

# HPLC 指纹图谱结合多模式化学计量学方法评价枳壳药材质量

李 灿<sup>1,2</sup>,曾 娟<sup>1,2</sup>,龙雨青<sup>1,2</sup>,  
周新茹<sup>1,2</sup>,杨 敏<sup>1,2</sup>,童巧珍<sup>1,2</sup>,周日宝<sup>1,2\*</sup>,刘湘丹<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>湖南中医药大学药学院; <sup>2</sup>湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点研究室,长沙 410208

**摘要:**本研究通过高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱对不同产地的枳壳进行质量评价。采用相似度评价、聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析对指纹图谱数据进行统计分析。结果表明11份枳壳样品确定了16个共有峰,其相似度处于0.992~0.999,相似度良好,并对13种化学成分进行了含量测定。聚类分析及主成分分析结果将枳壳聚为4类,主成分综合得分对11份枳壳样品质量进行了评价;正交偏最小二乘法-判别分析结果表明柚皮苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、枸橘苷是引起枳壳质量差异的主要成分。本研究建立的枳壳HPLC指纹图谱结合化学计量法的方法简便准确,可为枳壳质量控制和品质评价提供参考依据。

**关键词:**枳壳;HPLC 指纹图谱;定量分析;化学计量分析

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)4-0665-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.4.015

## Evaluation of the quality of Aurantii Fructus by HPLC fingerprint combined with multi-mode chemometrics

LI Can<sup>1,2</sup>, ZENG Juan<sup>1,2</sup>, LONG Yu-qing<sup>1,2</sup>,  
ZHOU Xin-ru<sup>1,2</sup>, YANG Min<sup>1,2</sup>, TONG Qiao-zhen<sup>1,2</sup>, ZHOU Ri-bao<sup>1,2\*</sup>, LIU Xiang-dan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine; <sup>2</sup>Key Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Bulk Authentic Medicinal Materials from Hunan, Changsha 410208, China

**Abstract:** In this study, the high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint was used to evaluate the quality of Aurantii Fructus from different habitats. Similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis were adopted to analyze fingerprint data. The results showed that 11 batches of Aurantii Fructus have 16 common peaks with similarity ranged from 0.992 to 0.999, and the content of 13 chemical components has been determined. According to the cluster analysis and principal component analysis, the samples of Aurantii Fructus could be divided into four types. The comprehensive principal component analysis scores evaluated the quality of different batches of Aurantii Fructus. Orthogonal partial least squares method was used to screen out 4 components with quality differences, including naringin, narirutin, hesperidin and poncirus. In this study, the method combining the HPLC fingerprint of Aurantii Fructus with chemical measurement was simple and accurate, which could provide references for the quality control and evaluation of Aurantii Fructus.

**Key words:** Aurantii Fructus; HPLC fingerprint; quantitative analysis; chemometric analysis

枳壳为芸香科(Rutaceae)柑橘属(*Citrus*)植物  
酸橙(*Citrus aurantium* L.)及其栽培变种黄皮酸橙

收稿日期:2021-09-16 接受日期:2022-01-24

基金项目:湖南省科技厅中央引导地方项目(2020ZYQ045);湖南省教育厅重点项目(20A383);农业农村部农产品质量安全收贮运管控重点实验室开放课题(S2020KFKT-17);刘良院士工作站指导项目(21YS005)

\*通信作者 Tel:86-731-88458233; E-mail:13973134355@139.com,  
paeonia\_dd@126.com

(*C. aurantium* ‘huangpi’)、代代花(*C. aurantium* ‘daidai’)、朱栾(*C. aurantium* ‘zhuluan’)、塘橙(*C. aurantium* ‘tangcheng’)的干燥未成熟果实,7月果皮尚绿时采收<sup>[1]</sup>。枳壳性微寒,味苦、辛、酸,具有理气宽中,行滞消胀功效<sup>[1]</sup>。我国枳壳根据分布地域和主栽品种分为湘枳壳、川枳壳、江枳壳和浙产枳壳(苏枳壳和温枳壳)4类。湘枳壳的基原植物主要为黄皮酸橙;川枳壳的基原植物主要为酸橙;江枳壳

的基原植物主要为臭橙；苏枳壳的基原植物为代代酸橙(代代花)；温枳壳基原植物为朱柰<sup>[2]</sup>。枳壳的化学成分主要为黄酮类、挥发油、香豆素类及少量的生物碱类<sup>[3]</sup>。黄酮类化合物为枳壳主要有效成分，且以柚皮苷、新橙皮苷为代表的二氢黄酮化合物在药理药效中起着重要作用，如抗氧化、抗炎抑菌、改善肠胃动力障碍等<sup>[3-5]</sup>，不同产地的枳壳药材的柚皮苷和新橙皮苷含量存在差异<sup>[6]</sup>。

枳壳来源品种众多，受产地、采收时间及贮藏条件等因素影响，导致其活性成分及含有量相差甚远，市场上枳壳商品药材的质量不稳定，从而直接影响枳壳的临床疗效。目前对枳壳药材的质量控制主要集中在柚皮苷和新橙皮苷的含量测定上，通过查阅文献可见，大多采用高效液相色谱法<sup>[7-9]</sup>建立柚皮苷和新橙皮苷的含量测定方法。考虑到中药活性成分的复杂多样性，柚皮苷和新橙皮苷作为枳壳检测指标已经不够全面，不能满足社会发展对药品质量控制越来越高的要求。中药指纹图谱是运用一定综合性的分析方法，通过特征性色谱图或光谱图，在整体上对其化学特征进行表征，是目前被公认为最有效的综合性评价中药整体质量的技术手段之一。本研究建立11份枳壳药材的高效液相色(HPLC)指纹图谱，测定13个化学成分的含有量，采用多模式化学计量法对其质量进行全面评价，旨在为枳壳药材的质量评价及控制提供参考。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent Technologies 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)；ME204E/02 电子分析天平[瑞士

梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]；超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)；Eco-S15 实验室纯水系统(上海和泰仪器有限公司)；中草药粉碎机(天津市泰式特仪器有限公司)；BCD-452 WDPF 冰箱(青岛海尔服务有限公司)。

### 1.2 试药

对照品圣草次苷(批号 18040305, 纯度 ≥ 98%)、新北美圣草苷(批号 20090801, 纯度为 99.87%)、芸香柚皮苷(批号 20080401, 纯度为 99.91%)、柚皮素(批号 19110604, 纯度为 99.87%)、橙皮素(批号 18010204, 纯度 ≥ 98%)、橙皮内酯(批号 21012202, 纯度为 99.01%)、川陈皮素(批号 18070602, 纯度 ≥ 98%)购于成都普菲德生物技术有限公司；对照品柚皮苷(批号 H24N9Z75896, 纯度 ≥ 98%)、橙皮苷(批号 K09S11L123847, 纯度 ≥ 98%)、新橙皮苷(批号 Z31J6L2067, 纯度 ≥ 98%)购于上海源叶生物技术有限公司；对照品枸橘苷(批号 AF9062201, 纯度 ≥ 98%)、桔皮素(批号 AF9092506, 纯度 ≥ 98%)、橙皮油素(批号 AF20100403, 纯度 ≥ 98%)购于成都埃法生物技术有限公司；乙腈为色谱纯(安徽天地高纯溶剂有限公司)；甲醇为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)；磷酸为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)；水为超纯水。

### 1.3 药材

11份枳壳药材，由湖南中医药大学周日宝教授鉴定为芸香科柑橘属植物酸橙(*Citrus aurantium* L.)及其栽培变种的干燥未成熟果。药材具体信息见表1，药材样品图见图1。

表1 枳壳样品信息  
Table 1 Information of Aurantii Fructus

编号 No.	产地 Production place	中果皮厚度 Mesocarp thickness(cm)	品种 Variety
S1	江西新干	0.6~0.9	臭橙
S2	江西	0.4~0.9	臭橙
S3	浙江	0.5~1.0	代代花
S4	浙江	0.5~0.9	代代花
S5	湖南沅江	0.5~0.8	黄皮酸橙
S6	湖南沅江	0.4~1.1	黄皮酸橙
S7	湖南湘潭	0.6~0.8	臭橙
S8	湖南涟源	0.7~1.1	代代花
S9	湖南耒阳	0.5~0.7	黄皮酸橙
S10	湖南隆回	0.5~0.8	黄皮酸橙
S11	湖南湘阴	0.7~1.2	黄皮酸橙

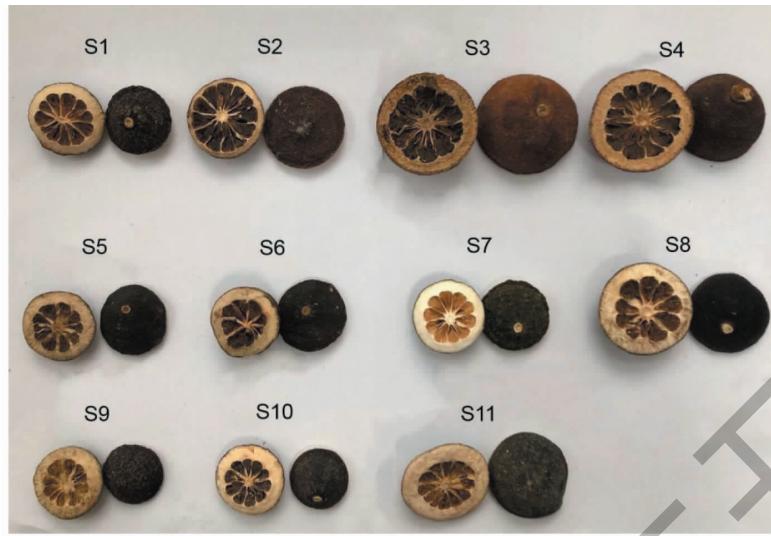


图 1 枳壳样品图片

Fig. 1 Pictures of Aurantii Fructus

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Supersil ODS-B100A 色谱柱( $4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$ )；流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)，采用梯度洗脱( $0 \sim 20\text{ min}, 20\% \text{ A}; 20 \sim 25\text{ min}, 20\% \rightarrow 60\% \text{ A}; 25 \sim 40\text{ min}, 60\% \rightarrow 90\% \text{ A}; 40 \sim 50\text{ min}, 90\% \text{ A}$ )；体积流量为  $1.0\text{ mL/min}$ ；柱温  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；进样量  $10\text{ }\mu\text{L}$ ；检测波长  $284\text{ nm}$ 。

### 2.2 对照品溶液制备

分别精密称取圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橘苷、柚皮素、橙皮素、橙皮内酯、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素对照品适量，加 75% 甲醇溶解并定容，制成质量浓度分别为  $0.165, 0.985, 1.400, 4.296, 1.685, 3.038, 0.700, 0.254, 0.097, 0.477, 0.454, 0.208, 0.231\text{ mg/mL}$  的混合对照品溶液，密封，低温避光保存，备用。

### 2.3 供试品溶液制备

取本品粉末(过 80 目药典筛)约  $1\text{ g}$ ，精密称定，置  $100\text{ mL}$  具塞锥形瓶中，加入  $15\text{ mL}$  浓度为 75% 的甲醇，称定质量，使用超声波仪在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴下提取  $30\text{ min}$ ，超声后静止至上液澄清，补足损失重量，取上清液  $0.45\text{ }\mu\text{L}$  滤膜滤过，取续滤液，即得。

### 2.4 方法学考察

#### 2.4.1 精密度试验

取枳壳药材样品(S5)，按“2.3”项下制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，进行色谱分析，记录色谱图。以柚皮苷为参照峰，测得

16 个共有峰相对保留时间的 RSD 在  $0.05\% \sim 0.10\%$ ，相对峰面积的 RSD 在  $0.08\% \sim 1.48\%$ ，表明仪器精密度良好。

#### 2.4.2 重复性试验

取枳壳药材样品(S5)粉末 6 份，每份称取  $1\text{ g}$ ，精密称定，按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，记录色谱图。以柚皮苷为参照峰，测得 16 个共有峰相对保留时间的 RSD 在  $0.07\% \sim 1.08\%$ ，相对峰面积的 RSD 在  $1.65\% \sim 3.92\%$ ，表明该方法重复性良好。

#### 2.4.3 稳定性试验

取枳壳药材样品(S5)供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别于  $0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24\text{ h}$  进样，进行色谱分析，记录色谱图。以柚皮苷为参照峰，测得 16 个共有峰相对保留时间的 RSD 在  $0.05\% \sim 0.30\%$ ，相对峰面积的 RSD 在  $0.32\% \sim 1.94\%$ ，表明供试品溶液在  $24\text{ h}$  内稳定性良好。

#### 2.4.4 参照峰选择

在各批枳壳样品色谱图中柚皮苷分离良好，峰形稳定，峰面积较大且为所有样品共有，所以确定柚皮苷为参照峰。

### 2.5 枳壳药材指纹图谱的建立及相似度分析

取表 1 中 11 批枳壳药材，按“2.3”项下制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2012A 版)，设置 S1 为参照图谱，对照图谱生成方法为中位数

法,多点校正后进行色谱峰匹配,得到 11 份枳壳样品的 HPLC 指纹图谱(见图 2),并生成对照图谱(见图 3)。结果表明共获得 16 个共有峰,通过对照品的色谱图和保留时间,与样品色谱图进行比对,指认 12 个共有峰:1 号峰为圣草次苷,2 号峰为新北美圣草苷,3 号峰为芸香柚皮苷,4 号峰为柚皮苷,5 号峰

为橙皮苷,7 号峰为新橙皮苷,9 号峰为枸橘苷,10 号峰为柚皮素,11 号峰为橙皮素,12 号峰为橙皮内酯,14 号峰为川陈皮素,15 号峰为桔皮素。11 份枳壳药材供试品色谱图与对照指纹图谱相似度见表 2,结果显示 11 份样品相似度在 0.992 ~ 0.999,表明 11 份枳壳药材相似度良好,化学成分种类较稳定。

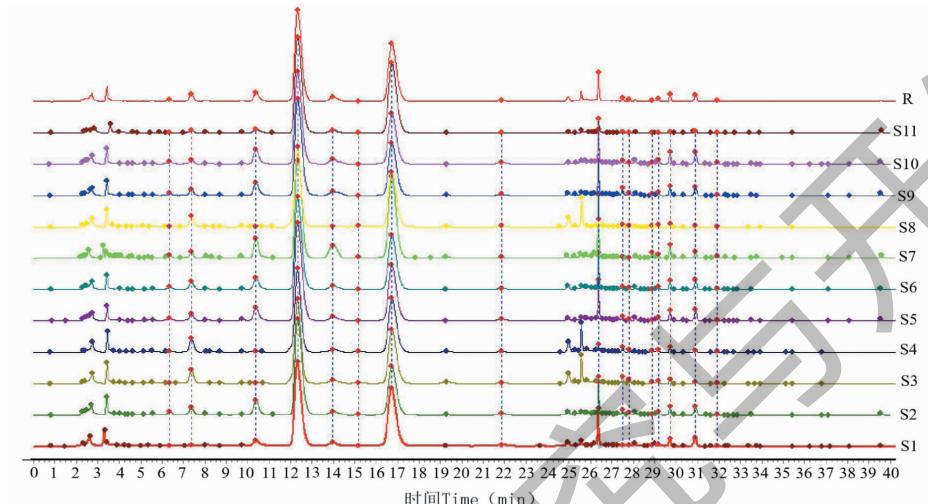


图 2 枳壳样品 HPLC 指纹图谱图

Fig. 2 HPLC fingerprint of Aurantii Fructus

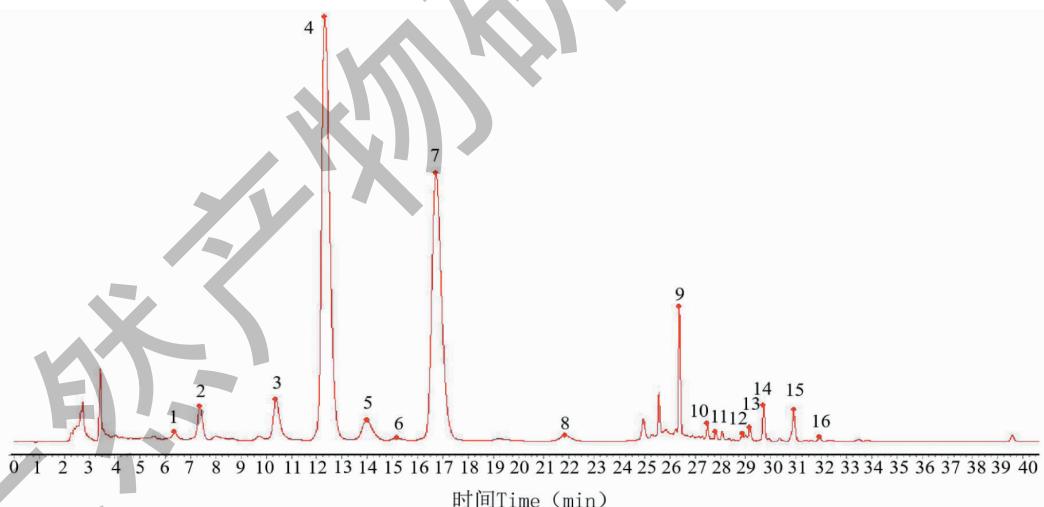


图 3 枳壳对照指纹图谱

Fig. 3 Control fingerprint of Aurantii Fructus

表 2 枳壳样品相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results of Aurantii Fructus

样品 Sample	相似度 Similarity	样品 Sample	相似度 Similarity
S1	0.997	S7	0.992
S2	0.993	S8	0.996

续表2(Continued Tab. 2)

样品 Sample	相似度 Similarity	样品 Sample	相似度 Similarity
S3	0.997	S9	0.997
S4	0.997	S10	0.997
S5	0.998	S11	0.995
S6	0.999		

## 2.6 枳壳药材中 13 种成分含量测定

### 2.6.1 色谱条件

色谱条件同“2.1”项,色谱图见图4。

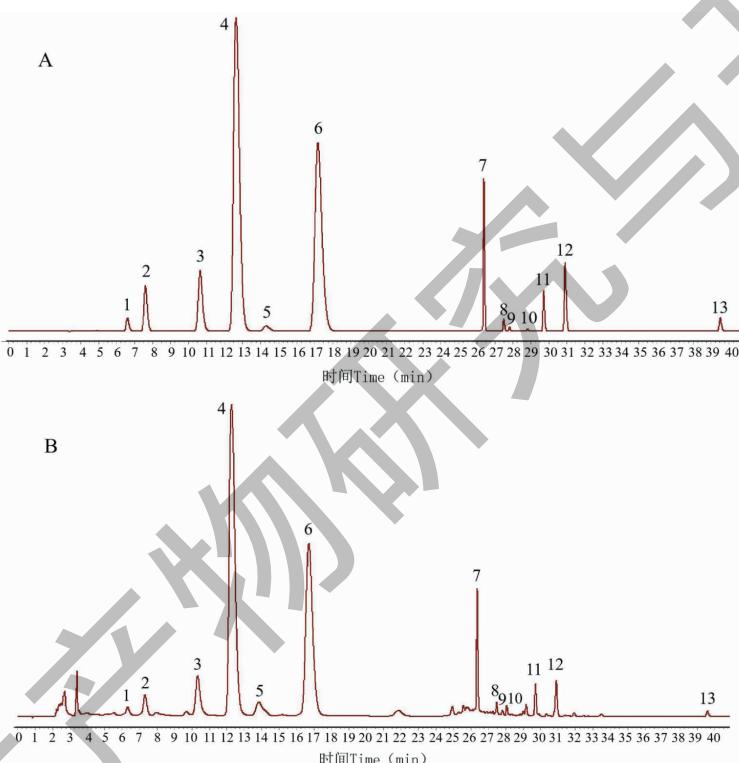


图4 混合对照品(A)和样品(B)的HPLC图

Fig. 4 HPLC for reference substance (A) and samples (B)

注:1-圣草次苷;2-新北美圣草苷;3-芸香柚皮苷;4-柚皮苷;5-橙皮苷;6-新橙皮苷;7-枸橘苷;8-柚皮素;9-橙皮素;10-橙皮内酯;11-川陈皮素;12-桔皮素;13-橙皮油素。Note:1-Eriocitrin,2-Neocitriocitrin,3-Narinutin,4-Naringin,5-Hesperidin,6-Neohesperidin,7-Poncirin,8-Naringenin,9-Hesperitin,10-Meranzin,11-Nobiletin,12-Tangeretin,13-Auraptene.

### 2.6.2 线性关系考察

取“2.2”项下混合对照品溶液适量,稀释2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、128倍,按“2.1”项下

色谱条件进样测定,记录峰面积。以各成分的质量浓度为横坐标( $X$ ),以测得的峰面积为纵坐标( $Y$ ),进行线性回归计算,结果见表3。

表3 线性回归方程及相关系数

Table 3 Linear regression equation and correlation coefficient

成分 Ingredient	线性回归方程 Equation of linear regression	R <sup>2</sup>	线性范围 Linearity range(mg/mL)
圣草次苷 Eriocitrin	$Y = 13.845X - 3.2842$	0.999 9	0.001 ~ 0.165

续表3(Continued Tab. 3)

成分 Ingredient	线性回归方程 Equation of linear regression	R <sup>2</sup>	线性范围 Linearity range (mg/mL)
新北美圣草昔 Neoeriocitrin	$Y = 15.977X + 46.495$	0.999 6	0.008 ~ 0.985
芸香柚皮昔 Narirutin	$Y = 16.287X + 77.587$	0.999 6	0.011 ~ 1.400
柚皮昔 Naringin	$Y = 18.299X + 530.23$	0.999 8	0.034 ~ 4.296
橙皮昔 Hesperidin	$Y = 9.276.3X - 49.304$	0.999 2	0.013 ~ 1.685
新橙皮昔 Neohesperidin	$Y = 22.929X + 209.22$	0.999 8	0.024 ~ 3.038
枸橘昔 Poncirin	$Y = 17.133X + 27.143$	0.999 9	0.005 ~ 0.700
柚皮素 Naringenin	$Y = 31.517X + 36.234$	0.999 4	0.002 ~ 0.254
橙皮素 Hesperitin	$Y = 35.358X + 14.308$	0.999 5	0.000 8 ~ 0.097
橙皮内酯 Meranzin	$Y = 7.136.6X - 3.121.4$	1.000 0	0.004 ~ 0.477
川陈皮素 Nobiletin	$Y = 12.406X + 18.319$	0.999 6	0.004 ~ 0.454
桔皮素 Tangeretin	$Y = 15.514X - 3.916.4$	0.999 9	0.002 ~ 0.208
橙皮油素 Auraptene	$Y = 6.503.6X + 4.320.4$	0.999 7	0.002 ~ 0.231

### 2.6.3 精密度试验

取枳壳药材样品(S5),按“2.3”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,进行色谱分析,记录色谱图。测得圣草次昔、新北美圣草昔、芸香柚皮昔、柚皮昔、橙皮昔、新橙皮昔、枸橘昔、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素、橙皮油内酯峰面积的RSD分别为0.21%、0.17%、0.17%、0.09%、0.16%、0.15%、1.48%、0.12%、0.13%、0.12%、0.11%、0.08%、0.08%,表明仪器精密度良好。

### 2.6.4 重复性试验

取枳壳药材样品(S5)粉末6份,每份称取1g,精密称定,按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图。测得圣草次昔、新北美圣草昔、芸香柚皮昔、柚皮昔、橙皮昔、新橙皮昔、枸橘昔、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素、橙皮油内酯峰面积的RSD分别为0.97%、0.53%、1.79%、2.78%、0.46%、0.33%、

0.59%、0.67%、0.40%、1.44%、1.42%、0.33%、0.34%,表明该方法重复性良好。

### 2.6.5 稳定性试验

取枳壳药材样品(S5)供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h进样,进行色谱分析,记录色谱图。测得圣草次昔、新北美圣草昔、芸香柚皮昔、柚皮昔、橙皮昔、新橙皮昔、枸橘昔、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素、橙皮油内酯峰面积的RSD分别为0.78%、0.35%、1.14%、1.27%、0.34%、0.41%、1.76%、0.41%、0.44%、0.74%、0.45%、0.40%、0.23%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

### 2.6.6 加样回收率试验

精密称定已知含量的枳壳样品(S5)6份,约0.5 g,分别精密加入适量对照品溶液,按“2.3”项制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率(按干燥品计算),结果见表4,结果表明该方法的回收率良好。

表4 枳壳回收率试验结果(n=6)

Table 4 The results of recovery test of Aurantii Fructus(n=6)

成分 Ingredient	取样量 Sample size(g)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Addition amount (mg)	测得量 Measured amount (mg)	回收率 Recovery rate(%)	平均回收率 Average recovery rate(%)	RSD(%)
圣草次昔 Eriocitrin	0.500 0	0.732 0	0.747 0	1.456 5	96.917 1	100.624 3	2.97
	0.500 1	0.744 0	0.747 0	1.468 5	96.820 2		
	0.500 2	0.748 5	0.747 0	1.504 5	101.217 7		

续表4(Continued Tab. 4)

成分 Ingredient	取样量 Sample size(g)	原有量 Original amount ( mg )	加入量 Addition amount ( mg )	测得量 Measured amount ( mg )	回收率 Recovery rate( % )	平均回收率 Average recovery rate( % )	RSD( % )
新北美圣草苷 Neoeriocitrin	0.500 3	0.750 0	0.747 0	1.518 0	102.902 1		
	0.500 4	0.753 0	0.747 0	1.519 5	102.661 5		
	0.500 5	0.754 5	0.747 0	1.525 5	103.227 4		
	0.500 0	1.420 5	1.410 0	2.761 5	95.148 5	97.762 9	2.22
	0.500 1	1.423 5	1.410 0	2.779 5	96.133 2		
	0.500 1	1.423 5	1.410 0	2.823 0	99.132 3		
	0.500 2	1.428 0	1.410 0	2.829 0	99.349 3		
芸香柚皮苷 Narirutin	0.500 3	1.431 0	1.410 0	2.848 5	100.508 7		
	0.500 4	1.452 0	1.410 0	2.811 0	96.305 5		
	0.500 0	3.798 0	4.084 5	7.810 5	98.257 5	102.183 8	2.09
	0.500 1	3.852 0	4.084 5	8.034 0	102.380 4		
	0.500 2	3.870 0	4.084 5	8.064 0	102.686 7		
	0.500 3	3.996 0	4.084 5	8.152 5	101.780 7		
	0.500 4	4.035 0	4.084 5	8.266 5	103.597 9		
柚皮苷 Naringin	0.500 5	4.051 5	4.084 5	8.316 0	104.399 3		
	0.500 2	32.587 5	32.665 5	64.113 0	96.512 0	96.570 2	0.15
	0.500 0	32.518 5	32.665 5	64.071 0	96.594 7		
	0.500 4	33.070 5	32.665 5	64.312 5	95.562 5		
	0.500 3	32.754 0	32.665 5	64.224 0	96.342 1		
	0.500 1	32.529	32.6655	64.090 5	96.622 2		
	0.500 1	32.529	32.6655	64.144 5	96.787 5		
橙皮苷 Hesperidin	0.500 5	3.268 5	3.262 5	6.688 5	104.802 4	102.767 5	1.16
	0.500 3	3.262 5	3.262 5	6.615 0	102.739 8		
	0.500 0	3.256 5	3.262 5	6.571 5	101.609 6		
	0.500 3	3.262 5	3.262 5	6.615 0	102.724 8		
	0.500 4	3.264 0	3.262 5	6.579 0	101.564 5		
	0.5002	3.261 0	3.262 5	6.628 5	103.163 8		
	0.500 2	14.910 0	16.177 5	30.898 5	98.833 7	98.807 4	1.76
新橙皮苷 Neohesperidin	0.500 0	14.895 0	16.177 5	31.009 5	99.614 8		
	0.500 1	14.907 0	16.177 5	31.072 5	99.920 6		
	0.500 3	14.917 5	16.177 5	31.029 0	99.583 7		
	0.500 4	14.934 0	16.177 5	31.041 0	99.557 5		
	0.500 5	14.940 0	16.177 5	30.363 0	95.333 9		
	0.500 0	2.401 5	2.428 5	4.924 5	103.865 1	101.787 2	2.92
	0.500 2	2.404 5	2.428 5	4.878 0	101.807 6		
枸橘苷 Poncirin	0.500 2	2.404 5	2.428 5	4.839 0	100.243 0		
	0.500 4	2.428 5	2.428 5	4.897 5	101.670 0		
	0.500 3	2.416 5	2.428 5	4.806 0	98.338 1		
	0.500 2	2.404 5	2.428 5	4.839 0	100.243 0		
	0.500 4	2.428 5	2.428 5	4.897 5	101.670 0		

续表4(Continued Tab. 4)

成分 Ingredient	取样量 Sample size(g)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Addition amount (mg)	测得量 Measured amount (mg)	回收率 Recovery rate(%)	平均回收率 Average recovery rate(%)	RSD(%)
柚皮素 Naringenin	0.500 5	2.430 0	2.428 5	4.975 5	104.799 1		
	0.500 2	0.156 0	0.171 0	0.334 5	104.467 1	99.946 5	2.31
	0.500 4	0.163 5	0.171 0	0.336 0	101.103 1		
	0.500 3	0.162 0	0.171 0	0.331 5	100.107 1		
	0.500 5	0.165 0	0.171 0	0.334 5	99.468 6		
	0.500 2	0.156 0	0.171 0	0.325 5	99.007 6		
橙皮素 Hesperitin	0.500 2	0.156 0	0.171 0	0.319 5	95.525 9		
	0.500 2	0.063 0	0.060 0	0.120 0	95.511 0	97.250 4	2.92
	0.500 2	0.063 0	0.060 0	0.120 0	96.780 3		
	0.500 2	0.063 0	0.060 0	0.120 0	96.043 3		
	0.500 3	0.064 5	0.060 0	0.121 5	98.417 7		
	0.500 3	0.064 5	0.060 0	0.123 0	98.711 9		
橙皮内酯 Meranzin	0.500 3	0.064 5	0.060 0	0.123 0	98.038 0		
	0.500 3	0.100 5	0.091 5	0.189 0	96.877 8	98.007 5	1.37
	0.500 2	0.099 0	0.091 5	0.190 5	100.166 8		
	0.500 2	0.099 0	0.091 5	0.187 5	97.514 3		
	0.500 2	0.099 0	0.091 5	0.187 5	97.368 1		
	0.500 0	0.097 5	0.091 5	0.187 5	98.390 9		
川陈皮素 Nobiletin	0.500 0	0.097 5	0.091 5	0.187 5	97.727 3		
	0.500 4	1.300 5	1.281 0	2.628 0	103.597 5	104.159 3	1.19
	0.500 1	1.276 5	1.281 0	2.604 0	103.688 0		
	0.500 2	1.278 0	1.281 0	2.619 0	104.634 7		
	0.500 3	1.285 5	1.281 0	2.622 0	104.268 4		
	0.500 0	1.275 0	1.281 0	2.620 5	104.961 9		
桔皮素 Tangeretin	0.500 0	1.275 0	1.281 0	2.605 5	103.805 5		
	0.500 0	1.329 0	1.329 0	2.628 0	97.819 4	100.292 5	0.53
	0.500 2	1.341 0	1.329 0	2.707 5	102.827 2		
	0.500 4	1.350 0	1.329 0	2.676 0	99.833 0		
	0.500 3	1.348 5	1.329 0	2.683 5	100.447 8		
	0.500 1	1.338 0	1.329 0	2.652 0	98.917 5		
橙皮油素 Auraptene	0.500 0	1.329 0	1.329 0	2.683 5	101.909 9		
	0.500 2	0.523 5	0.478 5	0.987 0	96.546 7	98.332 4	1.01
	0.500 0	0.516 0	0.478 5	0.988 5	98.468 8		
	0.500 0	0.516 0	0.478 5	0.990 0	98.715 2		
	0.500 1	0.519 0	0.478 5	0.988 5	98.155 2		
	0.500 1	0.519 0	0.478 5	0.990 0	98.533 6		
	0.500 0	0.516 0	0.478 5	0.993 0	99.575 1		

## 2.6.7 样品含量测定

称取 11 份枳壳样品粉末,按“2.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取各供试溶液 10  $\mu\text{L}$ ,按

“2.3”项下色谱条件进行测定,计算样品中各成分的百分含量(按干燥品计算),结果见表 5。

表 5 枳壳药材多成分含量测定结果

Table 5 Results of multi-component content determination of Aurantii Fructus by HPLC

成分 Ingredient	含量 Content (%)										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
圣草次苷 Eriocitrin	0.002	0.183	0.013	0.019	0.163	0.162	0.110	0.015	0.133	0.152	0.002
新北美圣草苷 Neocitrocin	0.053	0.372	0.598	0.639	0.314	0.355	0.253	0.457	0.262	0.195	0.130
芸香柚皮苷 Narirutin	0.411	0.872	0.053	0.061	0.854	0.682	0.979	0.039	0.721	0.857	0.248
柚皮苷 Naringin	5.143	6.171	5.303	5.291	7.096	5.729	6.424	4.844	5.968	5.754	5.936
橙皮苷 Hesperidin	0.595	0.477	0.619	0.531	0.704	0.662	2.042	0.236	0.766	0.909	0.454
新橙皮苷 Neohesperidin	3.525	3.061	3.262	3.300	3.241	3.253	4.675	3.208	3.070	3.054	4.227
枸橘苷 Poncirin	0.520	0.454	0.083	0.099	0.523	0.487	0.716	0.087	0.444	0.454	0.196
柚皮素 Naringenin	0.004	0.034	0.053	0.041	0.034	0.023	0.012	0.018	0.055	0.023	0.005
橙皮素 Hesperitin	0.008	0.013	0.029	0.022	0.014	0.012	0.004	0.009	0.018	0.013	0.003
橙皮内酯 Meranzin	0.056	0.032	0.077	0.091	0.022	0.019	0.203	0.056	0.074	0.074	0.015
川陈皮素 Nobiletin	0.196	0.224	0.103	0.138	0.289	0.239	0.317	0.086	0.248	0.316	0.038
桔皮素 Tangeretin	0.250	0.228	0.054	0.065	0.304	0.249	0.147	0.050	0.219	0.310	0.034
橙皮油素 Auraptene	0.029	0.116	-	-	0.115	0.080	0.158	-	0.153	0.154	0.166

注:“-”表示低于定量限。

Note: “-” means below the limit of quantitation.

## 2.7 基于化学计量学对不同产地枳壳药材 13 种化学成分的比较与分析

### 2.7.1 聚类分析(HCA)

以 11 份枳壳药材中 13 个化学成分含量为变量,运用 SPSS 22 数据统计软件,采用组间聚类方法,欧氏距离平方法测量样品间距离进行系统聚类分析(见图 5)。结果表明,以距离小于 5 为标准,将 11 份枳壳药材分为 4 类,S1、S3、S4、S8 聚为第一类;将 S2、S5、S6、S9、S10 聚为第二类;S11 聚为第三类;S7 聚为第四类。

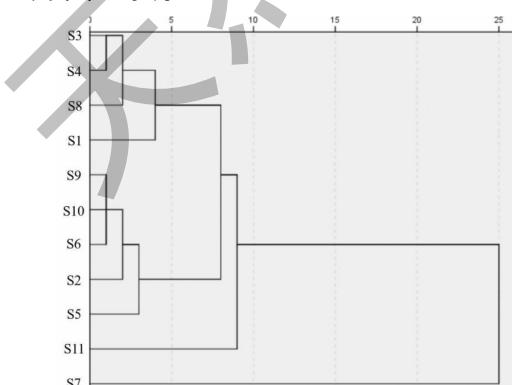


图 5 枳壳的系统聚类分析

Fig. 5 System cluster analysis of Aurantii Fructus

### 2.7.2 主成分分析和正交偏最小二乘判别分析

主成分分析法(principal component analysis)是一种通过降维技术把多个变量化为少数几个主成分(综合变量)的统计分析方法。这些主成分能够反映原始变量的绝大部分信息,它们通常表示为原始变量的某种线性组合。正交偏最小二乘判别分析(orthogonal PLS-DA, OPLS-DA)是一种有监督的判别分析统计方法,其最大的特点是可以除自变量  $X$  中与分类变量  $Y$  无关的数据变异,使分类信息主要集中在一个主成分,使模型更简单和易于解释,其判别效果及主成分得分图的可视化效果更加明显<sup>[10]</sup>。

将枳壳中 13 种化学成分含量导入 SPSS 22 数据统计软件,以特定的特征值与累计贡献率作为判定依据,对 11 份枳壳药材进行主成分分析。以特征值  $>2$  为提取标准,11 份枳壳药材有 3 个主成分,其特征值  $\lambda_1 = 6.315, \lambda_2 = 2.974, \lambda_3 = 2.013$ ,特征值  $\lambda_1$  的贡献率为 48.576%,  $\lambda_2$  的贡献率为 22.878%,  $\lambda_3$  的贡献率为 15.486%, 累积贡献率为 86.940%  $>85\%$ ,故选取前 3 个主成分进行评价,其代表枳壳中 13 个成分含量 86.940% 的信息量,具有良好的代表性,可以反映枳壳的综合质量。

以选取的主成分方差贡献率为权重系数,对11份枳壳药材主成分得分、综合得分进行分析,根据得分系数矩阵结果得PC1、PC2、PC3及综合得分线性表达式,如下:

$$\begin{aligned} PC1 &= 0.116BX1 - 0.097BX2 + 0.152BX3 + \\ &0.129BX4 + 0.113BX5 + 0.055BX6 + 0.15BX7 - \\ &0.04BX8 - 0.077BX9 + 0.045BX10 + 0.136BX11 + \\ &0.113BX12 + 0.128BX13 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} PC2 &= 0.2BX1 + 0.152BX2 + 0.08BX3 + \\ &0.04BX4 - 0.077BX5 - 0.272BX6 + 0.006BX7 + \\ &0.273BX8 + 0.243BX9 - 0.092BX10 + 0.127BX11 + \\ &0.16BX12 - 0.032BX13 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} PC3 &= -0.048BX1 + 0.253BX2 - 0.012BX3 + \\ &0.066BX4 + 0.318BX5 + 0.176BX6 - 0.008BX7 + \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &0.192BX8 + 0.192BX9 + 0.421BX10 + 0.073BX11 - \\ &0.185BX12 - 0.052BX13 \end{aligned}$$

$$\text{综合得分}(F) = 0.48576 \times PC1 + 0.71454 \times PC2 + 0.8694 \times PC3$$

BX1、BX2、BX3、BX4、BX5、BX6、BX7、BX8、BX9、BX10、BX11、BX12、BX13分别代表圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橘苷、柚皮素、橙皮素、橙皮内酯、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素的含量。

通过以上表达式得各地区的综合得分,并对得分结果进行排序(见表6)。得分情况反映各地区枳壳药材质量情况,质量越好,则分数越高。本研究中,湖南湘潭药材得分最高,质量较好。

表6 枳壳主成分得分、综合得分及排名

Table 6 Principal component score, composite score, and ranking of Aurantii Fructus

编号 No.	主成分1 Principal component 1	主成分2 Principal component 2	主成分3 Principal component 3	综合得分 Composite score	排名 Rank
S7	1.649 3	-0.984 3	2.013 8	1.848 6	1
S5	1.390 1	-0.496 4	1.319 3	1.467 5	2
S10	1.309 1	-0.451 9	1.230 1	1.382 4	3
S9	1.269 4	-0.454 4	1.239 8	1.369 8	4
S2	1.274 2	-0.386 0	1.159 5	1.351 2	5
S6	1.224 0	-0.487 8	1.213 2	1.300 7	6
S3	0.916 6	-0.588 5	1.315 7	1.168 6	7
S4	0.915 3	-0.584 4	1.306 6	1.163 0	8
S1	1.120 3	-0.692 6	1.145 2	1.044 9	9
S11	1.134 7	-0.900 1	1.304 2	1.041 9	10
S8	0.822 6	-0.600 2	1.098 4	0.925 6	11

将枳壳中13种化学成分含量导入SIMCA多元变量统计软件,得到PCA得分图、OPLS-DA得分图和VIP图。结果见图6、7、8。结果表明,采用PCA和OPLS-DA来观察样品的自然聚集,11份样品同样也聚为4类,且分离更加显著,与HCA结果一致。

结合变量重要性投影(VIP)法,以VIP值大于1为标准,筛选得到具有统计学意义的4个质量标志物,分别为柚皮苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、枸橘苷。所测13个化学成分影响程度由大到小依次为:柚皮苷>芸香柚皮苷>橙皮苷>枸橘苷>新橙皮苷>新北美圣草苷>川陈皮素>橙皮油素>桔皮素>圣草次苷>橙皮内酯>橙皮素>柚皮素。

### 3 讨论

#### 3.1 提取条件的选择

本实验考察了不同浓度甲醇(50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%)提取效果,结果表明用75%甲醇提取的样品效果最佳,故本研究选择75%甲醇为提取溶剂。

#### 3.2 流动相系统的选择

本实验考察了乙腈-0.1%甲酸水溶液和乙腈-0.1%磷酸水溶液的流动相系统,结果表明0.1%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱时色谱峰峰形较好,分离度较高,因此本研究选用乙腈-0.1%磷酸水溶液做为流动相。

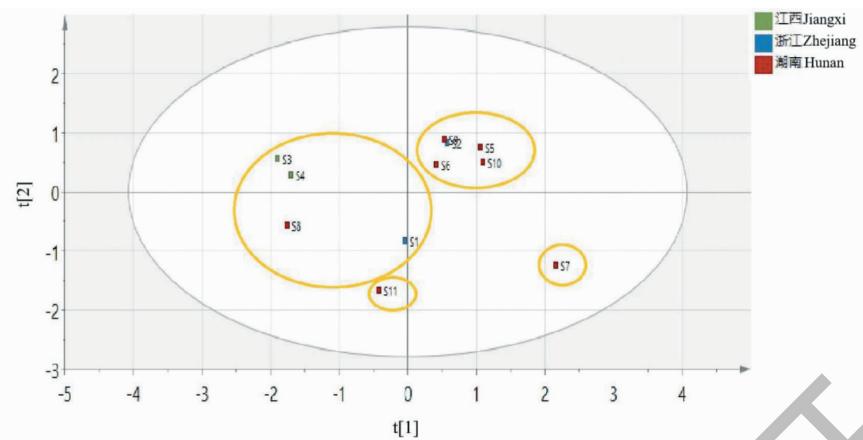


图6 不同枳壳样品的PCA得分图  
Fig. 6 PCA scores of different Aurantii Fructus

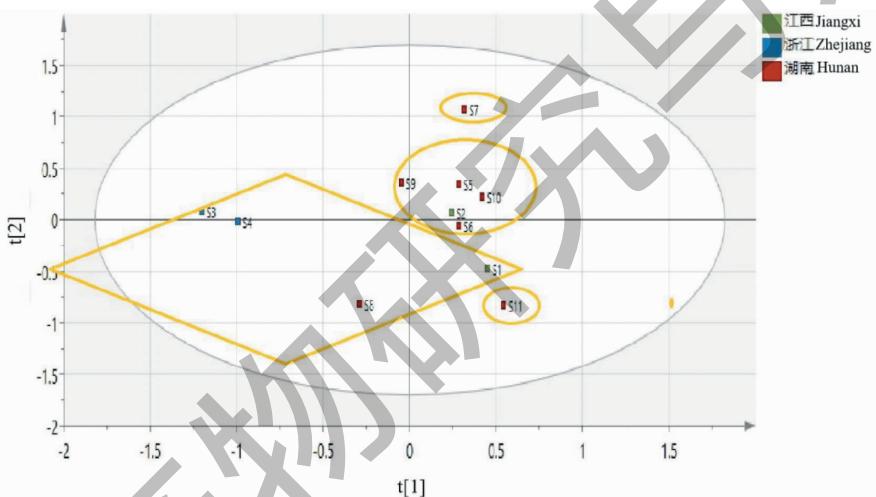


图7 不同枳壳样品的PCA得分图  
Fig. 7 OPLS-DA scores of different Aurantii Fructus

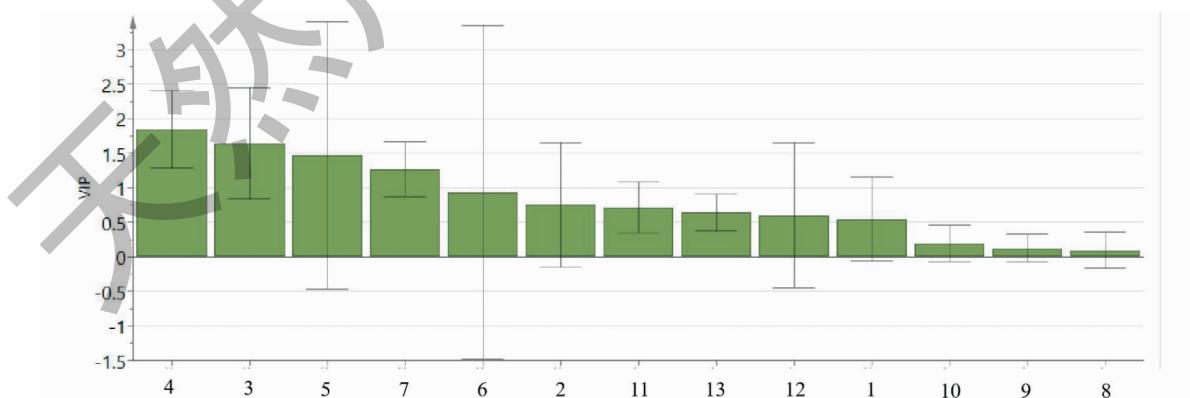


图8 枳壳13个化学成分的VIP值  
Fig. 8 VIP values of thirteen chemical components of Aurantii Fructus  
注:1~13同图4。Note:1-13 are the same as Fig. 4.

### 3.3 枳壳药材质量影响因素的讨论

化学模式识别的方法与指纹谱图分析相结合,能准确判别出枳壳样品之间的差异,可以初步作为考察商品药材质量优劣的判别标准<sup>[11]</sup>。本研究基于枳壳药材样品中13个化学成分含量结果,进行了聚类分析、主成分分析和判别分析,分析发现所研究的11份枳壳药材样品的质量不一。根据聚类结果可知不同产地也聚为一类,说明不同产地的枳壳质量较为均一,没有明显地域性,这是由于湖南、江西、浙江都属于长江流域以南地区,其地理、气候、土壤环境相似。根据表6综合得分排名的结果可知,湖南产的臭橙品种质量优于黄皮酸橙,而黄皮酸橙品种质量优于代代花,从柚皮苷、新橙皮苷(药典规定的指标成分)质量百分含量结果可知,枳壳不同品种新橙皮苷的质量百分含量较为一致,黄皮酸橙和臭橙品种的柚皮苷质量百分含量高于代代花,说明品种为影响枳壳药材质量的重要因素之一。枳壳来源中有较多的栽培变种品种,且枳壳用药历史悠久,有1700年的种植历史,经历多次品种变迁,基源问题自古以来就比较复杂,造成其品种的质量差异可能与长期的自然选择和人工选育有关。

### 4 结论

本实验采用HPLC法建立了11份枳壳药材样品的指纹图谱,并结合定量分析、相似度评价、主成分分析及判别分析对11份枳壳药材样品进行质量评价,该方法简便准确,可用于枳壳药材的综合质量评价。不同产地枳壳均为柚皮苷和新橙皮苷质量百分含量高;HPLC指纹图谱有16个共有峰,11份枳壳药材相似度良好,不同产地来源枳壳药材质量较稳定;从综合得分排名结果可知,湖南湘潭所产枳壳综合得分较高,说明其质量较佳;从VIP值结果可知,以VIP值大于1为标准,筛选得到柚皮苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、枸橘苷4个质量标志物。

### 参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the

- People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:257-258.
- 2 Zhao WL, Guo ZX, Zhang WT, et al. Study on original plant species and geographical distribution of Aurantii Fructus [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43: 4361-4364.
  - 3 He YJ. Construction of fingerprint and analysis of bioactive ingredients from Hunan Aurantii Fructus [D]. Changsha: Hunan Agricultural University(湖南农业大学), 2018.
  - 4 Su MS, Shyu YT, Chien PJ. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts [J]. Food Chem, 2008, 111:892-896.
  - 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 Guo ZX, Li WT, Li ZK. Determination of naringin and neo-hesperidin in Aurantii Fructus from different habitats [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43:1347-1348.
  - 7 Chen H, Gao M, Luo XQ, et al. Principal component analysis and discriminant analysis of 12 effective chemical constituents in Aurantii Fructus from different areas [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50:3433-3437.
  - 8 Tian F, He XF, Tan ZJ, et al. Study on characteristic chromatogram and quantitation method of six components in Aurantii Fructus [J]. J Pharm Anal(药物分析杂志), 2020, 40:1090-1096.
  - 9 Liu YL, Deng GZ, Xian MH, et al. Changes of HPLC fingerprint and main flavonoids content of Aurantii Fructus before and after processing [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26:113-118.
  - 10 Li D, Feng JW, Chen HP, et al. The quality evaluation of Psidii Guajavae Folium from different areas based on fingerprints and hemometrics [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:899-912.
  - 11 Zhao Y, Xie PS, Liang YZ, et al. HPLC fingerprint analysis and chemical pattern recognition of Aurantii Fructus [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2005, 40:812-815.