

不同栽培品种枳壳HPLC指纹图谱研究

罗光明, 陈 岩, 李 霞, 杨雅琴, 张晓云, 谭小辉, 杨世林^{*}
(江西中医学院, 江西 南昌 330004)

摘要: 目的 采用HPLC法建立江西枳壳药材指纹图谱。方法 Eclipse XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%磷酸水, 采用梯度洗脱, 以1.0 mL/min的体积流量于320 nm波长处进行检测。结果 通过对江西省道地产区10批酸橙及香橙枳壳指纹图谱的分析, 共检出13个分离度良好的共有峰; 并进行了不同品种枳壳指纹图谱的分析。结论 本方法可以用于枳壳药材质量控制, 还可以作为研究枳壳种质资源的有效手段。

关键词: 枳壳; 指纹图谱; 质量控制; 种质资源

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)03-0430-03

Fingerprint for different cultural species of *Fructus Aurantii* by HPLC

LUO Guang-ming, CHEN Yan, LI Xia, YANG Ya-qin, ZHANG Xiao-yun,
TAN Xiao-hui, YANG Shi-lin

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: Objective To set up the fingerprint for *Fructus Aurantii* in Jiangxi Province by using HPLC. **Methods** The chromatographic separation was performed on an Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Agilent) with a mobile phase consisting of methanol-water-phosphoric acid as gradient eluent at the flow rate of 1.0 mL/min. The UV detection wavelength was set at 320 nm. **Results** By the determination of the ten batches of *C. aurantium* 'Xiucheng' and *C. aurantium* 'Xiangcheng' in authentic regions of Jiangxi Province, thirteen common peaks were detected. And fingerprint analysis of different species was carried out. **Conclusion** This method can provide a scientific basis for the quality control of *Fructus Aurantii* and be a powerful mean of germplasm resources.

Key words: *Fructus Aurantii*; fingerprint; quality control; germplasm resources

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实^[1]。具有行气宽中、消食、化痰等功能, 用于胸脘满闷胀痛、食积不化、痰饮、胃下垂、脱肛、子宫脱垂^[2]。枳壳主产于湖南、四川、江西3省, 在江西有千年栽培历史。江西樟树市、新干县等地为传统的枳壳道地产区, 目前主要栽培品种有臭橙、香橙, 另有勒橙、鸡子橙及柚子橙等。枳壳来源复杂, 为控制和保证产品质量的稳定性, 笔者依据国家药品监督管理局颁布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》, 对江西省道地产区10批酸橙的不同栽培变种进行了指纹图谱测定和相似度分析, 实验结果可为更好地控制枳壳药材质量及进行种质资源评价提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器和材料: Agilent 1200 高效液相色谱仪(紫外检测器, 四元梯度泵): Eclipse XDB-C₁₈ 柱

(250 mm×4.6 mm, 5 μm); BP211D 电子天平(Sartorius, 万分之一); 柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所, 110722-200309); 乙腈为色谱纯(TEDIA 公司); 其余试剂为分析纯; 水为高纯水。

1.2 样品来源: 样品采集于江西樟树、丰城、新干, 经江西省林业科学院朱培林研究员鉴定分别为酸橙种子栽培变种臭橙、香橙、鸡子橙、柚子橙、勒橙, 见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为甲醇, B 为 0.1% 磷酸水溶液(A+B=100%); 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 320 nm; 进样量 10 μL。线性梯度洗脱时间程序为: 开始时 70% B, 25 min 时 50% B, 35 min 时 30% B, 40 min 时 25% B, 55 min 时 0% B, 保留 5 min。

* 收稿日期: 2007-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30460156); 国家“十五”攻关项目(2004BA721A 23); 江西省自然科学基金资助项目(340025)

作者简介: 罗光明(1958—), 男, 教授, 从事药用植物分类、资源保护和再生及药用植物引种栽培研究。Tel: (0791) 7118982

表1 枳壳样品来源

Table 1 Resources of *Fructus Aurantii* samples

编号	采集地点	来源
1	江西省新干县荷蒲乡	臭橙 <i>C. aurantium</i> 'Xiucheng'
2	江西省新干县三湖镇	臭橙
3	江西省樟树市黄土岗	臭橙
4	江西省新干县城	臭橙
5	江西省新干县沂江乡	臭橙
6	江西省新干县荷蒲乡	香橙 <i>C. aurantium</i> 'Xiangcheng'
7	江西省新干县三湖镇	香橙
8	江西省樟树市黄土岗	香橙
9	江西省新干县城	香橙
10	江西省新干县沂江乡	香橙
11	江西省丰城市铁路乡	勒橙 <i>C. aurantium</i> 'Lecheng'
12	江西省樟树市黄土岗	鸡子橙 <i>C. aurantium</i> 'Jizicheng'
13	江西省樟树市黄土岗	柚子橙 <i>C. aurantium</i> 'Youzicheng'

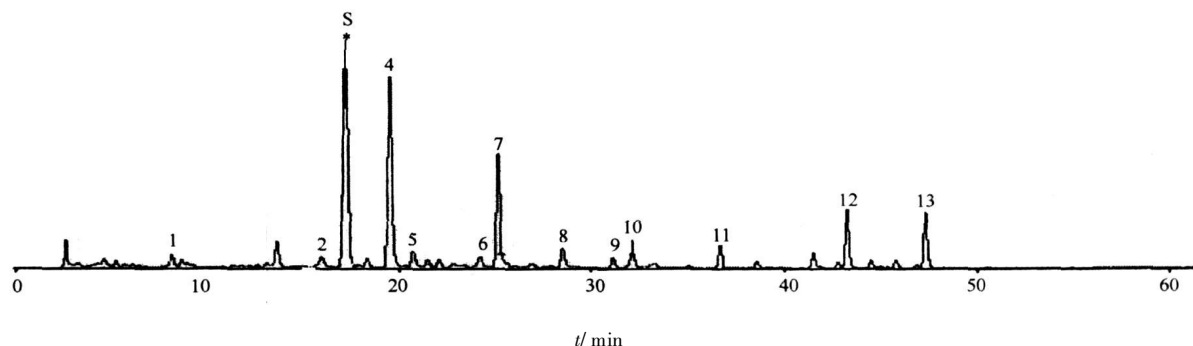


图1 臭橙(样品1)指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of *C. aurantium* 'Xiucheng' (sample No. 1)

共有峰的相对保留时间及峰面积比值进行考察,结果各共有峰相对保留时间RSD小于0.23%,峰面积比值RSD小于2.5%,符合特定(指纹)图谱分析要求。

2.5.2 重现性试验:精密称取5号枳壳药材5份,按“2.3”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析。分别对共有峰的相对保留时间及峰面积比值进行考察,结果各共有峰相对保留时间RSD小于0.19%,峰面积比值RSD小于2.8%,符合特定(指纹)图谱分析要求。

2.5.3 稳定性试验:精密称取5号枳壳药材,按“2.3”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别在1、4、8、12、24 h进样分析。分别对共有峰的相对保留时间及峰面积比值进行考察,结果各共有峰相对保留时间RSD小于0.9%,峰面积比值RSD小于2.1%,表明供试品在48 h内稳定,符合特定(指纹)图谱分析要求。

2.6 指纹图谱相似性评价

2.6.1 共有峰的标定:按“2.1”项下色谱条件分别将1~10号供试品进样分析,记录色谱图,确定共有

2.2 对照品溶液的制备:取真空干燥至恒重的柚皮苷适量,精密称量,加甲醇溶解制成2.06 mg/mL的对照品溶液,0.45 μm滤膜滤过,即得。

2.3 供试品溶液的制备:称取样品粉末(过2号筛)0.5 g,加甲醇25 mL,超声提取40 min,滤过,取5 mL滤液,定容至10 mL,0.45 μm滤膜滤过,即得。

2.4 指纹图谱测定时间的确定及测定:吸取样品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件,记录60 min色谱图,见图1。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验:取5号枳壳药材,制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样5次。分别对

峰13个。其中S峰为柚皮苷的峰,质量分数最高且比较稳定,将其作为参比峰,计算其他各峰的相对保留时间、相对峰面积,结果见表2、3。不同产地10批臭橙、香橙共有指纹峰的相对保留时间为峰1(7.125)、2(13.873)、3(14.931)、4(16.932)、5(17.990)、6(20.996)、7(21.822)、8(24.769)、9(27.041)、10(27.916)、11(31.895)、12(37.599)、13(41.140)。

2.6.2 相似度计算:利用中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统A版”,将1~10批次枳壳药材图谱数据导入,经多点校正和数据匹配,以中位数法生成对照指纹图谱。10批次枳壳药材的相似度分别是0.992、0.990、0.993、0.982、0.986、0.994、0.981、0.993、0.990、0.996,见图2。

2.6.3 不同品种枳壳之间的相似度比较:按“2.1”项下色谱条件分别将11~14号供试品进样分析,记录色谱图。利用中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统B版”,将1~10批次臭橙及香橙枳壳药材图谱生成的对照图谱导入,再将不同品种的枳壳药材图谱数据分别导入,勒橙、鸡子橙、柚子橙与对照图谱的相似度分别是0.937、0.876、0.827。

表 2 各样品共有峰相对保留时间

样品编号	相对保留时间												
	1	2	3(s)	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.477	0.930	1.000	1.133	1.204	1.405	1.460	1.657	1.808	1.867	2.132	2.512	2.748
2	0.480	0.930	1.000	1.136	1.207	1.413	1.464	1.663	1.815	1.874	2.142	2.526	2.764
3	0.478	0.929	1.000	1.134	1.205	1.405	1.460	1.657	1.809	1.867	2.133	2.513	2.749
4	0.478	0.933	1.000	1.134	1.205	1.407	1.462	1.663	1.813	1.872	2.140	2.523	2.761
5	0.478	0.930	1.000	1.135	1.207	1.408	1.462	1.661	1.813	1.870	2.135	2.519	2.750
6	0.477	0.930	1.000	1.134	1.205	1.405	1.460	1.657	1.809	1.867	2.133	2.512	2.743
7	0.477	0.929	1.000	1.109	1.204	1.404	1.459	1.655	1.807	1.865	2.132	2.510	2.741
8	0.475	1.331	1.000	1.134	1.208	1.405	1.460	1.657	1.808	1.868	2.134	2.516	2.752
9	0.476	0.930	1.000	1.134	1.206	1.406	1.463	1.663	1.814	1.873	2.139	2.523	2.761
10	0.477	0.928	1.000	1.133	1.206	1.406	1.463	1.660	1.813	1.872	2.140	2.523	2.761

表 3 各样品共有峰相对峰面积

样品编号	相对峰面积												
	1	2	3(s)	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.037	0.034	1.000	0.702	0.059	0.034	0.376	0.070	0.033	0.082	0.062	0.182	0.182
2	0.042	0.041	1.000	0.454	0.040	0.029	0.330	0.045	0.030	0.133	0.122	0.120	0.120
3	0.073	0.046	1.000	0.825	0.095	0.077	0.641	0.092	0.089	0.115	0.119	0.252	0.203
4	0.098	0.075	1.000	0.905	0.109	0.164	1.480	0.078	0.227	0.296	0.160	0.540	0.571
5	0.228	0.040	1.000	0.950	0.066	0.066	0.474	0.052	0.066	0.132	0.060	0.047	0.042
6	0.071	0.048	1.000	0.493	0.053	0.030	0.452	0.042	0.040	0.226	0.151	0.199	0.156
7	0.070	0.046	1.000	0.932	0.051	0.030	0.452	0.038	0.073	0.383	0.123	0.163	0.137
8	0.105	0.060	1.000	0.447	0.064	0.042	0.459	0.056	0.068	0.094	0.134	0.154	0.121
9	0.097	0.057	1.000	0.576	0.078	0.066	0.762	0.050	0.065	0.197	0.353	0.395	0.273
10	0.092	0.051	1.000	0.620	0.109	0.038	0.594	0.051	0.057	0.154	0.239	0.282	0.192

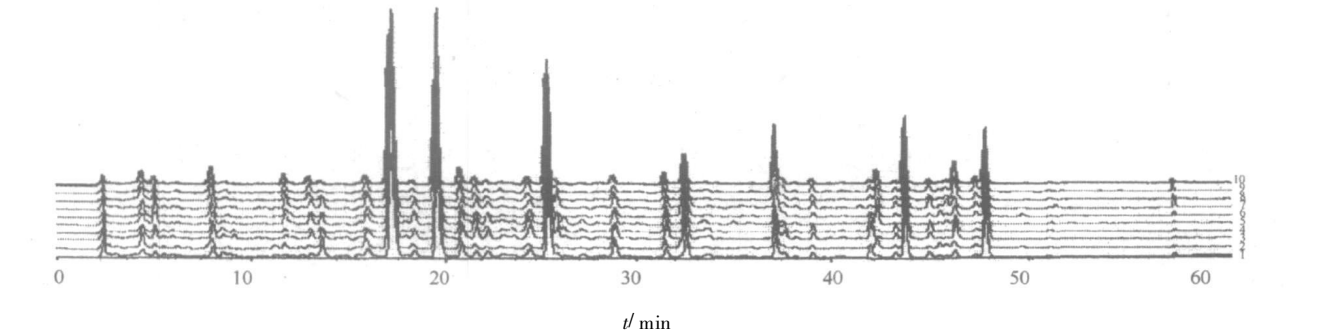


图 2 10 批次药材样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC Fingerprint of ten batches of samples

3 讨论

3.1 通过对不同产地 10 批臭橙、香橙枳壳药材的测定分析,发现其峰面积差异较大,但整体特征相似,标定了 13 个共有峰,共有峰面积之和大于总峰面积的 90%。相似度在 0.98~0.99,说明了各产地枳壳药材品种之间虽然存在差异但同时具有较好的相关性。鸡子橙、柚子橙与对照图谱的相似度低于 95%,说明其与臭橙、香橙的化学成分有一定差异。

3.2 色谱条件的优化:对甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸水等体系进行了考察,结果表明甲醇-0.1% 磷酸水系统分离良好,峰形佳,故选择甲醇-0.1 磷酸水系统进行梯度洗脱;枳壳主要含有黄酮类成分,比较了 260、280、300、320、330 nm 5 个波长下的色谱图,在 320 nm 处色谱峰较多且分离度较好,因此选择检测波长为 320 nm;在 30 ℃柱温以及 1.0 mL/min 的体

积流量下,色谱图出峰时间适当,分离效果良好。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

3.3.1 提取方式:考察了甲醇超声提取、回流提取、索氏提取 3 种提取方式,色谱图峰强度和峰数相近,超声提取操作简单,故选取超声提取方式。

3.3.2 提取溶剂:选择了甲醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇为提取溶剂,甲醇提取色谱图峰强度较大,峰数目较多,故选取甲醇为提取溶剂。

3.3.3 提取时间:考察了甲醇超声提取 30、45、60、90 min,60 min 后色谱图峰强度和峰数相近,故提取时间为 60 min。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 2005.

[2] 潘隽丽,杨翠平,苏薇薇. 枳壳类药材的研究概况[J]. 中药材, 2003, 26(10): 768-771.