

## 不同基原枳实药材的质量差异评价研究

陆超颖<sup>1,2</sup>, 王佳丽<sup>1,2</sup>, 王洪兰<sup>1</sup>, 池玉梅<sup>1</sup>, 张雯<sup>1,2</sup>, 赵晓莉<sup>1,2\*</sup>, 狄留庆<sup>1,2\*</sup>

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 通过比较性状、浸出物、生物碱和黄酮成分的含量、指纹图谱等内容来系统研究基原为酸橙 *Citrus aurantium* 和甜橙 *C. sinensis* 的枳实药材质量差异, 以期建立一个多元的枳实药材质量控制体系。方法 按照《中国药典》2020年版枳实项下对酸橙和甜橙枳实药材进行质量评价和比较, 通过 HPLC 法对枳实进行定性及定量分析, 分别建立不同基原枳实药材的指纹图谱并对其 9 个主要的黄酮成分进行含量测定。结果 不同基原的枳实药材浸出物含量差异明显, 而辛弗林含量没有显著性差异; 甜橙枳实中不含新橙皮苷, 而酸橙枳实中该成分含量最高; 除桔皮素外, 2 个基原枳实的其他黄酮成分含量均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 通过指纹图谱的模式识别, 2 种枳实分类情况与其产地分布较为吻合; 通过正交偏最小二乘判别分析筛选出了柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷这 3 个差异性成分。结论 不同基原枳实药材在浸出物含量、主要黄酮类成分的种类及含量等方面均存在一定的差异性, 对其进行的质量差异研究及指纹图谱的比较, 可以为枳实临床用药选择、新药开发、药材质量控制等方面提供依据。

**关键词:** 枳实; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)14-4493-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.028

## Study on quality difference of *Aurantii Fructus Immaturus* from different origins

LU Chao-ying<sup>1,2</sup>, WANG Jia-li<sup>1,2</sup>, WANG Hong-lan<sup>1</sup>, CHI Yu-mei<sup>1</sup>, ZHANG Wen<sup>1,2</sup>, ZHAO Xiao-li<sup>1,2</sup>, DI Liu-qing<sup>1,2</sup>

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** The quality differences of two origins of Zhishi (*Aurantii Fructus Immaturus*) were studied by comparing their characters, extractives, synephrine, fingerprint and flavonoid contents. **Methods** The quality of *Aurantii Fructus Immaturus* was evaluated and compared with that of *Aurantii Fructus Immaturus* under the items of character, extract and content determination of *Aurantii Fructus Immaturus* in *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition). Then, the qualitative and quantitative analysis of *Aurantii Fructus Immaturus* was carried out by HPLC, and the fingerprints of different *Aurantii Fructus Immaturus* were established and the nine main flavonoids were determined. **Results** There was significant difference in the content of extracts from different varieties of *Aurantii Fructus Immaturus*, but no significant difference in the content of synephrine. There was no new hesperidin in sweet orange immature orange, but the content of this component was the highest in *Citrus Aurantii*. There was a significant difference in the content of flavonoids in the two varieties except for tangerine peel ( $P < 0.05$ ). Through the pattern recognition of fingerprint, the classification of the two origins of *Aurantii Fructus Immaturus* was consistent with the distribution of its origin. Three different components, naringin, hesperidin and neohesperidin were selected by OPLS-DA analysis. **Conclusion** There are some differences in the extract content, types and contents of the main components of different origins of *Aurantii Fructus Immaturus*. The quality difference research and fingerprint comparison in this experiment can provide the basis for clinical drug selection, new drug discovery and quality control of *Aurantii Fructus Immaturus*.

**Key words:** *Aurantii Fructus Immaturus*; high performance liquid chromatography; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; naringin; hesperidin; neohesperidin

收稿日期: 2021-12-03

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程项目 (PAPD)

作者简介: 陆超颖 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 676891730@qq.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: diliuqing@126.com

枳实为临床常用中药,具有破气消积、化痰散痞的功效。根据《中国药典》2020年版记载,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<sup>[1]</sup>。不同基原的枳实药材所含活性成分的种类、含量等方面均存在差异性,而这些差异可导致其药理作用和活性上的不同。目前,《中国药典》规定浸出物与辛弗林含量是控制枳实药材质量的2个主要指标,而研究表明,黄酮类成分在枳实中的含量较高,是其主要功效成分。因此,本研究通过对不同基原枳实药材多方面的综合考察,建立起一个多元的质量控制体系,可以更好地为临床用药的有效性和新药研发药材的选择提供保障和依据。

### 1 仪器与材料

sartorius CPA225D 型电子天平; HH-S8 型数显恒温水浴锅(江苏金怡仪器科技有限公司); Milli-Q Synthesis 108 超纯水仪; Waters e2695 型高效液相色谱仪; KH-500DE 型超声波清洗器。无水甲醇、

无水乙醇、甲酸、磷酸二氢钾、十二烷基磺酸钠、冰醋酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, Tedia 公司); 对照品辛弗林(批号 110727-201608, 质量分数 99.9%)、橙皮苷(批号 110721-201617, 质量分数 96.1%)、柚皮苷(批号 110722-201714, 质量分数 93.4%)、新橙皮苷(批号 111857-201703, 质量分数 99.2%)均购于中国食品药品检定研究院; 芸香柚皮苷(批号 P11N8L48150)、橙皮素(批号 C03F6Y1)、柚皮素(批号 YJ0603HA13)、甜橙黄酮(批号 P14M6R1)、桔皮素(批号 H09M7K14409)、川陈皮素(批号 H22M8K32109)购于上海源叶生物有限公司,质量分数均大于 98%。

枳实药材采集自重庆江津、江西樟树、江西吉安、四川眉山的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 *C. aurantium* L.及其栽培变种或甜橙 *C. sinensis* Osbeck 的干燥幼果。详细信息见表1。

表1 样品信息

Table 1 Information of samples

序号	样品编号	基原	产地	采收时间	序号	样品编号	基原	产地	采收时间
1	S1	酸橙	重庆江津白沙镇	2018-06	17	T2	甜橙	重庆江津白沙镇	2018-07
2	S2	酸橙	重庆江津白沙镇	2018-06	18	T3	甜橙	重庆江津白沙镇	2018-07
3	S3	酸橙	重庆江津白沙镇	2018-06	19	T4	甜橙	重庆江津白沙镇	2018-07
4	S4	酸橙	重庆江津白沙镇	2018-06	20	T5	甜橙	重庆江津白沙镇	2018-07
5	S5	酸橙	重庆江津白沙镇	2018-06	21	T6	甜橙	江西樟树黄土岗	2018-05
6	S6	酸橙	江西樟树黄土岗	2018-07	22	T7	甜橙	江西樟树黄土岗	2018-05
7	S7	酸橙	江西樟树黄土岗	2018-07	23	T8	甜橙	江西樟树黄土岗	2018-06
8	S8	酸橙	江西樟树黄土岗	2018-07	24	T9	甜橙	江西樟树黄土岗	2018-06
9	S9	酸橙	江西樟树黄土岗	2018-06	25	T10	甜橙	江西樟树黄土岗	2018-06
10	S10	酸橙	江西樟树黄土岗	2018-06	26	T11	甜橙	江西吉安新干县	2017-05
11	S11	酸橙	江西吉安新干县	2018-06	27	T12	甜橙	江西吉安新干县	2017-05
12	S12	酸橙	江西吉安新干县	2018-06	28	T13	甜橙	江西吉安新干县	2017-05
13	S13	酸橙	江西吉安新干县	2018-06	29	T14	甜橙	江西吉安新干县	2017-06
14	S14	酸橙	江西吉安新干县	2018-06	30	T15	甜橙	江西吉安新干县	2017-06
15	S15	酸橙	江西吉安新干县	2018-06	31	T16	甜橙	四川眉山丹棱县	2018-07
16	T1	甜橙	重庆江津白沙镇	2018-07	32	T17	甜橙	四川眉山丹棱县	2018-07

## 2 方法与结果

### 2.1 不同基原枳实药材性状比较

随机选取酸橙与甜橙枳实不同产地的某一编号样品,对其进行性状分析,结果见图1,并从以上编号中每批随机选取6枚枳实,用游标卡尺(精度

为0.02 mm)测量其瓢囊及横切面直径,计算瓢囊占横切面积的百分比,结果见表2。酸橙、甜橙瓢囊占比差异性分析见图2。可以看出,2种基原的枳实药材多呈半球形,少数为球形。质地坚硬,气清香。药材外果皮颜色为棕褐色或灰绿色,外表有皱



A~C-酸橙枳实(分别产自重庆江津白沙镇、江西樟树黄土岗、江西吉安新干县, 瓢囊占比较小) D~F-甜橙枳实(分别产自重庆江津白沙镇、江西樟树黄土岗、江西吉安新干县, 瓢囊占比较大)

A~C-*C. aurantium* L. (From Baisha Town, Jiangjin, Chongqing. Huangtu Gang, Zhangshu, Jiangxi. Xingan County, Ji'an, Jiangxi. Proportion of pulp sac is small) D~F-*C. sinensis* Osbeck (From Baisha Town, Jiangjin, Chongqing. Huangtu Gang, Zhangshu, Jiangxi. Xingan County, Ji'an, Jiangxi. Proportion of pulp sac is large)

图1 不同基原产地枳实药材性状

Fig. 1 Characteristic map of samples from different varieties and producing areas

表2 不同基原代表性枳实药材瓢囊面积占横切面面积百分比

Table 2 Percentage of pulp capsule area in cross section area of different varieties of *Aurantii Fructus Immaturus*

编号	瓢囊直径/mm	横切面直径/mm	瓢囊面积/mm <sup>2</sup>	横切面面积/mm <sup>2</sup>	占比/%	平均值/%
S4	7.10	21.52	39.57	363.54	10.89	15.16
	7.32	22.44	42.06	395.29	10.64	
	9.12	25.14	65.29	496.14	13.16	
	9.98	22.54	78.19	398.82	19.60	
	10.52	24.48	86.88	470.43	18.47	
	11.34	26.56	100.95	553.77	18.23	
S6	4.50	13.18	15.90	136.36	11.66	13.83
	5.38	15.78	22.72	195.47	11.62	
	3.98	10.26	12.43	82.64	15.05	
	5.16	16.22	20.90	206.52	10.12	
	5.54	14.62	24.09	167.79	14.36	
	6.16	13.72	29.79	147.77	20.16	
S11	4.22	13.38	13.98	140.53	9.95	10.65
	3.98	12.12	12.43	115.31	10.78	
	5.06	12.58	20.10	124.23	16.18	
	3.56	10.68	9.95	89.54	11.11	
	2.44	10.24	4.67	82.31	5.68	
	3.14	9.82	7.74	75.70	10.22	
T1	14.36	25.06	161.87	492.98	32.84	45.63
	15.44	22.64	187.14	402.37	46.51	
	14.90	21.36	174.28	358.16	48.66	
	18.98	24.64	282.79	476.60	59.34	
	17.76	23.02	247.60	415.99	59.52	
	12.02	23.18	113.42	421.79	26.89	
T8	14.26	24.14	159.63	457.45	34.90	31.17
	15.22	25.98	181.84	529.84	34.32	
	11.96	24.06	112.29	454.42	24.71	
	11.88	21.10	110.79	349.49	31.70	
	11.22	22.50	98.82	397.41	24.87	
	14.24	23.56	159.18	435.73	36.53	
T14	8.62	16.22	58.33	206.52	28.24	30.13
	9.42	15.72	69.66	193.99	35.91	
	9.24	18.56	67.02	270.41	24.78	
	7.66	16.12	46.06	203.99	22.58	
	10.86	16.64	92.58	217.36	42.59	
	9.20	17.82	66.44	249.28	26.65	

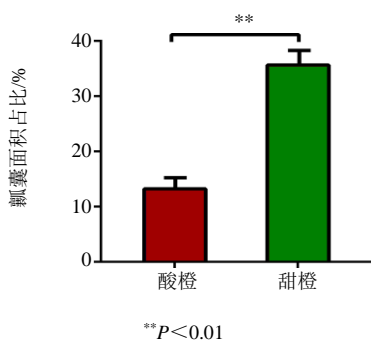


图2 酸橙、甜橙枳实瓤囊面积占比差异性分析

Fig. 2 Analysis on difference of percentage of pulp capsule area in samples

纹,有些具有残留的果梗,中果皮稍隆起且呈黄白(褐)色,瓢囊棕色。2种枳实药材所表现出的性状与《中国药典》2020年版中对枳实的描述基本一致。不同产地的酸橙样品与甜橙样品相比较,酸橙枳实样品的瓢囊占比较小,即中果皮相对较厚。这一结论与文献报道<sup>[2]</sup>中的一致。另外,不同产地的甜橙枳实在性状上比较接近,而酸橙枳实由于产地的不同表现出外观的大小不一。

### 2.2 浸出物含量测定

浸出物含量照《中国药典》2020年版醇溶性浸出物测定法(通则2201)项下的热浸法测定,用70%乙醇作溶剂。除去经甲苯法(通则0832第四法)所测得的水分,按干燥品计算浸出物的含量。测定结果见表3,浸出物含量差异性分析见图3。15批酸橙枳实的浸出物平均含量为58.19%;17批甜橙枳实的浸出物平均含量为25.12%,虽均符合药典枳实浸出物项下规定(不少于12.0%),但不同基原枳实浸出物含量差异明显( $P < 0.01$ )。

### 2.3 辛弗林含量测定

**2.3.1 色谱条件** 色谱柱为Waters X-Brige C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-磷酸二氢钾溶液(50:50)(即磷酸二氢钾0.6 g,十二烷基磺酸钠1.0 g,冰醋酸1 mL,加水溶解并稀释至1000 mL);检测波长为275 nm;体积流量为1 mL/min;柱温为30 ℃;进样量10 μL,理论塔板数(按辛弗林峰计算)应不低于2000。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 取辛弗林对照品适量,精密称定。加水制成含30.8 μg/mL的溶液,即得。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取枳实中粉约1 g,精密

表3 不同基原枳实药材的浸出物含量测定

Table 3 Determination of extract content of different kinds of *Aurantii Fructus Immaturus*

样品编号	浸出物/%	样品编号	浸出物/%
S1	56.07	T2	25.38
S2	57.81	T3	24.81
S3	59.22	T4	26.70
S4	64.36	T5	25.12
S5	59.57	T6	26.48
S6	65.26	T7	29.81
S7	65.08	T8	32.23
S8	66.71	T9	25.68
S9	53.08	T10	27.31
S10	54.13	T11	22.09
S11	57.89	T12	22.00
S12	53.42	T13	22.83
S13	53.84	T14	22.54
S14	54.66	T15	22.38
S15	51.81	T16	21.41
T1	27.46	T17	22.79

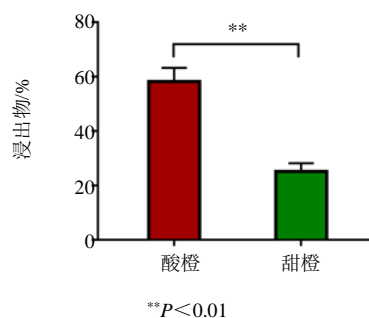


图3 样品浸出物含量差异性分析

Fig. 3 Analysis on difference of leachables content in samples

称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,加热回流1.5 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液10 mL,蒸干,残渣加水10 mL使溶解,通过聚酰胺柱(60~90目,2.5 g,内径为1.5 cm,干法装柱),用水25 mL洗脱,收集洗脱液,转移至25 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

**2.3.4 方法学考察** 精密吸取“2.3.3”项下供试品溶液10 μL,连续进样6次,再取同一供试品溶液,在制备后的0、2、4、8、12、24 h进样,结果辛弗林峰面积的RSD值均小于2.1%,说明仪器精密、供试品溶液稳定性良好;精密称取同一样品粗粉6份,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液并测定,

结果辛弗林含量的 RSD 值均小于 3%，表明该方法重复性良好；精密称取已知辛弗林含量的同批枳实粉末 6 份，每份 0.5 g，精密加入辛弗林对照品溶液，按“2.3.3”项供试品溶液制备方法处理后进样检测，结果辛弗林平均加样回收率为 98.3%，RSD 值均小于 2.2%，表明该方法准确度符合要求。

**2.3.5 样品测定结果** 取各批枳实样品，按“2.3.3”项配制供试品溶液；照“2.3.1”项色谱条件，分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，记录辛弗林峰面积，以外标法计算辛弗林的浓度。供试品平行 3 份，除去经甲苯法（通则 0832 第四法）所测得的水分，按干燥品计算样品中辛弗林的含量，结果见表 4，辛弗林含量差异性分析见图 4。根据统计数据，15 批酸橙枳实的辛弗林平均含量为 0.490%；17 批甜橙枳实的辛弗林平均含量为 0.647%，均符合药典枳实含量测定项下规定（不少于 0.30%）。2 种基原枳实中辛弗林的含量没有显著性差异（ $P>0.05$ ），其中江西樟树黄土岗的甜橙枳实辛弗林含量较其他产地高。

**2.4 黄酮类成分含量分析与指纹图谱的建立**

**2.4.1 色谱条件** 色谱柱为 Waters X-Brige C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B)；梯度洗脱条件为 0~10 min, 10%~19%A；10~25 min, 19%A；25~27 min, 19%~30%A；27~50 min, 30%~53%A；50~51 min,

表 4 不同基原枳实药材中辛弗林的含量测定

Table 4 Determination of synephrine in different varieties of *Aurantii Fructus Immaturus*

序号	样品编号	辛弗林/%	序号	样品编号	辛弗林/%
1	S1	0.429	17	T2	0.463
2	S2	0.434	18	T3	0.893
3	S3	0.410	19	T4	0.442
4	S4	0.429	20	T5	0.445
5	S5	0.501	21	T6	0.863
6	S6	0.577	22	T7	1.132
7	S7	0.579	23	T8	1.139
8	S8	0.514	24	T9	1.176
9	S9	0.363	25	T10	0.600
10	S10	0.555	26	T11	0.448
11	S11	0.520	27	T12	0.407
12	S12	0.416	28	T13	0.519
13	S13	0.750	29	T14	0.533
14	S14	0.374	30	T15	0.524
15	S15	0.496	31	T16	0.456
16	T1	0.453	32	T17	0.508

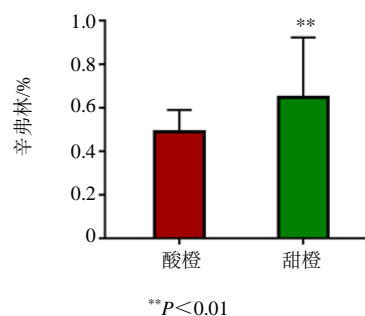


图 4 样品辛弗林含量差异性分析图

Fig. 4 Analysis of content difference of synephrine in samples

53%~75%A；51~56 min, 75%A；56~57 min, 75%~10%A；57~62 min, 10%A。检测波长为 330 nm；体积流量为 1 mL/min；柱温为 30 ℃；进样量 10 μL。

**2.4.2 对照品溶液的制备** 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，用甲醇配制成质量浓度分别为 103.57、596.00、335.47、968.53、22.55、22.97、6.67、33.07、23.34 μg/mL 的混合对照品溶液。

**2.4.3 供试品溶液的制备** 取枳实粗粉 0.1 g，精密称定，置于 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，甲醇定容，摇匀滤过，取续滤液过 0.45 μm 滤膜，即得。

**2.4.4 线性关系考察** 取“2.4.2”项下混合对照品溶液，作为标准曲线最高质量浓度，精密移取混合对照品溶液 1 mL，置于 2 mL 量瓶中，加甲醇稀释定容至刻度，混匀。依照倍比稀释法，依次制备得到不同质量浓度的混合对照品溶液，按“2.4.1”项色谱条件进样，以峰面积为纵坐标 (Y)，对照品质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线及回归方程，结果见表 5。

**2.4.5 方法学考察** 精密吸取“2.4.3”项下供试品溶液 10 μL，连续进样 6 次，再取同一供试品溶液，在制备后的 0、2、4、8、12、24 h 进样，结果 9 种成分峰面积的 RSD 值均小于 2.8%，表明仪器精密密度、供试品溶液稳定性良好；精密称取同一样品粗粉 6 份，按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算得 9 种成分含量的 RSD 值均小于 3%，表明该方法重复性良好；精密称取已测定的枳实粉末 6 份，每份

表5 9种成分的线性关系考察

成分	r	回归方程	线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
芸香柚皮苷	0.999 5	$Y=2\ 999.1 X-1\ 460.3$	1.62~103.57
柚皮苷	0.999 9	$Y=3\ 760.9 X+10\ 262$	9.31~596.00
橙皮苷	0.999 9	$Y=3\ 458.1 X+3\ 604.4$	5.24~335.47
新橙皮苷	0.999 9	$Y=4\ 111.6 X+19\ 473$	15.13~968.53
柚皮素	0.999 9	$Y=10\ 943 X+500.67$	0.35~22.55
橙皮素	0.999 9	$Y=11\ 487 X+865.8$	0.36~22.97
甜橙黄酮	0.999 8	$Y=25\ 816 X-445.27$	0.10~6.67
川陈皮素	1.000 0	$Y=12\ 673 X+1\ 354.4$	0.52~33.07
桔皮素	1.000 0	$Y=25\ 796 X+1\ 779.8$	0.36~23.34

0.05 g, 分别精密加入与样品中含量相当的9种对照品溶液, 按“2.4.3”项下方法制备供试品, 进样测定, 计算各成分的平均加样回收率及RSD, 结果表明9个成分平均加样回收率在103.5%~94.7%, RSD值均小于2.6%, 表明该方法准确度较好。

**2.4.6 样品中黄酮类成分含量测定结果** 将各供试品溶液按“2.4.1”项下的色谱条件进样检测, 记录各黄酮成分峰面积, 根据标准曲线计算黄酮类成分的浓度。供试品平行3份, 除去经甲苯法(通则0832第四法)所测得的水分, 按干燥品计算样品中黄酮类成分的含量, 结果见表6, 黄酮类成分的含量差异性分析见图5。数据显示, 酸

表6 不同基原枳实药材中的黄酮类成分种类及含量测定

Table 6 Types and contents of flavonoids in different varieties of samples

样品编号	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/%	总和/%
S1	0.356	9.166	1.152	14.980	0.018	0.016	0.007	0.076	0.018	25.788
S2	0.276	8.416	0.482	14.495	0.026	0.022	—	0.068	0.018	23.804
S3	0.314	9.187	0.733	15.685	0.019	0.016	0.004	0.082	0.021	26.059
S4	0.319	9.501	0.490	14.015	0.016	0.008	—	0.073	0.021	24.443
S5	0.306	8.003	1.082	20.123	0.037	0.036	0.006	0.093	0.023	29.709
S6	0.999	9.895	1.715	13.829	0.159	0.102	0.016	0.285	0.149	27.150
S7	1.099	10.260	1.350	13.854	0.157	0.087	0.016	0.323	0.176	27.321
S8	1.056	9.942	0.990	13.794	0.146	0.103	0.019	0.382	0.202	26.635
S9	0.486	7.212	0.519	13.313	0.047	0.025	0.014	0.208	0.084	21.908
S10	0.476	7.110	0.514	12.704	0.036	0.017	0.014	0.213	0.089	21.175
S11	0.729	4.204	2.857	16.707	0.045	0.073	0.023	0.130	0.073	24.842
S12	1.082	3.841	3.874	17.215	0.044	0.056	0.023	0.126	0.073	26.333
S13	1.138	4.418	3.083	16.418	0.059	0.096	0.026	0.160	0.085	25.483
S14	0.626	3.911	2.324	16.956	0.044	0.061	0.026	0.146	0.080	24.174
S15	1.073	4.152	4.533	16.218	0.054	0.199	0.030	0.136	0.077	26.472
T1	2.376	0.130	18.176	—	—	—	0.094	0.232	0.029	21.036
T2	2.188	0.266	19.436	—	0.017	0.026	0.051	0.361	0.154	22.498
T3	2.185	0.123	18.924	—	—	0.019	0.081	0.198	0.026	21.557
T4	2.138	0.094	18.607	—	0.008	0.012	0.076	0.181	0.024	21.139
T5	2.364	0.127	19.824	—	—	0.015	0.087	0.212	0.028	22.657
T6	1.676	0.424	24.400	—	0.021	0.043	0.022	0.471	0.257	27.313
T7	2.167	0.374	21.298	—	0.013	0.045	0.026	0.477	0.250	24.651
T8	2.460	0.433	18.267	—	0.009	0.024	0.026	0.527	0.260	22.007
T9	1.744	0.426	23.949	—	0.010	0.054	0.021	0.486	0.265	26.957
T10	1.947	0.405	23.303	—	0.010	0.045	0.025	0.484	0.263	26.482
T11	1.755	0.088	18.283	—	0.011	0.038	0.060	0.141	0.020	20.396
T12	2.096	0.112	21.322	—	0.013	0.041	0.065	0.152	0.023	23.822
T13	2.565	0.179	26.061	—	0.014	0.073	0.085	0.194	0.026	29.198
T14	1.907	0.074	18.689	—	0.011	0.018	0.061	0.143	0.021	20.924
T15	2.002	0.092	20.580	—	0.012	0.041	0.066	0.152	0.022	22.968
T16	2.006	0.318	14.069	0.154	0.017	0.016	0.083	0.201	0.028	16.892
T17	1.978	0.310	13.710	0.140	0.017	0.016	0.082	0.197	0.027	16.478



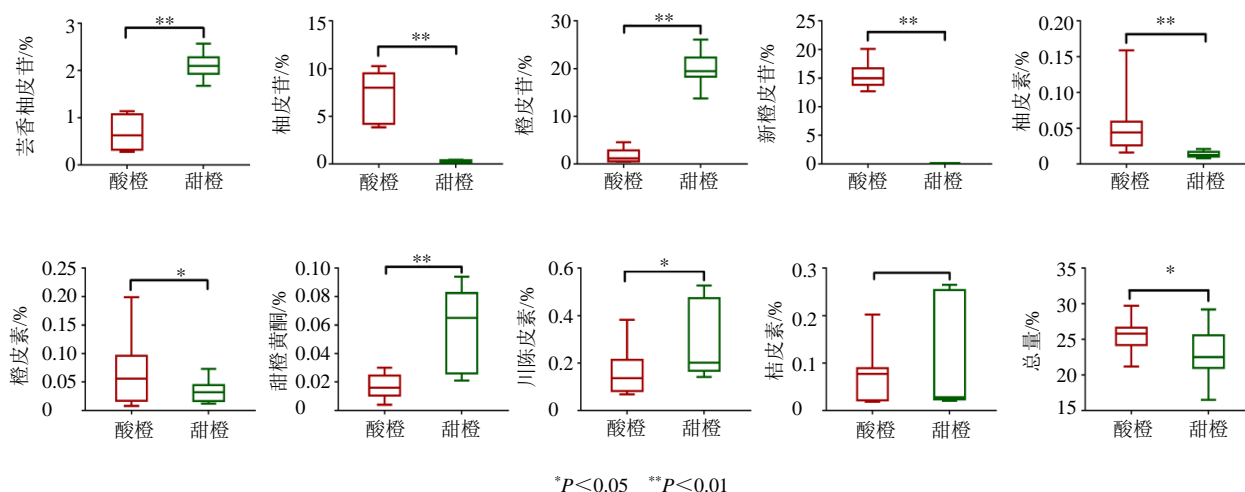


图5 样品主黄酮含量差异性分析图

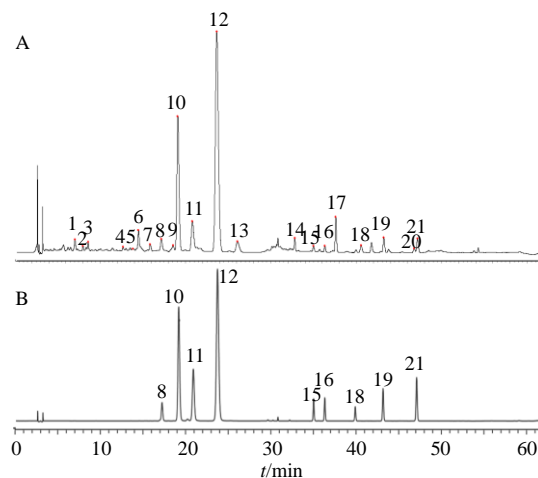
Fig. 5 Analysis of difference of content of main flavonoids in samples

橙枳实中包含了9种黄酮类成分；而甜橙枳实中，除产自四川眉山丹棱县的2个样品外，其余产地的甜橙枳实中包含了除新橙皮苷的8种黄酮类成分。且酸橙枳实以新橙皮苷、柚皮苷、橙皮苷、芸香柚皮苷为主导；甜橙枳实以橙皮苷、芸香柚皮苷、川陈皮素、柚皮苷含量占主导地位。2种基原枳实除桔皮素外，其余黄酮类成分含量均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )，总黄酮含量亦具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

**2.4.7 指纹图谱方法学考察** 精密吸取“2.4.3”项下供试品溶液 10  $\mu\text{L}$  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，再精密称取同一样品粗粉 0.1 g，按“2.4.3”项下方法同时制备 6 份供试品溶液后进样测定，以橙皮苷为参照峰，计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示，芸香柚皮苷等 9 种已知成分与橙皮苷之间的相对保留时间、各共有峰相对峰面积的 RSD 值均小于 3%。

**2.4.8 样品 HPLC 指纹图谱的建立** 将 15 批酸橙枳实的供试品溶液按“2.4.1”项下的色谱条件进样检测，所得的样品色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”软件。以 S1 指纹图谱作为参照谱，生成共有模式，标定出 21 个共有峰。精密吸取混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$  按“2.4.1”项下的色谱条件进样检测。通过与对照品保留时间及光谱图比对，指认出 9 个共有峰，见图 6。

同法 17 批甜橙枳实样品共标定出了 14 个共有峰，并指认出其中 8 个共有峰，见图 7。酸橙枳实

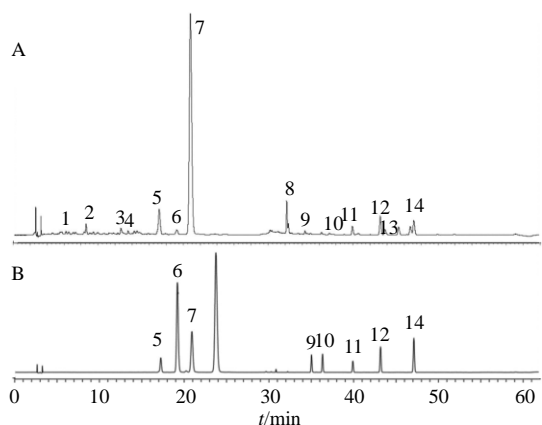


8-芸香柚皮苷 10-柚皮苷 11-橙皮苷 12-新橙皮苷 15-柚皮素 16-橙皮素 18-甜橙黄酮 19-川陈皮素 21-桔皮素  
8-narirutin 10-naringin 11-hesperidin 12-neohesperidin 15-naringenin 16-hesperetin 18-sinensetin 19-nobiletin 21-tangeretin

图6 酸橙样品 (A) 与混合对照品 (B) 的 HPLC 图  
Fig. 6 HPLC chromatograms of sample (A) and mixed standards (B)

指认出了 9 个黄酮类成分，甜橙枳实指认出了 8 个黄酮类成分，甜橙枳实缺少的为新橙皮苷。

对 2 种基原枳实样品分别进行指纹图谱测定，样品叠加图见图 8、9。以共有模式作为对照指纹图谱，进行指纹图谱相似度的评价。15 批酸橙枳实样品和对照图谱之间的相似度分别为 0.992、0.993、0.993、0.985、0.995、0.983、0.980、0.980、0.996、0.995、0.982、0.975、0.984、0.980、0.975，均大于 0.960，表明 15 批酸橙枳实药材相似度良好。17 批甜橙枳实样品与对照图谱之间的相似度分别为 0.999、



5-芸香柚皮苷 6-柚皮苷 7-橙皮苷 9-柚皮素 10-橙皮素 11-甜橙黄酮 12-川陈皮素 14-桔皮素  
5-narirutin 6-naringin 7-hesperidin 9-naringenin 10-hesperetin  
11-sinensetin 12-nobiletin 14-tangeretin

图7 甜橙样品(A)与混合对照品(B)的HPLC图

Fig. 7 HPLC chromatograms of sample (A) and mixed standards (B)

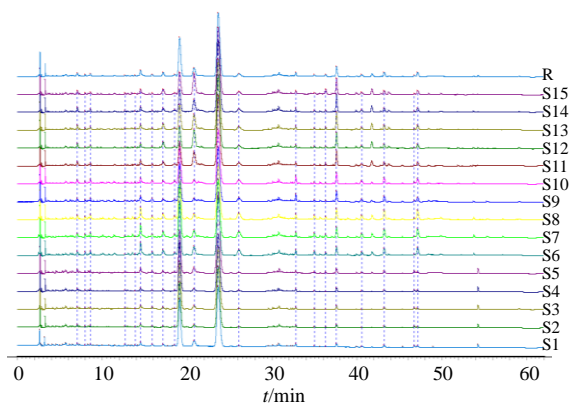


图8 15批酸橙枳实药材HPLC叠加图

Fig. 8 Overlapping HPLC chromatograms of 15 batches of samples

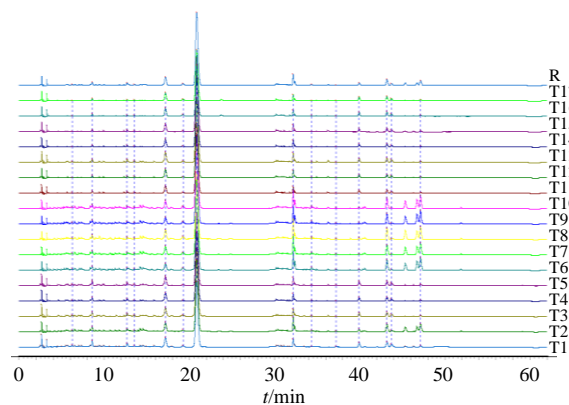


图9 17批甜橙枳实药材HPLC叠加图

Fig. 9 Overlapping chromatograms of 17 batches of samples

0.999、0.999、0.999、0.999、0.998、0.998、0.995、0.998、0.998、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999、0.999, 也均大于 0.960, 表明 17 批甜橙枳实药材相似度良好。

**2.4.9 指纹图谱的模式识别研究** 以 2 种枳实标定的共有峰峰面积为变量, 导入 SPSS 22.0 软件。对原始数据标准化后, 用欧氏距离进行聚类分析, 结果见图 10。根据聚类结果可以把枳实药材分为 7 类, 第 I 类包括 T16、T17, 产自四川眉山丹棱县; 第 II 类包括 T11、T12、T14、T15, 均产自江西吉安新干县; 第 III 类包括 T1、T3、T4、T5、T13, 其中除 T13 外, 其余样品均产自重庆江津白沙镇; 第 IV 类包括 T2、T6、T7、T8、T9、T10, 其中除 T2 外, 其余样品均产自江西樟树黄土岗; 第 V 类包括 S6、S7、S8, 均产自江西樟树黄土岗; 第 VI 类包括 S1、S2、S3、S4、S5, 均产自重庆江津白沙镇; 第 VII 类包括 S9、S10、S11、S12、S13、S14、S15, 其中除 S9、S10 外, 其余均产自江西吉安新干县。酸橙枳实根据产地不同聚为 3 类, 甜橙枳实根据产地聚为 4 类, 分类情况与枳实产地分布较为吻合, 其中部分几个样品未归在相应产地一类, 表明其与相同产地的其余批次样品间差异较大。

将各样品 28 个共有峰的峰面积导入到 SIMCA 14.1 软件, 数据经标准化后, 进行主成分分析, 结果见图 11。根据主成分结果可以把枳实药材分为 6

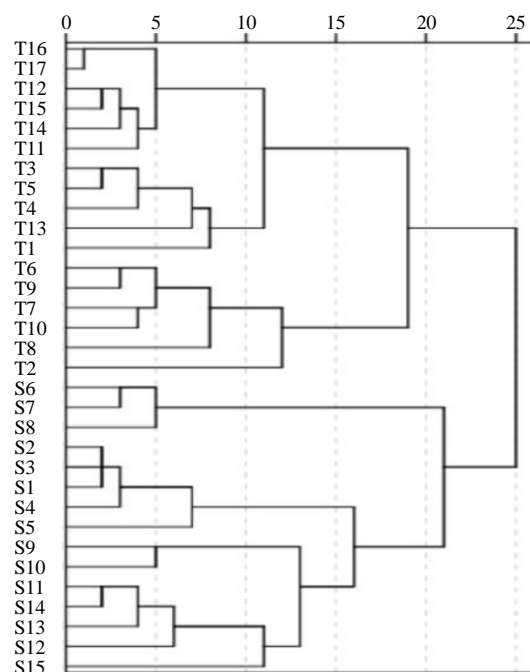


图10 聚类分析树状图

Fig. 10 Dendrogram of clustering analysis



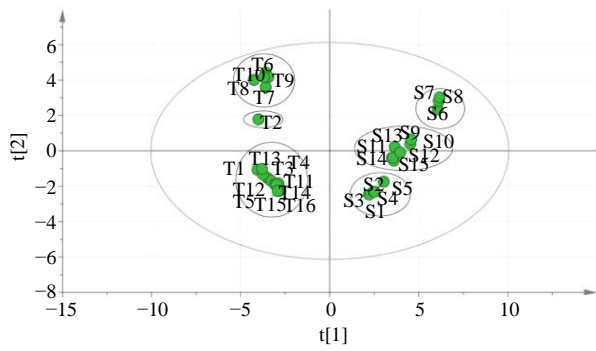


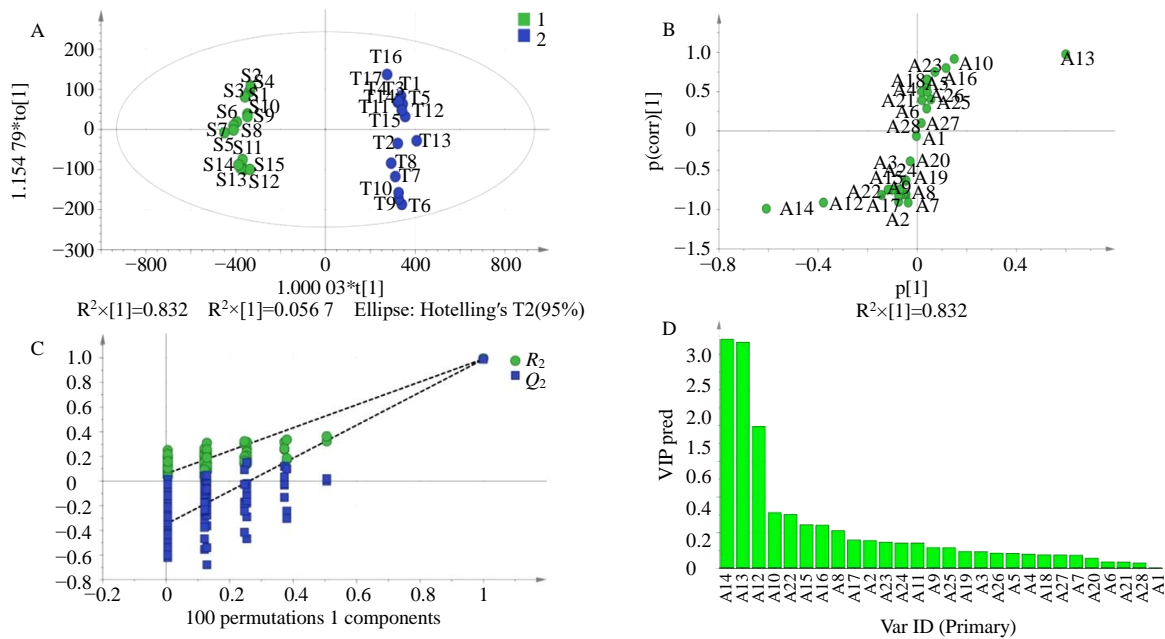
图 11 主成分分析图

Fig. 11 Principal component analysis

类: S1、S2、S3、S4、S5 归为 I 类; S6、S7、S8 归为 II 类; S9、S10、S11、S12、S13、S14、S15 归为 III 类; T1、T3、T4、T5、T11、T12、T13、T14、T15、T16、T17 归为 IV 类; T6、T7、T8、T9、T10 归为 V 类, T2 单独归为 VI 类。I 类为重庆江津白沙镇的酸橙枳实, II 类为产自江西樟树黄土岗的酸橙枳实, III 类酸橙枳实中, 除 S9、S10 外, 其余均产自江西吉安新干县, IV 类为重庆江津白沙镇、江西吉安新干县、四川眉山丹棱县 3 个产地的甜橙枳实, 第 V 类是江西樟树黄土岗的甜橙枳实, VI 类只有产自重庆江津白沙镇的 T2 甜橙枳实样品。

将各样品 28 个共有峰的峰面积导入 SIMCA

14.1 软件, 进行正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 筛选出差异性化合物。对酸橙组与甜橙组建模, 模型参数  $R^2X=0.832$ ,  $R^2Y=0.986$ ,  $Q^2=0.985$ 。结果见图 12。从 OPLS-DA 得分图 (图 12-A) 可见得分值集中分布于 95% 置信区间, 模型拟合效果好。S-plot (图 12-B) 中 12、13、14 号峰 (A12、A13、A14) 位于 S-plot 两端, 对应成分为柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷, 可筛选其作为差异性标记物。构建 OPLS-DA 的模型验证试验, 假设检验次数设为 100, 置换检验图 (图 12-C) 中显示, 获得随机模型的  $Q^2$  值均小于原模型的  $Q^2$  值, 表明模型具有良好的稳定性, 拟合良好。根据变量权重重要性 (Variable importance in the projection, VIP) 排序预测值分布图 (图 12-D), 提取  $VIP>1$  的变量, 分别为 12、13、14 号峰, 其在 S-plot 中距离原点均有较大的距离, 表明它们对分类的贡献较大, 提示其可能为 2 种不同基原枳实的差异性成分。其中, 14 号峰新橙皮苷的 VIP 值最大, 是基原鉴别最重要的标识物。将 32 批样品 28 个共有峰的峰面积导入 OmicShare 网站, 所有数据归一化后进行聚类热图分析, 结果见图 13。从聚类热图中可以看出, 15 个酸橙枳实



A-OPLS-DA 得分图 B-S-plot 图 C-100 次置换检验图 D-VIP 值图 A1~A28-峰 1~28

A-OPLS-DA score chart B-S-plot diagram C-inspection chart of 100 times replacement D-variable importance in the projection A1~A28-peak 1~28

图 12 OPLS-DA 结果图

Fig. 12 Graph of orthogonal partial least squares discriminant analysis

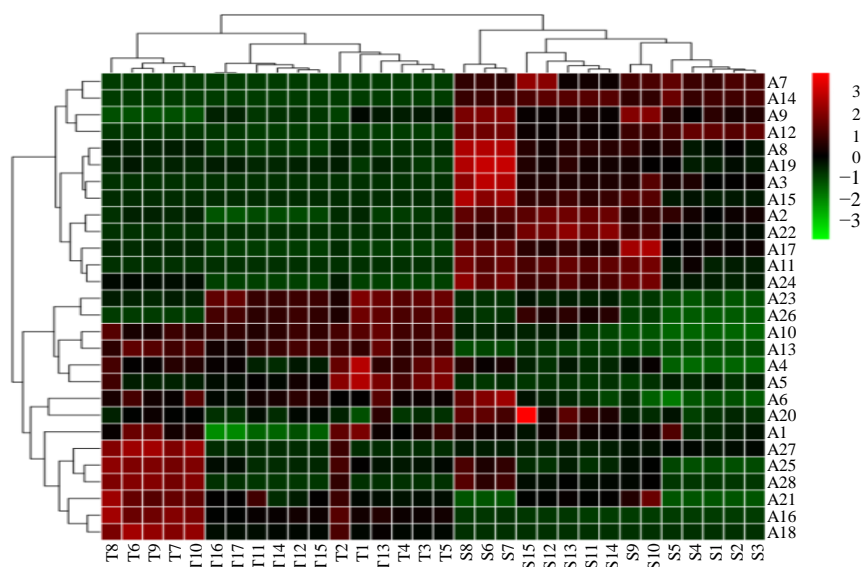


图 13 聚类热图

Fig. 13 Cluster heat map

样本聚为一类，17个甜橙枳实样本聚为一类，这与枳实基原的分类相符。色谱峰聚类表明：2~3、7~15、17、19、22~24、26号峰在不同基原枳实中差异较大，是区别2种枳实的强特征峰。

### 3 讨论

同一药材可能存在多基原现象，而基原的不同会导致所含活性成分的差异，进而会引起药物疗效的差别。枳实中醇浸出物含量会影响枳实药材的贮存及质量，故控制醇浸出物的含量对评价枳实质量有重要的意义<sup>[3]</sup>，但目前浸出物含量是否与枳实基原有关则很少见文献报道。生物碱类成分辛弗林是枳实中的有效成分之一，具有强心、升血压与抗组胺<sup>[4]</sup>的药理作用。枳实中生物碱成分的含量多少受药材采收时间、存放时间等因素影响<sup>[5]</sup>，采收的适宜期应为5月下旬，药材存放时间越长，生物碱含量则会降低。

对于枳实药材的质量控制，《中国药典》2020年版目前规定只对辛弗林进行含量测定，但枳实中的其他成分如黄酮类<sup>[6]</sup>也具有显著的药理活性，因此，只对单一的成分进行质量控制不能全面体现药材的质量。中药指纹图谱因信息量大、整体性好、特征性强<sup>[7]</sup>，可以很好地反映出中药多种成分、整体作用的特点。黄酮类成分在枳实中的含量较高，是其主要功效成分，主要为橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、柚皮芸香苷等<sup>[8]</sup>。现代研究发现，枳实的黄酮类成分具有抑制胃肠道平滑肌痉挛性收缩、抗炎、

抗氧化<sup>[9]</sup>等作用，这与枳实临床用于破气消积，治疗胃胀痛、胃溃疡等胃肠道疾病的功效相一致。有文献<sup>[10]</sup>报道称，不同基原枳实的黄酮类成分存在种类与含量差异，而这些差异可能进一步导致该药材药理作用及活性上的差异。本实验中黄酮类含量测定方法<sup>[11]</sup>参考了本课题组前期的研究。结果表明，甜橙枳实中不含有新橙皮苷，且不同基原的枳实黄酮类成分含量存在显著性差异。

近年来，许多研究人员对酸橙与甜橙枳实进行了质量差异的比较。其中关于酸橙与甜橙枳实黄酮类成分的含量测定研究，大多表明两者黄酮含量存在差异性<sup>[12-15]</sup>，但并未解释产生这种现象的原因。本实验研究发现，酸橙枳实总黄酮含量、浸出物含量均比甜橙枳实高，而又由于其瓢囊面积占横切面面积远小于甜橙枳实（即中果皮较厚），推测枳实中黄酮类成分与醇溶性浸出物主要存在于中果皮中。即酸橙枳实的总黄酮、浸出物含量高与其中果皮较厚有关。并且通过性状分析发现，酸橙枳实除瓢囊面积占比小之外，其横切面直径也比甜橙枳实小，印证了《本草图经》中“今医家多以皮厚而小者为枳实”<sup>[16]</sup>这一对酸橙枳实的描写。现代中医临床实践证明，来源于酸橙的枳实更适合现代中医临床病症<sup>[17]</sup>，本实验的研究结果也为这一观点提供了依据。从产地上来看，江西樟树黄土岗的酸橙枳实浸出物含量最高，且该地的甜橙枳实辛弗林含量也相对较高。研究结果验证了现代枳实以江西为道地产

区,品质以江西樟树最优<sup>[18]</sup>这一说法的科学性。实际应用中,可根据具体情况来选择不同基原、不同产地的枳实,以适应临床用药的需要,达到对药用资源的合理利用。此外,在2种枳实的质量均一性上,有研究者认为不同产地的酸橙枳实质量均一性较好,甜橙枳实质量差异较大<sup>[19]</sup>。而本实验的性状分析、相似度分析、主成分分析结果显示,甜橙枳实质量较为均一,分析产生不同结论的原因可能是实验所选取的枳实药材产地不同。除重庆、江西、四川外,陕西、江苏、福建、浙江、湖南等地亦为枳实的常见产地<sup>[20]</sup>。另外,考虑到树龄对于枳实的质量评价也会存在一定影响,后期实验还可以采集不同地区、不同树龄所产的枳实药材,进一步对枳实不同产地、树龄与其质量之间进行比较研究。

本实验分别建立了2个基原枳实的HPLC指纹图谱,并对其进行了模式识别研究。采用聚类分析、主成分分析、聚类热图分析对不同基原产地的枳实药材进行了质量分类,分类情况与枳实基原、产地分布较为吻合。利用OPLS-DA筛选出了柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷3种差异性标记物,其中新橙皮苷是枳实不同基原鉴别最重要的标识物。

中药材作为各种饮片、经典名方制剂等中成药新药开发的源头材料,其质量关乎到药品最终的临床疗效的发挥,因此建立健全药材的质量控制体系就显得尤为关键。近年来,随着一测多评、指纹图谱技术的广泛应用,中药质量控制水平得到了较大的提升,这也使得更多更好的且安全有效的中药制剂将服务于大众。

**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]. 一部. 2020: 63.
- [2] 邱伊星,肖瑞飞,龚力民,等. 湖南麻阳甜橙幼果枳实的质量评价分析 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(7): 851-855.
- [3] 白雁,樊明月,雷敬卫,等. 近红外漫反射光谱法快速测定枳实药材中醇浸出物的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 73-76.
- [4] 张霄潇,李正勇,马玉玲,等. 中药枳实的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 185-190.
- [5] 陈振峰. 枳实及其药用有效成分研究 [J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(4): 38-40.
- [6] 何英杰,刘东波,唐其,等. 酸橙类中药材枳实和枳壳化学成分研究进展 [J]. 中药材, 2017, 40(6): 1488-1494.
- [7] 李强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [8] 张红,孙明江,王凌. 枳实的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2009, 32(11): 1787-1790.
- [9] 黄雪丽,陈玉宇. 中药枳实的化学成分及分析方法研究进展 [J]. 广州化工, 2016, 44(17): 22-25.
- [10] 李辉,唐爱国,徐汉斌,等. 枳实研究进展 [J]. 内蒙古民族大学学报, 2011, 17(5): 58-59.
- [11] 高喜梅,池玉梅,张雯,等. 指纹图谱结合一测多评法评价酸橙枳实质量的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2548-2556.
- [12] 朱露,雷鹏,黄琪,等. 反相高效液相色谱法测定枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量 [J]. 中南药学, 2013, 11(12): 934-937.
- [13] 王淳. 不同品种产地枳实有效成分的对比分析 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2009.
- [14] 黎阳,刘素香,张铁军,等. 枳实的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1469-1474.
- [15] 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.
- [16] 宋·唐慎微撰. 重修政和经史证类备用本草 (三十卷) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957: 323.
- [17] 宋玉鹏,胡源祥,陈海芳,等. 对枳实和枳壳药用品种变迁的思考 [J]. 江西中医药大学学报, 2016, 28(4): 120-124.
- [18] 胡蓉,李忠贵,肖草茂,等. 枳实、枳壳药材基原及道地产地的变迁 [J]. 中药材, 2019, 42(3): 686-689.
- [19] 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.
- [20] 江苏新医学院. 中药大辞典-上册 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 263.

[责任编辑 时圣明]