多评”的指内标物。

本试验验证了在不同条件下(色谱仪、色谱柱、流速、柱温),相对校正因子均无明显影响。采用了两种方法定位色谱峰,试验结果表明,保留时间差法和相对保留值法均能准确定位色谱峰,但相对保留值法应用更为广泛,且RSD更小,因此笔者采用相对保留值定位色谱峰。采用外标法和“一测多评”测定了22批陈皮饮片的3种黄酮含量,结果表明两种方法测得的含量无明显差异,说明该“一测多评”法准确可靠。

本实验中所用的陈皮饮片种类多样,有新鲜柑青皮、二红皮、大红皮及不同贮存年限的大红皮(广陈皮和川陈皮),从试验的数据初步看出陈皮的不同采收期、贮存年限以及产地对其成分的含量有一定影响,但由于本试验样品量过少,不能说明其具体的影响规律,该问题有待进一步研究。据文献报道,陈皮中还含有少量的柚皮苷^[10],但本试验所用样品中柚皮苷含量极低,且部分样品未检测出柚皮苷,因此本文未对柚皮苷进行含量测定。从样品的色谱图可知,样品中除本文所检测的3种成分外,还有其他多种成分,这些成分含量较低,且结构未知,但在22批样品中属于共有成分,这些未知成分对陈皮的质量评价也起着

一定作用,有待在今后的研究中进一步明确。

[参考文献]

- [1] 李庆耀,梁生林.陈皮的药理作用研究进展[J].中成药,2008,30(2):246.
- [2] 钱俊臻,王伯初.橙皮苷的药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2010,22(1):176.
- [3] 王景翔,于宏伟,胡瑞省.川陈皮素研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(13):7731.
- [4] 周芳,彭朵花,杜方麓.多甲氧基黄酮的化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2008,39(6):734.
- [5] 王智民,高慧敏,付雪涛,等.“一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J].中国中药杂志,2006,31(23):1925.
- [6] 匡艳辉,朱晶晶,王智民,等.一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量[J].中国中药杂志,2009,34(5):390.
- [7] 丁黎艳,周璐,王丽娜,等.一测多评法测定补骨脂中不同类型成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):152.
- [8] 范玲,严冬,李爽,等.一测多评法测定虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素及大黄素甲醚的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(7):103.
- [9] 孟江,卢国勇,程轩轩,等.一测多评法同时测定干姜中4种姜酚类成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):77.
- [10] 郑小吉,詹晓如,王小平.陈皮研究进展[J].中国现代中药,2007,9(10):30.

[责任编辑 顾雪竹]