

## 不同规格青皮药材 UPLC 特征图谱和多指标成分含量对比研究

冯涌微<sup>1,2</sup>, 刘晓霞<sup>1,2</sup>, 梁月仪<sup>1,2</sup>,  
位翠杰<sup>1,2</sup>, 邓淙友<sup>1,2</sup>, 孙冬梅<sup>1,2</sup>, 何民友<sup>1,2</sup>, 李振雨<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>广东一方制药有限公司; <sup>2</sup>广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244

**摘要:**建立个青皮、四花青皮超高效液相色谱(UPLC)特征图谱,结合多成分含量测定,为完善不同规格青皮药材的质量控制提供参考。采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱,流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液,流速为每分钟 0.30 mL,梯度洗脱,检测波长为 275 nm,柱温为 40 °C,进样量为 1 μL;建立 15 批个青皮和 15 批四花青皮的特征图谱,通过对照品比对并结合光谱分析,对共有峰进行鉴定;借助中药色谱指纹图谱相似度评价系统对 15 批个青皮和 15 批四花青皮的特征图谱进行相似度评价,通过聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)比较两种规格青皮的差异,寻找差异性成分;并对两种规格青皮药材 5 种有效成分含量进行对比研究。结果显示,个青皮和四花青皮特征图谱均有 7 个共有峰,指出其中 5 个峰,分别为辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素;HCA 和 PCA 将青皮药材按规格不同大致分为两类,OPLS-DA 发现 3 个差异性标志物,分别为峰 1(辛弗林)、峰 4 和峰 2(橙皮苷)。含量测定研究结果显示,个青皮中辛弗林和橙皮苷的含量高于四花青皮,四花青皮中川陈皮素的含量高于个青皮,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。该方法可以有效鉴别不同规格的青皮药材质量的差异性,为其质量控制提供参考。

**关键词:**四花青皮;个青皮;UPLC 特征图谱;多成分含量测定

中图分类号:R282.4

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)7-1169-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.7.010

## Comparative study on UPLC characteristic chromatogram and multivariate component content of different specifications of *Pericarpium Citri Reticulatae Viride*

FENG Yong-wei<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-xia<sup>1,2</sup>, LIANG Yue-yi<sup>1,2</sup>,  
WEI Cui-jie<sup>1,2</sup>, DENG Cong-you<sup>1,2</sup>, SUN Dong-mei<sup>1,2</sup>, HE Min-you<sup>1,2</sup>, LI Zhen-yu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Guangdong E-fong Pharmaceutical Co., Ltd.; <sup>2</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, China

**Abstract:** UPLC characteristic chromatograms of *Fructus Citri Immaturus* (FCI) and *Pericarpium Citri Reticulatae Viride* (PCRV) were established, combined with multi-component content determination, so as to provide reference for the quality control of different specifications of PCRV. Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column was used. The mobile phase was acetonitrile -0.1% formic acid solution. The flow rate was 0.30 mL per minute with gradient elution. Detection wavelength was 275 nm. The column temperature was 40 °C. The injection volume was 1 μL. The characteristic chromatograms of 15 batches of FCI and PCRV were established. Cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to compare the differences between the two specifications of PCRV and look for different components. The contents of five effective components in two specifications of PCRV were compared. The result showed that there were seven common peaks in the characteristic chromatograms of FCI and PCRV. Five common peaks were identified, namely synephrine, narirutin, hesperidin, nobiletin and tange-

收稿日期:2022-01-06 接受日期:2022-05-05

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金(2020B1515120033);湖南省自然科学基金(2020JJ9006);江西省中医药标准化项目(2020A10)

\* 通信作者 Tel:86-757-85128602; E-mail: lzy1083656123@126.com

retin by comparing with the reference substances. HCA and PCA roughly divided PCRV into two categories. three differential markers, namely Peak 1 (synephrine), peak 4 and peak 2 (hesperidin) were found by OPLS-DA. The content determination results showed that the contents of synephrine and hesperidin in Fructus Citri Immaturus were higher than those in PCRV. The contents of nobiletin in PCRV were higher than those in FCI. The differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). This method can effectively analyze the quality differences of different specifications of PCRV and provide reference for the quality evaluation.

**Key words:** Fructus Citri Immaturus; Pericarpium Citri Reticulatae Viride; UPLC characteristic chromatogram; multi-component content determination

青皮始载于《珍珠囊》，李时珍曰“青橘皮，古无用者，至宋时医家始用之。”宋代才将未成熟以及成熟的橘皮进行对比，发现两者在药效上有稍许不同，因此才有了青橘皮和黄橘皮之分。青皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥幼果或未成熟果实的果皮，并规定青皮入药有两种不同规格：5~6月收集自落的幼果，晒干，习称“个青皮”；7~8月采收未成熟的果实，在果皮上纵剖成四瓣至基部，除尽瓢瓣，晒干，习称“四花青皮”。青皮性温，味苦、辛。归肝、胆、胃经。具有疏肝破气，消积化滞的功效，用于胸胁胀痛，疝气疼痛，乳癖，乳痈，食积气滞，脘腹胀痛<sup>[1]</sup>。青皮的主要成分为挥发油、黄酮类化合物，氨基酸类等<sup>[2-4]</sup>，现代药理研究表明，青皮具有调节肠胃、利胆、抗心律失常、祛痰、治疗乳腺炎等功效<sup>[5-8]</sup>。两种规格的青皮在功能主治上侧重点略有不同，个青皮以破气化滞为主，四花青皮以调肝理气为主<sup>[9]</sup>。

除此之外，两者在成分组成上也略有不同<sup>[10]</sup>。《中国药典》2020版对不同规格青皮的性状和鉴别做了不同的规定，含量测定项仅对橙皮苷作出限度要求。Li等<sup>[5]</sup>研究结果显示，个青皮中橙皮苷、辛弗林的含量较四花青皮高，*N*-甲基络胺及挥发油较四花青皮低，不同产地两个规格4种成分含量高低趋势基本相同。Zhao等<sup>[11]</sup>利用GC-MS对个青皮和四花青皮的挥发油进行分析，发现香叶醇、橙花醇、 $\alpha$ -异松油烯为等9个化合物为个青皮所特有，主成分柠檬烯和芳樟醇个青皮为四花青皮的两倍多，其他成分含量差异较大。Yi等<sup>[12]</sup>通过利用气相色谱和液相色谱对个青皮和四花青皮成分的研究，也指出了个青皮和四花青皮在成分上存在一定的区别。以上研究均表明个青皮与四花青皮的化学成分有所差异。

本次研究，通过建立个青皮、四花青皮超高效液相色谱(UPLC)特征图谱，结合化学计量学方法，比较两种规格青皮的差异，并对两种规格青皮药材5

种有效成分含量进行对比研究，为两种规格青皮质量标准的提高提供参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Thermo 高效液相色谱仪(Vanquish, 赛默飞世尔科技有限公司); Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.8  $\mu$ m) 色谱柱; 万分之一天平(ME204E, 梅特勒-托利多公司); 百万分之一天平(XP26A, 梅特勒-托利多公司); 电子天平(JJ600, 常熟市双杰测试仪器厂); 数控超声波清洗器(KQ500DE, 昆山市超声仪器有限公司); 超纯水系统(Milli-Q Direct, 默克股份有限公司); 电热恒温水浴锅(HWS28, 上海一恒科技有限公司)。

### 1.2 试剂与试剂

乙醇、甲醇为分析纯(天津市富宇精细化工有限公司); 乙醇、甲醇为色谱纯(默克股份有限公司); 甲酸为色谱纯(天津科密欧化学试剂有限公司); 水为超纯水(取自实验室 Milli-Q Direct 超纯水系统, 默克股份有限公司)。橙皮苷对照品(批号: 110721-202019; 含量: 95.3%)、辛弗林(批号: 110727-201809; 含量: 99.5%)均购自中国食品药品检定研究所; 芸香柚皮苷(批号: 14259-46-2; 含量  $\geq$  98%)、川陈皮素(批号: 18070602; 含量  $\geq$  98%)、橘皮素(批号: 18031501; 含量  $\geq$  98%)均购自成都普菲德生物技术有限公司。

本次研究各采集15批个青皮 Fructus Citri Immaturus(FCI)和四花青皮 Pericarpium Citri Reticulatae Viride(PCRV)药材, 经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定, 均为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥幼果或未成熟果实的果皮, 详细产地信息以及栽培品种见表1所示。

### 1.3 青皮的采收

本次研究所用药材参考药典中青皮的采收季

节,“个青皮”收集自6月中旬自落的幼果;“四花青皮”采收自7月下旬及8月上旬未成熟的果实。

表1 青皮样品信息来源

Table 1 Sample source information table of FCI and PCRV

序号 No.	个青皮编号 Number of FCI	四花青皮编号 Number of PCRV	产地来源 Origin	栽培品种 Cultivar
S1	FCI01	PCR01	湖南省沅江市	温州蜜桔
S2	FCI02	PCR02	湖南省沅江市	温州蜜桔
S3	FCI03	PCR03	湖南省沅江市	温州蜜桔
S4	FCI04	PCR04	江西省宜春市	大红袍
S5	FCI05	PCR05	江西省宜春市	大红袍
S6	FCI06	PCR06	江西省吉安市	大红袍
S7	FCI07	PCR07	江西省吉安市	大红袍
S8	FCI08	PCR08	江西省吉安市	大红袍
S9	FCI09	PCR09	浙江省衢州市	椪柑
S10	FCI10	PCR10	浙江省衢州市	椪柑
S11	FCI11	PCR11	浙江省衢州市	椪柑
S12	FCI12	PCR12	江西省宜春市	大红袍
S13	FCI13	PCR13	江西省宜春市	大红袍
S14	FCI14	PCR14	江西省宜春市	大红袍
S15	FCI15	PCR15	江西省宜春市	大红袍

## 2 方法与结果

### 2.1 特征图谱的建立

#### 2.1.1 色谱条件

采用 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱;以乙腈为流动相 A,以 0.1% 甲酸溶液为流动相 B,梯度洗脱 (0 ~ 2 min, 1% → 8% A; 2 ~ 5 min, 8% → 13% A; 5 ~ 12 min, 13% → 19% A; 12 ~ 13 min, 19% → 22% A; 13 ~ 20 min, 22% → 35% A; 20 ~ 21 min, 35% → 51% A; 21 ~ 30 min, 51% → 54% A), 流速为 0.30 mL/min;柱温为 40 °C;检测波长为 275 nm;进样量为 1 μL。

#### 2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取芸香柚皮苷对照品 2.162 mg、橙皮苷对照品 2.042 mg、橘皮素对照品 2.266 mg、川陈皮素对照品 2.186 mg、辛弗林对照品 2.175 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含芸香柚皮苷 84.750 0 μg、橙皮苷 78.494 5 μg、橘皮素 88.827 2 μg、川陈皮素 85.691 2 μg、辛弗林 85.260 3 μg 的混合溶液。

#### 2.1.3 供试品溶液的制备

取青皮细粉约 0.4 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称定重量,加热回流 30 min,取出,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减

失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

#### 2.1.4 方法学考察

##### 2.1.4.1 精密度试验

取个青皮 (FCI04) 供试品溶液和四花青皮 (PCR04) 供试品溶液,按“2.1.1”项下确定的色谱条件下连续进样 6 次,以橙皮苷色谱峰为参照峰 S,计算个青皮各特征峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.03% ~ 0.69% 范围内,相对峰面积 RSD 值 0.64% ~ 1.48% 范围内,四花青皮各特征峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.25% ~ 0.58% 范围内,相对峰面积 RSD 值在 0.29% ~ 1.16% 范围内,均小于 3.0%,表明仪器精密度良好。

##### 2.1.4.2 重复性试验

取同一批个青皮药材细粉 (FCI04) 和四花青皮药材细粉 (PCR04),平行 6 份,按“2.1.3”项下方法分别制备 6 份供试品溶液,分别进样测定,以橙皮苷色谱峰为参照峰 S,个青皮各特征峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.19% ~ 1.39% 范围内,相对峰面积 RSD 值 0.52% ~ 1.83% 范围内,四花青皮各特征峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.48% ~ 1.36% 范围内,相对峰面积 RSD 值在 0.53% ~ 2.19% 范围内,均小于 3.0%,表明该方法重复性良好。

### 2.1.4.3 稳定性试验

取同一批个青皮药材细粉(FCI04)和四花青皮药材细粉(PCR04),按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,以橙皮苷色谱峰为参照峰S,计算各特征峰与S峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值,个青皮药材各特征峰与S峰的相对保留时间RSD值在0.03%~0.89%范围内,四花青皮药材各特征峰

与S峰的相对保留时间RSD值在0.05%~2.21%范围内,个青皮药材各特征峰与S峰的相对峰面积RSD值在1.03%~2.13%范围内,四花青皮药材各特征峰与S峰的相对峰面积RSD值在0.15%~0.74%范围内,说明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

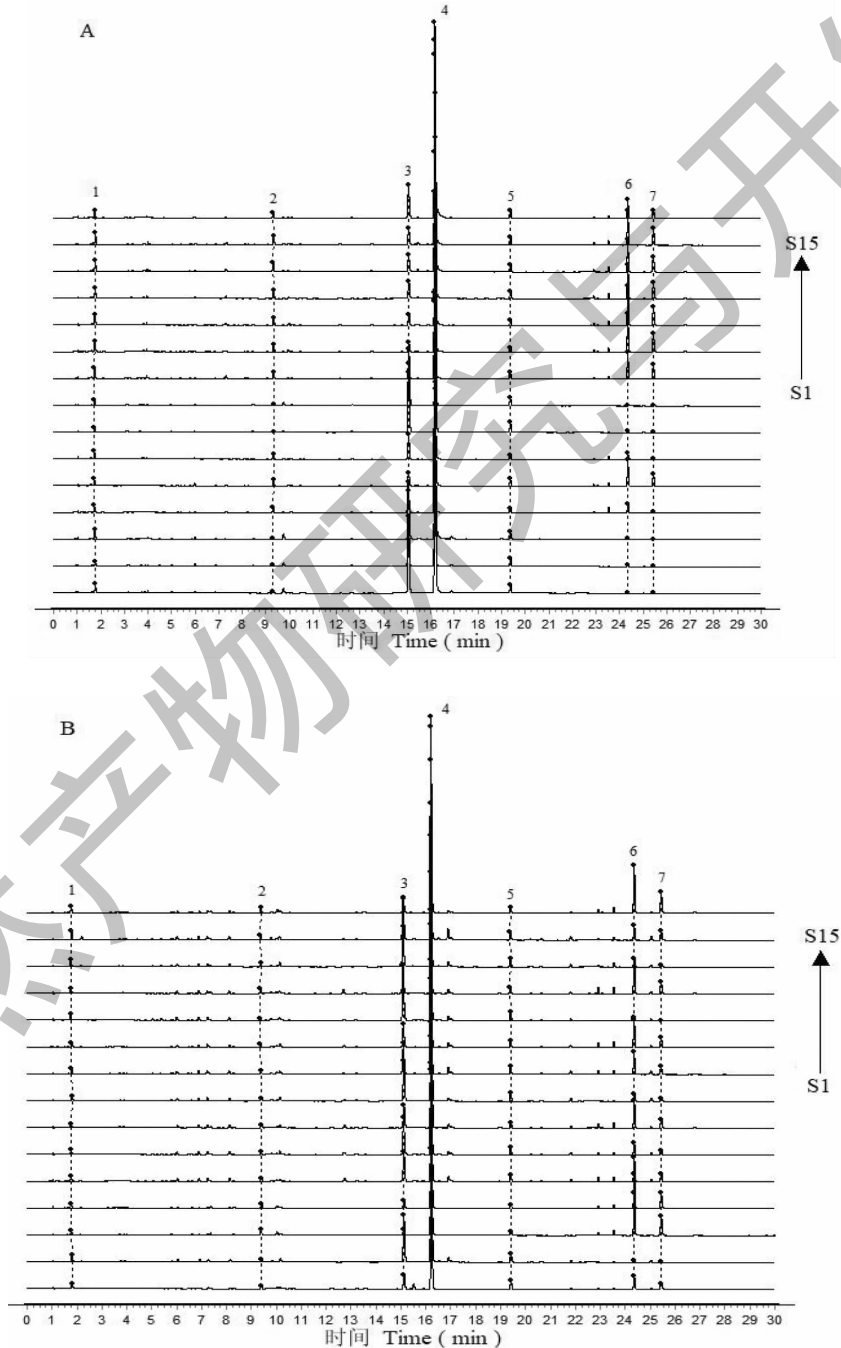


图1 不同规格青皮药材特征图谱叠加图

Fig. 1 The characteristic chromatograms of different specifications of FCI and PCRV

注:A:个青皮特征图谱;B:四花青皮特征图谱。Note:A:The characteristic chromatograms of FCI;B:The characteristic chromatograms of PCRV.

#### 2.1.4.4 相似度评价

分别取 15 批个青皮药材和 15 批四花青皮药材样品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下的色谱条件依次进行测定,记录色谱图,分别将 15 批青皮和四花青皮样品特征图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)”,以 S1 样品特征图谱为参照,进行多点校正和峰匹配,并生成对照特征图谱,个青皮和四花青皮对照特征图谱均标识出 7 个共有特征峰。15 批个青皮、四花青皮样品特征图谱叠加图见图 1,对照图谱

见图 2。分别计算各批样品特征图谱和对照特征图谱的相似度,结果见表 2。15 批四花青皮样品特征图谱与对照特征图谱的相似度范围在 0.983 ~ 0.999,15 批个青皮样品特征图谱与对照特征图谱的相似度范围在 0.942 ~ 1.000,均大于 0.9。说明个青皮和四花青皮样品质量均一、稳定、相似度较高。

#### 2.1.4.5 共有峰的指认

取“2.1.2”项下对照品溶液,按照“2.1.1”项下

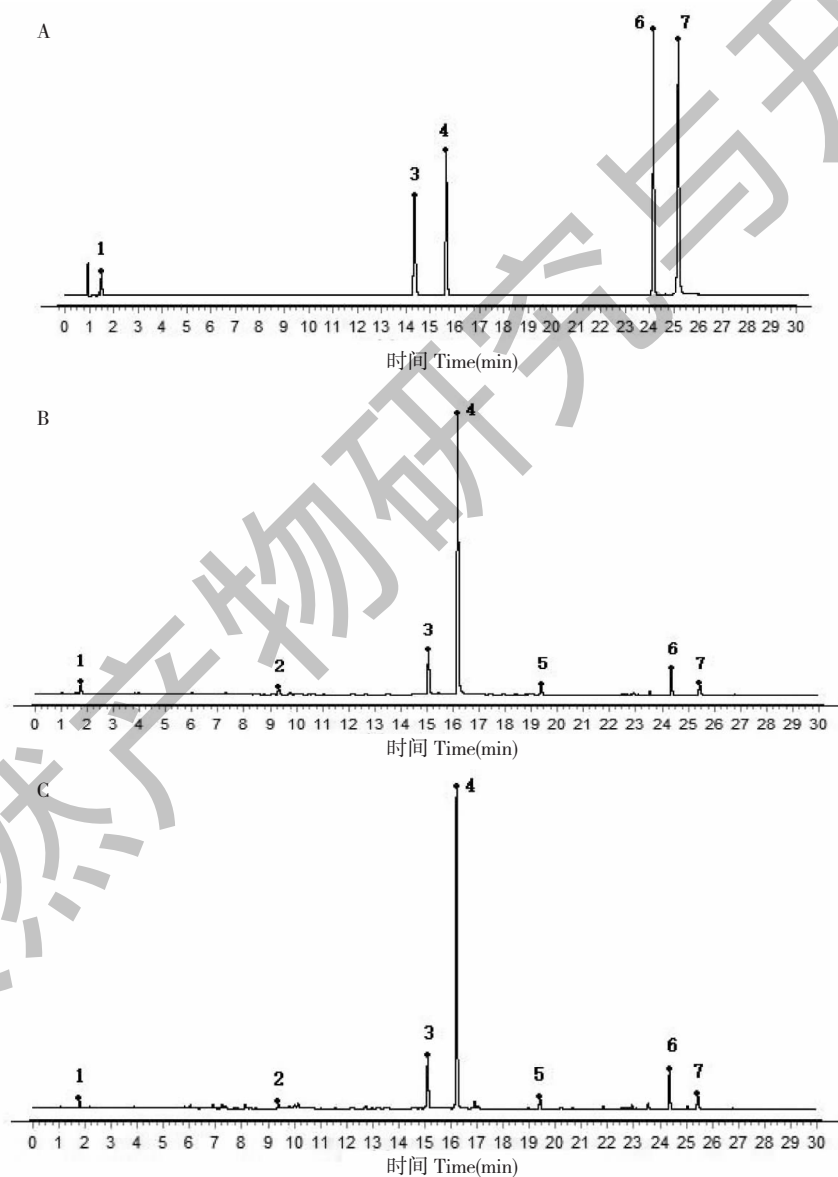


图 2 不同规格青皮药材特征图谱峰指认

Fig. 2 The characteristic chromatograms peak identification of different specifications of FCI and PCRV

注:A:混合对照品;B:个青皮对照特征图谱;C:四花青皮对照特征图谱。1:辛弗林;3:芸香柚皮苷;4:橙皮苷;6:川陈皮素;7:橘皮素。

Note:A: Mixed reference substance; B: Control characteristic chromatogram of FCI; C: Control characteristic chromatogram of PCRV. 1: Synephrine;

3: Narirutin; 4: Hesperidin; 6: Nobiletin; 7: Tangeretin.

色谱条件进样分析,根据色谱峰保留时间并结合紫外3D光谱图,分别对个青皮和四花青皮特征图谱中7个共有特征峰进行指认,确定峰1为辛弗林;峰3为芸香柚皮苷;峰4为橙皮苷;峰6为川陈皮素;峰7为橘皮素,结果见图2。

表2 不同规格对照特征图谱相似度评价结果

Table 2 Evaluation results of the similarity of control characteristic chromatograms of different specifications of FCI and PCRV

序号 No.	相似度 Similarity	
	FCI	PCRV
S1	0.991	0.997
S2	0.990	0.991
S3	0.993	0.979
S4	0.998	0.987
S5	0.994	0.999
S6	0.998	0.997
S7	0.980	0.999
S8	0.942	0.995
S9	0.995	0.999
S10	0.988	0.998
S11	0.987	0.983
S12	0.994	0.998
S13	0.994	0.996
S14	0.994	0.998
S15	1.000	0.986

## 2.2 不同规格青皮药材的化学计量学分析

### 2.2.1 聚类分析(HCA)

采用 IBM SPSS 24.0 软件,以 15 批个青皮和四

花青皮 7 个共有特征峰的峰面积积分值为变量进行 HCA 分析,当组间联接距离为 10~15 时,除去个别批次(PCR14、PCR15、PCR12、PCR2、和 FCI6)外,四花青皮、个青皮根据规格的不同基本分为两类,结果见图3所示。

### 2.2.2 主成分分析(PCA)

采用 SIMCA14.1 软件,以 15 批个青皮和四花青皮 7 个共有特征峰的峰面积积分值为变量进行 PCA 分析,所建立的模型  $R^2 X = 0.988$ ,  $Q^2 = 0.684 > 0.5$ ,表明模型有效。得分图(见图4)显示,四花青皮、个青皮除个别批次外,基本分为两类,结果与聚类分析一致。

### 2.2.3 OPLS-DA

采用 SIMCA14.1 软件,以共有指纹峰的峰面积积分值为变量进行有监督模式的 OPLS-DA 分析,所建立的模型  $R^2 X = 0.968$ ,  $R^2 Y = 0.772$ ,  $Q^2 = 0.668 > 0.5$ ,表明模型有效。得分图(见图5)显示,四花青皮、个青皮明显分为两类;将该模型随机排列 200 次进行置换检验(见图6)。置换检验参数  $R^2$  和  $Q^2$  的截距分别为 0.114、-0.533, OPLS-DA 模型的原始  $R^2$  和  $Q^2$  (位于图6右上方)均大于左边随机排列后的  $R^2$  和  $Q^2$ ,表明建立的 OPLS-DA 模型没有出现拟合现象,可用于不同规格青皮药材的模式识别。VIP 图(见图7)显示,变量对分类的影响,峰1 > 峰4 > 峰2 > 峰5 > 峰6 > 峰7 > 峰3。以 VIP 值 > 1.0 为显著影响,共找到 3 个差异标志物,分别为峰1(辛弗林)、峰4和峰2(橙皮苷)。

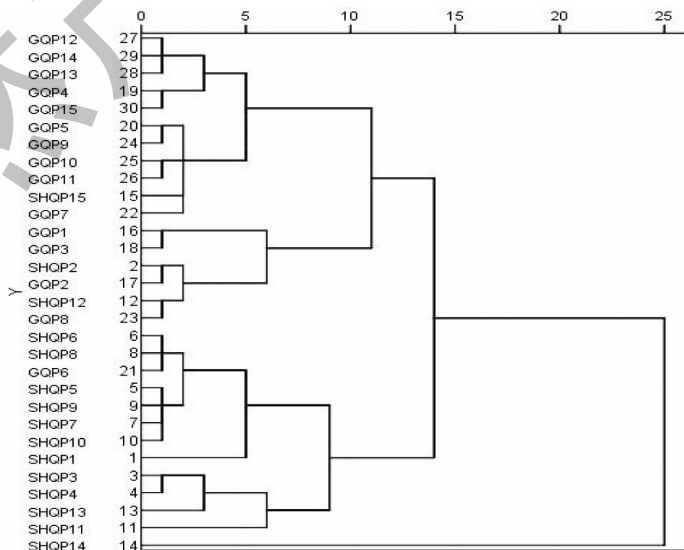


图3 30批不同规格的青皮的CA结果

Fig. 3 CA result of 30 batches of different specifications of Pericarpium Citri Reticulatae Viride

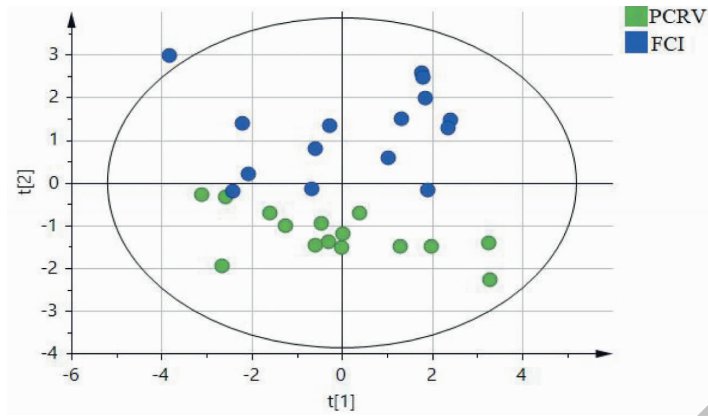


图 4 30 批不同规格的青皮的 PCA 得分图

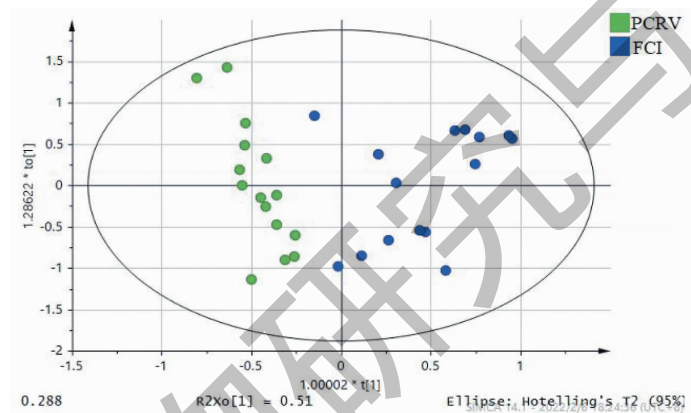
Fig. 4 PCA score plot of 30 batches of different specifications of *Pericarpium Citri Reticulatae Viride*.

图 5 30 批不同规格的青皮的 OPLS-DA 得分图

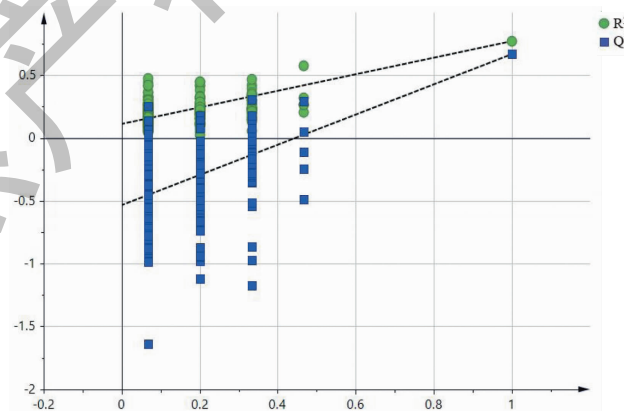
Fig. 5 OPLS-DA score plot of 30 batches of different specifications of *Pericarpium Citri Reticulatae Viride*.

图 6 OPLS-DA 模型置换验证图

Fig. 6 OPLS-DA model permutation test diagram

## 2.3 含量测定

### 2.3.1 精密度试验

取“2.1.2”项下混合对照品溶液,按“2.1.1”项

下色谱条件重复进样 6 次,分别测定辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素峰面积,并计算峰面积 RSD 值在 0.13% ~ 0.58% 范围内,均小于 3%,

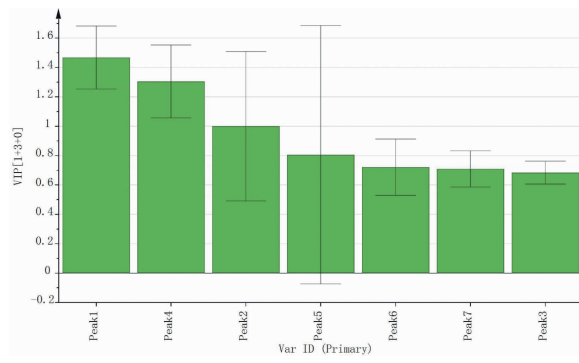


图7 差异性标志物 VIP 图

Fig. 7 VIP map of different markers

表明仪器精密度良好。

### 2.3.2 线性关系考察

取辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含辛弗林 1 180.627  $\mu\text{g}$ 、芸香柚皮苷 156.055  $\mu\text{g}$ 、橙皮苷 763.772  $\mu\text{g}$ 、川陈皮素 102.626  $\mu\text{g}$  和橘皮素 78.910  $\mu\text{g}$  的对照品储备液。精密移取上述对照品储备液 0.1 mL,置 50 mL 量瓶中,再精密移取上述对照品储备液 0.1、0.5、1、3、4 mL,分别置 5 mL 量

瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得到系列浓度的对照品稀释液,依次吸取上述对照品储备液和稀释液,分别按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,以峰面积为纵坐标,对照品浓度为横坐标进行线性回归,实验结果见表 3,辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素的线性相关系数  $r$  均为 0.999 9,表明以上 5 种成分在上述浓度范围内,对照品浓度与峰面积线性关系良好。

表 3 含量测定线性考察结果

Table 3 Results of linear inspection of content determination

指标成分 Index component	线性范围 Linear range( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	标准曲线 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient( $r$ )
辛弗林 Synephrine	2.361 ~ 1 180.627	$y = 6.194 9x - 1.536 8$	0.999 9
芸香柚皮苷 Narirutin	0.312 ~ 156.055	$y = 13.381x + 0.121 2$	0.999 9
橙皮苷 Hesperidin	1.528 ~ 763.772	$y = 6.144 7x + 0.032 8$	0.999 9
川陈皮素 Nobiletin	0.205 ~ 102.626	$y = 7.289 9x + 0.231 2$	0.999 9
橘皮素 Tangeretin	0.158 ~ 78.910	$y = 6.209 6x - 0.075 7$	0.999 9

### 2.3.3 重复性试验

各取个青皮(FCI01)、四花青皮(PCRV01)细粉约 0.4 g,精密称定,平行 6 份,分别按“2.1.3”项下方法制备样品溶液 6 份,按“2.1.1”项下色谱条件测定,计算含量;结果显示,个青皮中辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素的平均含量分别为 10.486、30.391、98.250、0.358 和 0.173 mg/g,四花青皮中辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素的平均含量分别为 5.708、22.976、57.502、2.883 和 1.031 mg/g,上述 6 份个青皮样品中 5 种有效成分含量的 RSD 值在 0.12% ~ 1.45% 范围内,6 份四花青皮样品中 5 种有效成分含量的 RSD 值在

0.75% ~ 2.09% 范围内,均小于 3%,说明该方法重复性良好。

### 2.3.4 加样回收率试验

各取个青皮(FCI01)、四花青皮(PCRV01)细粉约 0.4 g,精密称定,平行 9 份,按样品与对照品含量比为 0.5:1、1:1 和 1:1.5 的比例,加入辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素对照品,每种比例样品平行 3 份,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,测定个青皮辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素含量的回收率均值分别为 100.59%、99.16%、98.97%、98.65% 和 96.48%,9 份样品加样回收率 RSD 值在 0.83% ~ 2.81% 范围内,四花青



皮辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素含量的回收率均值分别为 105.95%、98.84%、99.90%、99.29% 和 98.01%，9 份样品加样回收率 RSD 值在 0.56%~1.97% 范围内，均小于 3%，说明加样回收率良好(见表 4)。

### 2.3.5 稳定性试验

取“2.3.3 重复性试验”项下供试品溶液，室温放置，按“2.1.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、8、12 和 24 h 进样分析，计算个青皮中辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素峰面积 RSD 值在 0.17%~1.80% 范围内，四花青皮中辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素峰面积 RSD 值在 0.51%~1.59% 范围内，均小于 3%，表明供试品溶

液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

### 2.3.6 样品测定

取 15 批个青皮和四花青皮样品，按“2.1.3”项下方法分别制备供试品溶液，每批样品平行两份，并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，外标法计算辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素的含量，结果见表 5。采用 SPSS 2.0 软件，以共有成分的含量为变量进行独立样本 *t* 检验分析，辛弗林  $P < 0.001$ ，橙皮苷  $P < 0.001$ ，川陈皮素  $P = 0.048$ ，在  $\alpha = 0.05$  的检验水准下，差异具有统计学意义，可以认为，个青皮与四花青皮中辛弗林、橙皮苷、川陈皮素的含量差异明显(见图 8)。

表 4 含量测定加样回收率考察结果

Table 4 Results of the investigation of the sample recovery rate of the content determination

规格 Specification	指标成分 Index component	回收率均值 Average recovery rate (%)	RSD (%)
FCI	辛弗林 Synephrine	100.59	0.83
	芸香柚皮苷 Narirutin	99.16	2.01
	橙皮苷 Hesperidin	98.97	1.59
	川陈皮素 Nobiletin	98.65	1.28
	橘皮素 Tangeretin	96.48	2.81
PCRV	辛弗林 Synephrine	105.95	0.56
	芸香柚皮苷 Narirutin	98.84	1.34
	橙皮苷 Hesperidin	99.90	0.72
	川陈皮素 Nobiletin	99.29	1.97
	橘皮素 Tangeretin	98.01	1.66

表 5 样品含量测定结果

Table 5 Results of sample determination

编号 No.	辛弗林 Synephrine (mg/g)	芸香柚皮苷 Narirutin (mg/g)	橙皮苷 Hesperidin (mg/g)	川陈皮素 Nobiletin (mg/g)	橘皮素 Tangeretin (mg/g)
FCI01	10.651	30.386	98.241	0.355	0.172
FCI02	4.892	27.653	88.447	0.378	0.174
FCI03	10.474	27.290	96.037	0.402	0.203
FCI04	8.268	16.765	91.221	2.589	0.358
FCI05	8.356	7.429	81.201	5.600	2.233
FCI06	8.862	13.841	91.347	1.622	0.295
FCI07	6.462	33.066	80.277	0.375	0.179
FCI08	7.524	30.861	79.473	0.368	0.183
FCI09	12.887	8.438	81.674	6.653	2.134
FCI10	12.795	5.472	87.816	9.496	4.985

续表 5 (Continued Tab. 5)

编号 No.	辛弗林 Synephrine (mg/g)	芸香柚皮苷 Narirutin (mg/g)	橙皮苷 Hesperidin (mg/g)	川陈皮素 Nobiletin (mg/g)	橘皮素 Tangeretin (mg/g)
FCI1	12.705	5.564	83.360	9.690	4.916
FCI2	13.170	9.623	91.051	8.600	4.250
FCI3	15.315	9.391	98.501	8.223	4.055
FCI4	14.838	9.262	92.246	8.419	4.383
FCI5	5.377	18.502	95.213	4.639	2.214
PCRV01	5.710	22.987	57.489	2.977	1.024
PCRV02	7.664	24.458	80.528	2.218	0.729
PCRV03	4.998	21.203	66.574	5.579	0.750
PCRV04	4.612	15.024	68.832	7.905	1.456
PCRV05	5.797	3.975	64.104	7.052	3.128
PCRV06	5.595	11.926	70.620	2.854	2.186
PCRV07	4.556	29.136	67.681	6.236	2.000
PCRV08	5.833	21.569	72.306	1.825	1.975
PCRV09	6.001	1.585	67.474	8.100	3.954
PCRV10	4.477	2.636	71.682	13.546	6.630
PCRV11	4.438	2.289	52.852	14.436	6.366
PCRV12	8.069	7.995	76.482	11.043	4.764
PCRV13	5.372	9.006	67.028	15.518	5.606
PCRV14	7.595	7.435	75.163	9.813	5.223
PCRV15	5.237	12.428	76.292	5.350	2.827
$t_{FCI}$	10.172	16.903	89.074	4.554	2.217
$t_{PCRV}$	5.730	13.437	69.007	7.630	3.008
$F$	18.926	0.584	0.013	0.081	0.016
$P$	0.001	0.267	0.001	0.048	0.116

注:  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义;  $t$  代表含量均值。

Note:  $P < 0.05$  indicates that the difference was statistically significant;  $t$  represents the average content.

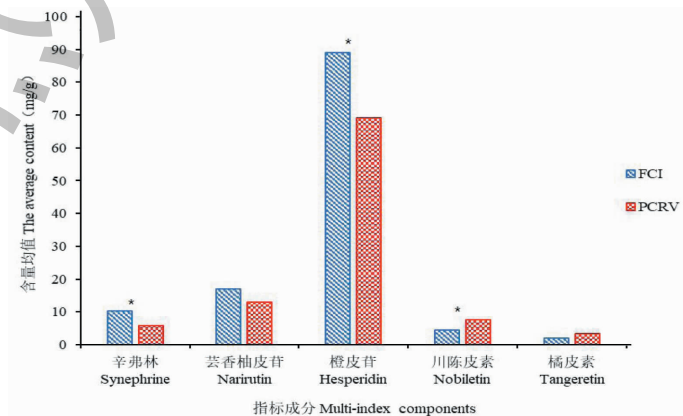


图 8 个青皮、四花青皮多指标成分含量均值对比图

Fig. 8 Comparison chart of the average content of multi-index components in PCRV and FCI

注: \* 该成分具有显著性差异。Note: \* The component has significant difference.

### 3 讨论与结论

#### 3.1 供试品溶液制备

本研究通过单因素分析,以色谱峰“总峰面积/称样量”和辛弗林、橙皮苷、芸香柚皮苷、川陈皮素和橘皮素的含量为评价指标,分别考察了提取溶剂(甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、70%乙醇、50%乙醇)、提取方式(超声提取、加热回流)、提取时间(15、30、45 min)对特征图谱和各成分含量测定的影响,最终确定采用70%甲醇加热回流30min效果最佳。

#### 3.2 特征图谱的建立及分析

特征图谱研究结果显示,个青皮和四花青皮 UPLC 特征图谱均有7个共有峰。通过对照品指认出个青皮和四花青皮的5个特征性成分,分别为辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素和橘皮素。分别考察了不同水相(0.1%磷酸和0.1%甲酸)、两种不同类型色谱柱 Waters ACQUITY HSS T3(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)、YMC Triart C<sub>18</sub>(100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm),还比较了不同检测波长(275 nm 和 284 nm)、不同柱温(38、40、42 °C)、不同流速(0.28、0.30、0.32 mL/min)对青皮特征图谱色谱峰的影响,结果显示采用 Waters ACQUITY HSS T3(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱,以0.1%甲酸为水相,在275 nm检测波长、柱温为40 °C、流速0.30 mL/min 色谱条件下色谱峰的分离度较好,基线平稳,色谱峰数目较多,且信号相应较高。

#### 3.3 个青皮和四花青皮化学成分的区别

本研究建立的不同规格青皮药材的 UPLC 特征图谱,个青皮和四花青皮均标识出7个共有峰,其中均指认了5个特征峰,确定峰1为辛弗林;峰3为芸香柚皮苷;峰4为橙皮苷;峰6为川陈皮素;峰7为橘皮素,本研究采用 HCA、PCA、OPLS-DA 均可把不同规格的青皮药材分为2类;进一步分析可知,1号峰、4号峰、2号峰所代表的化学成分为这两种规格的青皮药材的差异性成分,因此后续可以将这3种成分作为区分这两种规格的青皮药材的切入点进行深入分析。

黄酮类化合物是青皮的主要有效成分,个青皮和四花青皮中含有的5种已知黄酮类成分的含量测定结果显示,个青皮中辛弗林和橙皮苷的含量高于四花青皮,个青皮中川陈皮素和橘皮素的含量低于四花青皮,两种规格的青皮芸香柚皮苷的含量总体上较为接近,独立样本 *t* 检验分析,辛弗林、橙皮苷

和川陈皮素的差异具有统计学意义。此结果与 Li 等<sup>[5]</sup> 研究结果较一致。

除本实验中研究的黄酮类化合物外,挥发油也是青皮药材的有效成分之一。Zhao<sup>[11]</sup> 对个青皮和四花青皮的挥发油的研究结果显示,香叶醇、橙花醇、 $\alpha$ -异松油烯等为9个化合物为个青皮所特有,主成分柠檬烯和芳樟醇个青皮为四花青皮的两倍多。临床应用,四花青皮的功能主治较个青皮会更为温和,这可能与四花青皮中橙皮苷、辛弗林等有效成分以及挥发油含量较个青皮降低有关。

查阅相关著作文献得知,个青皮是5~6月收集自落的幼果;四花青皮则是7~8月采收未成熟的果实,两种的区别在于采收时间和成熟阶段。由上述结果可知,不同的生长发育阶段会影响青皮活性成分的积累,但是青皮在生育发育期间,有效成分并不是简单地呈现递增或者递减的趋势,而是有的递增有的递减:川陈皮素和橘皮素呈现递增的趋势;辛弗林、橙皮苷和芸香柚皮苷呈现递减的趋势。这些含量的差异是否直接或间接地导致不同规格的青皮的功效侧重点不同,需要进一步药理实验证明。根据两种不同规格的青皮5种有效成分含量的区别,结合两种功效侧重点的不同启示我们,若在临床应用中,开具处方时,分开标明使用,可以更好地实施中医的辨证施治,提高治疗的效率。同时,若现行药典标准可以对个青皮和四花青皮分开建立质量标准,可以更有利于青皮药材的质量控制。

#### 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: 205-206.
- 2 Chinese Herbalism Editorial Board, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China. Chinese Materia Medica(中华本草)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1999:1345.
- 3 Wang TH, Luo YY, Wang YC, et al. Study on active components and mechanism of volatile oil of *Citri reticulatae* preventing and treating Alzheimer's disease based on GC-MS and network pharmacology[J]. J China Pharm(中国药房), 2020, 31:2093-2100.
- 4 Liu LC, Wang XY, Li LN, et al. Research advances of chemical constituents and analytical methods of *Citri Reticulatae* Pericarpium Viride and *Citri Reticulatae* Pericarpium[J].

- China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2022,47:2866-2879.
- 5 Li XD, Ma ZJ, Ma SJ, et al. Comparison of four components in Fructus Citri Immaturus and Pericarpium Citri Reticulatae Viride[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2005,27:611-612.
- 6 Ren X, Shi KX, Zhang Z, et al. Protective effects of polymethoxyflavones extract from *Citrus reticulata* 'Chachi' on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice[J]. J. Huazhong Agr Univ(华中农业大学学报),2021,40:248-255.
- 7 Liu LL, Li H, He D, et al. Metabolic and excretory process of Citri Reticulatae Pericarpium Viride and Citri Reticulatae Pericarpium in rats' urine and feces analyzed by RRLC-QqQ-MSn[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2018,43:4519-4527.
- 8 Jin XY. Efficacy evaluation of traditional Chinese medicine combined with antibiotics in the treatment of lactation mastitis and study on milk microbiome[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学),2021.
- 9 Beijing Municipal Medical Products Administration. Beijing Standard for Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces(北京市中药饮片标准)[M]. Beijing: Capital Normal University Press,2000:147.
- 10 Li GW, Qiu YJ, Suo CX, et al. Research on the UPLC fingerprint and content determination of traditional Chinese medicine decoction pieces in Rutaceae based on standard decoction[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:1649-1667.
- 11 Zhao YS. The study of the quality evaluation of Pericarpium Citri Reticulatae and Pericarpium Citri Reticulatae Viride from the same plant source[D]. Chengdu: Chengdu University of Chinese Medicine(成都中医药大学),2011:37,58.
- 12 Yi ZL, Xie PS, Liang YZ, et al. Studies on Fingerprints of Pericarpium Citri Reticulatae Viride[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中药新药与临床药理),2004,15:403-406.

---

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社