

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)21-0098-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.21.022



枳实和枳壳高效液相色谱指纹图谱的建立*

李翅翔, 黄玉兰[△], 袁常珍, 邹欣宴

(四川省泸州市市场检验检测中心, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 建立枳实和枳壳的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液和 0.1% 十二烷基磺酸钠溶液(枳实)、乙腈-0.1% 甲酸溶液(枳壳), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 283 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)建立 46 批次枳实和 40 批次枳壳的指纹图谱, 确定共有峰, 并进行相似度评价。结果 枳实、枳壳 HPLC 指纹图谱的方法学考察结果良好, 分别指认了 12 个和 8 个共有峰, 46 批次枳实和 40 批次枳壳的指纹图谱相似度均大于 0.900。结论 所建立的方法重复性、专属性良好, 能为枳实、枳壳的质量控制和评价提供参考。

关键词: 高效液相色谱法; 指纹图谱; 枳实; 枳壳

Establishment of HPLC Fingerprints of Aurantii Fructus Immaturus and Aurantii Fructus

LI Chixiang, HUANG Yulan, YUAN Changzhen, ZOU Xinyan

(Luzhou Market Inspection and Testing Center, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of Aurantii Fructus Immaturus and Aurantii Fructus. **Methods** The chromatographic column was Agilent ZORBAX SB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% formic acid solution and 0.1% sodium dodecyl sulfonate solution (Aurantii Fructus Immaturus), acetonitrile 0.1% formic acid solution (Aurantii Fructus), gradient elution, the detection wavelength was 283 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. Fingerprints of 46 batches of Aurantii Fructus Immaturus and 40 batches of Aurantii Fructus were established through the Similarity Evaluation System of Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprints (Version 2012), and the common peaks were determined, and the similarity was evaluated. **Results** The methodological investigation of HPLC fingerprints of Aurantii Fructus Immaturus and Aurantii Fructus showed good results, twelve and eight common peaks were identified, and the similarities of 46 batches of Aurantii Fructus Immaturus and 40 batches of Aurantii Fructus were higher than 0.900. **Conclusion** The established method has good repeatability and specificity, which can provide a reference for the quality control and evaluation of Aurantii Fructus Immaturus and Aurantii Fructus.

Key words: HPLC; fingerprint; Aurantii Fructus Immaturus; Aurantii Fructus

枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果, 于 5~6 月采收, 干燥后直径为 0.5~2.5 cm, 具有破气消积、化痰散痞功效, 可用于治疗积滞内停、痞满胀痛、泻痢后重、大便不通、痰滞气阻、胸痹、结胸及脏器下垂^[1]。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, 于 7 月果皮尚绿时采收, 干燥后直径为 3~5 cm, 具有理气宽中、行滞消胀功效, 可用于治疗胸胁气滞、胀满疼痛、食积不化、痰饮内停、脏器下垂^[1]。枳实专利低位性气滞, 枳壳专利高位性气滞^[2]。枳实、枳壳主要有黄酮类^[3-4]、生物碱类^[5]、挥发油^[6]、香豆素类^[7]、三萜类^[8-9]等成分, 具有抗菌消炎、抗过敏、抗肿瘤、抗氧化、升压、强心、促进胃肠道功能、抗抑郁等作用^[10-16]。目前的研究主要集中于枳实、枳壳指纹图谱的分析^[17-22], 但大多方法复杂, 且指认的共有峰较少,

或样本量较少, 不能全面、真实地反映枳实、枳壳药材的质量。为此, 本研究中建立了 46 批次枳实和 40 批次枳壳的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 并进行相似度评价, 为其质量控制和评价提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

U3000 型高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技 <中国> 有限公司), 配有二极管阵列检测器; XS205DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为 0.01 mg/0.1 mg); KH7200 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司, 功率为 600 W, 频率为 50 kHz); UPHW-I-90T 型微量分析超纯水机(四川优普超纯科技有限公司)。

1.2 试剂

橙皮苷对照品(批号为 110721-202220, 含量为 97.2%), 新橙皮苷对照品(批号为 111857-201804, 含

* 基金项目: 四川省药品监督管理局科技计划项目[2021007]。

第一作者: 李翅翔, 女, 大学本科, 中药师, 研究方向为中药材、中药饮片质量标准, (电子信箱)1904803039@qq.com。

[△]通信作者: 黄玉兰, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品质量控制与评价, (电子信箱)329601883@qq.com。

量为99.4%),川陈皮素对照品(批号为112055-202102,含量为99.7%),辛弗林对照品(批号为110217-202110,含量为99.8%),枳壳对照药材(批号为120981-202106),枳实(酸橙)对照药材(批号为120936-202107),均购于中国食品药品检定研究院;枸橼苷对照品(批号为M25HB179212,含量为99.2%),*N*-甲基酪胺对照品(批号为7-RTU-100-1,含量为95%),均购于上海源叶生物科技有限公司;新北美圣草苷对照品(批号为22051001,含量为98.33%),芸香柚皮苷对照品(批号为PCS-210309,含量为98.6%),柚皮苷对照品(批号为PCS-210913,含量为98.89%),柚皮素对照品(批号为PCS-210224,含量为99.21%),橙皮素对照品(批号为PCS-200811,含量为98.45%),桔红素对照品(批号为PCS-210123,含量为98.78%),均购于北京中科质检生物有限公司;乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技<中国>有限公司,批号为191614);甲酸(批号为20100610),甲醇(批号为2022011802),十二烷基磺酸钠(批号为20121023),均为分析纯,购于成都市科龙化工试剂厂;水为超纯水;枳实、枳壳样品信息见表1,产地均为四川泸州王湾枳实、枳壳种植基地,经四川省食品药品检验检测院主任药师黎跃成教授鉴定为正品。

表1 枳实和枳壳样品信息

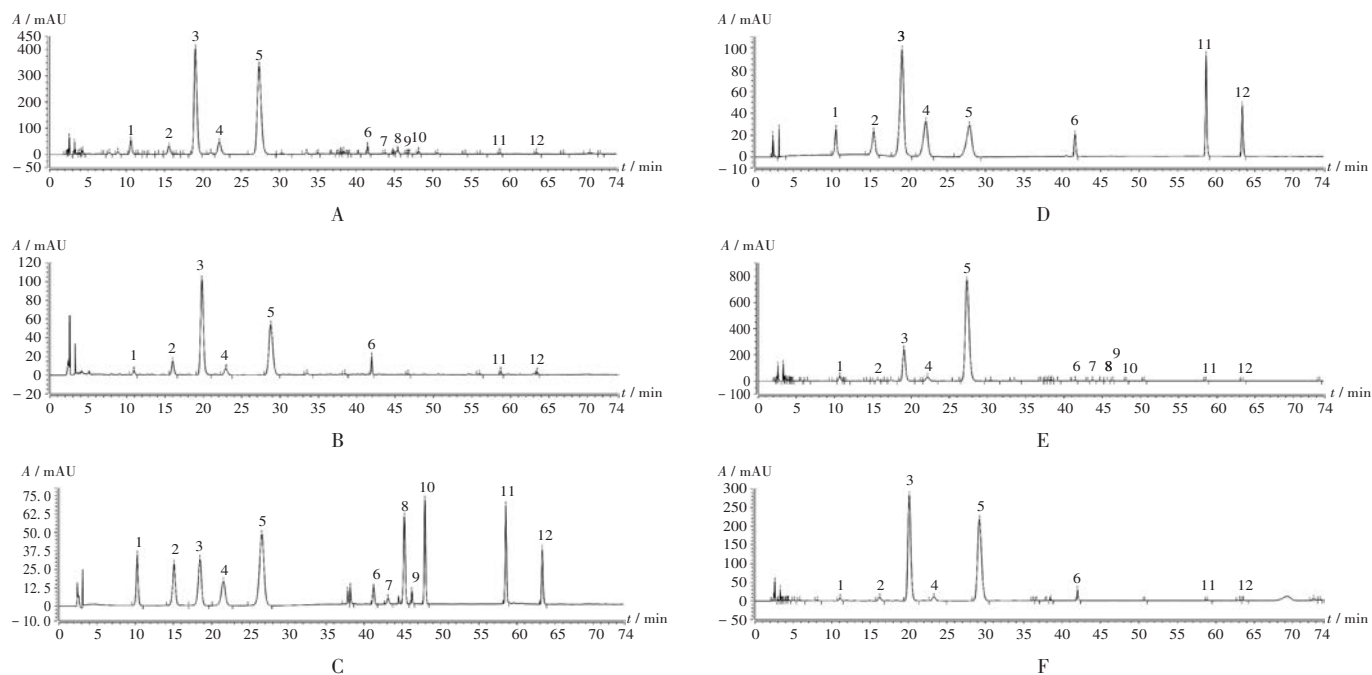
Tab. 1 Information of *Aurantii Fructus Immaturus* and *Aurantii Fructus* samples

枳实		枳壳	
编号	采集时间	编号	采集时间
S1-S11	2020年5月	Q1-Q11	2020年6月11日后
S12-S31	2020年6月8日前	Q12-Q28	2020年7月
S32-S38	2021年5月	Q29-Q34	2020年8月10日前
S39-S46	2021年6月8日前	Q35-Q40	2021年7月

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:枳实为乙腈(A)-0.1%甲酸溶液和0.1%十二烷基磺酸钠溶液(B),枳壳为乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B'),梯度洗脱(0~26 min时18%A, 26~73 min时18%A→62%A, 73~74 min时62%A→18%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:283 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL;分析时间:74 min。在此色谱条件下,对照品溶液、对照药材溶液和供试品溶液中,各成分均达到基线分离,理论板数按柚皮苷峰计应不低于5 000。色谱图见图1。



1. 新北美圣草苷 2. 芸香柚皮苷 3. 柚皮苷 4. 橙皮苷

5. 新橙皮苷 6. 枸橼苷 7. 辛弗林 8. 柚皮素 9. *N*-甲基酪胺 10. 橙皮素 11. 川陈皮素 12. 桔红素

A - B. 对照药材溶液(枳实、枳壳) C - D. 对照品溶液(枳实、枳壳) E - F. 供试品溶液(编号分别为枳实S₁、枳壳Q₁)

图1 高效液相色谱图

1. Neohesperidin 2. Narirutin 3. Naringin 4. Hesperidin 5. Neohesperidin 6. Citrin 7. Synephrine 8. Naringenin 9. *N*-methyltyramine
10. Hesperetin 11. Nobiletin 12. Tangeretin

A - B. Reference medicinal materials solution (*Fructus Aurantii Immaturus* and *Aurantii Fructus*) C - D. Reference solution (*Aurantii Fructus Immaturus* and *Aurantii Fructus*) E - F. Test solution (numbered *Aurantii Fructus Immaturus* S₁ and *Aurantii Fructus* Q₁, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液制备

供试品溶液:取46批(编号为S1-S46)枳实药材,粉碎,过4号筛,取粉末0.1g,精密称定,置20 mL容量瓶中,加甲醇适量,超声30 min,放冷,用甲醇定容,摇匀,用0.45 μm滤膜过滤,取续滤液,即得枳实供试品溶液。取40批(编号为Q1-Q40)枳壳药材,粉碎,过4号筛,取粉末0.1g,精密称定,依上法制备枳壳供试品溶液。

对照药材溶液:分别取枳实、枳壳对照药材0.1003g和0.1006g,精密称定,按供试品溶液制备方法制备,即得。

对照品溶液:取新北美圣草苷对照品9.87 mg、芸香柚皮苷对照品9.03 mg、柚皮苷对照品10.36 mg、橙皮苷对照品15.29 mg、新橙皮苷对照品10.77 mg、枸橼苷对照品10.02 mg、辛弗林对照品10.17 mg、柚皮素对照品5.09 mg、*N*-甲基酪胺对照品5.33 mg、橙皮素对照品4.90 mg、川陈皮素对照品10.63 mg、桔红素对照品5.71 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇分别制成单标贮备液;精密量取上述单标贮备液各适量,置同一20 mL容量瓶中,加甲醇制备枳实对照品溶液(质量浓度分别为47.54, 53.36, 242.55, 100.46, 98.77, 22.84, 101.50, 27.59, 50.64, 29.65, 47.46, 22.98 μg/mL)。取除辛弗林、柚皮素、*N*-甲基酪胺、橙皮素单标贮备液外制备枳壳对照品溶液。以柚皮苷对照品溶液作为参照物溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:分别取枳实样品(编号为S1)和枳壳样品(编号为Q1)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,分别按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图,以柚皮苷为参照峰,计算共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果,枳实样品的12个共

有色谱峰的相对保留时间的RSD为0.007%~0.538%范围之内,相对峰面积的RSD为0.021%~1.521%;枳壳样品的8个共有色谱峰的相对保留时间的RSD为0.005%~0.047%,相对峰面积的RSD为0.601%~1.310%,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:分别取枳实样品(编号为S1)和枳壳样品(编号为Q1),依法制备供试品溶液,分别于0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以柚皮苷为参照峰,计算共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果枳实样品的12个共有色谱峰的相对保留时间的RSD为0.074%~0.443%,相对峰面积的RSD为0.092%~1.997%;枳壳样品的8个共有色谱峰的相对保留时间的RSD为0.007%~0.260%,相对峰面积的RSD为0.665%~1.983%,表明供试品溶液24 h内稳定性良好。

重复性试验:分别取枳实样品(编号为S1)和枳壳样品(编号为Q1),依法制备供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以柚皮苷为参照峰,计算共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果枳实样品的12个共有色谱峰的相对保留时间的RSD为0.068%~0.333%,相对峰面积的RSD为0.383%~1.771%;枳壳样品的8个共有色谱峰的相对保留时间的RSD为0.009%~0.133%,相对峰面积的RSD为0.233%~1.959%,表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱建立

枳实:分别取2.2项下枳实对照品溶液和供试品溶液各10 μL,按2.1项下色谱条件进行色谱采集,通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)生成46批样品的色谱指纹峰,设定时间窗宽度为0.1 min,采用中位数法结合多点校正进行色谱峰匹配叠加(图2)及对照指

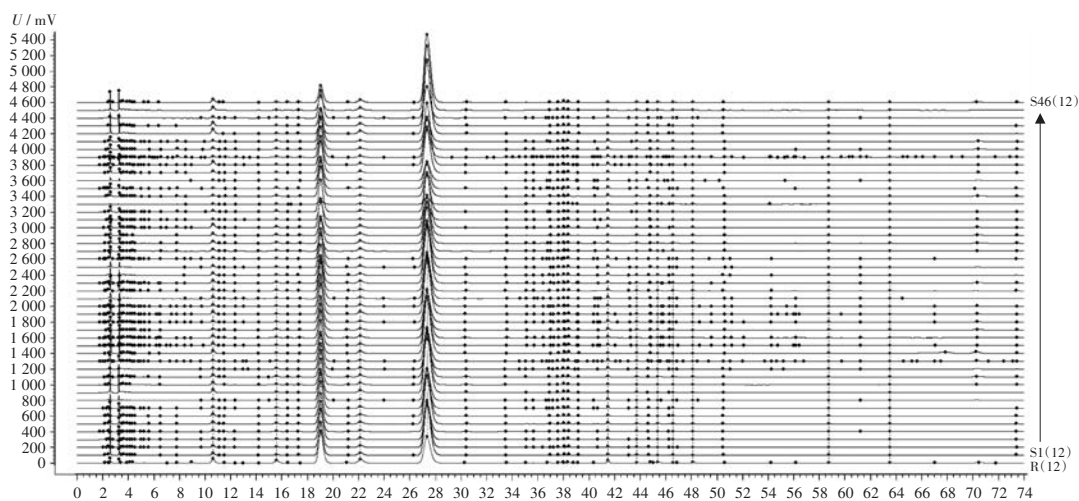


图2 46批枳实药材高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 2 HPLC overlay fingerprints of 46 batches of Aurantii Fructus Immaturus

纹图谱(图3)。通过与对照品溶液保留时间和紫外吸收光谱图对比,指认其中12个共有峰,分别为新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷、柚皮素、橙皮素、*N*-甲基酪胺、辛弗林、川陈皮素和桔红素。

枳壳:分别取2.2项下枳壳对照药材溶液和枳壳供试品溶液各10 μL,按2.1项下色谱条件进行色谱采集,通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)生成40批样品的色谱指纹峰,设定时间窗宽度为0.1 min,采用中位数法结合多点校正进行色谱峰匹配叠加(图4)及对照指纹图谱(图5)。通过与对照品溶液保留时间和

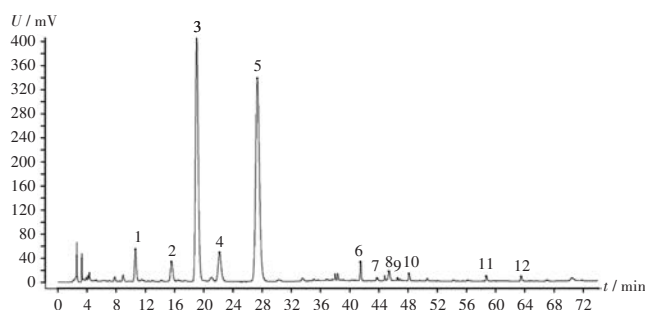


图3 枳实对照药材高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 3 HPLC reference fingerprints of the reference medicinal materials of Aurantii Fructus Immaturus

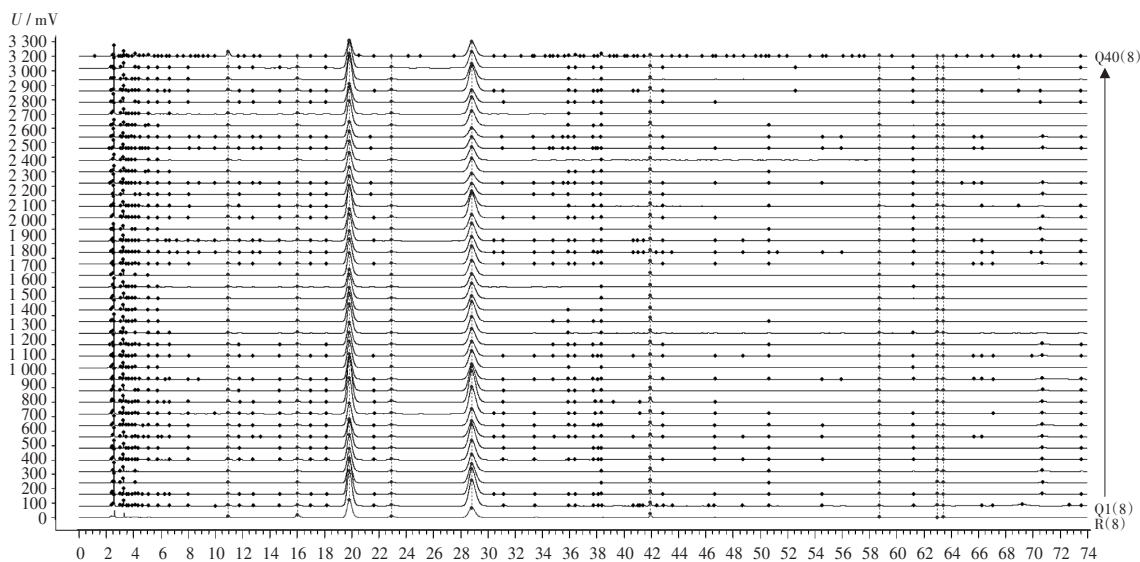


图4 40批枳壳药材高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 4 HPLC overlay fingerprints of 40 batches of Aurantii Fructus

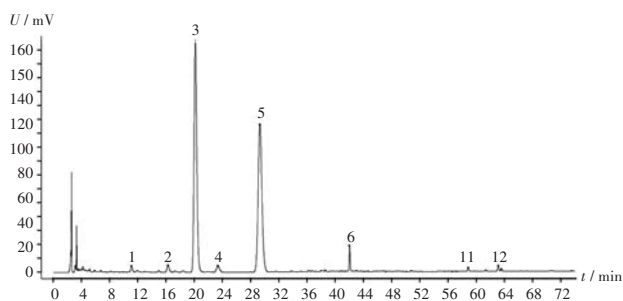


图5 枳壳对照药材高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 5 HPLC reference fingerprints of the reference medicinal materials of Aurantii Fructus solution

紫外吸收光谱图对比,共指认8个共有峰,分别为新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷、川陈皮素、桔红素。

2.5 相似度评价

HPLC 指纹图谱相似度评价结果显示,46批枳实药材与枳实对照药材指纹图谱的相似度为0.900~0.996,非共有峰面积占比为2.13%~13.51%;40批枳壳药材与枳壳对照药材指纹图谱的相似度为0.963~

0.995,非共有峰面积占比为4.74%~15.08%。枳实、枳壳与对照药材的指纹图谱相似度均大于0.900,相似度良好。详见表2和表3。

表2 枳实药材相似度

Tab. 2 Similarity of Aurantii Fructus Immaturus

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.938	S13	0.972	S25	0.986	S37	0.934
S2	0.926	S14	0.934	S26	0.972	S38	0.968
S3	0.940	S15	0.941	S27	0.924	S39	0.982
S4	0.988	S16	0.984	S28	0.994	S40	0.978
S5	0.980	S17	0.985	S29	0.956	S41	0.988
S6	0.957	S18	0.928	S30	0.913	S42	0.917
S7	0.987	S19	0.938	S31	0.928	S43	0.982
S8	0.925	S20	0.994	S32	0.930	S44	0.951
S9	0.930	S21	0.987	S33	0.986	S45	0.928
S10	0.903	S22	0.943	S34	0.900	S46	0.996
S11	0.987	S23	0.902	S35	0.942		
S12	0.900	S24	0.968	S36	0.984		

表3 枳壳药材相似度

Tab. 3 Similarity of Aurantii Fructus

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
Q1	0.987	Q11	0.986	Q21	0.991	Q31	0.988
Q2	0.989	Q12	0.995	Q22	0.987	Q32	0.991
Q3	0.976	Q13	0.993	Q23	0.985	Q33	0.995
Q4	0.985	Q14	0.994	Q24	0.992	Q34	0.994
Q5	0.981	Q15	0.988	Q25	0.987	Q35	0.994
Q6	0.974	Q16	0.995	Q26	0.984	Q36	0.992
Q7	0.967	Q17	0.988	Q27	0.987	Q37	0.989
Q8	0.985	Q18	0.993	Q28	0.995	Q38	0.995
Q9	0.986	Q19	0.993	Q29	0.995	Q39	0.994
Q10	0.990	Q20	0.986	Q30	0.990	Q40	0.963

3 讨论

通过优化流动相、检测波长、柱温、流速等色谱条件,建立了合适的分析方法。方法学考察结果显示,精密度、重复性、稳定性良好,符合指纹图谱的技术要求,可靠性高,能作为枳实、枳壳药材的HPLC指纹图谱的分析方法。

采用该方法对46批枳实药材和40批枳壳药材进样分析,与对照药材的相似度均大于0.900,表明枳实、枳壳与对照药材所含化学物质基本一致,不同采收时间得到的样品质量均一性较高,能对枳实、枳壳药材的质量进行整体描述及评价。通过与对照品溶液的保留时间和紫外吸收光谱图对比,枳实、枳壳药材分别指认了12个和8个共有峰,其中新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷、川陈皮素、橘红素为两者共有成分,可作为枳实、枳壳药材的质量标志物^[23],反映其共同点。相较于枳壳,柚皮素、橙皮素、*N*-甲基酪胺、辛弗林为枳实药材的特有成分,可体现二者的差异。

综上所述,本研究中建立的枳实、枳壳药材HPLC指纹图谱分析方法简单、结果准确可靠,样品的收集具有一定代表性,能为其质量控制和评价提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:257-258.
- [2] 黄伟. 来源于酸橙的枳实、枳壳品质评价体系研究[D]. 成都:成都中医药大学,2011.
- [3] 杨丽丽,姜艳艳,蒋丽娟,等. 枳实黄酮对照提取物研究及

其在枳实药材质量控制中的应用[J]. 中国中医药信息杂志,2019,26(9):73-79.

- [4] 陈建真,袁华,陈彬. 枳实和枳壳中黄酮苷类成分的比较研究[J]. 中国中医药科技,2015,22(5):529-530.
- [5] 董晶,梁兆昌,陈海芳,等. HPLC法同时测定不同采收期江枳壳中辛弗林和*N*-甲基酪胺的含量[J]. 井冈山大学学报(自然科学版),2016,37(2):92-96.
- [6] 徐小娜,左利,蒋军辉. GC-MS联用技术结合化学计量学方法分析枳实枳壳挥发油成分[J]. 南华大学学报(自然科学版),2020,34(1):68-74.
- [7] 徐倩,徐国兵. 香豆素类化合物代谢研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):222-225.
- [8] 杨玉环,张灵煜,郭秋平,等. 枳实、枳壳的生物活性成分及其应用研究进展[J]. 食品与药品,2021,23(5):476-484.
- [9] 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.
- [10] 赵思宇. 基于化学分类法探讨橘属植物的物质基础及枳实、枳壳不同抗炎作用[D]. 北京:北京中医药大学,2018.
- [11] 徐欢,陈海芳,介磊,等. 枳实、枳壳的化学成分及胃肠动力研究概述[J]. 江西中医学院学报,2009,21(1):42-44.
- [12] 钟民勇,乔日发,魏飞亭,等. 枳壳、枳实胃肠动力作用及其机制的研究概况[J]. 江西中医药,2021,52(12):68-71.
- [13] 王红勋. 枳实与枳壳的现代药理与临床应用研究[J]. 中国卫生标准管理,2014,5(16):39-40.
- [14] 张晚南,黄世敬. 枳实、枳壳的抗抑郁作用[J]. 环球中医药,2014,7(1):77-80.
- [15] 汲守信. 枳实与枳壳的品种及临床功用变迁沿革考[D]. 成都:成都中医药大学,2011.
- [16] 曾鸿莲. 枳实和枳壳中活性化合物的富集检测与PAMPA快速筛选研究[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [17] 何英杰. 湘枳壳有效成分指纹图谱构建及活性分析[D]. 长沙:湖南农业大学,2019.
- [18] 童培珍,李国卫,何嘉莹,等. 基于指纹图谱和多指标成分含量测定的枳壳与枳实药材质量差异性研究[J]. 中南药学,2022,20(4):898-904.
- [19] 庞文静,郑玉莹,彭维,等. 正品枳壳指纹图谱的构建及其与混伪品的聚类分析[J]. 中南药学,2017,15(10):1345-1350.
- [20] 吴梦玫,马舒婷,钟楚楚,等. 5种柑橘属药材中黄酮差异比较[J]. 中成药,2022,44(10):3225-3228.
- [21] 刘晓晴,孙磊,乔善义. 高效液相色谱指纹图谱法评价市售枳实、枳壳的质量[J]. 国际药学研究杂志,2014,41(2):244-248.
- [22] 赵宇. 枳实、枳壳色谱指纹图谱研究[D]. 长沙:中南大学,2005.
- [23] 许姗姗,许浚,张笑敏,等. 常用中药陈皮、枳实和枳壳的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药,2018,49(1):35-44.

(收稿日期:2023-02-22;修回日期:2023-07-04)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号:78-130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真:(023) 86592565

网上投稿: <http://www.zhongguoyaoye023.com> 或 中国药业在线投稿系统