

基于指纹图谱定性、多指标成分定量与化学计量学的枳壳质量评价

钟民勇¹, 乔日发¹, 罗涛², 杨林¹, 杨武亮¹, 袁金斌^{1*}

(1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 南昌大学第一附属医院, 南昌 330006)

[摘要] 目的:建立枳壳色谱指纹图谱定性、多组分定量与化学计量学的整合分析方法,评价不同产区、不同基原枳壳药材的质量属性与差异。方法:采用COSMOSIL 5C₁₈-MS-II色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2%磷酸水溶液梯度洗脱(0~4 min, 19%A; 4~5 min, 19%~21%A; 5~18 min, 21%A; 18~19 min, 21%~28%A; 19~27 min, 28%A; 27~28 min, 28%~40%A; 28~36 min, 40%A; 36~37 min, 40%~50%A; 37~42 min, 50%~60%A; 42~46 min, 60%~95%A; 46~55 min, 95%~100%A),流速1 mL·min⁻¹,柱温30℃,检测波长320 nm,进样量10 μL。建立不同产地、不同基原枳壳的高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱,结合聚类分析(CA),主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)对26批枳壳进行质量评价。开发并验证了12个组分的含量测定分析方法,并基于样品含量差异对不同产地、不同基原的枳壳进行热图聚类分析。结果:指纹图谱及含量测定的方法学验证均良好,12批枳壳的指纹图谱相似度处于0.85~0.996,标定了20个共有峰,并归属了其中14个色谱峰;定量分析的12个成分分离度、线性关系均良好,加样回收率99.2%~101.0%,RSD均≤2.0%;CA,PCA与OPLS-DA显示,不同产地枳壳的区分度较大,不同品种间也存在差异。结论:基于同一色谱条件的指纹图谱定性分析与多指标成分定量分析操作方便、准确可靠,结合化学计量学手段可实现对不同产地、不同基原枳壳的判别归属与质量分析,可为其整体质量控制和评价提供参考。

[关键词] 枳壳; 质量评价; 高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 产区; 基原

[中图分类号] R22;R28;R931;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0138-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211946 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210923.1753.007.html>

[网络出版日期] 2021-09-24 12:06

Quality Evaluation of Aurantii Fructus Based on Fingerprint Qualitative Analysis, Multi-component Quantitative Analysis and Chemometrics

ZHONG Min-yong¹, QIAO Ri-fa¹, LUO Tao², YANG Lin¹, YANG Wu-liang¹, YUAN Jin-bin^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education,

Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an integrated method of fingerprint qualitative, multi-component quantitative analysis and chemometrics, and to evaluate the quality attributes and differences of Aurantii Fructus from different production areas and origins. **Method:** Analysis was performed on COSMOSIL 5C₁₈-MS-II column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution for gradient elution (0-4 min, 19%A; 4-5 min, 19%-21%A; 5-18 min, 21%A; 18-19 min, 21%-28%A; 19-27 min, 28%A; 27-28 min, 28%-40%A; 28-36 min, 40%A; 36-37 min, 40%-50%A; 37-42 min, 50%-

[收稿日期] 20210726(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860698,81760680)

[第一作者] 钟民勇,在读硕士,从事中药物质基础与质量评价研究,E-mail:zmy1157@163.com

[通信作者] *袁金斌,博士,教授,从事中药物质基础与质量评价研究,Tel:0791-87118658;E-mail:kings2008@163.com

60%A; 42-46 min, 60%-95%A; 46-55 min, 95%-100%A), the flow rate was 1 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C, the detection wavelength was set at 320 nm, and the injection volume was 10 μL. High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of Aurantii Fructus from different production areas and origins were established. Then, the quality of 26 batches of samples was evaluated by cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). A method for the determination of 12 components was developed and verified, and a thermal map-based CA of Aurantii Fructus from different production areas and origins was carried out based on the content difference of samples. **Result:** The fingerprint and determination methods were well verified. The similarity of HPLC fingerprint of 12 batches of Aurantii Fructus was 0.85-0.996, 20 common peaks were calibrated and 14 of them were assigned. The resolution and linear relationship of 12 components in quantitative analysis were good. The recovery rates were 99.2%-101.0% with RSD≤2.0%. The results of CA, PCA and OPLS-DA indicated that the differentiation of Aurantii Fructus in different production areas was great, and there were differences among different cultivars. **Conclusion:** The qualitative analysis of fingerprint and quantitative analysis of multiple indexes based on the same chromatographic analysis conditions are convenient, accurate and reliable, and combined with chemometrics, the identification and quality analysis of Aurantii Fructus from different production areas and origins can be realized, which can provide reference for quality control and evaluation of Aurantii Fructus.

[Keywords] Aurantii Fructus; quality evaluation; high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; production area; origin

枳壳,六大陈药之一,为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* 及其栽培变种的干燥未成熟果实^[1]。据报道,枳壳有调节胃肠、利胆排石和降血脂等药理作用,临床多用于肠胃功能性疾病^[2-3]。枳壳的主要化学成分包括挥发油、黄酮类、香豆素类、生物碱和少量的微量元素^[4-6]。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)以柚皮苷和新橙皮苷的含量作为枳壳的质量控制指标^[1]。柠檬烯是枳壳挥发油的主要成分,早期被认为是枳壳燥性的主要来源,而郑莹等^[3]发现该成分也是枳壳促胃肠动力作用的药效成分之一。同时,挥发油^[3]、多甲氧基黄酮^[5]和黄酮类^[6]被认为是枳壳促胃肠动力作用的活性物质。许姗姗等^[7]在文献分析基础上,预测橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、辛弗林等可作为枳壳的质量标志物。本课题组前期研究表明芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷等既是枳壳理气的质量标志物,也是枳壳燥性的质量标志物,提示枳壳理气功效可能是多成分的整体作用结果,且其功效的强弱可能还跟这些化合物的含量及配比有关^[5,8-9]。因此,有必要重新梳理与枳壳功效相关的质量控制指标,以提升其质量标准。

现有枳壳质量控制的研究手段较为单一^[10-14],很难全面评价其质量。近年来,指纹图谱定性结合多指标定量的分析方法为中药质量评价提供了有

益探索^[15-18],为中药质量快速准确的评价提供了良好途径。因此,为了辨别不同产地、不同基原的枳壳药材是否存在差异,发掘更多的枳壳质量评价指标,以便更全面地评价其质量,本实验拟对不同产地、不同基原枳壳进行系统研究,建立基于同一色谱条件的质量标志物指纹图谱和多指标成分含量测定方法,从定性和定量2个方面进行有效评价,以期为枳壳的整体质量评价提供借鉴。

1 材料

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),AE240型1/10万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),BT25S型1/1万电子天平(德国赛多利斯公司),PS-80A型超声波清洗机(东莞市洁康超声波设备有限公司)。对照品新北美圣草苷(批号DST-190710-095),伞形花内酯(批号DST-170526-066),芸香柚皮苷(批号DST-180325-098),柚皮苷(批号DST-180601-099),橙皮苷(批号DST-180619-038),新橙皮苷(批号DST-170714-039),水合橙皮内酯(批号DST-190408-147),橙皮内酯(批号DST-190408-146),川陈皮素(批号DST-170607-037),橘皮素(批号DST-170712-004),橙皮油素(批号DST-190607-098)购自成都德思特生物科技有限公司,纯度均≥98%,马尔敏[实验室自制^[9]],经高效液相色谱法(HPLC)检测,纯度>98%,水为娃哈哈纯净水,

乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。枳壳药材来自江西、湖南、四川、浙江、重庆等地,经江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室杨武亮教授鉴定为芸香科植物酸橙 *C. aurantium* 的栽培变种的干燥未成熟果实,具体信息见表1。所有药材进行润湿、切片、烘干(60℃)和粉碎处理。

表1 26批枳壳药材的产地信息

Table 1 Origin information of 26 batches of *Aurantii Fructus*

编号	产地	采集时间	基原植物	编号	产地	采集时间	基原植物
S1	江西樟树	2018-07	香橙	S14	湖南沅江	2018-07	香橙
S2	江西新干	2018-07	柚子橙	S15	湖南怀化	2018-07	香橙
S3	江西樟树	2018-07	柚子橙	S16	湖南沅江	2018-08	柚子橙
S4	江西新干	2018-07	柚子橙	S17	四川安岳	2018-08	香橙
S5	江西樟树	2018-07	臭橙	S18	四川眉山	2018-08	臭橙
S6	江西新干	2018-07	臭橙	S19	四川宜宾	2018-08	香橙
S7	江西宜春	2018-07	香橙	S20	四川眉山	2018-08	臭橙
S8	江西宜春	2018-07	臭橙	S21	重庆綦江	2018-07	臭橙
S9	江西宜春	2018-11	臭橙	S22	重庆綦江	2018-07	香橙
S10	湖南沅江	2018-07	臭橙	S23	重庆江津	2018-07	柚子橙
S11	湖南沅江	2018-07	臭橙	S24	浙江金华	2018-07	臭橙
S12	湖南沅江	2008-07	臭橙	S25	浙江金华	2018-07	臭橙
S13	湖南汉寿	2008-07	臭橙	S26	浙江金华	2018-07	香橙

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 分别称取各对照品适量,精密称定,分别置于量瓶中配制成母液;分别精密吸取上述各母液适量,配制成新北美圣草苷、伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、橙皮内酯、川陈皮素、橘皮素、橙皮油素的质量浓度分别为24.2, 6.12, 18.6, 688.8, 43.2, 560, 28.8, 13.6, 41.6, 21.1, 8.80, 22.4 mg·L⁻¹的混合对照品溶液,摇匀,备用。

2.1.2 供试品溶液 称取枳壳样品粉末(过三号筛,下同)约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,静置1 h,超声处理30 min(功率480 W,频率40 kHz),4 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径9.5 cm),取上清液;药渣重复提取1次,合并上清液,加甲醇定容至50 mL量瓶中,摇匀,临用前过0.22 μm微孔滤膜,即得。

2.2 色谱条件 COSMOSIL 5C₁₈-MS- II 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相选择乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~4 min, 19%A; 4~

5 min, 19%~21%A; 5~18 min, 21%A; 18~19 min, 21%~28%A; 19~27 min, 28%A; 27~28 min, 28%~40%A; 28~36 min, 40%A; 36~37 min, 40%~50%A; 37~42 min, 50%~60%A; 42~46 min, 60%~95%A; 46~55 min, 95%~100%A),进样量设定10 μL,柱温30℃,流速1 mL·min⁻¹,检测波长320 nm。

2.3 HPLC指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 取样品S1适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.2项下色谱条件连续进样6次,以6号峰(柚皮苷)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积的RSD均<3.0%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取样品S1适量,平行6份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.2项下色谱条件测定,以6号峰(柚皮苷)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积的RSD均<3.0%,表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取样品S1适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0, 2, 4, 8, 12, 24 h按2.2项下色谱条件测定,以6号峰(柚皮苷)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积的RSD均<3.0%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.4 相似度评价 取26批不同产地的枳壳样品适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.2项下条件测定,得HPLC色谱图,选择S1~S3, S10~S12, S17~S19和S24~S26这12批枳壳药材的HPLC色谱图,将其数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版),设定S1为参照色谱图,选取时间窗宽度0.2 min,通过平均数法生成指纹图谱,运用多点校正方法对色谱峰进行匹配,计算相似度。结果12批样品与其对照图谱的相似度均≥0.85,见表2,共标记了20个共有峰,见图1。基于前期研究情况^[5,19-20],归属了14个共有峰,分别为3号峰(新北美圣草苷),4号峰(伞形花内酯),5号峰(芸香柚皮苷),6号峰(柚皮苷),7号峰(橙皮苷),9号峰(新橙皮苷),10号峰(水合橙皮内酯),11号峰(枸橼苷),12号峰(马尔敏),14号峰(橙皮内酯),16号峰(川陈皮素),18号峰(3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮),19号峰(橘皮素)和20号峰(橙皮油素)。

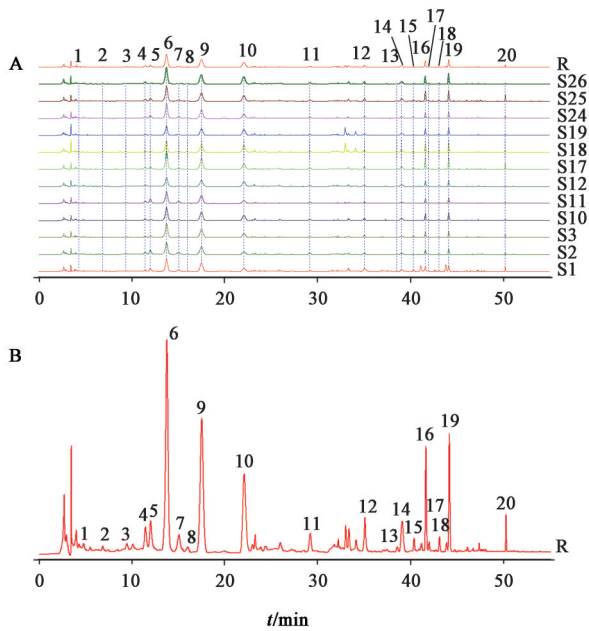
2.4 基于化学计量学的枳壳质量分析

2.4.1 聚类分析(CA)^[4,14,16] 将26批枳壳样品的20个共有峰的峰面积导入SPSS 21.0,采用组间连接系统聚类法,测量区间为平方欧氏距离,见图2。

表2 12批不同产地枳壳的相似度评价

Table 2 Similarity evaluation of 12 batches of Aurantii Fructus from different production areas

样品	S1	S2	S3	S10	S11	S12	S17	S18	S19	S24	S25	S26	对照指纹图谱
S1	1.000	0.982	0.983	0.943	0.975	0.983	0.987	0.983	0.979	0.984	0.965	0.951	0.994
S2	0.982	1.000	0.976	0.900	0.977	0.968	0.992	0.968	0.942	0.953	0.973	0.973	0.987
S3	0.983	0.976	1.000	0.914	0.993	0.989	0.979	0.983	0.947	0.959	0.986	0.962	0.993
S10	0.943	0.900	0.914	1.000	0.891	0.943	0.914	0.945	0.951	0.975	0.873	0.850	0.935
S11	0.975	0.977	0.993	0.891	1.000	0.988	0.977	0.985	0.930	0.938	0.995	0.972	0.990
S12	0.983	0.968	0.989	0.943	0.988	1.000	0.976	0.996	0.956	0.965	0.977	0.955	0.993
S17	0.987	0.992	0.979	0.914	0.977	0.976	1.000	0.974	0.948	0.960	0.972	0.978	0.992
S18	0.983	0.968	0.983	0.945	0.985	0.996	0.974	1.000	0.955	0.963	0.977	0.950	0.992
S19	0.979	0.942	0.947	0.951	0.930	0.956	0.948	0.955	1.000	0.984	0.907	0.882	0.961
S24	0.984	0.953	0.959	0.975	0.938	0.965	0.960	0.963	0.984	1.000	0.920	0.900	0.972
S25	0.965	0.973	0.986	0.873	0.995	0.977	0.972	0.977	0.907	0.920	1.000	0.980	0.984
S26	0.951	0.973	0.962	0.850	0.972	0.955	0.978	0.950	0.882	0.900	0.980	1.000	0.971
对照指纹图谱	0.994	0.987	0.993	0.935	0.990	0.993	0.992	0.992	0.961	0.972	0.984	0.971	1.000



R. 对照指纹图谱

图1 12批枳壳的HPLC指纹谱(A)与对照指纹谱(B)

Fig. 1 HPLC fingerprint (A) and reference fingerprint (B) of 12 batches of Aurantii Fructus

结果发现当平方欧氏距离为25时,26批样品可大致聚为两类,其中产自江西的9批样品(S1~S9)聚为一大类,其余17批枳壳药材(S10~S26)聚为一大类。在产自江西的这一大类中,基原植物为香橙的S1和S7聚为一类,基原植物为柚子橙的S2~S4聚为一类,基原植物为臭橙的S5,S6,S8和S9聚为一类。在另外的一大类中,产自湖南的枳壳(S10~S16)聚为一类,其中的基原植物为臭橙的S10~S13聚为一小类,基原植物为香橙的S14和S15聚为一小类,基

原植物为柚子橙的S16单独聚为一小类。产自四川和重庆的S17~S23聚为一类,其中基原植物为香橙的S17,S19和S22聚为一小类,基原植物为臭橙的S18,S20和S21聚为一小类,基原植物为柚子橙的S23单独聚为一小类。产自浙江的基原植物为臭橙的S24和S25聚为一小类,基原植物为香橙的S26单独成一小类。说明不同产地的枳壳之间存在一定差异;相同产地、不同基原植物的枳壳之间也存在差异。

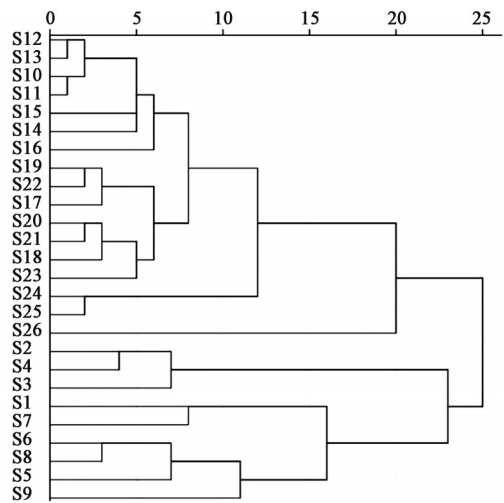


图2 26批枳壳的CA

Fig. 2 CA of 26 batches of Aurantii Fructus

2.4.2 主成分分析(PCA)^[4,9,15] 将26批枳壳样品中20个共有峰的峰面积导入SIMCA 14.1进行PCA处理,结果前4个主成分的累计贡献率83.6%,说明所提取的4个主成分能代表枳壳指纹图谱中20个

共有峰信息,从而反映枳壳药材质量情况,见图3。结果发现PCA结果与CA结果基本一致,进一步验证了前4个主成分可以代表这26批枳壳药材的整体质量情况,且表明不同产地枳壳间存在差异,相同产地、不同基原的枳壳之间也存在差异。

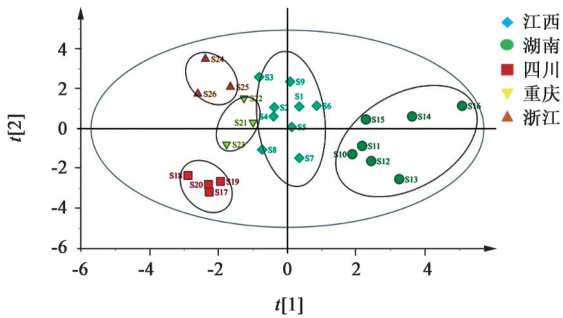


图3 26批枳壳样品的PCA得分

Fig. 3 PCA score of 26 batches of Aurantii Fructus

2.4.3 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)处理 为进一步寻找不同产地枳壳间产生差异的标志物,对26批枳壳样品进行OPLS-DA处理。将共有峰峰面积导入SIMCA 14.1,获得相应OPLS-DA模型,见图4。结果与CA,PCA基本一致,进一步验证了分析结果的可靠性。变量重要性投影(VIP)值是筛选差异性化合物的重要指标,VIP值越高,对组间差异的影响越大。以VIP值>1为阈值,筛选出了7个成分,见图5,按VIP值大小排序依次为9号峰(新橙皮苷)>6号峰(柚皮苷)>10号峰(水合橙皮内酯)>19号峰(橘皮素)>16号峰(川陈皮素)>5号峰(芸香柚皮苷)>7号峰(橙皮苷),提示这7个共有峰是引起不同产地枳壳之间差异的主要变量。

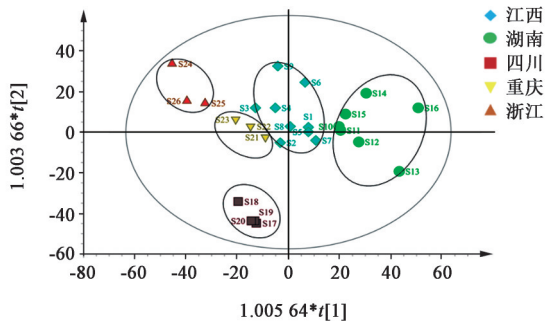


图4 26批枳壳样品的OPLS-DA得分矩阵

Fig. 4 OPLS-DA score matrix of 26 batches of Aurantii Fructus

2.5 多指标成分的含量测定^[5]

2.5.1 色谱条件 同2.2项。

2.5.2 专属性考察 精密吸取2.1项下混合对照品溶液及供试品溶液适量,按2.2项下色谱条件测定,记录色谱图,见图6。结果发现各化合物均能达到

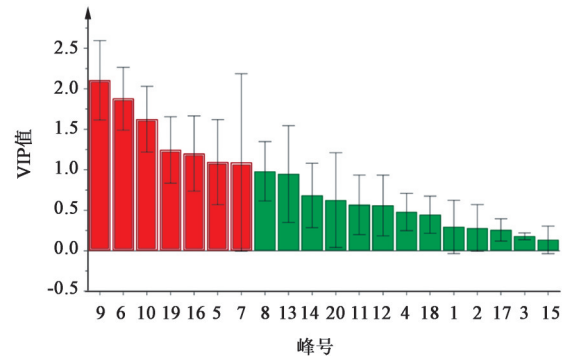
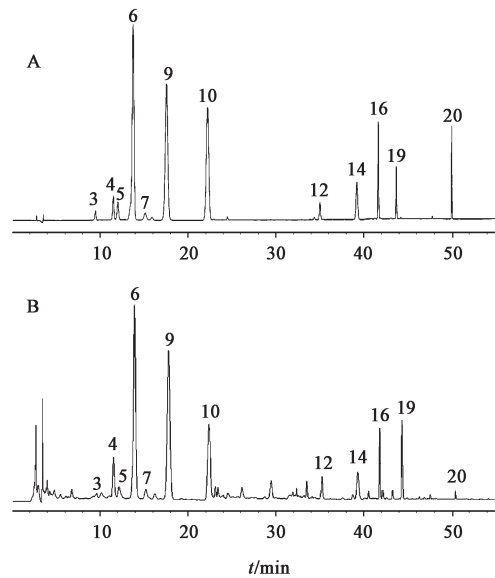


图5 枳壳样品中各成分的VIP值

Fig. 5 VIP values of components in Aurantii Fructus samples

良好的分离,分离度均>1.5。



A. 混合对照品;B. 供试品;3. 新北美圣草苷;4. 伞形花内酯;5. 芸香柚皮苷;6. 柚皮苷;7. 橙皮苷;9. 新橙皮苷;10. 水合橙皮内酯;12. 马尔敏;14. 橙皮内酯;16. 川陈皮素;19. 橘皮素;20. 橙皮油素(图7同)

图6 枳壳样品的HPLC

Fig. 6 HPLC chromatograms of Aurantii Fructus

2.5.3 线性关系考察 精密吸取2.1.1项下混合对照品溶液5 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,依次加甲醇稀释,得6个水平的系列混合对照品溶液,按2.2项下条件测定。以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归分析,得回归方程、相关系数及线性范围,见表3。

2.5.4 精密度试验 取2.1.1项下混合对照品溶液,按2.2项下条件连续进样6次,计算新北美圣草苷、伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、橙皮内酯、川陈皮素、橘皮素和橙皮油素峰面积的RSD分别为2.9%,2.5%,2.1%,1.4%,1.3%,1.0%,0.7%,0.7%,0.7%,0.6%,

表3 枳壳中12个指标成分含量测定的线性参数

Table 3 Linear parameters of 12 components in Aurantii Fructus

化合物	回归方程	R ²	线性范围/mg·L ⁻¹
新北美圣草苷	Y=2.357 3X+8.671 4	0.999 5	0.756~24.2
伞形花内酯	Y=64.874 1X+1.792 2	0.999 4	0.191~6.12
芸香柚皮苷	Y=6.950 6X+2.659 6	0.999 1	0.581~18.6
柚皮苷	Y=2.938 7X+15.245 6	0.999 6	21.5~688.8
橙皮苷	Y=3.041 6X+1.667 0	0.999 6	1.35~43.2
新橙皮苷	Y=3.442 6X+10.242 4	0.999 7	17.5~560
水合橙皮内酯	Y=34.386 6X-1.343 7	0.999 8	0.900~28.8
马尔敏	Y=43.560 5X-1.484 9	0.999 9	0.425~13.6
橙皮内酯	Y=14.402 6X-1.837 4	0.999 9	1.30~41.6
川陈皮素	Y=22.640 4X-1.199 5	0.999 9	0.659~21.1
橘皮素	Y=49.837 8X+6.656 7	0.999 4	0.275~8.80
橙皮油素	Y=14.441 2X-8.402 6	0.999 9	0.700~22.4

0.6%, 2.2%, 表明仪器精密度良好。

2.5.5 重复性试验 取样品S1适量, 平行6份, 按2.1.2项下方法制备供试品溶液, 按2.2项下条件测定, 计算新北美圣草苷、伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、橙皮内酯、川陈皮素、橘皮素和橙皮油素平均质量分数分别为8.453, 0.412, 1.335, 57.01, 3.389, 51.03, 2.806, 0.388, 1.297, 2.425, 0.753, 0.247 mg·g⁻¹, RSD分别2.5%, 1.3%, 2.2%, 0.6%, 0.8%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.4%, 0.6%, 1.0%, 2.2%, 表明该方法重复性良好。

2.5.6 稳定性试验 称取样品S1适量, 按2.1.2项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后0, 2, 4, 8, 12, 24 h按2.2项下条件测定, 计算新北美圣草苷、伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、橙皮内酯、川陈皮素、橘皮素和橙皮油素峰面积的RSD分别2.4%, 0.8%, 1.1%, 0.5%, 1.8%, 0.8%, 0.7%, 0.8%, 0.6%, 0.5%, 0.5%, 1.7%, 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.5.7 加样回收试验 称取样品S1共6份, 每份约0.25 g, 精密称定, 分别按已知指标成分含量的100%加入新北美圣草苷、伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、橙皮内酯、川陈皮素、橘皮素、橙皮油素混合对照品溶液, 按2.1.2项下方法制备供试品溶液, 按2.2项下条件测定, 计算上述各成分的平均加样回收率分别为101.00%, 100.79%, 99.53%, 99.99%, 100.21%, 100.77%, 99.96%, 100.04%, 100.15%,

100.91%, 99.21%, 100.16%, RSD分别为1.6%, 1.7%, 1.9%, 0.9%, 1.4%, 1.3%, 1.5%, 1.6%, 1.6%, 2.0%, 1.5%, 1.8%。

2.5.8 检测限及定量限 精密吸取2.1.1项下混合对照品溶液适量, 逐级稀释, 按2.2项下色谱条件测定, 以信噪比(S/N)=3作为检测限, S/N=10作为定量限, 得新北美圣草苷、伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、橙皮内酯、川陈皮素、橘皮素和橙皮油素的检测限分别为0.101, 0.010 5, 0.049 2, 0.089 7, 0.094 8, 0.097 2, 0.015 2, 0.012 4, 0.063 6, 0.021 7, 0.013 2, 0.058 8 mg·L⁻¹; 定量限分别为0.336, 0.034 9, 0.164, 0.299, 0.316, 0.324, 0.050 8, 0.041 2, 0.212, 0.072 3, 0.044 1, 0.196 mg·L⁻¹。

2.5.9 样品测定 取26批枳壳样品粉末, 按2.1.2项下方法制备供试品溶液, 按2.2项下条件测定, 计算12个成分的含量, 见增强出版附加材料; 同时, 以各成分含量生成聚类热图, 见图7。结果发现26批样品中新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、川陈皮素的含量差异较大, 这与OPLS-DA筛选出的7个差异性成分基本一致。相同产地、相同基原、不同采收时间的样品S11和S12, 新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量差异较大, 且S12均较S11高, 这种差异可能与药材的储藏时间有关。

3 讨论

枳壳是一种多基原、多产地的中药, 不同基原与产地的枳壳存在化学成分差异, 进而药效作用可能也有所区别。枳壳药材在市场的流通甚广, 主要来源四大产地, 江西的江枳壳作为地道药材、四川和重庆的川枳壳作为主流品种、湖南的湘枳壳作为大宗药材、浙江和江苏的浙产枳壳在市场上也较为常见。此外, 枳壳药材质量与地理环境、采收时间和栽培品种等因素密切相关。因此, 有效区分枳壳的基原、产地及活性成分差异是枳壳质量评价的关键环节。对于多基原的中药材, 有必要应用新技术结合传统鉴别方法, 因为只有建立全面、可行的质量标准, 明确不同产地、不同基原药材之间的差异, 才能更好地发挥药材的药效价值。本课题组多年来收集了不同基原、产区、采收期的枳壳样品220多个, 经系统分析, 发现表1的26批样品能较好地代表所收集的所有样品。为简化分析结果及相关表述, 本文仅提供了上述26个样品的分析结果。

本课题组前期优选出了枳壳的12个有效成分,

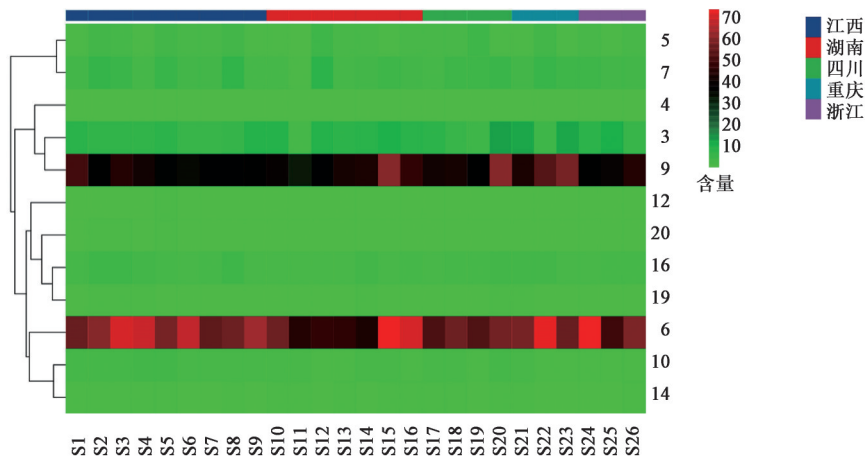


图7 26批枳壳12个成分含量的聚类热分析

Fig. 7 Cluster thermal analysis of 12 components of 26 batches of Aurantii Fructus

并进行了PCA与判别分析,以探讨其道地性成因^[9],后续实验发现新北美圣草苷、枸橼苷和伞形花内酯系其重要的理气质量标志物(Q-marker)^[5],因此,对含量测定指标性成分做了进一步调整。在含量测定实验中选择了枳壳的12个理气Q-marker(新北美圣草苷、伞形花内酯、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、橙皮内酯、川陈皮素、橘皮素和橙皮油素)为评价指标。为实现良好的色谱分离,笔者系统优化了分析流程与影响因素,包括样品制备、流动相组成、洗脱梯度及检测条件等。结果显示,以甲醇为提取溶剂,浸泡1h,超声提取2次,每次30min时,各个化合物均有较好的提取效率。本研究对乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液和乙腈-0.2%磷酸水溶液等流动相体系进行考察,结果以乙腈-0.2%磷酸水溶液体系得到的色谱峰峰形及分离度较好。根据全波长(190~400nm)扫描结果,发现320nm波长下的色谱峰信息较多,分离情况良好。考察了不同柱温、不同流速等条件对色谱分离的影响,结果表明柱温30℃,流速设定1mL·min⁻¹时,色谱分离结果较优。基于优化的色谱条件,筛选了12批枳壳药材建立了特征HPLC指纹图谱。指纹图谱相似度评价结果显示,各产地枳壳药材相似度较高,不足以辨别各个产地的枳壳药材是否存在差异。继而采用CA,PCA和OPLS-DA等化学计量学方法充分挖掘枳壳药材的化学成分、产地与品种等信息,结果表明相同产地的枳壳自动聚为一类,同时筛选得到7个差异性成分;这3种化学计量学分析得到的结果互为补充、互为验证。

含量测定结果表明,26批药材均符合2020年版《中国药典》枳壳含量测定项下的要求,均为合格药材。另一方面,部分样品间的含测结果差异较大,

以柚皮苷和新橙皮苷质量分数为例,二者最低值分别为44.92, 32.24 mg·g⁻¹,最高值则依次为74.83, 61.64 mg·g⁻¹,含量差异接近两倍。因此,对中药而言,仅以1~2个化学成分指标去评价药材的质量属性是不够的,建立更加科学和完善的中药质量评价体系至关重要。本文研究结果还提示,单纯的指纹图谱相似度评价很难适应多基原、多产地药材的评价,需进一步的统计分析以获取更丰富的药材信息,进而对其作出更全面的质量评价。本文研究结果表明,枳壳作为栽培的大宗药材,其基原容易确定,同一产区各基原枳壳的质量差异不大;产地、气候等因素对药材质量的影响更大,如湘枳壳、川枳壳多是从江西引种,但二者与江枳壳的差异已比较明显。在操作模式上,本文采用了统一的色谱条件,实现了指纹图谱定性与多指标定量的同时分析,简单可行。在研究思路,本文借鉴了中药质量标志物的研究成果^[21-24],在指纹图谱研究基础上,纳入了更多能反映中药整体质量属性的指标,再结合化学计量学方法充分挖掘药材质量信息,可以更全面地评价药材质量。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 中国医药科技出版社, 2020: 246.
- [2] 李陈雪, 杨玉赫, 冷德生, 等. 枳壳化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(2): 158-161.
- [3] 郑莹, 王帅, 孟宪生, 等. 中药枳壳挥发油成分气相色谱-质谱联用分析和促进胃肠动力药效研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 516-518.
- [4] LI P, ZENG S L, DUAN L, et al. Comparison of

- Aurantii Fructus Immaturus and Aurantii Fructus based on multiple chromatographic analysis and chemometrics methods [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1469:96-107.
- [5] QIAO R F, ZHOU L F, ZHONG M Y, et al. Spectrum-effect relationship between UHPLC-Q-TOF/MS fingerprint and promoting gastrointestinal motility activity of Aurantii Fructus based on multivariate statistical analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114366.
- [6] HE Y, LI Z, WANG W, et al. Chemical profiles and simultaneous quantification of Aurantii Fructus by use of HPLC-Q-TOF-MS combined with GC-MS and HPLC methods[J]. *Molecules*, 2018, 23(9):2189.
- [7] 许姗姗, 许凌, 张笑敏, 等. 常用中药陈皮、枳实和枳壳的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. *中草药*, 2018, 49(1):35-44.
- [8] 祝婧, 钟凌云, 叶喜德, 等. 枳壳不同炮制品的燥性比较及其对功能性消化不良大鼠胃肠功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(22):20-26.
- [9] 陈欢, 高萌, 罗小泉, 等. 不同产地枳壳药材中12种有效成分的主成分分析和判别分析[J]. *中草药*, 2019, 50(14):3433-3437.
- [10] 陈向东, 李荣, 孙冬梅, 等. 麸炒枳壳配方颗粒HPLC指纹图谱[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(3): 100-103.
- [11] 关海燕, 杜晓娜, 张婷, 等. HPLC指纹图谱法鉴别四磨汤中枳壳药材的产地[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(6):1388-1390.
- [12] ZHOU D, XU Q, XUE X, et al. Rapid qualitative and quantitative analyses of flavanone aglycones in Aurantii Fructus by HPLC ion-trap MS[J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(6):858-867.
- [13] CHEN H F, ZHANG W G, YUAN J B, et al. Simultaneous quantification of polymethoxylated flavones and coumarins in Aurantii Fructus and Aurantii Fructus Immaturus using HPLC-ESI-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 59:90-95.
- [14] 胡源祥, 陈海芳, 宋玉鹏, 等. HPLC法测定酸橙枳壳和枸橼枳壳中黄酮苷的含量[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(12):2162-2166.
- [15] 樊小瑞, 刘梓晗, 冯伟红, 等. 基于UPLC技术的吴茱萸定性定量一体化研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(20):3945-3956.
- [16] 刘雅莉, 邓桂珠, 贤明华, 等. 枳壳炮制前后指纹图谱及主要黄酮类成分含量的变化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(2):113-118.
- [17] 黄涛, 刘丽, 张笑敏, 等. 夏天无HPLC指纹图谱及多指标含量测定研究[J]. *中草药*, 2019, 50(10):2474-2479.
- [18] 吴安, 张誉晴, 赵志峰, 等. 经典名方枇杷清肺饮的UPLC指纹图谱及多指标成分含量分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(14):12-20.
- [19] 魏飞亭, 程昊, 乔日发, 等. UPLC-Q-TOF/MS鉴定大鼠灌服枳壳提取物后的入血成分及其代谢产物[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(21):161-172.
- [20] 魏飞亭. 枳壳的成分分析与多组分药动学研究[D]. 南昌:江西中医药大学, 2020.
- [21] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J]. *中草药*, 2016, 47(9):1443-1457.
- [22] 杜茂波, 李涛, 沈硕, 等. 黄连汤的定性“制剂质量标志物”筛选[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(4): 101-109.
- [23] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法[J]. *药学报*, 2019, 54(2): 186-196.
- [24] 马建超, 郭庆梅. 基于药物动力学和多元统计方法解析瓜蒌祛痰止咳相关质量标志物[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(19):132-140.

[责任编辑 刘德文]