

一测多评法结合指纹图谱在枳壳质量评价中的应用

卢焘韬¹, 王雪莲¹, 穆成林¹, 唐丽婧¹, 周欣¹, 张琳², 曲彤³, 康希², 杨荣平^{1,2,3*}

1. 西南大学药学院, 重庆 400715

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

3. 陕西中医药大学药学院, 陕西 西安 712046

摘要: 目的 基于一测多评(QAMS)与指纹图谱的方法建立27批枳壳的质量评价方法。方法 以柚皮苷为参照, 计算芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的相对校正因子, 并测定其含量, 比较外标法与QAMS法的差异性。采用HPLC法, 建立27批枳壳饮片的指纹图谱, 通过聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)对指纹图谱进行评价。结果 QAMS法与外标法测量值之间无显著性差异; 建立枳壳饮片指纹图谱方法, 相似度均>0.95, 共标定11个共有峰, 通过与对照品谱图比对, 确定了3号峰为芸香柚皮苷、4号峰为柚皮苷、5号峰为橙皮苷、6号峰为新橙皮苷。结论 QAMS法结合指纹图谱可为评价枳壳饮片的质量提供参考。

关键词: 枳壳饮片; 一测多评; 指纹图谱; 聚类分析; 芸香柚皮苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 主成分分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)02-0558-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.02.030

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

LU Tao-tao¹, WANG Xue-lian¹, MU Cheng-lin¹, TANG Li-jing¹, ZHOU Xin¹, ZHANG Lin², QV Tong³, KANG Xi², YANG Rong-ping^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. College of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To establish the quality evaluation method of 27 batches of *Aurantii Fructus* based on QAMS and the fingerprint. **Methods** Taking naringin as the reference, the relative correction factors of narirutin, hesperidin, and neohesperidin were calculated. The contents were determined and the differences between the external standard method and QAMS method were compared. And the fingerprints of 27 batches of decoction pieces of *Aurantii Fructus* were established by HPLC, and evaluated by cluster analysis(CA) and principal component analysis (PCA). **Results** There was no significant difference between the measured values of QAMS method and external standard method. The method of fingerprint of decoction pieces of *Aurantii Fructus* was established, the similarities were greater than 0.95. There were 11 common peaks in the HPLC fingerprint, compared with the control product spectrogram, peak 3 was narirutin, peak 4 was naringin, peak 5 was hesperidin, peak 6 was neohesperidin. **Conclusion** The QAMS method combined with fingerprint can provide a reference for evaluating the quality of decoction pieces of *Aurantii Fructus*.

Key words: decoction pieces of *Aurantii Fructus*; QAMS; fingerprints; cluster analysis; narirutin; naringin; hesperidin; neohesperidin; principal component analysis

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], 枳壳之名始载于《雷公炮炙论》^[2], 在此之前枳壳一直以枳实之名载于《神农本草经》^[3]。枳壳具有理气宽中、行滞消

胀的功效。其味苦、辛、酸, 性微寒, 归脾、胃经。用于治疗胸胁气滞、胀满疼痛、食积不化、痰饮内停、脏器下垂。枳壳主要含有挥发油类、黄酮类和生物碱类等化学成分^[4]。黄酮类化合物是

收稿日期: 2020-08-09

基金项目: 国家中医药管理局中药标准化项目(ZYBZH-Y-CQ-46)

作者简介: 卢焘韬(1996—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药新制剂、新剂型及新技术的研究与应用。Tel: 17623409186

E-mail: 502351917@qq.com

*通信作者: 杨荣平, 女, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药新制剂、新剂型及新技术的研究与应用。Tel: (023)89029056

E-mail: yangrp@cqacmm.com

枳壳具有理气、行滞、祛痰作用的重要化学成分，主要为橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷、芸香柚皮苷等。现代研究表明，黄酮类化合物主要在抗氧化、抗炎、抗癌抑菌等方面发挥作用^[5-7]。

目前对于枳壳的研究还停留在对其单一成分进行质量控制，然而中药多成分的复杂性决定了单一成分无法全面控制枳壳药材的质量^[8-9]。王智民等^[10]提出一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)通过药材有效成分间存在的内在函数和比例关系，可测定一个成分的含量进而实现多个成分的同时测定。基于此，本研究通过建立QAMS的方法达到以主要成分作为指标来进行全面质量控制；同时采用HPLC法建立枳壳的指纹图谱，并进行相似度评价、聚类分析和主成分分析^[11-12]，以期为枳壳的质量评价提供技术手段和科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

HY-04型超高速中药粉碎机(巩义市予华仪器有限公司)；CPA-225D型电子天平(万分之

一、十万分之一，德国Sartorius公司)；SCQ[®]-G2016数控加热超声波清洗机(上海声彦超声波仪器有限公司)；予华HH恒温水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂)；DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱(巩义市予华仪器有限责任公司)；Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000高效液相色谱仪(四元泵、DAD检测器，美国Thermo-fisher公司)。

1.2 试剂

对照品芸香柚皮苷(批号111530-201715，质量分数≥96.8%)、柚皮苷(批号110722-201815，质量分数≥91.7%)、橙皮苷(批号110721-201818，质量分数≥96.2%)、新橙皮苷(批号111857-201707，质量分数≥92.5%)均购于中国食品药品检定研究院；乙腈、甲醇均为色谱纯(美国TEDIA公司)；水为自制超纯水；其他试剂均为分析纯。枳壳饮片共27批样品，经重庆市中药研究院李隆云教授鉴定为芸香科植物酸橙*C. aurantium* L.及其栽培变种的干燥未成熟果实枳壳净制润制切制等后的加工品，样品信息见表1。

表1 样品信息

Table 1 Batches of samples information

样品编号	产地	批号	厂家
S1	江西	1510230172	亳州市沪谯药业有限公司
S2	江西	161001	安徽新盛中药饮片有限公司
S3	江西	1611001	安国市聚药堂药业有限公司
S4	江西	170501	安徽谓博中药股份有限公司
S5	江西	160501	安徽徽草堂药业饮片股份有限公司
S6	江西	1610001	安国市聚药堂药业有限公司
S7	湖南	170801	安徽谓博中药股份有限公司
S8	江西	17080701	国药乐仁堂河北药业有限公司
S9	江西	1702001	安国市聚药堂药业有限公司
S10	江西	170824	亳州市永刚饮片有限公司
S11	江西	170801CP219	河北万修药业有限公司
S12	江西	170301	安徽方氏制药有限公司
S13	江西	160401CP219	河北万修药业有限公司
S14	四川	1705030	四川新荷花中药饮片股份有限公司
S15	四川	170119	四川省中药饮片有限责任公司
S16	四川	170301	四川原上草中药饮片有限公司
S17	湖南	160901	湖南省南国药都中药饮片有限公司
S18	江西	17040102	郑州瑞龙制药股份有限公司
S19	江西	170503CP220	河北万修药业有限公司
S20	湖南	170701	安徽谓博中药股份有限公司
S21	四川	170512	四川省中药饮片有限责任公司
S22	湖南	170303	安徽谓博中药股份有限公司
S23	四川	Z03417M01	四川中庸药业有限公司
S24	四川	Z03417E01	四川中庸药业有限公司
S25	四川	Z03417R01	四川中庸药业有限公司
S26	四川	Z03417J01	四川中庸药业有限公司
S27	四川	Z03417F02	四川中庸药业有限公司

2 QAMS 法

2.1 内参物的选择

柚皮苷作为枳壳的成分之一，在药材中含量较高且从色谱图分离效果良好，因此选择柚皮苷作为内参物。

2.2 方法学考察

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(18:82)等度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 283 nm, 进样量 10 μL, 柱温 25 °C, 上述色谱条件下, 对照品及枳壳供试品溶液色谱图见图 1。

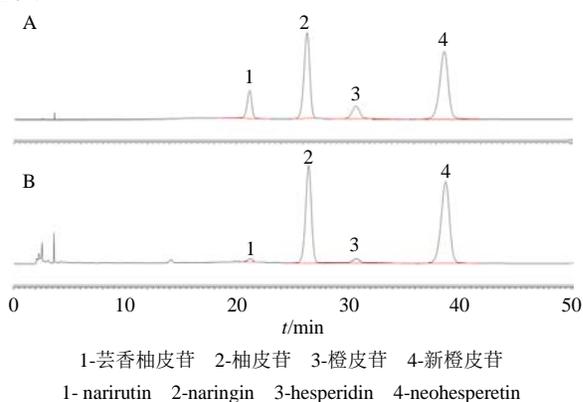


图 1 混合对照品 (A) 和枳壳样品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig.1 HPLC profile of mixed reference substances (A) and sample of *Aurantii Fructus* (B)

2.2.2 混合对照品溶液的制备 分别取芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成含芸香柚皮苷 0.32 mg/mL、柚皮苷 1.06 mg/mL、橙皮苷 0.20 mg/mL、新橙皮苷 1.01 mg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取枳壳饮片粉末 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 1.5 h (75 °C), 放冷, 称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液经 0.22 μm 滤膜滤过, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 0.1、0.5、1、2、3、4、5 mL, 加甲醇稀释制得系列混合对照品溶液。按“2.2.1”项下方法, 精密吸取对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积。以各对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得回归方程、线性范围、相关系数, 见表 2。

表 2 线性关系

Table 2 Results of linear equations

成分	线性方程	线性范围/μg	r
芸香柚皮苷	$Y=204.5310X+0.0946$	0.099~2.837	0.9999
柚皮苷	$Y=236.3897X-0.0754$	0.341~10.718	0.9999
橙皮苷	$Y=289.3408X-0.6429$	0.075~2.163	0.9996
新橙皮苷	$Y=288.3231X+0.0761$	0.319~10.019	0.9999

2.2.5 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品 10 μL, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.56%、0.10%、1.21%、0.10%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批枳壳供试品 (S1), 按“2.2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.02%、0.56%、2.11%、0.13%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一批枳壳供试品 (S1), 按“2.2.3”项下方法制备, 按“2.2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、20、24 h 测定, 测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.08%、0.54%、1.64%、0.54%, 表明供试液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取样品 (S1) 0.25 g, 共 6 份, 分别加入一定量的混合对照品溶液, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定含量, 计算加样回收率, 结果芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的加样回收率分别为 99.72%、100.45%、99.79%、100.20%, RSD 值分别为 2.57%、1.65%、1.88%、1.20%, 表明加样回收率符合要求。

2.3 相对校正因子 ($f_{k/s}$) 的计算

以柚皮苷为内参物, 按照公式 $f_{k/s} = (C_s \times A_k) / (C_k \times A_s)$ (式中 C_k 为待测组分对照品 k 的浓度, A_k 为待测组分对照品 k 的峰面积, C_s 为内参物浓度, A_s 为内参物峰面积)。因此, QAMS 法可在外标法测得一个成分 (标准物) 的基础上, 测定样品中其他成分 C_k 的浓度 (或含量), 按照公式 $C_k = (C_s \times A_k) / (f_{k/s} \times A_s)$ 计算, 即得。取“2.2.2”项下的混合对照品溶液, 分别进样 2、4、6、8、10、20 μL 测定, 计算柚皮苷对芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的 $f_{k/s}$, 结果见表 3。进一步对 $f_{k/s}$ 重现性考察。

表3 枳壳成分 $f_{k/s}$ 的测定结果 ($n=3$)

Table 3 Determination results of reference correction factors ($f_{k/s}$) tests ($n=3$)

进样体积/ μL	$f_{\text{芸香柚皮苷/柚皮苷}}$	$f_{\text{橙皮苷/柚皮苷}}$	$f_{\text{新橙皮苷/柚皮苷}}$
2	0.939	1.147	1.227
4	0.973	1.167	1.226
6	0.977	1.173	1.224
8	0.978	1.184	1.225
10	0.977	1.184	1.228
20	0.972	1.186	1.229
平均值	0.969	1.174	1.226
RSD/%	1.550	1.260	0.160

2.3.1 色谱柱及高效液相色谱仪的考察 在不同实验室条件下, 分别考察 Ecosil HPLC C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 3 种不同厂家色谱柱, 以及 UltiMate 3000 高效液相色谱仪, Agilent 1290 液相色谱仪和岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪对 $f_{k/s}$ 及待测峰相对保留时间的影响, 结果见表 4。结果表明不同色谱柱、不同仪器以及不同实验室实验条件下, 柚皮苷对芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的 $f_{k/s}$ 分别为 0.954、1.159、1.223, RSD 值均小于 5%, 表

表4 不同实验室、不同仪器、不同色谱柱测得的 $f_{k/s}$

Table 4 RCF determined by different lab, instructions, and columns

实验室	仪器	色谱柱	$f_{\text{芸香柚皮苷/柚皮苷}}$	$f_{\text{橙皮苷/柚皮苷}}$	$f_{\text{新橙皮苷/柚皮苷}}$
实验室 1	UltiMate 3000	Ecosil HPLC C ₁₈	0.963	1.153	1.231
		Synchronis C ₁₈	0.971	1.163	1.227
		Ultimate XB-C ₁₈	0.903	1.170	1.224
	Agilent 1290	Ecosil HPLC C ₁₈	0.964	1.123	1.215
		Synchronis C ₁₈	0.966	1.158	1.206
		Ultimate XB-C ₁₈	0.954	1.122	1.221
实验室 2	岛津 LC-20A	Ecosil HPLC C ₁₈	0.932	1.165	1.226
		Synchronis C ₁₈	0.956	1.167	1.231
		Ultimate XB-C ₁₈	0.978	1.213	1.223
平均值			0.954	1.159	1.223
RSD/%			2.42	2.33	0.65

明本方法重现性, 耐用性良好。

2.3.2 待测组分色谱峰的定位考察 内参物柚皮苷通过对照品定位, 其他待测组分采用相对柚皮苷的保留时间 (retention time, RT 值) 进行定位。采用 QAMS 法进行测定时, 通过柚皮苷的保留时间计算其他待测组分峰的相对保留时间 (relative

retention time, RRT), 根据 RRT 值及光谱吸收可对其他 3 个组分进行准确定位。本实验测定了相对保留值在不同仪器、不同色谱柱上的重现性, 结果见表 5。可见, 各待测组分与柚皮苷的相对保留时间 RSD 均 < 5%, 表明利用 RRT 进行色谱峰的定位是可行的。

表5 不同高效液相仪器和色谱柱对 RRT 的影响

Table 5 RRTs obtained from different columns and instruments

实验室	仪器	色谱柱	RRT		
			芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
实验室 1	UltiMate 3000	Ecosil HPLC C ₁₈	0.805 2	1.155	1.458
		Synchronis C ₁₈	0.804 2	1.208	1.414
		Ultimate XB-C ₁₈	0.816 3	1.124	1.442
	Agilent 1290	Ecosil HPLC C ₁₈	0.804 9	1.156	1.462
		Synchronis C ₁₈	0.806 1	1.155	1.453
		Ultimate XB-C ₁₈	0.804 8	1.154	1.451
实验室 2	岛津 LC-20A	Ecosil HPLC C ₁₈	0.803 5	1.157	1.465
		Synchronis C ₁₈	0.813 9	1.172	1.486
		Ultimate XB-C ₁₈	0.828 4	1.158	1.474
平均值			0.809 7	1.160	1.456
RSD/%			1.030 0	1.890	1.410

2.4 QAMS 法与外标法结果的比较研究

按照“2.2.3”项下方法制备 27 批饮片供试品溶液，并按“2.2.1”项下色谱条件进样。先用外标法对枳壳样品中 4 种不同成分进行测定，再用 QAMS 法建立待测成分间的 $f_{k/s}$ 对其他成分的质量分数进行计算，各批次每个样品测定 3 次，取平均值，对外标

法和 QAMS 法检测结果进行比较，结果见表 6。常规的外标法实测含量值与 QAMS 法计算的含量经 t 检验，结果表明，2 种方法所得枳壳饮片含量不存在显著性差异，且 2 种方法所得含量值的相对误差都在 3% 以内，由此说明 QAMS 法用于枳壳饮片的多成分质量评价研究是可行的。

表 6 外标法与 QAMS 法对枳壳饮片中 4 种黄酮类成分的含量测定结果 ($n=3$)

Table 6 Determination results of four components in decoction pieces of *Aurantii Fructus* by QAMS and ESM methods ($n=3$)

编号	芸香柚皮苷/(mg·g ⁻¹)			柚皮苷/(mg·g ⁻¹)			橙皮苷/(mg·g ⁻¹)			新橙皮苷/(mg·g ⁻¹)		
	外标法	QAMS	相对误差	外标法	外标法	QAMS	相对误差	外标法	QAMS	相对误差		
S1	6.20	6.23	0.48	55.45	3.43	3.41	-0.58	39.76	39.76	0.00		
S2	9.11	9.15	0.44	46.66	4.59	4.56	-0.65	39.42	39.41	-0.03		
S3	8.21	8.24	0.37	52.08	4.25	4.23	-0.47	42.55	42.55	0.00		
S4	15.34	15.41	0.46	71.34	7.65	7.61	-0.52	34.04	34.04	0.00		
S5	2.61	2.62	0.38	47.65	2.73	2.72	-0.37	42.72	42.72	0.00		
S6	4.90	4.93	0.61	45.31	3.09	3.08	-0.32	34.65	34.65	0.00		
S7	5.09	5.12	0.59	57.13	3.42	3.40	-0.58	42.63	42.63	0.00		
S8	6.98	7.01	0.43	66.00	4.44	4.41	-0.68	46.88	46.89	0.02		
S9	3.91	3.93	0.51	45.20	3.43	3.42	-0.29	41.81	41.81	0.00		
S10	8.76	8.80	0.46	78.68	5.31	5.28	-0.56	38.97	38.97	0.00		
S11	8.04	8.08	0.50	75.69	5.77	5.74	-0.52	45.60	45.60	0.00		
S12	3.69	3.71	0.54	63.57	3.61	3.60	-0.28	53.74	53.73	-0.02		
S13	7.68	7.72	0.52	68.91	5.54	5.51	-0.54	40.84	40.84	0.00		
S14	1.71	1.72	0.58	66.14	3.83	3.81	-0.52	66.30	66.30	0.00		
S15	1.28	1.29	0.78	59.82	1.42	1.42	0.00	49.68	49.68	0.00		
S16	1.04	1.05	0.96	39.03	1.64	1.63	-0.61	40.47	40.46	-0.02		
S17	7.33	7.37	0.55	91.13	3.26	3.25	-0.31	44.38	44.38	0.00		
S18	2.30	2.31	0.43	68.17	2.31	2.30	-0.43	48.60	48.60	0.00		
S19	6.90	6.94	0.58	90.14	3.86	3.85	-0.26	56.47	56.47	0.00		
S20	7.97	8.01	0.50	88.16	2.20	2.19	-0.45	38.61	38.61	0.00		
S21	1.98	1.99	0.51	85.82	3.19	3.18	-0.31	86.42	86.42	0.00		
S22	8.27	8.31	0.48	95.75	3.75	3.73	-0.53	60.94	60.94	0.00		
S23	5.63	5.66	0.53	55.33	3.50	3.48	-0.57	42.07	42.07	0.00		
S24	5.46	5.49	0.55	55.26	4.20	4.18	-0.48	44.45	44.45	0.00		
S25	5.49	5.52	0.55	64.14	4.20	4.18	-0.48	49.27	49.27	0.00		
S26	5.75	5.78	0.52	57.30	4.09	4.08	-0.24	45.56	45.56	0.00		
S27	6.05	6.08	0.50	58.47	4.24	4.22	-0.47	46.21	46.21	0.00		

3 枳壳 HPLC 指纹图谱的建立

3.1 色谱条件

色谱柱: Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 (A) -0.1% 的磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~35 min, 30%~50% A; 35~45 min, 50%~70% A; 45~50 min, 70%~75% A; 50~70 min, 75%~100% A)。体积流量 1 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 330 nm, 进样体积 10 μL。

3.2 对照品溶液的制备

分别取芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇

溶解并定容至刻度, 制成含芸香柚皮苷 0.05 mg/mL、柚皮苷 0.7 mg/mL、橙皮苷 0.04 mg/mL、新橙皮苷 0.5 mg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

3.3 供试品溶液的制备

供试品溶液制备同“2.2.3”项下方法。

3.4 精密度试验

取“3.1.2”项下对照品 10 μL, 按“3.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.23%、1.06%、1.94%、1.82%, 表明仪器精密度良好。

3.5 重复性试验

取同一批枳壳供试品(S1),按“2.2.3”项下方法制备6份供试品溶液,按“3.1.1”项下色谱条件测定,测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷峰面积的RSD分别为1.70%、1.14%、1.00%、0.21%,表明该方法重复性良好。

3.6 稳定性试验

取同一批枳壳供试品(S1),按“2.2.3”项下方法制备,按“3.1.1”项下色谱条件,分别于0、2、4、8、12、20、24 h测定,测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷峰面积的RSD分别为1.99%、1.55%、1.76%、1.83%。

3.7 枳壳饮片指纹图谱的建立及共有峰的鉴定

按“2.2.3”项下方法制备27批枳壳供试品溶液,按“3.1.1”项下色谱条件测定,得到27批枳壳饮片样品HPLC指纹图谱,见图2。将其全部导入《中药色谱特征图谱相似度评价系统软件》(2012版),设定S1为参照图谱,采用中位数法生成共有模式图,共确定11个共有色谱峰,见图3。通过与对照品图谱对照,指认其中4个色谱峰,即峰3为芸香柚皮苷,峰4为柚皮苷,峰5为橙皮苷,峰6为新橙皮苷。

3.8 共有峰的相对峰面积

以峰4为对照峰(S),计算其他10个共有峰的相对峰面积,结果见表7。

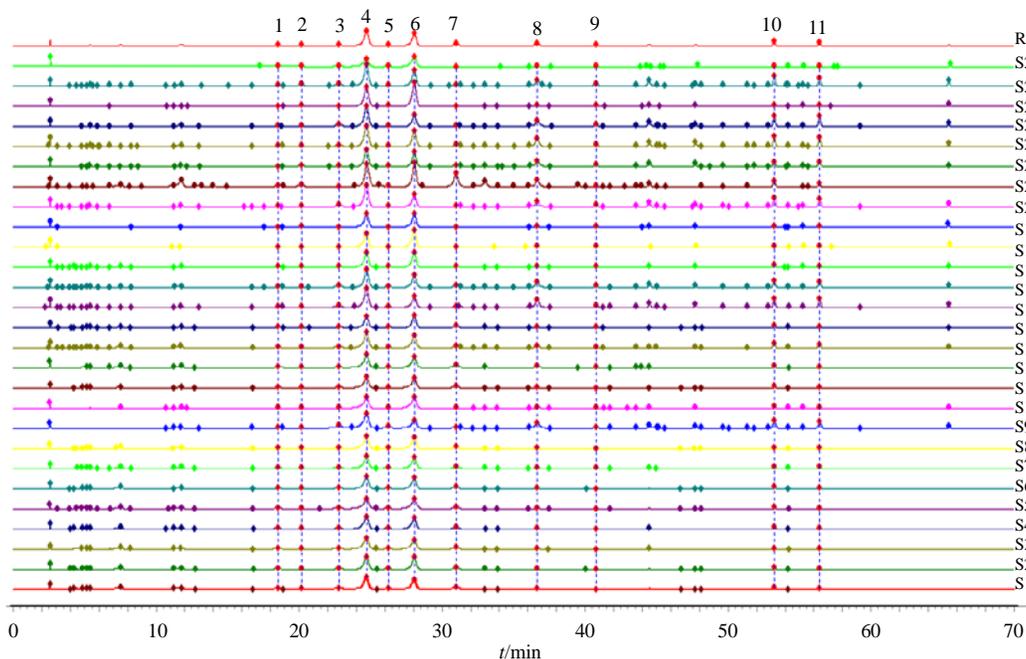
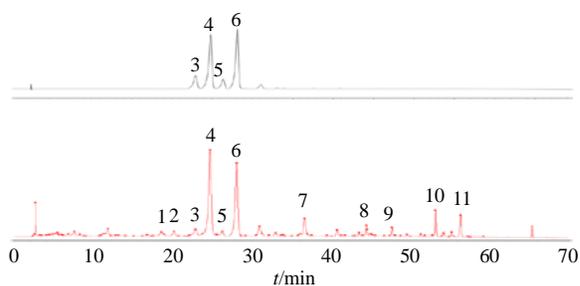


图2 枳壳饮片的HPLC指纹图谱

Fig.2 HPLC fingerprints of *Aurantii Fructus*



3-芸香柚皮苷 4-柚皮苷 5-橙皮苷 6-新橙皮苷
3-narirutin 4-naringin 5-hesperidin 6-neohesperetin

图3 混合对照品色谱图(A)及枳壳饮片HPLC指纹图谱共有模式(B)

Fig. 3 Mixed control product chromatogram (A) and common pattern of HPLC fingerprints decoction pieces of *Aurantii Fructus* (B)

3.9 指纹图谱相似度评价

以27批样品指纹图谱共有模式为对照,计算各批次样品相似度,结果见表8。S9、S15、S16、S20、S22、S23、S24、S26的相似度分别为0.956、0.963、0.989、0.973、0.989、0.979、0.956、0.988, S25的相似度为0.974, S21的相似度为0.950,其余批号相似度均大于0.990。

3.10 聚类分析(CA)

以11个共有峰峰面积为变量,导入SPSS 20.0软件,选择平方欧式距离为测度进行CA,结果见图4。当分类距离为5时,可分为4类, S1~8、S10~14、S17~19、S27聚为一类, S9、S15、S16、S20、S22~24、S26聚为一类, S25聚为一类, S21聚为一

表 7 27 批样品共有峰相对峰面积

Table 7 Relative peak areas of common peaks for 27 batches of samples

样品	共有峰相对峰面积										
	1	2	3	4(S)	5	6	7	8	9	10	11
S1	0.09	0.04	0.11	1.00	0.07	0.81	0.14	0.03	0.03	0.07	0.06
S2	0.1	0.04	0.10	1.00	0.08	0.9	0.16	0.04	0.03	0.07	0.06
S3	0.11	0.04	0.11	1.00	0.07	0.79	0.14	0.06	0.02	0.06	0.05
S4	0.09	0.04	0.09	1.00	0.07	0.83	0.16	0.03	0.02	0.07	0.06
S5	0.11	0.04	0.11	1.00	0.08	0.87	0.15	0.08	0.03	0.08	0.06
S6	0.08	0.04	0.10	1.00	0.08	0.86	0.16	0.03	0.03	0.06	0.06
S7	0.09	0.04	0.13	1.00	0.08	0.87	0.15	0.05	0.03	0.09	0.07
S8	0.08	0.04	0.11	1.00	0.08	0.84	0.15	0.03	0.02	0.06	0.06
S9	0.03	0.04	0.24	1.00	0.10	0.55	0.07	0.33	0.05	0.24	0.22
S10	0.05	0.04	0.06	1.00	0.04	0.99	0.07	0.12	0.04	0.08	0.07
S11	0.09	0.04	0.10	1.00	0.07	0.83	0.17	0.06	0.03	0.08	0.06
S12	0.08	0.04	0.09	1.00	0.06	0.81	0.24	0.09	0.03	0.07	0.05
S13	0.09	0.04	0.11	1.00	0.07	0.77	0.13	0.13	0.04	0.13	0.11
S14	0.11	0.06	0.11	1.00	0.09	1.02	0.16	0.05	0.04	0.09	0.07
S15	0.03	0.05	0.13	1.00	0.07	0.56	0.05	0.34	0.07	0.22	0.22
S16	0.05	0.04	0.13	1.00	0.08	0.67	0.10	0.26	0.05	0.18	0.17
S17	0.04	0.03	0.07	1.00	0.06	0.91	0.07	0.05	0.02	0.05	0.04
S18	0.03	0.04	0.04	1.00	0.06	1.08	0.01	0.04	0.04	0.04	0.03
S19	0.02	0.04	0.03	1.00	0.04	0.91	0.02	0.08	0.03	0.04	0.04
S20	0.04	0.05	0.10	1.00	0.03	0.55	0.05	0.26	0.06	0.20	0.20
S21	0.06	0.09	0.01	1.00	0.03	0.99	0.58	0.25	0.06	0.13	0.07
S22	0.01	0.08	0.05	1.00	0.05	0.81	0.10	0.33	0.07	0.15	0.15
S23	0.03	0.04	0.10	1.00	0.05	0.70	0.08	0.34	0.07	0.24	0.21
S24	0.04	0.04	0.12	1.00	0.03	0.50	0.05	0.28	0.06	0.25	0.24
S25	0.03	0.05	0.04	1.00	0.05	1.12	0.02	0.05	0.03	0.03	0.03
S26	0.03	0.07	0.11	1.00	0.05	0.69	0.07	0.25	0.07	0.22	0.18
S27	0.04	0.03	0.03	1.00	0.06	1.14	0.02	0.10	0.04	0.07	0.05
均值	0.06	0.05	0.09	1.00	0.06	0.83	0.12	0.14	0.04	0.11	0.10

表 8 27 批枳壳饮片样品相似度分析结果

Table 8 Similarity of common peaks for 27 batches of samples

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.993	S15	0.963
S2	0.992	S16	0.989
S3	0.994	S17	0.991
S4	0.993	S18	0.991
S5	0.995	S19	0.992
S6	0.993	S20	0.973
S7	0.994	S21	0.950
S8	0.993	S22	0.989
S9	0.956	S23	0.979
S10	0.991	S24	0.956
S11	0.995	S25	0.974
S12	0.993	S26	0.988
S13	0.999	S27	0.990
S14	0.990		

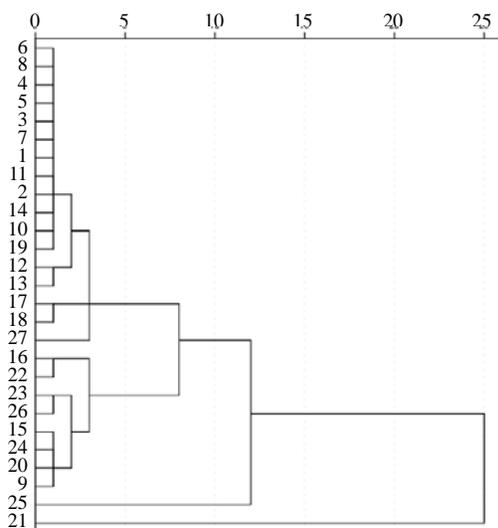


图 4 27 批枳壳饮片聚类分析树状图

Fig. 4 Cluster analysis dendrogram for 27 batches of samples

类。聚类趋势与相似度评价基本一致。

3.11 主成分分析 (PCA)

PCA 是在尽可能保持原有数据信息的前提下, 通过降维处理达到简化指标的目的。本实验将 27 批样品的 11 个共有峰峰面积导入 SPSS20.0 软件, 计算相关系数矩阵、特征值和方差贡献率, 进行 PCA 分析, 并将特征值大于 1 的成分提取出来, 得到数个主成分, 结果见表 9、10。由表 9 可知, 前 3 个主成分特征值大于 1, 对方差的累积贡献率为 88.801%, 因此枳壳饮片的多个成分可以简化为 3 个主成分进行分析。

载荷的绝对值越大, 对主成分的贡献越大。由表 10 可知, 峰 8、9、10、11、4 在主成分 1 上有较高的载荷, 峰 7、6、2 在主成分 2 上有较高的载荷, 峰 5、3 在主成分 3 上有较高的载荷, 绝对值大于 0.7。参照对照品谱图, 可以知道峰 3 为芸香柚皮苷, 峰 4 为柚皮苷, 峰 5 为橙皮苷, 峰

表 9 特征值与贡献率

Table 9 Eigen values and contribution rate result

主成分	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%
1	5.535	50.316	50.316
2	2.648	24.069	74.385
3	1.586	14.416	88.801
4	0.718	6.526	95.326
5	0.284	2.581	97.907
6	0.111	1.013	98.920
7	0.060	0.545	99.466
8	0.029	0.264	99.730
9	0.019	0.170	99.900
10	0.008	0.077	99.977
11	0.003	0.023	100.000

表 10 旋转后公共因子载荷矩阵表

Table 10 Public factor loading matrix after rotation

峰号	主成分		
	1	2	3
8	0.963	0.112	0.070
9	0.960	0.202	-0.052
10	0.960	0.007	0.221
11	0.953	-0.132	0.219
4	0.844	0.427	0.011
7	0.021	0.916	0.118
6	0.117	0.743	-0.435
2	0.596	0.741	-0.172
5	0.182	-0.091	0.807
3	0.559	-0.295	0.746
1	-0.452	0.477	0.634

6 为新橙皮苷。

4 讨论

本实验分别考察了样品溶液的提取方法 (加热回流和超声)、提取溶媒 (纯甲醇、乙醇、80% 甲醇)、溶媒用量 (100、150、200 倍) 和提取时间 (1、1.5、2 h), 在保证既节约成本、有效利用, 又操作简单的条件下, 最终确定以甲醇 50 mL (100 倍) 回流提取 1.5 h 作为供试品的制备方法。色谱条件考察了流动相种类 (甲醇-0.1% 磷酸水、甲醇-水、乙腈-0.1% 磷酸水等) 和等度洗脱的流动相比比例 (16:84、18:82、19:81), 实验发现以乙腈-0.1% 磷酸水为流动相, 18:82 等度洗脱时出峰多, 峰形好且分离度高, 因此选择此系统为更优的色谱条件。

目前, QAMS 法已在多种中药材、饮片以及中药制剂的多成分的含量测定中得到广泛认可和应用^[13], 《中国药典》2015 年版中就已收录用 QAMS 法对黄连、丹参等中药进行含量测定^[14]。本研究利用枳壳黄酮类化合物结构的相似性, 建立了 QAMS 法用于枳壳饮片中的 4 种成分的初步测定。研究选择的芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷成分在枳壳药材中含量较大, 具有一定的生物活性, 可以反映药材的内在质量。其中柚皮苷化学性质稳定, 作为内参物, 具有一定的代表性。通过比较本法和外标法, 相对误差的结果表明所建立的枳壳“一测多评”含量测定方法与外标法的测定结果无显著性差异, 表明建立的方法具有良好的可信度。同时研究考察了不同高效液相色谱仪及色谱柱对相对校正因子的影响, 验证了 QAMS 法在枳壳质量控制中的准确性和可行性。本研究可以为枳壳饮片多指标质量控制模式提供新方法, 为修订枳壳饮片的质量标准和评价提供参考依据。

枳壳中含有多种化学成分, 测定一个或几个指标成分往往具有局限性, 不能充分反映其质量。因此建立全面系统的特征性指纹图谱是评价和控制质量的有效方法。通过化学计量法 (CA、PCA) 的分析, 表明枳壳饮片具有明显分类趋势。通过相似度分析、CA、PCA 模式识别等分析方法结果相互印证, 对所收集到的 27 批枳壳饮片进行分类并筛选出共有的特征成分和影响其质量关键的色谱峰, 为枳壳饮片鉴别和质量控制提供依据。

综上, 本研究以芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮

昔、新橙皮苷4种成分作为指标建立QAMS法测定枳壳含量的同时,建立枳壳的HPLC指纹图谱将定性的指纹图谱与定量的QAMS结合起来。其操作简便、结果准确、重复性好、专属性强,可以为枳壳的质量评价等研究提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 四部 2015: 191.
- [2] 张智敏, 聂菀, 李亚梅, 等. 聚类分析结合主成分分析评价不同产地枳壳药材的一致性与差异性 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(4): 30-36.
- [3] 罗小泉, 杨武亮, 周至明, 等. 中药枳壳药材的研究概况 [J]. 江西中医学院学报, 2006, 18(2): 45-47.
- [4] 舒尊鹏, 胡书法, 翟亚东, 等. 中药枳壳化学成分及药理作用研究 [J]. 科技创新与应用, 2012(17): 8-9.
- [5] Tan W, Li Y, Wang Y, *et al.* Anti-coagulative and gastrointestinal motility regulative activities of *Fructus Aurantii immaturus* and its effective fractions [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 244-252.
- [6] He Y J, Cheng P, Wang W, *et al.* Rapid investigation and screening of bioactive components in Simo decoction via LC-Q-TOF-MS and UF-HPLC-MD methods [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1792.
- [7] Zhang J, Gao W, Liu Z, *et al.* Systematic analysis of main constituents in rat biological samples after oral administration of the methanol extract of fructus aurantii by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Iran J Pharm Res*, 2014, 13(2): 493-503.
- [8] 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.
- [9] 董秋菊, 周园, 冯薇, 等. 指纹图谱结合一测多评法在五子衍宗丸质量评价中的应用 [J]. 中药材, 2019, 42(3): 579-583.
- [10] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.
- [11] 周欣, 张琳, 毛婵, 等. 基于化学计量学方法结合正交偏最小二乘判别分析的陈皮饮片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2194-2200.
- [12] 裴玉琼, 石海培, 严辉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多成分一测多评法定量的炙甘草饮片质量评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4293-4304.
- [13] 左岚, 孟胜男. 一测多评法在中药药物分析中的应用进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(18): 2589-2592.
- [14] 杨洋, 黄良永, 朱美玲, 等. 一测多评法在中国药典2015年版中的应用 [J]. 中南药学, 2017, 15(12): 1738-1741.

[责任编辑 时圣明]