doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.13.011

不同方法提取陈皮中黄酮类有效成分含量比较

张婷婷[1],梁 燕[2],彭 灿[2,3△]

(1.安徽中医药大学第一附属医院药学部,安徽 合肥 230031; 2.安徽中医药大学药学院,安徽 合肥 230012; 3.安徽中医药大学药学院中药复方安徽省重点实验室·安徽道地中药材品质提升协同创新中心,安徽 合肥 230012)

摘要:目的 为陈皮的质量控制提供参考。**方法** 建立并优化超声提取工艺,分别采用超声提取法和索氏提取法对5批不同产地的陈皮药材进行提取,并建立测定陈皮中橙皮苷、川陈皮素、桔皮素含量的高效液相色谱法。**结果** 超声提取法提取橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的提取率均高于索氏提取法。**结论** 超声提取法提取率高于索氏提取法,且简单便捷,可用于提取陈皮中的黄酮类成分,以控制陈皮的质量。

关键词:陈皮;超声提取法;索氏提取法;橙皮苷;川陈皮素;桔皮素;含量

中图分类号:R932;R284.2;R286.0 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)13－0040－04

Comparison of Flavonoids Content in *Pericarpium Citri Reticulatae* Extracted by Different Methods

ZHANG Tingting[1], LIANG Yan[2], PENG Can[2,3]

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230031; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012 3. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine·Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicine Formula·Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei, Anhui, China 230012)

Abstract: Objective To provide a reference for quality control of *Pericarpium Citri Reticulatae*. **Methods** Ultrasonic extraction technology was established and optimized. Five batches of *Pericarpium Citri Reticulatae* from different places were extracted by ultrasonic method and Soxhlet extraction method respectively. A high－performance liquid chromatography(HPLC) method was established for the content determination of hesperidin, nobiletin and tangeretin in *Pericarpium Citri Reticulatae*. **Results** Compared with the Soxhlet method, the ultrasonic extraction method had a higher extraction rate of hesperidin, nobiletin and tangeretin. **Conclusion** Ultrasonic extraction method is simple and convenient, and it has a higher extraction rate than the Soxhlet extraction method, which is more suitable for the extraction of flavonoids from *Pericarpium Citri Reticulatae*.

Key words: *Pericarpium Citri Reticulatae*; ultrasonic extraction method; Soxhlet extraction method; hesperidin; nobiletin; tangeretin; content

第一作者:张婷婷,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)664977687@qq.com。

△**通信作者:**彭灿,男,博士,副教授,研究方向为药物制剂新技术与药物体内外分析,(电子信箱)pengcanking@hotmail.com。

参考文献

[1] 宋艳玲,孙 欢,李柏娜. 西坦类药物研究进展[J]. 中国药业,2015,24(1):4－7.

[2] 张湘衡,陈忠平. 抗癫痫新药左乙拉西坦[J]. 中国神经肿瘤杂志,2010,8(2):120－123.

[3] JACOB S, NAIR AB. An updated overview on therapeutic drug monitoring of recent antiepileptic drugs[J]. Drugs in R&D, 2016,16(4):303－316.

[4] 张启明,谢沐风,宁保明. 采用多条溶出曲线评价口服固体制剂的内在质量[J]. 中国医药工业杂志,2009,40(12):946－950.

[5] 谢沐风. 改善溶出度评价方法,提高固体制剂水平[J]. 中医药工业杂志,2005,36(7):447－451.

[6] The United States Pharmacopieial Convention. USP 40－NF35[M]. Rockville: The United States Pharmacopieial Convention, 2016:2529.

[7] 国家食品药品监督管理总局. 关于发布普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则和化学药物(原料药和制剂)稳定性研究技术指导原则的通告[EB/OL].(2015－02－05)[2020－02－13]. https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20150205120001100.html.

[8] 国家食品药品监督管理总局. 总局发布普通口服固体制剂参比制剂选择和确定等3个技术指导原则的通告(2016年第61号)[EB/OL].(2016－03－18)[2020－02－13]. https://www.nmpa.gov.cn/zhuanti/ypqxgg/ggzhcfg/20160318210001633.html.

[9] 国家食品药品监督管理总局. 总局关于发布人体生物等效性试验豁免指导原则的通告(2016年第87号)[EB/OL].(2016－05－19)[2020－02－13]. https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20160519192001687.html.

[10] 谢沐风. 如何科学、客观地制订溶出度试验质量标准[J]. 中国医药工业杂志,2012,43(3):243－252.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:121.

[12] 谢沐风. 溶出曲线相似性的评价方法[J]. 中国医药工业杂志,2009,40(4):308－311.

[13] 林 兰,牛剑钊,许明哲,等. 国外仿制药一致性评价比较分析[J]. 中国新药杂志,2013,22(21):2470－2473.

[14] 胡昌勤,潘瑞雪. 溶出度试验评价/预测固体口服制剂生物等效性的研究进展[J]. 中国新药杂志,2014,23(1):44－51.

(收稿日期:2020－03－15)

陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮，味苦、辛，性温，归肺、脾经，用于脘腹胀满，食少吐泻，咳嗽痰多[1]。陈皮在我国分布广泛，来源众多，主要药理作用有抗氧化[2]、抗炎[3]、抗心脑血管疾病[4]、抗癌[5]、调节脂质代谢[6]等，主要化学成分为黄酮类[7]、挥发油类[8]、生物碱类成分及微量元素等。黄酮类化合物是陈皮中的主要活性成分，橙皮苷为陈皮中含量最高的黄酮类物质。陈皮中其余黄酮类物质有新橙皮苷、柚皮苷、芸香柚皮苷、桔皮素、川陈皮素等[9]。目前，陈皮的主要提取方法有 2015 年版《中国药典(四部)》中收录的索氏提取与加热回流结合的方法和超声提取法。本研究中在橙皮苷的基础上增加了桔皮素和川陈皮素多甲氧基黄酮类成分作为测定指标[10]，比较 2 种提取方法提取陈皮中黄酮类成分的差异，为陈皮的有效成分提取和质量控制提供依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技 < 中国 > 有限公司)；ST - 528 型超微粉碎机(瑞安市赛特机电有限公司)；YL - 060S 型超声波清洗机(深圳市语路清洗设备有限公司，功率为 300 W，频率为 40 kHz)；SHZ - D(Ⅲ)型循环水式多用真空泵(河南省予华仪器有限公司)；DF - 101S 型集热式恒温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)；JY502 型电子天平(上海浦春计量仪器有限公司，精度为标准度三级)；BT25S 型电子天平(赛多利斯科学仪器 < 北京 > 有限公司，精度为十万分之一)。

1.2 试药

超纯水(自制)；甲醇、乙腈均为色谱纯，购自河北百灵威超精细材料有限公司；石油醚(分析纯，无锡市佳妮化工有限公司)；冰醋酸(分析纯，太仓市周氏化学品有限公司，批号为 20180810JN)；橙皮苷标准品(批号为 CHB - C - 034，质量分数 > 98%)，川陈皮素标准品(批号为 CHB - C - 047，质量分数 > 98%)，桔皮素标准品(批号为 CHB - J - 046，质量分数 > 98%)，均购自成都克洛玛生物科技有限公司；陈皮药材产地分别为湖南省怀化市、湖北省宜昌市、山东省临沂市、浙江省丽水市、湖南省常德市，编号分别为 01，02，03，04，05。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：Thermo C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm，5 μm)；流动相：乙腈(A) - 2% 醋酸水溶液(B)，梯度洗脱(0 ~ 14 min 时 85% B→67.5% B，14 ~ 20 min 时 67.5% B→43% B，20 ~ 25 min 时 43% B→33% B，25 ~ 30 min 时 33% B→85% B)；流速：1 mL/min；柱温：25 ℃；进样量：5 μL；检测波长：283 nm。在此色谱条件下，供试品溶液Ⅰ(索氏提取法)、供试品溶液Ⅱ(超声提取法)色谱图中，与混合标准品溶液色谱图中相同保留时间有相应色谱峰出现。详见图 1。

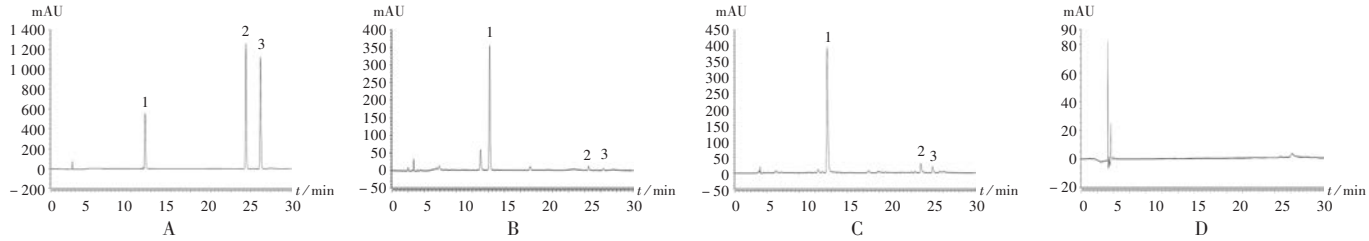
2.2 溶液制备

供试品溶液：每个批次(共 5 组)分别取 100 g 陈皮药材，打粉，得粗粉，过 3 号筛，备用。分别取各组粗粉 1.000 0 g，精密称定，置索氏提取器中，加石油醚(60 ~ 90 ℃)80 mL，加热回流 2 ~ 3 h，弃去石油醚，药渣挥干，加甲醇 80 mL，加热回流至提取液无色，放冷，滤过，滤液置 100 mL 容量瓶中，用少量甲醇分次洗涤容器，洗液倒入同一容量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，即得供试品溶液Ⅰ(索氏提取法)。分别取 1.000 0 g 各组粗粉，精密称定，置 100 mL 具塞锥形瓶中，加入 50 mL 甲醇，混匀，称定质量，超声提取 30 min，称定质量，用甲醇补足减失的质量，过滤，留取滤液，即得供试品溶液Ⅱ(超声提取法)。

混合标准品溶液：分别取 10.00 mg 橙皮苷、川陈皮素、桔皮素标准品，精密称定，加入 10 mL 容量瓶中，加入甲醇溶解并定容至刻度，即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察：取 2.2 项下混合标准品溶液 1 mL，用甲醇分别稀释，配制成 6 个质量浓度水平的待测样品溶液，其中橙皮苷标准品的质量浓度分别为 1 000.0，



1. 橙皮苷 2. 川陈皮素 3. 桔皮素

A. 混合标准品溶液 B. 供试品溶液Ⅰ(索氏提取法) C. 供试品溶液Ⅱ(超声提取法) D. 甲醇空白溶液

图 1 高效液相色谱图

1. hesperidin 2. nobiletin 3. tangeretin

A. Mixed standard solution B. Test solution Ⅰ(Soxhlet extraction method) C. Test solution Ⅱ(ultrasonic extraction method) D. Methanol blank solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

500.0,100.0,50.0,25.0,12.5 μg/mL;川陈皮素和桔皮素的质量浓度均为 500,100,50,25,10,5 μg/mL,按 2.1 项下色谱条件进样分析,重复 3 次,以样品的质量浓度(X,μg/mL)为横坐标、平均峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果(n=3)

Tab. 1 Results of linear relation test(n=3)

化合物	回归方程	R^2	线性范围(μg/mL)
橙皮苷	Y=0.156 1X+0.240 6	0.999 7	989.839~1 000.932
川陈皮素	Y=0.317 2X−0.095 0	0.999 9	4.496~499.440
桔皮素	Y=0.316 5X−0.129 7	0.999 9	4.702~499.486

精密度试验:取橙皮苷、川陈皮素、桔皮素质量浓度均为 100 μg/mL 的对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件每个样品日内连续进样 6 次,连续考察 3 d,记录峰面积,计算平均值。结果橙皮苷、川陈皮素、桔皮素日内及日间测得含量的 *RSD* 均小于 2%(n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同批次陈皮 6 份,依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录各组样品的峰面积,并计算含量。结果橙皮苷、川陈皮素、桔皮素含量的平均值分别为 4.52%,0.016%,0.012%,*RSD* 分别为 1.03%,0.97%,1.13%(n=6),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取陈皮药材,依法制备供试品溶液,分别于 0,2,4,8,12,24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录峰面积,并计算橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的含量。结果橙皮苷含量的 *RSD* 均不超过 2%(n=6),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

加样回收试验:取已知含量的陈皮样品 6 份,每份 0.500 0 g,精密称定,分别加入橙皮苷、川陈皮素、桔皮素对照品粉末 1.190 0,0.161 9,0.108 5 mg,依法提取,得供试品溶液,取适量,按 2.1 项下色谱条件进样检测,重复进样 3 次,记录峰面积,取平均值并计算该条件下的加样回收率。结果的 *RSD* 分别为 1.54%,1.96%,1.87%(n=3),表明方法回收良好。

2.4 样品含量测定

取各批次陈皮样品,依法制备供试品溶液,每批样品重复进样 3 次,按 2.1 项下色谱条件测定含量,计算峰面积平均值及橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的含量。详见表 2。采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据。先进行正态性检验($K-S$ 检验和 W 检验),橙皮苷、川陈皮素和桔皮素含量测定结果的 W 检验和 $K-S$ 检验的 P 值均小于 0.05,故认为不满足正态性,故采用非参数 Wilcoxon 检验。经分析表明,2 种提取方法对陈皮中橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的提取率差异均有统计学意义 P 值分别 0.045,0.000 018,0.000 024,每批药材超声提取的平均含量均大于索氏提取的平均含量。故认为超声提取法的提取率高于索氏提取法。

表 2 2 种提取方法提取陈皮中黄酮类成分的含量测定结果($\bar{X}\pm s$,%,n=3)

Tab. 2 Content determination of flavonoids in *Pericarpium Citri Reticulatae* by two extraction methods($\bar{X}\pm s$,%,n=3)

样品编号	索氏提取法			超声提取法		
	橙皮苷	川陈皮素	桔皮素	橙皮苷	川陈皮素	桔皮素
01	4.588 3±0.020 2	0.016 2±0.000 5	0.014 1±0.000 5	4.791 2±0.014 8	0.024 6±0.000 3	0.021 8±0.000 2
02	3.636 2±1.266 8	0.028 1±0.032 8	0.019 5±0.019 3	3.742 1±1.115 3	0.042 2±0.043 4	0.031 2±0.033 5
03	3.313 5±1.363 3	0.024 4±0.004 5	0.016 5±0.002 4	3.879 0±1.598 4	0.037 0±0.003 2	0.026 6±0.003 0
04	3.447 6±1.951 9	0.033 8±0.004 2	0.023 3±0.004 7	3.366 7±1.991 7	0.050 8±0.009 4	0.038 6±0.006 7
05	2.965 5±1.102 7	0.060 1±0.008 2	0.036 8±0.006 0	3.542 6±1.594 1	0.105 2±0.014 5	0.077 7±0.009 9

3 讨论

3.1 指标成分选择

2015 年版《中国药典(一部)》中采用单一成分橙皮苷的含量作为控制陈皮药材质量的指标,陈皮中橙皮苷的含量极高,但除橙皮苷外,多甲氧基黄酮类化合物也是陈皮中含量较高的活性物质,具有抗氧化[11]、抗癌[12-13]等药理作用。作为道地药材,部分广陈皮中橙皮苷的含量低于其他产地的陈皮,甚至有的不符合药典标准[14-15],故单一成分并不能较好地反映药材的质量。

3.2 陈皮产地选择

影响中药材成分含量的因素包括来源品种、产地、药材的采集加工过程等。陈皮向来以广东新会陈皮为胜,但产自广东的陈皮中黄酮类成分的含量并没有显著高于其他产地的陈皮[16-18]。而且本课题组经过市场调研发现,产自广东的陈皮市场价远高于其他产地的陈皮。故本实验选择了除广东外的其他几个常见产地的陈皮。

3.3 色谱条件优化

本研究中以甲醇-醋酸-水(35∶4∶61,$V/V/V$)为流动相进行分离,结果色谱峰的分离效果差;曾考察以甲醇-1% 醋酸溶液为流动相进行液相色谱检测,但分离效果仍较差;曾考察乙腈-1% 醋酸溶液系统,以该系统洗脱色谱峰的分离效果并不好。故选取乙腈(A)-2% 醋酸溶液(B)作为流动相,梯度洗脱,每次进样 5 μL。在肖建春等[19]的梯度洗脱程序基础上进行了优化,将进样时间由原来的 1 h 缩短至 30 min,节约了时间。最终确定梯度洗脱程序 0~14 min,85%B→67.5%B;

14～20 min，67.5% B→43% B；20～25 min，43% B→33% B；25～30 min，33B%→85% B。结果橙皮苷、川陈皮素、桔皮素 3 个成分的色谱分离效果较好，其色谱峰与相邻色谱峰的分离度均在 1.5 以上。

3.4 提取率分析

由表 2 可知，超声提取法提取橙皮苷、川陈皮素、桔皮素 3 种成分的提取率均高于索氏提取法。研究结果显示，对于川陈皮素，索氏提取法的提取率低于超声提取法[20]。川陈皮素和桔皮素均属于多甲氧基黄酮类成分，在黄酮母核 2－苯基色原的 3,5,6,7,8,2′,3′,4′,5′,6′位上有 4 个或 4 个以上的甲氧基取代，这一结构特性决定其极性较弱，脂溶性好。由于索氏提取法中结合了石油醚脱色处理，导致川陈皮素在石油醚中溶解，导致提取率降低，这可能是索氏提取法中川陈皮素和桔皮素提取率低的主要原因；橙皮苷的含量较低，可能是橙皮苷在索氏提取过程中，在石油醚中有损耗。但具体原因仍需进一步探索。

3.5 2 种方法优缺点比较

索氏提取法具有明显的缺点：1）提取耗时长，且提取过程中需人工看护；2）根据样本量不同，需要大量的萃取溶剂；3）提取过程中通过加热提高了萃取效率，但对于一些热不稳定物质，提取结果在定量上是不完整的[21]。超声提取法的优点在于：1）节省溶剂，索氏提取法每批样品都要耗费 80 mL 石油醚和 100 mL 甲醇，而超声提取不需要石油醚；2）节约时间，超声提取法仅需 30 min，而索氏提取法需要 4～5 h，且超声提取可同时提取多份样品，更节省时间；3）对于陈皮中的有效成分（橙皮苷、川陈皮素、桔皮素），超声提取法提取更彻底。

3.6 方法评价

超声提取法提取橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的提取率均高于索氏提取法，简单便捷。未来研究中将优化时间、投料比、提取温度等条件，完善陈皮的超声提取方法，为陈皮的质量控制提供依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会．中华人民共和国药典（一部）[M]．北京：中国医药科技出版社，2015：191.
[2] FU MQ，XU YJ，CHEN YL，et al. Evaluation of bioactive flavonoids and antioxidant activity in *Pericarpium Citri Reticulatae*（*Citrus reticulata* 'Chachi'）during storage[J]. Food Chemistry，2017，230：649－656.
[3] 李敬芳．陈皮中柠檬苦素的响应面提取及其抗炎作用研究[J]．食品工业，2015，36(5)：163－165.
[4] TESTAI L，MARTELLI A，MARINO A，et al. The activation of mitochondrial BK potassium channels contributes to the protective effects of naringenin against myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Biochem Pharmacol，2013，85(11)：1634－1643.
[5] ZHANG RJ，CHEN J，MAO LZ. et al. Nobiletin Triggers Reactive Oxygen Species－Mediated Pyroptosis through Regulating Autophagy in Ovarian Cancer Cells[J]. J Agric Food Chem，2020，68(5)：1326－1336.
[6] SU DX，LIU HS，QI XY，et al. Citrus peel flavonoids improve lipid metabolism by inhibiting miR－33 and miR－122 expression in HepG2 cells[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry，2019，83(9)：1747－1755.
[7] 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.
[8] GOYAL L，KAUSHAL S. Evaluation of chemical composition and antioxidant potential of essential oil from *Citrus reticulata* fruit peels[J]. Advances in Resesrch，2018，15(2)：1－9.
[9] 杨 洁．陈皮化学成分的研究[D]．长春：吉林大学，2013.
[10] 张 怀，陈明权，农根林，等．新会陈皮质量控制研究[J]．中国医药导报，2019，16(21)：120－124.
[11] XI WP，FANG B，ZHAO QY，et al. Flavonoid composition and antioxidant activities of Chinese local pummelo（*Citrus grandis* Osbeck.）varieties[J]. Food Chemistry，2014，161：230－238.
[12] LIEN LM，WANG MJ，CHEN RJ，et al. Nobiletin，a Polymethoxylated Flavone，Inhibits Glioma Cell Growth and Migration via Arresting Cell Cycle and Suppressing MAPK and Akt Pathways[J]. Phytother Res，2016，30(2)：214－221.
[13] PEREIRA CV，DUARTE M，SILVA P，et al. Polymethoxylated Flavones Target Cancer Stemness and Improve the Antiproliferative Effect of 5－Fluorouracil in a 3D Cell Model of Colorectal Cancer[J]. Nutrients，2019，11(2)：326.
[14] 黄少宏，梁惠明，彭 敏，等．新会陈皮含量测定研究[J]．食品与药品，2016，18(3)：195－198.
[15] 钟永翠，巩 珺，徐家能，等．基于 3 种黄酮类化合物含量比值鉴别广陈皮道地性[J]．药物分析杂志，2017，37(1)：20－29.
[16] 禤雪梅．HPLC 法测定不同产地药材陈皮中橙皮苷的含量[J]．北方药学，2015，12(2)：9－10.
[17] 吴愫青，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)：20－22.
[18] 宋玉鹏，陈海芳，谭舒舒，等．不同陈皮来源药材中橙皮苷、川陈皮素、橘皮素和辛弗林的含量比较[J]．时珍国医国药，2017，28(9)：2061－2064.
[19] 肖建春，陈 帅，袁崇均，等．HPLC 法同时测定陈皮中 4 个黄酮类成分的含量[J]．四川中医，2012，30(7)：55－57.
[20] 罗琥捷，杨宜婷，黄寿根，等．超声提取法与索氏提取法提取陈皮黄酮类有效成分的分析比较[J]．中药材，2016，39(2)：371－374.
[21] DE CASTRO MDL，PRIEGO－CAPOTE F. Soxhlet extraction：Past and present panacea[J]. Journal of Chromatography A，2010，1217(16)：2383－2389.

（收稿日期：2020－04－08）