

指纹图谱结合一测多评法评价酸橙枳实质量的研究

高喜梅^{1,2}, 池玉梅¹, 张 雯^{1,2}, 赵晓莉^{1,2*}, 狄留庆^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 通过对枳实进行多成分定性、定量分析, 为不同产地酸橙枳实药材的质量控制提供依据。**方法** 结合指纹图谱和一测多评(QAMS)模式, 采用 Waters X-Brige C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动性, 梯度洗脱, 检测波长为 283 nm 和 330 nm, 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。**结果** 建立了不同产地酸橙枳实药材的 HPLC-UV 指纹图谱, 确定了 21 个共有峰, 鉴别出了芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素 9 种成分, 且 23 批次枳实样品的相似度均大于 0.9, 聚类分析(CA)及主成分(PCA)分析结果显示的分类情况与该药材的产地分布情况相一致, 以新橙皮苷为参照物的 QAMS 法测定结果均显示一定的差异性。**结论** 从成分的角度来看, 不同产地间药材质量存在一定差异, 实验所建的 QAMS 法准确、高效、可行, 与标准曲线法和外标法相比具有明显的优势, 可应用于酸橙枳实的质量评价, 为不同产地酸橙枳实药材的质量控制奠定实验基础。

关键词: 枳实; 指纹图谱; 一测多评; 聚类分析; 主成分分析; 质量评价; 芸香柚皮苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 柚皮素; 橙皮素; 甜橙黄酮; 川陈皮素; 桔皮素

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)09-2548-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.032

Application of fingerprint combined with QAMS in quality evaluation of *Aurantii Immaturus Fructus*

GAO Xi-mei^{1,2}, CHI Yu-mei¹, ZHANG Wen^{1,2}, ZHAO Xiao-li^{1,2}, DI Liu-qing^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective This paper aims to provide the experimental foundation for quality control of *Aurantii Immaturus Fructus* from different habitats by analyzing the multi-component qualitatively and quantitatively. **Methods** Fingerprint pattern and QAMS were combined in this experiment, and HPLC analysis was performed on a Waters X-Brige C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase composed of acetonitrile (A) -0.1% methanoic acid solution at a flow rate of 1.0 mL/min in gradient elution mode. The column temperature was maintained at 30 ℃, the injection volume was 10 μL, and the detection wavelengths were set at 283 and 330 nm. **Results** The HPLC-UV fingerprint of *Aurantii Immaturus Fructus* from different habitats was established with 21 common peaks, 9 of them were identified as narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, naringenin, hesperetin, sinensetin, nobiletin and tangeretin, and the similarity of 23 batches of samples were greater than 0.9, CA and PCA show the classification is consistent with the habitats distribution of the medicine. Then, the QAMS result showed some differences with neohesperidin to be the internal standard. **Conclusion** From the perspective of composition, there are some differences in the quality of *Aurantii Immaturus Fructus* from different habitats, and the method of QAMS is accurate, efficient and feasible, which has obvious advantages than standard curve method and external standard method. In a word, it can be applied to quality evaluation and provides the experimental foundation for quality control of *Aurantii Immaturus Fructus* from different habitats.

Key words: *Aurantii Immaturus Fructus*; fingerprint; analysis of multi-components by single marker method; cluster analysis; principal component analysis; quality evaluation; narirutin; naringin; hesperidin; neohesperidin; naringenin; hesperetin; sinensetin; nobiletin; tangeretin

收稿日期: 2019-11-03

基金项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX19_1265); 江苏省高等学校自然科学研究项目(19KJB360004)

作者简介: 高喜梅(1996—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药药剂学。E-mail: gaoximei1996@163.com

*通信作者 赵晓莉(1976—), 女, 副研究员, 研究方向为中药药剂学。E-mail: xlee_zhao@163.com

狄留庆(1964—), 男, 教授, 研究方向为中药药剂学。E-mail: diliuqing928@163.com

枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *C. sinensis* Osbeck 的干燥幼果，有破气消积、化痰散痞之功效^[1-2]。研究表明，黄酮是枳实中含量较高的一类成分，具有调节胃肠道、抗癌、抗氧化、抗炎等活性^[3-6]。目前已有文献报道枳实药材中黄酮类成分的定性和定量研究，但依然存在所测指标单一等问题，无法系统地评价不同产地药材质量间的差异性^[7-11]。鉴于此，本研究首先建立了酸橙枳实药材的 HPLC-UV 指纹图谱，并以对照品和样品进行比对，鉴别出其中 9 种黄酮类成分，通过相似度评价、聚类分析（CA）和主成分分析（PCA）等识别技术，对药材进行了分析归类。其次，本实验采用一测多评法（QAMS）建立各已知成分相对于参照物的相对校正因子（*f*），并对各成分进行定位，可做到同时测定该 9 种成分的含量，以分析不同产地酸橙枳实的质量差异，为枳实药材的整体质量评价及药材市场的合理管控提供实验依据。

1 仪器和材料

Waters e2695 型高效液相色谱仪；KH-500DE 型超声波清洗器；Sartorius CPA225D 电子天平。乙腈、甲醇为色谱纯（Tedia 公司）；无水甲醇、无水乙醇、甲酸、磷酸、乙酸均为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）。

柚皮苷（批号 110722-201714）、橙皮苷（批号 110721-201617）、新橙皮苷（批号 111857-201703）购于中国食品药品检定研究院，质量分数分别为 93.4%、96.1%、99.2%；芸香柚皮苷（批号 P11N8L48150）、柚皮素（批号 YJ0603HA13）、橙皮素（批号 C03F6Y1）、甜橙黄酮（批号 P14M6R1）、川陈皮素（批号 H22M8K32109）、桔皮素（批号 H09M7K14409）购于上海源叶生物有限公司，质量分数均大于 98%。

枳实样品由南通精华制药股份有限公司提供，采自江西和重庆的 4 个不同地区，经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥幼果，样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters X-Brige C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B）；梯度洗脱程序条件为 0~10 min，10%~19% A；

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	批次	产地	编号	批次	产地
S1	180610	江西樟树黄土岗镇	S13	181201	重庆江津白沙镇
S2	180611	江西樟树黄土岗镇	S14	180615	江西樟树店下镇
S3	180612	江西樟树黄土岗镇	S15	180616	江西樟树店下镇
S4	180613	江西樟树黄土岗镇	S16	180617	江西樟树店下镇
S5	180614	江西樟树黄土岗镇	S17	180618	江西樟树店下镇
S6	180801	江西樟树黄土岗镇	S18	180619	江西樟树店下镇
S7	180802	江西樟树黄土岗镇	S19	180620	江西新干县
S8	180803	江西樟树黄土岗镇	S20	180621	江西新干县
S9	181015	重庆江津白沙镇	S21	180622	江西新干县
S10	181018	重庆江津白沙镇	S22	180623	江西新干县
S11	181105	重庆江津白沙镇	S23	180624	江西新干县
S12	181114	重庆江津白沙镇			

10~25 min，19% A；25~27 min，19%~30% A；27~50 min，30%~53% A；50~51 min，53%~75% A；51~56 min，75% A；56~57 min，75%~10% A；57~62 min，10% A；检测波长为 283 nm（检测芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素）、330 nm（分析指纹图谱，检测甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素）；体积流量为 1 mL/min；柱温为 30 ℃；进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别取芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素 9 种对照品适量，精密称定，以甲醇配制成质量浓度分别为 103.6、596.0、335.5、968.5、22.6、23.0、6.7、33.1、23.3 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取枳实粗粉 0.1 g，精密称定，置 25 mL 量瓶中，加入 3/4 体积甲醇，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）45 min，取出，放冷，用甲醇定容，摇匀，滤过，取续滤液过 0.45 μm 滤膜，即得。

2.4 指纹图谱方法学验证

精密吸取“2.3”项下供试品溶液 10 μL 连续进样 6 次，再取同一供试品溶液，分别在溶液制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析，再精密称取同一样品粗粉 0.1 g，按“2.3”项下方法同时制备 6 份供试品溶液后进样测定，上述实验均分别在 330 nm 波长下以新橙皮苷为参照（S），计算其他共有峰相对保留时间的 RSD 值。结果显示，芸香柚皮苷等 8 种已知成分与新橙皮苷之间的相对保留时间 RSD

值均小于 0.59%，且其他各共有峰相对峰面积的 RSD 值均小于 3%，表明仪器精密性、供试品溶液稳定性以及样品处理方法的重复性均较良好。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 共有模式的建立及部分共有峰的指认 将 23 批酸橙枳实样品的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”软件，以 S6 指纹图谱作为参照谱，使用中位数进行自动匹配，加以多点校正，生成了指纹图谱共有模式，标定出 21 个共有峰。精密吸取混合对照品溶液 10 μ L 进样测定，通过与对照品保留时间及紫外吸收光谱图对比，指认出其中 9 个共有峰，分别为芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素，见图 1。

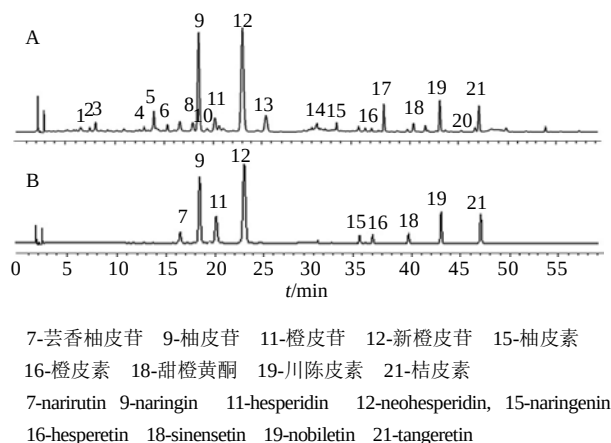


图 1 样品 (A) 和混合对照品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of sample (A) and mixed standards (B)

2.5.2 枳实指纹图谱的相似度评价 以共有模式作为对照指纹图谱，对 23 批样品指纹图谱进行相似度评价，结果 23 批样品与对照图谱间的相似度分别为 0.994、0.987、0.996、0.996、0.998、0.983、0.979、0.979、0.987、0.991、0.988、0.992、0.992、0.982、0.981、0.992、0.990、0.986、0.980、0.968、0.979、0.974、0.969，均大于 0.960，表明 23 批药材相似度良好，样品叠加图见图 2。比较不同产地样品间相似度的 RSD 值为 0.75%，同一产地样品间相似度的 RSD 值为 0.24%~0.81%，说明不同产地样品间差异性较小，且同一产地样品虽然基本相似，但在质量上依然存在一定的差异。

2.6 指纹图谱的模式识别研究

2.6.1 聚类分析 分别以枳实指纹图谱中标定的

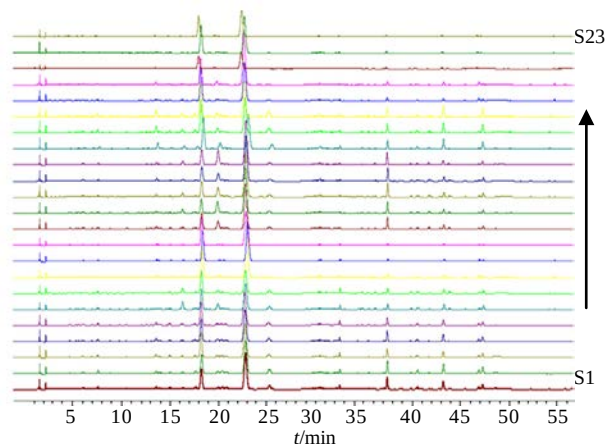


图 2 23 批枳实药材 HPLC 叠加图

Fig. 2 Overlapping chromatograms of 23 batches of samples

共有峰的峰面积为变量，采用 SPSS 22.0 数据统计软件，先对原始数据进行标准化，再采用欧氏距离进行系统聚类分析，见图 3。根据聚类分析结果，可将枳实药材大致分为 4 类，第 I 类包括 S10、S19、S20~S23，其中除 S10 外，其余 5 个样品均产自江西新干县；第 II 类包括 S1~S6、S8、S9、S12、S16~S18，其中除 S9 和 S12 外，其余样品均产自江西樟树的黄土岗镇和店下镇两个产地，第 III 类包括 S11、S13~S15，产自重庆江津白沙镇和江西樟树店下镇，第 IV 类仅包括 S7，说明该样品与同产地其他批次样品间差异较大。另外，重庆江津白沙镇的 5 批样品 (S9~S13) 在第 I~III 类中均有分布，推测该产地样品批间性较差、质量不均。

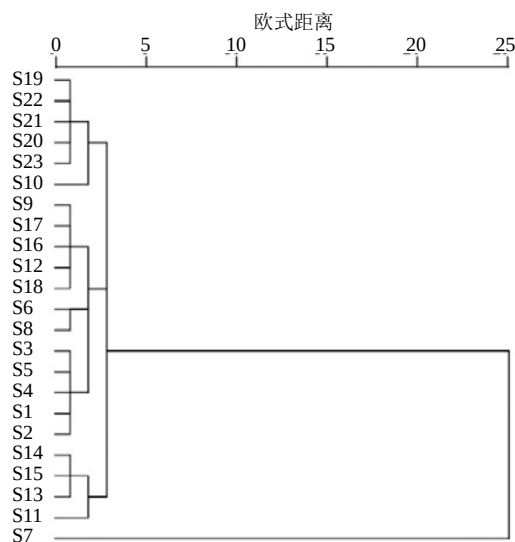


图 3 聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of clustering analysis

2.6.2 主成分分析 将 23 批样品 21 个共有峰的峰面积导入 SPSS 22.0 软件, 数据经标准化后进行主成分分析, 主成分个数提取原则是提取主成分对应的特征值大于 1 的前 3 个主成分, 其累积贡献率达到 88.09%, 且前 4 个主成分的累积贡献率高达 92.01%, 包括了大部分信息。其中前 3 个主成分特征值分别为 9.584、7.108、1.806, 方差贡献率分别为 45.638%、33.848%、8.602%。分别以其第 1~3 主成分建立坐标系, 见图 4, 图中每个点对应一个样品。主成分分析结果可将枳实药材分为 4 类: S1~S6、S8 归为 I 类, S9~S18 归为 II 类, S19~S23 归为 III 类, S7 归为 IV 类。该分类情况与枳实产地分布较为吻合: I 类和 IV 类均归属于江西樟树黄土岗镇, II 类归属于重庆江津白沙镇及江西樟树店下镇, III 类归属于江西新干县。该结果与聚类分析结果存在一定的差异性, 主要是因为聚类分析是以各

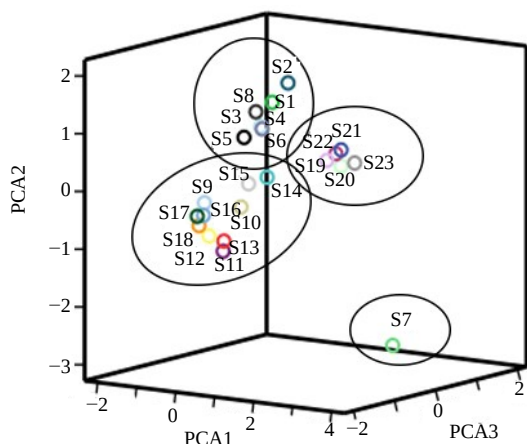


图 4 主成分 3D 得分图

Fig. 4 3D score graph of principal component

峰的相对峰面积进行数据处理, 主成分分析是以各峰的绝对峰面积进行数据处理。

2.7 标准曲线法方法学验证

2.7.1 精密度、稳定性、重复性试验 精密吸取“2.3”项下供试品溶液 10 μL 连续进样 6 次, 再取同一供试品溶液, 分别在溶液制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 再精密称取同一样品粗粉 0.1 g, 按“2.3”项下方法同时制备 6 份供试品溶液后进样测定, 上述试验均分别在 283 nm 波长下记录芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素以及 330 nm 波长下记录甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素的保留时间和峰面积。以新橙皮苷为参照, 计算其他 8 种成分的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。结果显示, 芸香柚皮苷等 8 种成分的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 1.88%, 表明仪器精密度、供试品溶液稳定性以及样品处理方法的重复性均较好。

2.7.2 线性关系考察 将“2.2”项下混合对照品溶液按对半稀释法稀释 7 次, 得到不同质量浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 以对照品溶液的质量浓度为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。同系列对照品制备方法逐级稀释, 分别以信噪比 3 和 10 考察检测限和定量限 (表 2), 结果显示, 芸香柚皮苷等 9 种成分在该质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.7.3 加样回收率试验 精密称取已测定的供试品 0.05 g, 精密加入 9 种对照品适量, 按“2.3”项下供试品制备方法进行制备, 并按“2.1”项下色谱条件进样分析, 计算 9 种已知成分的回收率, 结果显示各成分的回收率均在 95%~105%, 且其

表 2 9 种成分的线性关系考察

Table 2 Results of linear regression of nine components

成分	线性方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检测限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
芸香柚皮苷	$Y=14\,036\,X+4\,649.3$	0.999 9	0.81~103.57	0.08	0.27
柚皮苷	$Y=18\,085\,X+47\,161.0$	0.999 9	4.66~596.00	0.05	0.17
橙皮苷	$Y=17\,459\,X+24\,582.0$	0.999 9	2.62~335.47	0.09	0.30
新橙皮苷	$Y=20\,828\,X+90\,811.0$	0.999 9	7.57~968.53	0.04	0.13
柚皮素	$Y=30\,355\,X+1\,770.9$	0.999 9	0.18~22.55	0.03	0.10
橙皮素	$Y=34\,592\,X+2\,455.7$	0.999 9	0.18~22.97	0.03	0.10
甜橙黄酮	$Y=35\,076\,X-230.84$	0.999 9	0.05~6.67	0.01	0.03
川陈皮素	$Y=19\,787\,X+1\,706.8$	0.999 9	0.26~33.07	0.03	0.10
桔皮素	$Y=29\,475\,X+1\,816.5$	1.000 0	0.18~23.34	0.02	0.07

RSD 值分别为 0.78%、0.81%、2.79%、0.92%、3.73%、1.27%、2.58%、0.72%、0.91%，说明本方法回收率结果良好。

2.8 QAMS 法的建立

2.8.1 相对校正因子 ($f_{k/s}$) 的计算

(1) 多点校正法 (MPC): 因枳实中以新橙皮苷含量最高, 且色谱信息较稳定, 故选该成分作为内标参照物。按公式 $f_{k/s} = f_k/f_s = C_k A_s / (A_k C_s)$ 计算, 式中 C_s 为参照物的质量浓度, A_s 为参照物的峰面积, C_k 为待测成分的质量浓度, A_k 为待测成分的峰面积。精密吸取不同质量浓度混合对照品溶液进样测定, 计算芸香柚皮苷 (A)、柚皮苷 (B)、橙皮苷 (C)、柚皮素 (E)、橙皮素 (F)、甜橙黄酮 (G)、川陈皮素 (H)、桔皮素 (I) 的 $f_{k/s}$ 值。结果显示, 上述 8 种待测成分相对于新橙皮苷 (D) 的 $f_{k/s}$ 分别为 1.515、1.178、1.199、0.684、0.609、0.612、1.056、0.699, RSD 值分别为 1.56%、0.23%、0.23%、0.30%、0.15%、1.04%、1.59%、0.82%。

(2) 斜率校正法 (SC): 斜率校正因子 $f_{k/s} = a_k/a_s$, a_k 为待测成分标准曲线斜率, a_s 为内参物标准曲线斜率, 即为两者斜率之比, 而后推算出其他待测成分的量。从线性关系考察试验中可获得各成分标准曲线的 a 值, 即可测得 8 种待测成分相对于参照物新橙皮苷的 $f_{k/s}$ 分别为 1.484、1.152、1.193、0.686、0.602、0.594、1.053、0.707。

2.8.2 $f_{k/s}$ 耐用性考察 通过比较多点校正法和斜率校正法发现, 前者比后者适用性更广^[12-14], 故本实验主要对重现性较好、适用性较强的多点校正法进行耐用性考察。

(1) 不同仪器和不同色谱柱对 $f_{k/s}$ 的影响: 实验分别考察了 3 种仪器 (Waters e2695、Agilent1260、岛津 LC-2010A)、4 种色谱柱 (Waters X-Bridge C₁₈、Thermo C₁₈、Kromasil C₁₈、Waters Sunfire C₁₈) 以及 2 种色谱柱长 (250、200 mm) 对各成分与参照物质橙皮苷 $f_{k/s}$ 测定的影响。结果显示各成分 RSD 值均小于 3% (表 3), 表明该方法具有良好的重复性和适应性。

表 3 不同仪器和色谱柱条件下所测相对校正因子

Table 3 Relative correction factors determined by different columns and chromatographic systems

仪器	色谱柱	相对校正因子							
		$f_{A/D}$	$f_{B/D}$	$f_{C/D}$	$f_{E/D}$	$f_{F/D}$	$f_{G/D}$	$f_{H/D}$	$f_{I/D}$
Waters e2695	Waters X-Bridge C ₁₈	1.477	1.180	1.201	0.678	0.606	0.601	1.035	0.687
	Thermo C ₁₈	1.482	1.174	1.193	0.677	0.600	0.613	1.040	0.692
	Kromasil C ₁₈ -250 mm	1.491	1.194	1.196	0.675	0.605	0.607	1.045	0.704
	Kromasil C ₁₈ -200 mm	1.506	1.178	1.197	0.691	0.628	0.591	1.032	0.679
	Waters Sunfire C ₁₈	1.531	1.191	1.230	0.703	0.636	0.614	1.041	0.706
Agilent1260	Waters X-Bridge C ₁₈	1.537	1.174	1.187	0.691	0.625	0.590	1.040	0.669
	Thermo C ₁₈	1.469	1.171	1.185	0.700	0.638	0.598	1.028	0.662
	Kromasil C ₁₈ -250 mm	1.419	1.185	1.217	0.693	0.631	0.622	1.027	0.689
	Kromasil C ₁₈ -200 mm	1.501	1.178	1.197	0.691	0.628	0.591	1.032	0.679
岛津 LC-2010A	Waters X-Bridge C ₁₈	1.457	1.167	1.193	0.673	0.611	0.584	1.013	0.669
	Thermo C ₁₈	1.436	1.168	1.192	0.691	0.622	0.587	1.019	0.666
	Kromasil C ₁₈	1.477	1.173	1.201	0.681	0.614	0.586	1.016	0.666
均值		1.482	1.178	1.199	0.687	0.620	0.598	1.031	0.681
RSD/%		2.350	0.740	1.060	1.450	2.060	2.110	1.030	2.220

(2) 其他因素对 $f_{k/s}$ 的影响: 实验考察了不同实验人员、不同流动相、不同柱温以及不同流速对 $f_{k/s}$ 测定的影响。实验结果显示, 3 名实验人员在同一实验室、同一仪器、同一色谱条件下测得 8 种待测成分相对于参照物新橙皮苷的 $f_{k/s}$ 分别为 1.492、1.178、1.224、0.681、0.604、0.604、1.042、0.695, 且 RSD 值均小于 0.50%; 在乙腈-0.1%甲酸、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.1%乙酸 3 种流动相条件下测得

$f_{k/s}$ 分别为 1.488、1.179、1.200、0.681、0.608、0.605、1.042、0.689, 且 RSD 值均小于 0.93%; 在 28、30、32 °C 3 种柱温条件下测得 $f_{k/s}$ 分别为 1.445、1.177、1.046、0.675、0.601、0.578、1.028、0.681, 且 RSD 值均小于 0.98%; 在 0.9、1.0、1.1 mL/min 3 种体积流量条件下测得 $f_{k/s}$ 分别为 1.445、1.177、1.050、0.676、0.602、0.577、1.030、0.684, 且 RSD 值均小于 0.98%, 表明该方法适应性较强。

2.8.3 待测组分色谱峰的定位 查阅文献发现^[15-16], 保留时间差 ($\Delta t_{k/s} = t_{Rk} - t_{Rs}$) 法和相对保留值 ($t_{Rk/s} = t_{Rk}/t_{Rs}$) 法为常用的色谱峰定位法。在本实验过程中, 若以保留时间差法对待测成分的峰进行定位, 在不同类型仪器和色谱柱的条件下, 各成分的 RSD 值均大于 5%, 重现性较差, 很难实现对各成分的准确定位, 故分析该色谱峰定位法只适用于同一仪器的相同填料或色谱行为极其相似的色谱柱。实验比较多种色谱柱发现各待测成分与参照物之间的保留时间差仅在 Waters X-Bridge C₁₈ 和 Thermo C₁₈ 2 根色谱柱上的差异较小。

若以相对保留值法对待测成分的色谱峰进行定位, 8 种待测成分的相对保留值仅在 Waters X-Bridge C₁₈ 和 Thermo C₁₈ 2 根色谱柱上差异较小, 在其他类型色谱柱条件下, 仅有芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷 3 个待测成分的 RSD 值小于 3%, 柚皮素等其他 5 个待测成分的 RSD 值均偏大, 表明该定位法对保留时间位于参照物 (新橙皮苷) 之前的 3 种成分可进行较精准的定位, 对参照物之后的 5 种成分定位效果较差, 这可能与苷和苷元类成分之间的极性 or 结构等性质的差异有关。故推测该色谱

峰定位法只适用于色谱行为极其相似的色谱柱或仅适用于定位与参照物性质类似的成分。

本实验采用两点校正法^[17]对待测成分进行定位。在两点校正法中, 2 种内参物的选择尤为关键, 取点不宜太近或太远, 以避免色谱图两端的成分出峰时间推算出的理论值发生较大误差。实验利用新橙皮苷和保留时间最长的桔皮素进行两点校正时, 发现各待测成分理论值与实测值 RSD 均大于 5%, 若以距离较远的柚皮苷和桔皮素进行两点校正, 除个别数据外, 其他数据 RSD 值均小于 5%, 定位效果较好, 故选择以柚皮苷和桔皮素 2 个点为参照物对其他待测成分进行定位。

2.9 QAMS 法与其他测定方法结果的比较

分别精密吸取 23 批供试品溶液 10 μ L, 注入高效液相色谱仪测定, 记录各成分峰面积, 分别采用标准曲线法、MPC-QAMS 法、SC-QAMS 法和外标法对 8 种待测成分进行定量测定分析。结果 (表 4) 显示, 通过不同方法计算所得的结果之间不存在显著性的差异, 且 QAMS 法相较于外标法和标准曲线法更为简便、易操作、低成本, 具有明显的优势。

表 4 9 种成分不同方法定量测定结果

Table 4 Determination of nine ingredients by different methods

编号	芸香柚皮苷/%					柚皮苷/%					橙皮苷/%				
	标准曲线法	MPC-QAMS 法	SC-QAMS 法	外标法	RSD	标准曲线法	MPC-QAMS 法	SC-QAMS 法	外标法	RSD	标准曲线法	MPC-QAMS 法	SC-QAMS 法	外标法	RSD
S1	0.455	0.469	0.460	0.455	1.46	6.613	6.781	6.631	6.507	1.70	0.809	0.842	0.838	0.844	1.96
S2	0.421	0.434	0.425	0.421	1.45	5.711	5.857	5.728	5.625	1.67	0.793	0.825	0.821	0.827	1.92
S3	0.465	0.480	0.470	0.466	1.42	7.846	8.028	7.851	7.709	1.67	0.712	0.745	0.741	0.747	2.22
S4	0.461	0.475	0.465	0.461	1.41	6.893	7.058	6.902	6.779	1.66	0.988	1.020	1.015	1.023	1.57
S5	0.446	0.460	0.451	0.447	1.44	7.557	7.734	7.563	7.426	1.67	0.690	0.723	0.719	0.725	2.28
S6	0.924	0.944	0.925	0.916	1.28	9.417	9.623	9.411	9.238	1.67	2.095	2.123	2.113	2.129	0.71
S7	0.835	0.854	0.836	0.829	1.29	10.150	10.366	10.137	9.951	1.67	1.633	1.663	1.655	1.667	0.91
S8	0.961	0.982	0.962	0.953	1.28	10.364	10.586	10.352	10.161	1.67	1.259	1.290	1.284	1.293	1.23
S9	0.343	0.356	0.349	0.346	1.63	10.261	10.487	10.255	10.061	1.70	0.588	0.622	0.619	0.623	2.70
S10	0.293	0.306	0.299	0.296	1.82	7.962	8.164	7.984	7.818	1.78	1.222	1.256	1.249	1.256	1.28
S11	0.142	0.151	0.148	0.148	2.39	3.790	3.875	3.789	3.753	1.36	0.495	0.522	0.520	0.528	2.85
S12	0.162	0.172	0.168	0.167	2.52	0.677	0.751	0.734	0.720	4.35	0.561	0.593	0.590	0.594	2.71
S13	0.185	0.195	0.191	0.189	2.11	5.727	5.859	5.729	5.640	1.57	0.497	0.527	0.525	0.530	2.93
S14	2.569	2.603	2.550	2.534	1.17	5.980	6.115	5.980	5.887	1.57	1.997	2.019	2.009	2.030	0.71
S15	1.650	1.673	1.639	1.630	1.13	6.751	6.889	6.737	6.640	1.52	1.175	1.201	1.195	1.209	1.22
S16	0.346	0.359	0.352	0.348	1.65	9.745	9.969	9.749	9.557	1.73	0.653	0.686	0.683	0.687	2.42
S17	0.292	0.304	0.298	0.295	1.75	9.499	9.715	9.500	9.317	1.71	0.501	0.534	0.531	0.535	3.09
S18	0.266	0.277	0.272	0.269	1.82	9.129	9.330	9.124	8.958	1.67	0.429	0.462	0.460	0.463	3.67
S19	0.670	0.689	0.674	0.667	1.40	4.847	4.994	4.883	4.785	1.79	2.924	2.956	2.941	2.958	0.54
S20	1.241	1.268	1.242	1.228	1.33	4.157	4.293	4.198	4.113	1.82	4.547	4.578	4.555	4.582	0.37
S21	1.147	1.172	1.148	1.135	1.33	4.711	4.853	4.746	4.651	1.79	3.631	3.661	3.642	3.664	0.43
S22	0.639	0.657	0.644	0.637	1.42	4.327	4.466	4.367	4.280	1.82	2.799	2.831	2.817	2.834	0.57
S23	1.168	1.193	1.169	1.156	1.33	4.701	4.846	4.739	4.644	1.80	5.419	5.449	5.422	5.454	0.33

续表 4

编号	柚皮素%					橙皮素%					甜橙黄酮%				
	标准曲线法	MPC-QAMS 法	SC-QAMS 法	外标法	RSD)	标准曲线法	MPC-QAMS 法	SC-QAMS 法	外标法	RSD	标准曲线法	MPC-QAMS 法	SC-QAMS 法	外标法	RSD
S1	0.028	0.029	0.029	0.029	2.20	0.025	0.027	0.026	0.026	3.18	0.020	0.020	0.019	0.019	2.68
S2	0.026	0.028	0.028	0.028	2.26	0.024	0.026	0.026	0.026	3.10	0.022	0.022	0.021	0.021	2.64
S3	0.037	0.038	0.038	0.038	1.64	0.022	0.023	0.023	0.023	3.62	0.015	0.015	0.015	0.014	2.71
S4	0.022	0.023	0.023	0.023	2.85	0.016	0.018	0.018	0.018	4.77	0.018	0.018	0.018	0.017	2.66
S5	0.046	0.047	0.047	0.047	1.27	0.028	0.030	0.030	0.029	2.77	0.012	0.013	0.012	0.012	2.75
S6	0.156	0.156	0.156	0.157	0.41	0.105	0.107	0.106	0.105	0.94	0.020	0.020	0.020	0.019	2.67
S7	0.150	0.150	0.150	0.151	0.42	0.094	0.096	0.095	0.094	0.99	0.019	0.019	0.018	0.018	2.67
S8	0.157	0.157	0.158	0.159	0.41	0.102	0.104	0.103	0.102	0.96	0.020	0.020	0.019	0.019	2.67
S9	0.021	0.022	0.022	0.022	3.02	0.012	0.014	0.014	0.014	6.25	0.034	0.035	0.034	0.033	2.64
S10	0.038	0.039	0.039	0.039	1.57	0.039	0.041	0.041	0.040	2.05	0.007	0.007	0.007	0.006	3.04
S11	0.007	0.008	0.008	0.008	8.05	0.006	0.008	0.008	0.008	11.07	0.003	0.003	0.002	0.002	4.36
S12	0.032	0.033	0.033	0.033	1.82	0.023	0.024	0.024	0.024	3.34	0.004	0.004	0.004	0.004	3.47
S13	0.015	0.016	0.017	0.017	3.79	0.010	0.012	0.011	0.011	7.14	0.003	0.003	0.003	0.003	4.12
S14	0.166	0.165	0.166	0.167	0.53	0.171	0.173	0.171	0.170	0.71	0.026	0.026	0.026	0.025	2.55
S15	0.133	0.133	0.133	0.134	0.58	0.114	0.116	0.115	0.114	0.73	0.033	0.033	0.032	0.031	2.51
S16	0.052	0.053	0.053	0.054	1.09	0.045	0.047	0.046	0.046	1.81	0.004	0.004	0.004	0.004	3.45
S17	0.029	0.030	0.030	0.031	2.05	0.023	0.024	0.024	0.024	3.40	0.004	0.004	0.004	0.003	3.64
S18	0.024	0.026	0.026	0.026	2.53	0.017	0.019	0.019	0.019	4.47	0.003	0.003	0.003	0.003	4.08
S19	0.050	0.050	0.051	0.051	1.18	0.069	0.071	0.070	0.070	1.31	0.024	0.024	0.024	0.023	2.70
S20	0.048	0.049	0.049	0.049	1.25	0.065	0.067	0.067	0.066	1.37	0.023	0.023	0.023	0.022	2.71
S21	0.059	0.060	0.061	0.061	0.93	0.106	0.109	0.107	0.106	1.01	0.026	0.026	0.025	0.025	2.69
S22	0.050	0.051	0.051	0.052	1.19	0.072	0.074	0.073	0.073	1.29	0.027	0.027	0.027	0.026	2.69
S23	0.058	0.059	0.059	0.059	1.01	0.215	0.218	0.216	0.214	0.89	0.032	0.033	0.032	0.031	2.68

编号	川陈皮素%					桔皮素%					新橙皮苷%				
	标准曲线法	MPC-QAMS 法	SC-QAMS 法	外标法	RSD	标准曲线法	MPC-QAMS 法	SC-QAMS 法	外标法	RSD	标准曲线法	MPC-QAMS 法	SC-QAMS 法	外标法	RSD
S1	0.305	0.306	0.305	0.301	0.74	0.131	0.131	0.132	0.132	0.48	14.750	14.750	14.750	14.750	14.750
S2	0.355	0.355	0.354	0.349	0.73	0.165	0.163	0.165	0.165	0.52	12.859	12.859	12.859	12.859	12.859
S3	0.230	0.231	0.230	0.227	0.69	0.099	0.099	0.100	0.100	0.52	13.575	13.575	13.575	13.575	13.575
S4	0.283	0.283	0.283	0.279	0.70	0.121	0.120	0.121	0.121	0.50	12.959	12.959	12.959	12.959	12.959
S5	0.212	0.213	0.212	0.209	0.69	0.090	0.090	0.091	0.091	0.55	13.522	13.522	13.522	13.522	13.522
S6	0.355	0.355	0.354	0.349	0.74	0.194	0.192	0.194	0.193	0.53	13.675	13.675	13.675	13.675	13.675
S7	0.379	0.379	0.378	0.373	0.75	0.215	0.213	0.215	0.214	0.55	13.580	13.580	13.580	13.580	13.580
S8	0.409	0.410	0.408	0.403	0.75	0.223	0.220	0.223	0.222	0.55	13.978	13.978	13.978	13.978	13.978
S9	0.087	0.089	0.089	0.088	1.00	0.030	0.031	0.031	0.031	1.95	15.136	15.136	15.136	15.136	15.136
S10	0.091	0.093	0.093	0.091	1.05	0.026	0.027	0.027	0.027	2.26	19.726	19.726	19.726	19.726	19.726
S11	0.031	0.033	0.033	0.033	2.33	0.009	0.010	0.010	0.010	6.65	6.152	6.152	6.152	6.152	6.152
S12	0.072	0.074	0.073	0.072	1.14	0.022	0.023	0.024	0.024	2.59	14.319	14.319	14.319	14.319	14.319
S13	0.052	0.054	0.053	0.053	1.39	0.015	0.017	0.017	0.017	3.74	9.633	9.633	9.633	9.633	9.633
S14	0.182	0.183	0.182	0.180	0.57	0.097	0.096	0.097	0.097	0.55	9.722	9.722	9.722	9.722	9.722
S15	0.145	0.146	0.146	0.144	0.52	0.073	0.073	0.074	0.074	0.64	9.031	9.031	9.031	9.031	9.031
S16	0.087	0.089	0.089	0.088	1.03	0.030	0.031	0.031	0.031	1.92	16.596	16.596	16.596	16.596	16.596
S17	0.073	0.075	0.075	0.074	1.16	0.024	0.025	0.025	0.025	2.46	15.462	15.462	15.462	15.462	15.462
S18	0.056	0.058	0.058	0.057	1.49	0.017	0.019	0.019	0.019	3.57	13.665	13.665	13.665	13.665	13.665
S19	0.141	0.143	0.143	0.141	0.83	0.075	0.076	0.076	0.076	0.65	17.887	17.887	17.887	17.887	17.887
S20	0.140	0.142	0.141	0.139	0.83	0.078	0.078	0.079	0.079	0.64	18.131	18.131	18.131	18.131	18.131
S21	0.173	0.174	0.174	0.171	0.78	0.091	0.091	0.092	0.092	0.54	17.106	17.106	17.106	17.106	17.106
S22	0.165	0.167	0.167	0.164	0.80	0.088	0.088	0.089	0.089	0.58	18.159	18.159	18.159	18.159	18.159
S23	0.158	0.160	0.159	0.157	0.80	0.087	0.087	0.088	0.087	0.58	17.932	17.932	17.932	17.932	17.932

通过计算可知, 23 批样品中 9 种黄酮类成分的总质量分数分别为 23.186%、20.423%、23.044%、21.806%、22.647%、26.967%、27.079%、27.500%、26.551%、29.457%、10.677%、15.948%、16.180%、20.931%、19.128%、27.602%、25.948%、23.647%、26.746%、28.488%、27.103%、26.388%、29.824%, 江西樟树黄土岗镇、重庆江津白沙镇、江西樟树店下镇和江西新干县 4 个产地的平均总质量分数分别为 24.081%、19.763%、23.451%、27.710%, 其中以江西新干县的含量为最高。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

实验通过比较以水、50%甲醇、50%乙醇和甲醇为提取溶剂时所制备的供试品溶液, 发现以甲醇为溶剂提取的供试品色谱图信息量丰富, 且 9 种已知成分分离度较好, 保留时间及峰面积相对稳定, 故选择以甲醇为提取溶剂。

通过紫外扫描光谱可知芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素 9 种成分的最大吸收波长分别为 282.4、282.4、283.6、283.6、288.4、287.2、330.2、333.8、323.0 nm, 比较分析该指纹图谱在 283、330 nm 下的峰数目、峰形、分离度、对称因子、理论塔板数等参数发现, 在波长 330 nm 条件下, 上述色谱参数信息均相对较好, 故选择以 330 nm 为指纹图谱的分析波长。在 QAMS 法中, 前 6 种成分和后 3 种成分分别在 283 nm 和 330 nm 波长下进行测定, 各峰的分离度大于 1.5, 对称因子均在 0.95~1.10, 图谱较稳定, 故确定波长 283 nm 和 330 nm 作为含量分析波长。

3.2 枳实药材质量评价

本实验在建立 HPLC-UV 指纹图谱的同时, 采用 QAMS 法测定 4 个产地共 23 批酸橙枳实药材中 9 种黄酮类成分的含量, 与现有文献相比, 本研究更全面地反映了酸橙枳实的质控化学信息特征, 并建立了更加科学实用的定性及定量方法。采用 CA 及 PCA 2 种分析方法对不同产地的药材进行质量分类, 发现该药材主要含有芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷 4 种黄酮苷类成分, 该结果与文献报道中所显示的枳实主要药理活性成分相一致^[3-6]。另外, 上述枳实样品大致可以产地类型分为 4 大类, 其中 S7 样品被单独分为一类, 与同产地其他批次样品差异较大, 可能存在市场批次混乱、取样不均、

样品贮存条件不宜等影响因素, 反映了中药材质量管理问题的重要性, 提示药材样品必须保证其在采收、加工、贮存、运输等各个环节中信息的真实性和完整性, 从而能够从源头上做到质量可控。

通过比较不同产地酸橙枳实中 9 种黄酮类成分的含量, 发现其含量均具有一定的差异性, 成分的差异可能进一步导致该药材药理作用及活性上的差异, 因此有必要建立一个多元的枳实样品的质量控制体系, 为临床用药的有效性提供保障。分析数据发现, 芸香柚皮苷和橙皮苷是对不同产地枳实质量之间差异贡献较大的成分, 提示这些成分在枳实药材质量评价过程中具有较大的影响, 故可考虑增加芸香柚皮苷和橙皮苷作为枳实质量控制指标, 对枳实进行多指标综合评价。通过分析比较不同产地的 9 种已知黄酮成分的总含量, 发现以江西新干县为最高, 总含量高达 27.710%, 该实验结果从主成分含量方面验证了长期以来以江西为枳实道地产区的科学性以及本课题组通过对枳实药材进行资源评估后选择以江西和重庆为主要的药材供应产地的合理性。

通过结合文献研究^[18]和前期实验研究, 本课题组发现酸橙和甜橙不同品种枳实质量差异较大。虽然临床上很少对 2 个品种进行区别使用, 但该品种差异对于药材质量以及目前较经典的经典名方的研究与开发具有较大影响, 故对酸橙和甜橙两个不同品种枳实药材的比较或可作为后期研究重点, 从多方面综合考察其差异性, 为枳实药材的质量控制以及新药开发奠定实验基础。

参考文献

- [1] 范莉, 侯小龙, 王文清, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在藤茶质量评价中的应用研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4076-4081.
- [2] 何兵, 刘艳, 田吉, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在中药鱼腥草质量评价中的应用研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2682-2689.
- [3] 黄爱华, 迟玉广, 曾元儿, 等. 枳实黄酮对功能性消化不良大鼠胃肠动力的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 612-623.
- [4] Park K I, Park H S, Kim M K, et al. Flavonoids identified from Korean *Citrus aurantium* L. inhibit non-small cell lung cancer growth *in vivo* and *in vitro* [J]. *Food*, 2014, 7: 287.
- [5] Soudani N, Rafti M, Ben A I, et al. Oxidative stress-related lung dysfunction by chromium (VI):

- alleviation by *Citrus aurantium* L. [J]. *J Physiol Biochem*, 2013, 69(2): 239-? .
- [6] Kim J A, Park H S, Park K I, et al. Proteome analysis of the anti-inflammatory response of flavonoids isolated from Korean *Citrus aurantium* L. in Lipopolysaccharide-Induced L6 rat skeletal muscle cells [J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41(4): 901-909.
- [7] 贾富霞, 王秀娟, 罗 容. 酸橙枳实 HPLC 指纹图谱方法研究及 6 种黄酮类药效组分的含量测定 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(12): 2917-2920.
- [8] 曾鸿莲, 刘振丽, 宋志前, 等. 不同品种枳实 HPLC 指纹图谱及成分含量差异性研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(17): 3272-3278.
- [9] 陈建维, 刘 圆, 刘晟楠, 等. 一测多评法测定枳实中 4 种黄酮类成分 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1374-1377.
- [10] 叶晓岚, 宋粉云, 范国荣, 等. 高效液相色谱法同时测定广陈皮药材中的 11 种化学成分 [J]. 色谱, 2015, 33(4): 423-427.
- [11] 魏惠珍, 谢 菲, 饶 毅, 等. 内标多控法测定枳实、枳壳、青皮和陈皮中黄酮类成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 74-77.
- [12] 陈 驰, 关琴笑, 朱冬宁, 等. 一测多评法测定人参中 9 种人参皂苷的含量 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 122-126.
- [13] 何 兵, 刘 艳, 杨世艳, 等. HPLC 一测多评法同时测定双青咽喉片中 10 种成分 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 974-981.
- [14] 董 迎, 夏彦铭, 狄留庆, 等. 一测多评法同时测定补肾清利颗粒中 8 种成分 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5158-5167.
- [15] 赵 倩, 冯伟红, 张启伟, 等. “一测多评”法用于栀子金花丸多成分含量测定的可行性研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1826-1833.
- [16] 罗祖良, 仇 峰, 韦日伟, 等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.
- [17] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫淼. 一种提高色谱指纹谱保留时间重现性的新方法 [J]. 分析化学, 2003, 31(10): 1232-1236.
- [18] 张振霞, 郑玉忠, 梁丽娟, 等. 酸橙和甜橙 2 种枳实药材 HPLC 指纹图谱研究及其柚皮苷和辛弗林含量分析 [J]. 中国药房, 2011, 22(39): 3711-3714.