

不同栽培品种橘皮中主要活性成分的动态积累

刘荣, 韦正, 樊丹青, 杨丽, 陈鸿平, 刘友平*
(成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部
共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**比较不同采收时间 3 个栽培品种红橘、樟头红、南丰蜜橘皮中黄酮、生物碱、总酚酸、多糖类成分的含量, 探讨橘皮类药材中上述 4 种活性成分及相对间的组成比例随采收时间的动态积累过程。**方法:**采用紫外-可见分光光度法测定橘皮中总黄酮、总酚酸、多糖的含量; HPLC 测定药材中 4 种主要黄酮类成分、辛弗林的含量。HPLC 测定药材中 4 种主要黄酮类成分及辛弗林含量, Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相为 0.05% 磷酸-乙腈梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 流速 0.7 mL·min⁻¹, 双波长检测 283, 335 nm, 进样量 5 μL。**结果:**3 种橘皮中黄酮、总酚酸、辛弗林含量随采收时间的增加逐渐降低至果实成熟时趋于稳定, 多糖则逐渐上升至成熟期达最高; 红橘和樟头红中总黄酮与总酚酸(7.01 ~ 11.14, 6.37 ~ 9.14)的比例随果实成熟度增加而增加, 而南丰蜜橘(6.25 ~ 4.04)则降低; 3 种橘皮中多糖与总酚酸(6.18 ~ 21.45, 2.70 ~ 4.40, 6.36 ~ 14.51)的比例均随果实成熟度的增加而升高。**结论:**该研究为阐释我国传统中药青皮、陈皮两药“同源不同效、一体二用”的物质基础差异及橘皮类药材质量标准的升级提供参考。

[关键词] 橘皮; 活性成分; 黄酮; 生物碱; 总酚酸; 多糖; 动态积累

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0111-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150111

[收稿日期] 20130728(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072991); 四川省教育厅自然科学重点项目(09ZA033)

[第一作者] 刘荣, 在读硕士, 从事中药化学成分与质量标准化研究, Tel: 15928667250, E-mail: liurong2007@126.com

[通讯作者] * 刘友平, 研究员, 博士生导师, 从事中药质量标准化及药效物质基础研究, Tel: 028-61800158, E-mail: lyp@cdutcm.edu.cn

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 177.

[2] 周思思, 马增春, 梁乾德, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS 分析附子煎煮过程中化学成分的变化[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(8): 894.

[3] 陈荣昌, 孙桂波, 张强, 等. 附子毒性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1126.

[4] 张思佳, 刘敏卓, 刘静涵, 等. 附子的化学成分研究[J]. 药学研究, 2010, 37(3): 262.

[5] 丁立生, 陈维新. 天然 C₁₉-二萜生物碱的核磁共振谱(I)[J]. 天然产物研究与开发, 1989, 7(1): 6.

[6] Pelletier S W, Keith L H, Parthasarathy P C. Structure of condalpine isotalatizidine and talatizidine[J]. J Am Chem Soc, 1967, 89(7): 4146.

[7] Khetwal K S, Desai H K, Joshi B S, et al. A new norditerpenoid alkaloids from the seeds of *Delphinium ajacis*[J]. Heterocycles, 1994, 38(4): 833.

[8] 于海兰, 贾世山. 蒙药草乌叶中的一个新二萜生物碱

Bewucine[J]. 药学学报, 2000, 35(3): 232.

[9] 魏巍, 李绪文, 杨瑞杰, 等. 3 种单酯型乌头碱的 NMR 研究[J]. 波谱学杂志, 2010, 27(2): 238.

[10] Christov R, Bankova V, Tsvetkova I, et al. Antibacterial furofuran lignans from Canary Islands propolis[J]. Fitoterapia, 1999, 70(6): 89.

[11] 叶敏, 阎玉凝, 乔梁, 等. 中药菟丝子化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(2): 115.

[12] Chen I S, Chen T L, Chang Y L, et al. Chemical constituents and biological activities of the fruit of *Zanthoxylum intergrifolium*[J]. J Nat Prod, 1999, 62(6): 833.

[13] Jutiviboonsuk A, Zhang H J, Tan G T, et al. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*[J]. Phytochemistry, 2005, 66(23): 2745.

[14] 杨阳, 蔡飞, 陈万生, 等. 头花蓼化学成分的研究(I)[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(8): 937.

[15] Munksgaard V. Oligosaccharider I honing[D]. Kemisk Institut; Danmarks Farmaceutiske Hojskole, 1981.

[责任编辑] 邹晓翠

Dynamic Accumulation of Main Active Ingredient in Different Cultivars of Orange Peel

LIU Rong, WEI Zheng, FAN Dan-qing, YANG Li, CHEN Hong-ping, LIU You-ping*

(Department of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, the Breeding Base of State Key Laboratory of Resources System Research and Development Utilization of Chinese Herbal Medicines Co-constructed by the Ministry of Science and Technology of the PRC, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** Compare three different cultivars of *C. tangerina* Hort. et Tanaka, *C. reticulata* Blanco cv. *Kinokuni*, *Citrus reticulata* Blanco cv. *zhangshuensis* Hort orange peel flavonoids, alkaloids, total phenolic acid, polysaccharides content with different harvesting time, exploring the orange peel herbs active ingredients in the above four main active ingredients and the relative composition ratio between harvest time with the dynamics accumulation. **Method:** Using ultraviolet spectrophotometry orange peel herbs total flavonoids, total phenolic acid and polysaccharides, HPLC determination of four main herbs flavonoids and synephrine content. **Result:** Three kinds of orange peel in flavonoids, total phenolic acid, synephrine content increased with the increase of harvest time gradually reduced to stabilize, polysaccharides are gradually increased to reach maximum maturity. The total flavonoids and total phenolic acids, polysaccharides and total phenolic acids between the ratio and the increases of fruit maturity are increasing. **Conclusion:** The study interpretation of traditional Chinese medicine peel, Citri Reticulatae Pericarpium and Citri Reticulatae Pericarpium Viride ‘homologous different effect and one material used as two kinds of Chinese medicine’ material differences and the quality standards of orange peel herbs further upgrade provide some reference.

[Key words] orange peel; active ingredient; flavonoids; alkaloids; total phenolic acid; polysaccharides; dynamic accumulation

橘皮来源于芸香科柑橘属植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的果皮,橘皮类药材,品种较多,在我国历史上具有悠久的药食两用价值,而且也是作为我国传统中药青皮、陈皮药材的重要来源^[1]。橘皮始载于《神农本草经》:“橘柚又名橘皮”,由于用药历史的发展,橘皮药材因其采收时间的不同而划分成为 2 味不同的药材——青皮、陈皮。陈嘉谟在《本草蒙筌》曰:“青皮、陈皮一种,因其迟早采收,特分老嫩而立名也。嫩者性酷治下,老者性缓治高”^[2]。李时珍《本草纲目》有云:“陈皮浮而升,入脾肺气分;青皮沉而降,入肝胆气分,一体二用,物理自然也”^[2]。可见,我国历代医家已经指出,青皮、陈皮本属一物,而功效迥异,导致其在临床应用上有别,不可混淆。《中国药典》2010 年版一部收载陈皮药材来源的主要包括茶枝柑 *C. reticulata* ‘Chachi’ 及其栽培变种大红袍 *C. reticulata* ‘Dahongpao’、福橘 *C. reticulata* ‘Tangerina’ 等^[3];青皮药材来源基本同陈皮,但较陈皮多 1 个栽培变种来源—甜橙 *C. sinensis* (L.) Osbeck, 习称“小青

皮”^[4]。青皮、陈皮药材中主要含有的化学成分包括挥发油类、黄酮类、生物碱类、多糖类以及少量维生素 B₁、维生素 C、肌醇等^[5-7]。有学者对青皮、陈皮药材中所含的主要化学成分进行比较研究,发现不同产地及品种的青皮、陈皮药材中所含的化学成分有所差异,吴憬青等对不同基原陈皮药材中橙皮苷含量进行研究,发现不同基原的陈皮药材中橙皮苷含量差异较大^[8];王姿媛等对不同产地的青皮、陈皮药材中辛弗林含量进行比较研究发现,不同产地及品种药材之间辛弗林含量有显著差别^[9]。由此可见,青皮、陈皮药材来源相同由于成熟度不同其有效成分的组成及比例差异而导致其发挥药效的物质基础差异。课题组通过调查国内中药材市场作为橘皮药材供应的几个主流品种,以川陈皮来源红橘、赣陈皮来源樟头红和南丰蜜橘为例,研究其主要活性成分的动态积累规律。本研究为了确保药材来源的同一性,降低环境、气候、栽培方式及个体差异等客观因素带来的中药材品质不一的影响,采取了定点、定植株、定品种的采样方式对重庆、江西作为青

皮、陈皮入药的3个不同栽培品种橘皮药材红橘、南丰蜜橘、樟头红中主要活性成分——黄酮类、生物碱类、酚酸类、多糖类成分随采收时间的动态积累规律进行系统研究,探讨青皮、陈皮药材主要活性成分的动态积累与其采收期的相关性,为后期青皮、陈皮中发挥药效的物质基础差异研究及阐释青皮、陈皮药材“一体二用”提供依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂 UV-1100型紫外-可见分光光度计(上海天美科技有限公司),DZKW-4型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司),BP211D型1/10万电子分析天平(德国Sartorius公司),SB25-12D型超声波清洗器(宁波新艺超声设备有限公司),Shimadzu LC-20AT高效液相色谱仪(日本岛津公司);芸香柚皮苷对照品(批号 MUST-12041206),橙皮苷对照品(批号 MUST-12020304),川陈皮素对照品(批号 MUST-12060111),橘皮素对照品(批号 MUST-12062902),以上4种对照品均购于成都曼思特生物科技有限公司,纯度>98.0%,没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110831-

200302,纯度>98.0%),辛弗林对照品(中国食品药品检定研究院,批号 0727-200004,纯度>98.0%),无水葡萄糖对照品(成都市科龙化工试剂厂,供含量测定用,批号 20110331),陈皮精制多糖(自制),其他试剂均为分析纯。

1.2 药材的采集 课题组收集了重庆、江西产的3个不同栽培变种橘皮药材,并经成都中医药大学药学院严铸云教授和江西省新干县农业局廖学林工程师共同鉴定,南丰蜜橘为芸香科植物橘的栽培变种南丰蜜橘 *C. reticulata* Blanco cv. *Kinokuni*;樟头红为芸香科植物橘的栽培变种樟头红 *C. reticulata* Blanco cv. *zhangshuensis* Hort,二者均采集于江西省新干县三湖镇(新干);红橘为芸香科植物红橘 *C. tangerina* Hort. et Tanaka,采集于重庆市璧山县健龙镇(璧山)的大红袍品系。药材采集过程中发现重庆、江西的橘皮品种植株挂果、落果、成熟时间不一致,因此收集了8个时间点重庆产红橘药材;6个时间点江西产樟头红和南丰蜜橘药材,各批次橘皮药材采集时间见表1。

表1 橘皮药材采集时间

No.	品种	采集时间	No.	品种	采集时间	No.	品种	采集时间
1	红橘	2012-09-08	10	南丰蜜橘树1	2012-07-15	19	南丰蜜橘树2	2012-10-15
2	红橘	2012-09-23	11	南丰蜜橘树1	2012-08-15	20	南丰蜜橘树2	2012-11-15
3	红橘	2012-10-08	12	南丰蜜橘树1	2012-09-15	21	樟头红	2012-06-15
4	红橘	2012-10-23	13	南丰蜜橘树1	2012-10-15	22	樟头红	2012-07-15
5	红橘	2012-11-08	14	南丰蜜橘树1	2012-11-15	23	樟头红	2012-08-15
6	红橘	2012-11-23	15	南丰蜜橘树2	2012-06-15	24	樟头红	2012-09-15
7	红橘	2012-12-08	16	南丰蜜橘树2	2012-07-15	25	樟头红	2012-10-15
8	红橘	2012-12-23	17	南丰蜜橘树2	2012-08-15	26	樟头红	2012-11-15
9	南丰蜜橘树1	2012-06-15	18	南丰蜜橘树2	2012-09-15			

注:南丰蜜橘树1、南丰蜜橘树2为采集于同一地点的2个不同植株。

2 方法与结果

2.1 橘皮药材中4种主要黄酮类成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 Hypersil BDS C₁₈色谱柱(4.6 mm×200 mm,5 μm),流动相0.05%磷酸-乙腈,按以下梯度洗脱0~5 min,20%~25%乙腈,5~10 min,25%~30%乙腈,10~20 min,30%~50%乙腈,20~30 min,50%~60%乙腈,30~35 min,60%~90%乙腈,35~40 min,90%~100%乙腈,柱温30℃,流速0.7 mL·min⁻¹,双波长检测283,335 nm,进样量5 μL。

2.1.2 供试品溶液的制备 取橘皮药材粉末(过

3号筛)约0.2 g,精密称定,精密加入甲醇25 mL,称定质量,在75℃下水浴回流1 h,冷却,再次称定质量,用甲醇补重,摇匀,过滤,取续滤液过0.45 μm微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 分别精密称取4种黄酮类成分(芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素)对照品适量,加入甲醇配制成每1 mL含芸香柚皮苷0.046 mg、橙皮苷0.374 mg、川陈皮素0.104 8 mg和橘皮素0.054 mg的混合对照品溶液。

2.1.4 吸收波长的确定 精密吸取混合对照品溶液5 μL注入HPLC,按2.1.1项下色谱条件进行采集,

用 DAD 紫外检测器对三维谱图进行分析,其中芸香柚皮苷和橙皮苷在 283 nm 有最大吸收,川陈皮素和橘皮素在 335 nm 有较大吸收。因此,选取 283,335 nm 2 个波长作为 4 种黄酮类成分的检测波长。

2.1.5 标准曲线的制备 精密吸取 2,5,8,10,15,20 μL 混合对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,作线性回归,4 种黄酮类成分对照品线性回归方程及线性范围见表 2。

表 2 线性回归方程

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
芸香柚皮苷	$Y=2\ 363\ 942.77X-37\ 330.54$	0.999 8	0.092~0.920
橙皮苷	$Y=2\ 518\ 435.52X-95\ 141.02$	0.999 6	0.748~7.480
川陈皮素	$Y=4\ 520\ 177.71X-2\ 163.24$	0.999 9	0.210~2.096
橘皮素	$Y=5\ 844\ 599.98X-74\ 861.82$	0.999 8	0.108~1.080

2.1.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 5 μL ,重复进样 5 次,计算 4 种黄酮类成分峰面积的精密度。结果芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素 RSD 分别为 1.23%,0.27%,0.18%,1.37%,结果表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 按 2.1.2 项下供试品溶液的制备方法制备的同一批供试品溶液,在 0,2,4,8,12,24 h 分别测定 4 种黄酮类成分的含量,实验结果测定芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素 RSD 分别为 1.22%,0.70%,1.08%,1.45%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 精密称取同一份药材粉末,按 2.1.2 项下供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液,测定 4 种黄酮类成分的含量。测定结果 4 种黄酮成分的 RSD 分别为 1.64%,1.1%,2.5%,1.22%,结果表明重复性良好。

2.1.9 回收率试验 称取已知含量的橘皮药材粉末 6 份,每份约 0.02 g,精密称定,分别加入一定量的混合对照品溶液,按 2.1.2 项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液,测定其 4 种黄酮类成分的含量,并计算加样回收率。结果芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素的平均回收率分别为 96.37%,98.26%,96.67%,98.74%;RSD 分别为 2.21%,1.38%,2.17%,3.12%。

2.1.10 样品中 4 种主要黄酮类成分的含量测定 称取橘皮药材粉末 0.5 g,精密称定,按 2.1.2 项下供试品溶液制备方法制备样品溶液,精密量取 5 μL 进样,按 2.1.1 项下色谱条件测定样品中 4 种黄酮

类成分的含量,测定结果见表 3。

2.2 橘皮药材中总黄酮的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 对照品溶液中含 0.38 mg 橙皮苷对照品贮备溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品粉末(过 3 号筛)约 0.2 g,精密称定,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,在 75 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴回流 1 h,冷却,再次称定质量,用甲醇补重,摇匀,过滤,即得供试品溶液。

2.2.3 最大吸收波长的确定 以甲醇为空白溶剂,于 200~400 nm 扫描,结果表明对照品和供试品溶液在 283 nm 处有最大吸收,因此以 283 nm 作为橘皮药材总黄酮的测定波长。

2.2.4 标准曲线的绘制 精密量取橙皮苷对照品溶液 0.25,0.5,1.0,1.2,1.5,2.0 mL,分别置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,以甲醇为空白溶剂,用紫外分光光度法在 283 nm 处测定其吸光度,以吸光度为纵坐标,橙皮苷对照品质量浓度为横坐标,绘制橙皮苷标准曲线,得回归方程 $Y=0.029\ 7X+0.025\ 7$ ($r=0.999\ 6$),橙皮苷在 3.808~30.464 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与吸光度线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密量取橙皮苷对照品贮备液 0.5 mL,于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,重复测定吸光度值 6 次,橙皮苷吸光度 RSD 0.18%,表明仪器精密度符合要求。

2.2.6 稳定性试验 取橘皮药材粗粉约 0.2 g,精密称定,按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备成样品溶液,分别于 0,0.5,1,1.5,2 h,按 2.2.4 项下自用甲醇稀释至刻度起,于 283 nm 下测定吸光度,计算得到总黄酮含量的 RSD 1.92%。实验表明样品溶液在 2 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取橘皮药材粗粉约 0.2 g,精密称取 6 份,按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备成样品溶液,于 283 nm 下测定吸光度,根据橙皮苷标准曲线计算出总黄酮含量 RSD 1.65%。

2.2.8 加样回收率试验 取已知总黄酮含量的橘皮药材粗粉 6 份,每份约 0.1 g,精密称量,各份中加入约含等量对应对照品含量的橙皮苷对照品贮备液,按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备样品溶液,计算加样回收率分别为 97.26%,95.38%,99.03%,98.07%,97.96%,99.23%,平均值为 97.82%,RSD 1.40%。

2.2.9 样品中总黄酮的含量测定 称取橘皮药材粉末 0.2 g,精密称定,按 2.2.2 项下供试品溶液的

表3 橘皮药材主要活性成分含量测定

%

No.	芸香柚皮苷	橙皮苷	川陈皮素	橘皮素	总黄酮	辛弗林	总酚酸	多糖	总黄酮/总酚酸	多糖/总酚酸
1	0.25	10.97	1.47	0.48	20.62	0.90	2.94	18.18	7.01	6.18
2	0.18	9.37	1.30	0.44	16.03	0.79	2.00	17.41	8.02	8.71
3	0.17	10.00	1.26	0.40	16.42	0.68	1.68	20.02	9.77	11.92
4	0.20	11.15	0.88	0.31	17.11	0.61	1.59	20.56	10.76	12.93
5	0.18	9.69	0.73	0.26	14.94	0.57	2.38	24.77	6.28	10.41
6	0.17	10.06	0.67	0.24	14.69	0.44	2.12	20.84	6.93	9.83
7	0.12	6.02	0.60	0.21	9.67	0.43	1.26	17.06	7.67	13.54
8	0.14	9.00	0.57	0.21	13.37	0.45	1.20	25.74	11.14	21.45
9	1.09	13.93	0.91	0.63	24.49	1.33	3.92	10.60	6.25	2.70
10	0.56	7.83	0.67	0.35	13.33	0.72	1.87	25.07	7.13	13.41
11	0.23	9.09	1.28	0.68	16.84	0.82	2.33	17.27	7.23	7.41
12	0.18	7.71	1.67	0.93	17.33	0.89	3.66	16.21	4.73	4.43
13	0.18	7.52	1.80	0.95	16.67	0.95	2.77	16.69	6.02	6.03
14	0.15	8.09	0.80	0.42	14.40	0.75	3.56	15.66	4.04	4.40
15	0.76	14.30	1.57	0.95	26.02	1.61	3.12	13.01	8.34	4.17
16	0.54	7.81	0.97	0.51	14.57	0.87	1.92	21.04	7.59	10.96
17	0.23	7.82	1.88	1.00	17.83	1.02	3.18	12.67	5.61	3.98
18	0.18	7.64	1.72	0.94	17.15	1.01	3.09	17.40	5.55	5.63
19	0.17	7.28	1.73	0.37	16.40	1.06	3.78	18.49	4.34	4.89
20	0.17	7.17	1.80	0.91	16.16	0.98	3.38	17.12	4.78	5.07
21	0.48	6.18	0.68	0.30	12.43	0.38	1.95	12.40	6.37	6.36
22	0.45	5.85	1.88	0.80	16.93	0.43	2.42	11.91	7.00	4.92
23	0.36	5.92	0.81	0.33	11.73	0.35	2.31	16.21	5.08	7.02
24	0.34	5.13	1.48	0.06	14.24	0.37	1.40	15.23	10.17	10.88
25	0.43	6.18	1.50	0.64	15.53	0.32	2.51	15.50	6.19	6.18
26	0.33	4.94	1.14	0.56	12.62	0.23	1.38	20.02	9.14	14.51

注:总黄酮/总酚酸、多糖/总酚酸为同一时间点采集的橘皮样品中总黄酮、总酚酸、多糖含量之比。

制备方法制备样品溶液,精密量取 0.5 mL 置于 25 mL量瓶中加甲醇稀释至刻度,于 283 nm 下测定吸光度,计算橘皮药材中总黄酮含量,见表 3。

2.3 橘皮药材中生物碱类成分——辛弗林的含量测定

2.3.1 色谱条件 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(水中含 0.05% 磷酸-0.1% 十二烷基庚烷磺酸钠)57:43, 柱温 30 ℃, 流速 0.7 mL·min⁻¹, 检测波长 224 nm, 进样量 10 μL。

2.3.2 供试品溶液的制备 取橘皮药材粉末(过 3 号筛)约 0.5 g, 精密称定, 精密加入 75% 乙醇

25 mL, 称定质量, 超声提取(功率 250 W, 频率 50 kHz)45 min, 冷却, 再次称定质量, 用 75% 乙醇补重, 过滤, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.3.3 对照品溶液的制备 称取一定量辛弗林对照品, 用 75% 乙醇配制成每 1 mL 含辛弗林 0.109 mg 的辛弗林对照品溶液。

2.3.4 标准曲线的制备 精密吸取 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30 μL 辛弗林对照品溶液, 按 2.3.1 项下的色谱条件测定, 以辛弗林对照品进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 作线性回归, 得辛弗林对照品线性回归方程为 $Y = 3\,529\,848.67X - 24\,561.30$ ($r = 0.999\,9$),

结果辛弗林对照品在 $0.545 \sim 3.27 \mu\text{g}$ 与峰面积线性关系良好。

2.3.5 精密度试验 精密吸取辛弗林对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 重复进样 5 次, 记录峰面积, 计算精密度。结果辛弗林对照品溶液的 RSD 0.19%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 按 2.3.2 项下供试品溶液的制备方法制备的同一批样品溶液, 在 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 分别测定样品溶液中辛弗林的峰面积, 实验结果测得样品中辛弗林峰面积的 RSD 2.8%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 精密称取同一份药材粉末, 按 2.3.2 项下供试品溶液的制备方法制备 6 份样品溶液, 测定其辛弗林的含量。结果辛弗林的 RSD 1.23%, 表明重复性良好。

2.3.8 回收率试验 称取已知含量的橘皮药材粉末 6 份, 每份约 0.2 g, 精密称定, 分别加入一定量辛弗林对照品溶液, 按 2.3.2 项下方法制备样品溶液, 测定辛弗林含量, 计算加样回收率。结果辛弗林的平均回收率为 98.37%, RSD 1.68%。

2.3.9 样品中辛弗林的含量测定 称取橘皮药材粉末 0.5 g, 精密称定, 按 2.3.2 项下方法制备样品溶液, 精密量取 $10 \mu\text{L}$ 进样, 按 2.3.1 项下的色谱条件测定样品中辛弗林的含量, 结果见表 3。

2.4 橘皮药材中总酚酸的含量测定 参照《中国药典》2010 年版一部附录 X B 项下鞣质含量测定方法, 测定橘皮药材中总酚酸的含量。

2.4.1 对照品溶液的制备 取没食子酸对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 $0.052 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 分别取各橘皮药材粉末(过三号筛)约 1.0 g, 精密称定, 置 250 mL 棕色量瓶中, 加水 150 mL 放置过夜, 超声处理 10 min, 放冷, 用水稀释至刻度, 摇匀, 静置, 滤过, 弃去初滤液 50 mL, 精密量取续滤液 20 mL, 置 100 mL 棕色量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4.3 标准曲线的绘制 精密量取对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置 25 mL 棕色量瓶中, 各加入磷钼钨酸试液 1 mL, 再分别加水 11.5, 11, 10, 9, 8, 7 mL, 用 29% 碳酸钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 放置 30 min, 以相应的试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法在 760 nm 的波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程为 $Y = 82.387X + 0.0401$, $r = 0.9985$, 表明没

食子酸在 $1.04 \sim 10.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4.4 样品含量测定 称取一定量的橘皮药材粉末按 2.4.2 项下方法制备样品溶液, 精密量取供试品溶液 2.0 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 按照标准曲线的制备项下的方法 2.4.3 项下自“加入磷钼钨酸试液 1 mL”起, 加水 10 mL, 依次测定吸光度, 由回归方程计算出橘皮药材中总酚酸的量, 测定结果见表 3。

2.5 橘皮药材中多糖类成分的含量测定

2.5.1 供试品溶液的制备 称取橘皮药材粉末 1.0 g, 精密称定, 加入石油醚(沸程 $30 \sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$) 25 mL 于 500 mL 圆底烧瓶中, $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴回流 2 h, 过滤, 残渣挥干石油醚。加入 80% 乙醇 30 mL, 与 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 下水浴回流 2 h, 过滤, 残渣用 80% 乙醇洗涤 2 次, 每次 15 mL, 残渣连同滤纸置于烧瓶中, 加入 250 mL 蒸馏水于 $92 \text{ }^\circ\text{C}$ 下回流提取 2.5 h, 趁热抽滤, 滤液置于 250 mL 量瓶中, 放冷, 加水稀释至刻度, 即得。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥至恒重的无水葡萄糖 10.12 mg, 置于 100 mL 棕色量瓶中, 加水溶解, 稀释至刻度, 得质量浓度为 $0.1012 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无水葡萄糖对照品储备液, 备用。

2.5.3 最大吸收波长的确定 精密量取无水葡萄糖对照品储备液和橘皮供试品溶液 1.0 mL 置于具塞试管中, 加水补足 2.0 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL、浓硫酸 7.0 mL, 于 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴下反应 15 min, 取出置于冷水浴中冷却至室温。以蒸馏水为空白, 于 200 ~ 600 nm 扫描, 经比对二者的最大吸收波长, 确定陈皮水溶性多糖的最大吸收波长 λ_{max} 为 488 nm。

2.5.4 标准曲线的制备 分别精密量取无水葡萄糖对照品储备液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL 置于 10 mL 具塞试管中, 按 2.5.3 项下“自加水补足 2.0 mL 起”, 以蒸馏水为空白, 于 488 nm 波长下依次测定其吸光度, 以无水葡萄糖质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐, 所得线性回归方程为 $Y = 0.0643X - 0.0248$, $r = 0.9962$, 结果表明葡萄糖在 $2.02 \sim 12.14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系。

2.5.5 精密度试验 精密量取葡萄糖对照品储备液 0.8 mL 置于 10 mL 具塞试管中, 按 2.5.3 项下“自加水补足 2.0 mL 起”, 以蒸馏水为空白, 于 488 nm 波长下测定吸光度, 重复测定 6 次, 所得结果分别为 0.364, 0.365, 0.365, 0.366, 0.366, 0.364, 计算 RSD 0.24%, 表明仪器精密度良好。

2.5.6 稳定性试验 取橘皮药材粉末约 1.0 g, 精

密测定,按供试品溶液制备方法制备样品溶液,于0,0.5,1,1.5,2,2.5 h 测定吸光度分别为0.424,0.422,0.419,0.415,0.410,0.409,计算RSD 1.49%,表明供试品溶液在2.5 h内稳定。

2.5.7 重复性试验 取橘皮药材粉末约1.0 g,精密称定6份,分别按供试品溶液制备方法制备样品溶液,以蒸馏水为空白,分别于488 nm下测定吸光度,计算样品中多糖的含量为24.42%,25.23%,24.76%,25.71%,24.68%,25.12%,计算RSD 1.84%,表明按此方法制备供试品溶液重复性较好。

2.5.8 加样回收率试验 取已知多糖含量的橘皮药材粉末6份,每份约0.5 g,精密称定,分别加入一定量的橘皮精制多糖,按供试品溶液制备方法制备样品溶液,以蒸馏水为空白,分别于488 nm下测定吸光度,计算样品中多糖的回收率均值为96.38% ($n=3$),RSD 2.88%。

2.5.9 样品中多糖的含量测定 精密称定橘皮药材粉末1.0 g,按2.5.1项下供试品溶液的制备方法制备样品溶液,以蒸馏水为空白,于488 nm下测定吸光度,代入回归方程计算样品中多糖的含量,结果见表3。

3 讨论

从表3可知,3种橘皮药材中黄酮类成分含量随采收时间的增加而逐渐降低至趋于稳定,以橙皮苷和川陈皮素降低较为明显;总酚酸、辛弗林含量也呈现相似的变化趋势,这与课题组研究结果相符^[10-12]。多糖则随采收时间的增加而增加,最后趋于稳定。此外,在整个采收过程中3种橘皮药材活性成分的积累量存在差异,红橘中橙皮苷及总黄酮的含量较南丰蜜橘和樟头红高,而南丰蜜橘又比樟头红高,其他成分差异不明显。另,3种橘药材在整个采收时间内总黄酮与总酚酸、多糖与总酚酸之间的比例也呈现一定的变化规律,红橘和樟头红中总黄酮/总酚酸的比例随果实成熟度增加而增加,而南丰蜜橘中二者的比例则降低;3种橘皮药材中多糖/总酚酸的比例均随果实成熟度的增加而增加,特别是在果实成熟期增加比例尤为明显,这提示了随橘果实的成熟橘皮中糖分的积累也迅速增加。3种橘皮药材主要活性成分在果实生长发育期内的动态积累既有差异又存在共性,其差异表现为次生代谢产物合成积累量及组成比例不同,这主要是由三者品种差异造成的;共性表现为次生代谢产物合成积累

动态变化趋势相似,这也可能是三者产生相似药效而均作为青皮、陈皮来源品种的原因之一。

讨论 本实验在课题组研究基础上,对红橘、南丰蜜橘、樟头红中主要活性成分随采收时间的动态积累进行研究,发现3种橘皮药材在整个采收时间内主要活性成分及其比例随采收时间增加而呈现一定的变化规律,这种变化规律与采收时间的相关性,体现了3种橘皮药材中主要活性成分在其体内合成积累的变化过程,究竟是何种成分的变化或转化引起了青皮、陈皮药材中药效成分的量变,从而导致青皮、陈皮药材功效差异的质变还有待进一步研究。本研究为当地橘皮药材采收期的制定及合理利用橘皮资源提供参考,也为阐释橘皮类药材—青皮、陈皮“一体二用”的物质基础差异奠定基础。

[参考文献]

- [1] 颜正华. 中药学[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1990:277.
- [2] 国家中医药管理局. 中华本草. 第4卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999:886.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:176.
- [4] 谢宗万. 中药品种理论与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008:766.
- [5] 高蓓. 广陈皮黄酮类化合物和挥发油成分及其活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [6] 张小斌, 雷燕妮. 不同品种的陈皮挥发油含量的比较研究[J]. 商洛学院学报, 2011, 25(4):53.
- [7] 李庆耀, 梁生林. 陈皮的药用研究进展[J]. 中成药, 2008, 30(2):246.
- [8] 吴慷青, 叶莹, 张俊. HPLC测定不同产地陈皮橙皮苷的含量[J]. 中国现代中药, 2008, 10(8):20.
- [9] 王姿媛, 孙亦群. HPLC法测定陈皮、青皮中辛弗林的含量[J]. 中药材, 2009, 32(6):913.
- [10] 韦正, 陈鸿平, 杨丽, 等. 同一植株不同生长期橘皮中辛弗林含量动态变化规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10):80.
- [11] 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.
- [12] 刘荣, 韦正, 银玲, 等. 星点设计效应面法优化陈皮多糖提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18):20.

[责任编辑 邹晓翠]