

## 不同基原的化橘红 UPLC 指纹图谱、化学模式识别及含量测定研究

张靖年, 胥爱丽, 李养学, 李素梅, 陈昭, 肖观林[广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院), 广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095]

**摘要:** **目的** 建立化橘红药材的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱, 并进行化学模式识别分析及含量测定, 以鉴别不同基原的化橘红差异。**方法** 通过建立 UPLC 指纹图谱, 确定 20 批化橘红样品共有峰及峰面积, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)进行相似度分析。以共有峰峰面积数据为基础, 采用统计分析软件 SPSS 19.0 进行聚类分析, SIMCA 13.0 进行主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA), 并对指认的化学成分进行含量测定。**结果** UPLC 指纹图谱确定了 18 个共有峰, 指认其中 5、6、8、12、15 号峰分别为 7-羟基香豆素、柚皮苷、野漆树苷、佛手柑内酯、异欧前胡素; 相似度评价结果显示样品 S2、S3、S6、S8 相似度介于 0.851~0.891 之间, 其余 16 批样品相似度均 > 0.900。聚类分析可大致区分毛橘红和光橘红, 少数批次存在偏差; PCA 和 OPLS-DA 结果显示毛橘红和光橘红有更明显的区分趋势, 并筛选出 3 个可能造成两种化橘红差异的标志物。含量测定结果表明, 化橘红近成熟组柚皮苷含量高于幼果组和未成熟组 ( $P < 0.05$ ), 未成熟组佛手柑内酯含量明显高于近成熟组 ( $P < 0.05$ ), 各组野漆树苷、异欧前胡素含量无显著性差异。**结论** 所建立的 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别及含量测定方法, 可系统、全面地评价化橘红药材质量, 筛选出的差异性标志物可为药效物质研究提供参考。

**关键词:** 化橘红; 超高效液相色谱指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法判别分析; 含量测定  
**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2023)01-0103-07

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2023.01.014

### Study on UPLC Fingerprints, Chemical Pattern Recognition and Content Determination of Citri Grandis Exocarpium from Different Origins

ZHANG Jingnian, XU Aili, LI Yangxue, LI Sumei, CHEN Zhao, XIAO Guanlin [Guangdong Provincial Second Hospital of Traditional Chinese Medicine (Guangdong Provincial Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine)/Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095 Guangdong, China]

**Abstract:** **Objective** To establish UPLC fingerprints of Citri Grandis Exocarpium from different origins, and then analyze the samples by combination of chemical pattern recognition and content determination. The aim of our study was to find the difference of Citri Grandis Exocarpium from different origins. **Methods** The UPLC fingerprints of 20 batches of samples were established to confirm the common peaks and peak area. Similarity analysis was then performed using "Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine" (2012A Edition). Based on the common peak area data, cluster analysis was done by using SPSS 19.0, principal component analysis(PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA) were carried out by using SIMCA 13.0. The content of the identified components was also determined. **Results** 18 common peaks were identified by UPLC fingerprint. We identified peak 5, 6, 8, 12, 15 as 7-hydroxycoumarin, naringin, rhoifolin, bergamot lactone, isoimperatorin, respectively. Similarity evaluation result displayed that the similarity of S2, S3, S6 and S8 was in the range of 0.851 to 0.891, the similarity of other 16 batches of samples was greater than 0.900.

收稿日期: 2022-07-19

作者简介: 张靖年, 男, 硕士, 主管中药师, 研究方向: 中药鉴定及质量评价。Email: zjn9110@163.com。

基金项目: 2021 年省属科研机构稳定性支持项目(粤财科教[2021]113 号)。

Cluster analysis can be used to roughly distinguish *Citri grandis* “Tomentosa” and *Citrus grandis*, but a small amount of them was inconsistent. The results of PCA and OPLS-DA showed that there was obvious distinctive trend between *Citri grandis* “Tomentosa” and *Citrus grandis*. Furthermore, we selected 3 marking substance, which may be the cause of difference between two kinds of Citri Grandis Exocarpium. Content analysis indicated that naringin content of Citri Grandis Exocarpium in the near-mature group was higher than that in the young-fruit group and the immature group ( $P < 0.05$ ). The content of bergamot lactone in the immature group was higher than that in in the near-mature group ( $P < 0.05$ ). And there was no significant difference for content of rhoifolin and isoimperatorin among other groups. **Conclusion** We could evaluate quality of Citri Grandis Exocarpium comprehensively by means of UPLC fingerprints, chemical pattern recognition and content determination. The selected marking substance would provide reference for the research of effective substances.

**Keywords:** Citri Grandis Exocarpium; UPLC fingerprints; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; determination of content

化橘红为芸香科化州柚 *Citrus grandis* ‘Tomentosa’ 或柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥外层果皮,前者习称“毛橘红”,后者习称“光橘红”,具有理气宽中、燥湿化痰的功效,主治咳嗽痰多、食积伤酒、呕恶痞闷等症<sup>[1]</sup>。化橘红主要化学成分种类有挥发油、黄酮类、香豆素类、多糖等<sup>[2-7]</sup>,具有化痰止咳、抗炎、抗氧化、免疫调节等药理作用<sup>[8-12]</sup>。化橘红产区以两广地区为主,尤以产自化州的毛橘红为最佳,为“十大广药”之一。由于基原、成熟度、产地等因素,市面上的化橘红药材有多种商品规格,质量参差不齐<sup>[13]</sup>。指纹图谱是研究中药质量的常用方法,能反映中药材化学成分的种类与数量,但主要集中于整体相似度评价,差异性不够突出。化学模式识别技术则强调数据之间的差异性,恰好可以弥补中药指纹图谱的不足,两者结合可在整体评价的基础上体现出差异性成分的信息。化橘红药材的指纹图谱及化学模式识别已有相关研究<sup>[14-16]</sup>,但应用该法对不同基原、成熟度和产地的化橘红药材进行鉴别研究未见报道。本文基于指纹图谱结合化学模式识别方法,对20批化橘红药材进行质量研究,在区分不同基原、产地化橘红药材的同时,对可能影响化橘红药效的差异指标性成分进行筛选并进行含量测定,以期对化橘红药材的整体质量评价提供实验依据。

## 1 仪器与材料

Agilent 1290 Infinity II 型超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); MilliPore Advantage A10 自动纯水机(美国 MilliPore 公司); METTLER TLE204 型

万分之一电子分析天平、METTLER XS205DU 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); KQ5200DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH-8 数显恒温水浴锅(上海梅香仪器有限公司)。7-羟基香豆素、柚皮苷、野漆树苷、异欧前胡素(批号:111739-200501、110722-201714、111919-201503、110827-201611,纯度:100%、93.4%、92.3%、99.4%,中国食品药品检定研究院);佛手柑内酯(批号:F-008-151018,纯度:98%,成都瑞芬思生物科技有限公司);甲醇、冰醋酸为色谱纯(德国默克公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。20批化橘红药材均为自采,采收时间为2020年6月~8月,经广东省中医药工程技术研究院刘法锦研究员鉴定,S1~S14为芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* ‘Tomentosa’ 未成熟的干燥外层果皮或幼果,S15~S20分别为芸香科植物柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 近成熟的干燥外层果皮。按照习称“毛橘红”“光橘红”分别将其标记为 MJH 和 GJH。样品来源信息见表1。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm) 色谱柱;流动相:甲醇(A)-0.1%冰醋酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 10%→40%A; 5~20 min, 40%→65%A; 20~35 min, 65%→95%A);柱温:30℃;检测波长:320 nm;体积流量:0.2 mL·min<sup>-1</sup>;进样体积:1 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 取7-羟基香豆素、柚皮苷、野漆树苷、佛手柑内酯、异欧前胡素对照品适量,

表 1 化橘红样品信息

Table 1 Detailed informations of Citri Grandis Exocarpium

编号	批号	成熟度	产地	编号	批号	成熟度	产地
S1	MJH1	未成熟	广东化州	S11	MJH11	幼果	广东高州
S2	MJH2	幼果	广东化州	S12	MJH12	未成熟	广东化州
S3	MJH3	幼果	广东化州	S13	MJH13	未成熟	广东化州
S4	MJH4	幼果	广东化州	S14	MJH14	未成熟	广东化州
S5	MJH5	幼果	广东化州	S15	GJH1	近成熟	广东高州
S6	MJH6	幼果	广东化州	S16	GJH2	近成熟	广东高州
S7	MJH7	幼果	广东化州	S17	GJH3	近成熟	广东梅县
S8	MJH8	幼果	广东化州	S18	GJH4	近成熟	广东梅县
S9	MJH9	幼果	广东化州	S19	GJH5	近成熟	广西容县
S10	MJH10	幼果	广东高州	S20	GJH6	近成熟	广西容县

精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含 7-羟基香豆素 40 μg、柚皮苷 100 μg、野漆树苷 60 μg、佛手柑内酯 80 μg、异欧前胡素 40 μg 的混合对照品溶液，即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 取样品(S1)粉末(过 4 号筛) 1.0 g，精密称定，加甲醇 25 mL，称质量，超声处理(700 W，40 kHz)30 min，再次称质量并用甲醇补足减失的质量，摇匀，0.22 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

**2.4 方法学考察**

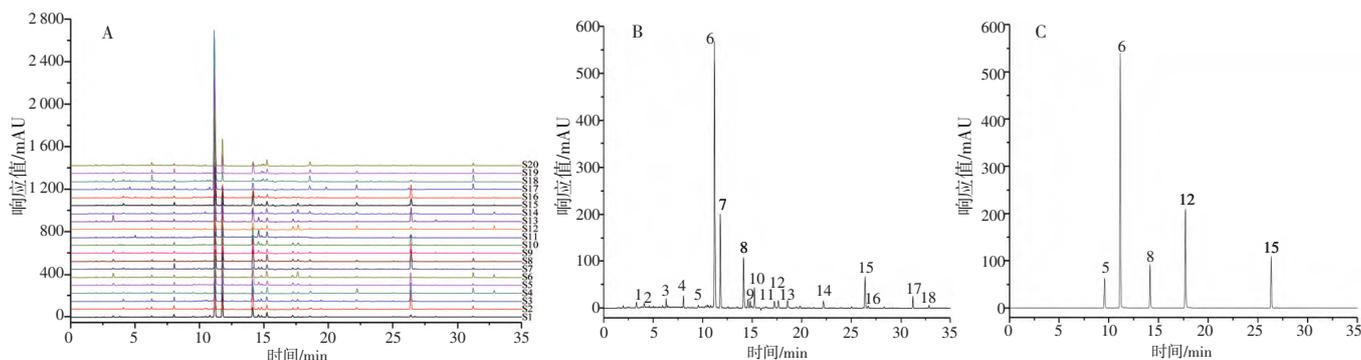
**2.4.1 精密度试验** 取同一供试品溶液(S1)，连续进样测定 6 次，以柚皮苷为参照峰计算得共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 分别介于 0.17%~0.28%、0.35%~0.96%之间，表明仪器精密度良好。

**2.4.2 稳定性试验** 取同一供试品溶液(S1)，分别于

0、2、4、8、12、24 h 进样测定，以柚皮苷为参照峰计算得共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 分别介于 0.24%~0.59%、0.42%~1.26%之间，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.4.3 重复性试验** 取同一样品(S1)平行制备 6 份供试品溶液并进样测定，以柚皮苷为参照峰计算得共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 分别介于 0.37%~0.66%、0.74%~1.89%之间，表明本试验重复性良好。

**2.5 指纹图谱的建立及相似度评价** 将 20 批样品的 UPLC 色谱图数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)，以 S1 为参照图谱进行多点校正，生成对照指纹图谱。该共有模式共有 18 个共有峰，通过对照品指认出其中 5、6、8、12、15 号峰分别为 7-羟基香豆素、柚皮苷、野漆树苷、佛手柑内酯、异欧前胡素。20 批样品 UPLC 色谱叠加图、指纹图谱共有模式及混合对照品色谱图见图 1。以柚皮苷峰为参照(S)计算共有峰的相对保留时间及相对峰面积，结果相对保留时间的 RSD 介于 0.14%~0.24%之间，表明所建立的 UPLC 指纹图谱可稳定反映样品共有峰保留时间；相对峰面积的 RSD 介于 49.26%~186.50%之间，表明同一共峰相对面积差异较大，即不同批次样品所含化学成分种类相当，但含量存在较大差异。



注：A. 化橘红色谱叠加图；B. 化橘红共有模式；C. 混合对照品。5. 7-羟基香豆素；6. 柚皮苷；8. 野漆树苷；12. 佛手柑内酯；15. 异欧前胡素

图 1 化橘红样品 UPLC 指纹图谱

Figure 1 UPLC fingerprint of Citri Grandis Exocarpium

将上述 20 批样品的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)进行相似度评价。结果见表 2。除 S2、S3、S6、S8 外，其余样品相似度均 >0.900，表明光橘红与大部分毛橘红相似度较高，而 4 批毛橘红(S2、S3、S6、S8)可能由于不同产区、不同生长阶段等原因导致相似度低于 0.9。

表 2 20 批化橘红样品相似度评价结果

Table 2 Similarity of 20 batches of Citri Grandis Exocarpium

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.978	S6	0.860	S11	0.985	S16	0.980
S2	0.891	S7	0.951	S12	0.982	S17	0.945
S3	0.851	S8	0.887	S13	0.965	S18	0.952
S4	0.907	S9	0.950	S14	0.941	S19	0.982
S5	0.927	S10	0.962	S15	0.992	S20	0.982

## 2.6 化学模式识别

**2.6.1 聚类分析** 将上述 20 批样品的共有峰峰面积数据导入 IBM SPSS Statistics 19.0, 采用平均组间连接法, 以欧氏距离为度量标准进行聚类分析。结果见图 2。20 批样品可聚为两类: S17、S18 聚为第 I 类, 其余 18 批聚为第 II 类, 表明在共有峰对应的化学成分含量或比例上, S17、S18 与其他样品存在明显区别。聚为第 II 类的 18 批样品又可分别聚为两类, 其中 S7、S15、S16、S19 聚为 IIa 类, 其余 14 批样品聚为 IIb 类。该聚类情况可基本将光橘红与毛橘红作出区分, 但少数批次如 S7、S20 会出现偏差。

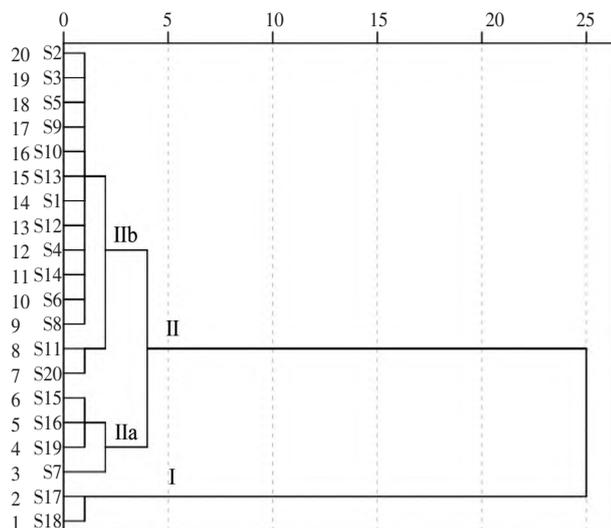


图 2 20 批化橘红聚类分析树状图

Figure 2 Hierarchical clustering analysis for 20 batches of Citri Grandis Exocarpium

**2.6.2 主成分分析** 主成分分析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一种降维分析方法。采用数据统计分析软件 SIMCA 13.0, 以 18 个共有峰峰面积为变量, 以 Par 作为标度化方式进行无监督主成分分析, 结果模型质量参数  $R^2_x=0.859$ ,  $Q^2=0.569$ , 其中  $R^2_x$  表示在 X 轴方向模型的累积解释率, 即 X 轴方向保留原始数据信息百分比的平方;  $Q^2$  表示模型的累积预测率, 两者数值越接近 1, 表明该数据分析模型越好。 $R^2_x$  和  $Q^2$  均大于 0.5, 表明该模型稳定性及预测性良好。在此基础上绘制主成分分析二维得分图, 见图 3。20 批化橘红可大致分为两类: S1~S14 为毛橘红, 均分布于得分图左侧; S15~S20 为光橘红, 分布于得分图右侧。其中 S17、S18 靠近 95% 置信区间划分线, 与其他批次有明显区分趋势, 这可与聚类分析结果相互印证。

**2.6.3 正交偏最小二乘法判别分析** 正交偏最小二乘

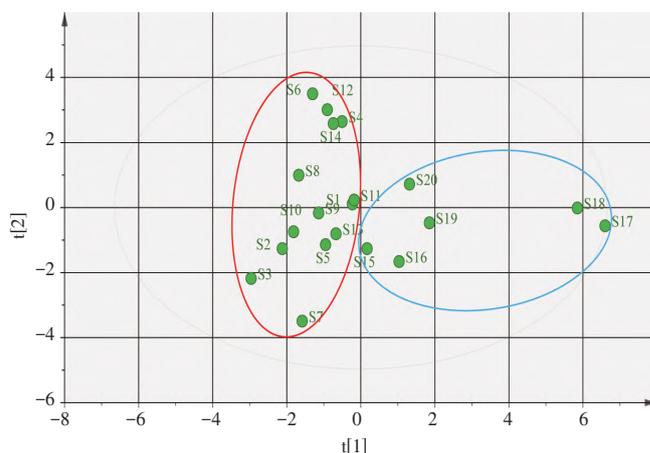


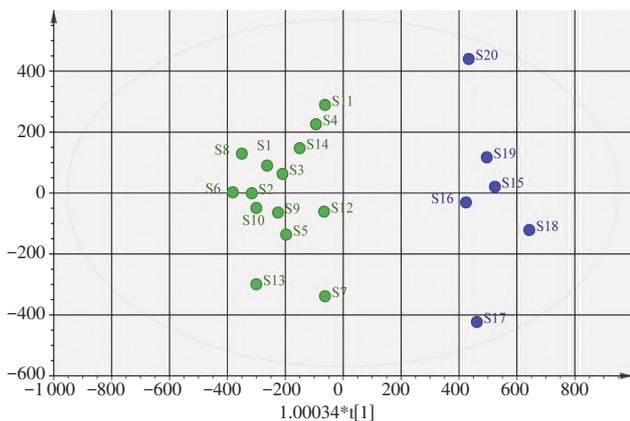
图 3 20 批化橘红主成分分析(PCA)二维得分散点图

Figure 3 Two-dimensional scatter plot of principal component analysis for 20 batches of Citri Grandis Exocarpium

判别分析法(OPLS-DA)是常用来处理分类和判别问题的一种非常有效的监督分析方法。为进一步观察不同样品间的差异, 在 PCA 的基础上, 将 20 批样品按毛橘红(S1~S14)和光橘红(S15~S20)分为 2 组, 进行有监督的 OPLS-DA 判别分析, 相关模型参数 ( $R^2_x=0.897$ ,  $R^2_y=0.916$ ,  $Q^2=0.634$ ;  $R^2_x$  和  $Q^2$  含义同 PCA 分析,  $R^2_y$  表示在 Y 轴方向模型的累积解释率, 即 Y 轴方向保留原始数据信息百分比的平方)表明其稳定性和交叉验证预测力良好, 据此绘制二维散点图。见图 4。结果显示 2 个分组较 PCA 二维得分散点图具有更明显的区分趋势。为确认对上述分类结果贡献较大的成分, 在 OPLS-DA 的基础上, 以变量投影重要度 (Variable Importance for the Projection, VIP) 大于 1.0 为筛选标准对数据进行分析。结果筛选出 6 号峰(柚皮苷)、7 号峰和 8 号峰(野漆树苷) 3 个变量, VIP 分别为 3.6009、1.1616、1.0084。见图 5。这 3 种成分可能是毛橘红和光橘红之间产生差异的主要原因, 即差异性质量标志物。因此, 为更全面、高效地评价化橘红药材质量, 本试验在化学成分指认的基础上, 对其中的柚皮苷、野漆树苷、佛手柑内酯及异欧前胡素进行含量测定研究, 7-羟基香豆素由于含量较低, 暂不列入研究范围。

## 2.7 含量测定

**2.7.1 供试品溶液的制备** 精密称取化橘红粉末(过 4 号筛)0.1 g, 按“2.3”项下方法制备, 得供试品溶液(1), 用于测定柚皮苷含量; 精密吸取该供试品溶液 20 mL, 水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 2 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液(2), 用于测定野漆树苷、佛手柑内酯及异欧前胡素含量。



注：●为毛橘红；●为光橘红

图 4 20 批化橘红正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 散点图

Figure 4 Scatter plot of orthogonal partial least squares discriminant analysis for 20 batches of Citri Grandis Exocarpium

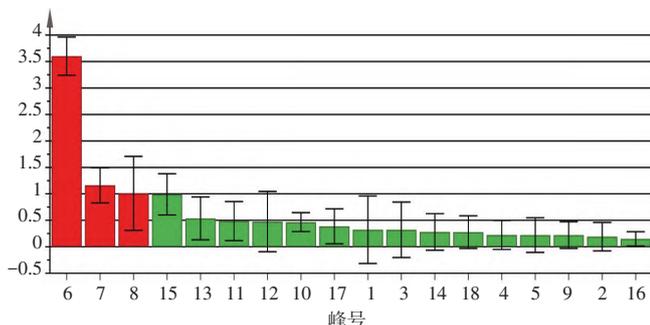


图 5 20 批化橘红变量投影重要度 (VIP) 柱状图

Figure 5 Variable importance in projection (VIP) histogram for 20 batches of Citri Grandis Exocarpium

**2.7.2 色谱条件及系统适用性考察** 色谱条件同“2.1”项下,在该色谱条件下,各化合物分离度均大于 1.5,理论塔板数均大于 8 000,表明该方法系统适用性良好。

**2.7.3 线性关系考察** 精密称取柚皮苷对照品 19.95 mg、野漆树苷对照品 9.87 mg,加甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,得对照品母液(1)。精密吸取该母液 0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 mL 分别置于 2 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得系列混合对照品溶液(1)。精密称取佛手柑内酯对照品 5.02 mg、异欧前胡素对照品 21.66 mg,加甲醇溶解并定容于 50 mL 量瓶中,得对照品母液(2)。精密吸取该母液 0.1、0.2、0.5、1、2、5 mL 分别置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得系列混合对照品溶液(2)。精密吸取上述系列对照品溶液各 1 μL,注入液相色谱仪,照“2.7.2”项下色谱条件测定,得到各对照品不同浓度对应的峰面积。以各对照品进样浓

度为横坐标(X),相应峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得到线性回归方程、相关系数及线性范围。见表 3。

表 3 4 个化学成分线性回归方程及范围

Table 3 Linear regression equation and linear range for 4 chemical composition

化学成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL <sup>-1</sup> )
柚皮苷	Y=41.676X-3 067.1	0.999 9	46.58~1863.33
野漆树苷	Y=128.35X-3 394.5	0.999 6	22.78~911.40
佛手柑内酯	Y=1 324.8X-511.97	0.999 5	0.39~19.68
异欧前胡素	Y=1 346.3X-20 887	0.999 8	1.72~86.12

**2.7.4 方法学考察** 根据“2.4”项下各试验方法进行测定,分别计算柚皮苷、野漆树苷、佛手柑内酯、异欧前胡素等 4 种成分的精密度、稳定性和重复性的 RSD,结果各成分的精密度、稳定性和重复性的 RSD 均小于 3.0%,表明仪器精密度、供试品溶液 24 h 内稳定性及供试品溶液制备方法的重复性均良好。

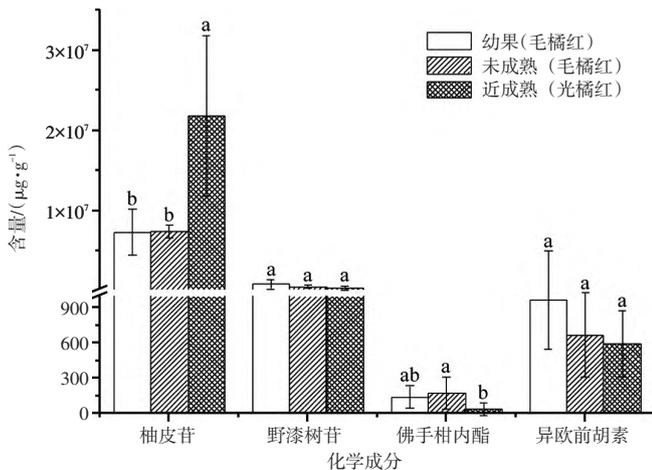
**2.7.5 加样回收率考察** 精密称取供试品(S1)0.05 g,平行 6 份,分别加入柚皮苷 3.68 mg,野漆树苷 253.71 μg,佛手柑内酯 2.37 μg,异欧前胡素 25.14 μg,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.7.2”项下条件进行测定,计算得 4 种化学成分的平均加样回收率分别为:柚皮苷 99.64%,野漆树苷 97.52%,佛手柑内酯 103.10%,异欧前胡素 96.45%;RSD 分别为 2.23%、2.62%、3.41%、2.88%,表明方法准确性良好。

**2.7.6 样品含量测定** 精密称取 20 批化橘红样品各 0.1 g,按“2.7.1”和“2.7.2”项下方法制备供试品溶液并测定,计算 4 种化学成分含量。结果见表 4。将 20 批样品按照成熟度分为幼果组(S2~S11)、未成熟组(S1、S12~S14)和近成熟组(S15~S20),对比两两之间 4 种化学成分含量的差异,将各成分含量单位统一为 μg·g<sup>-1</sup>,采用 Origin Pro 8 绘制柱状图。见图 6。幼果组和未成熟组柚皮苷含量无显著性差异,但近成熟组柚皮苷含量高于幼果组和未成熟组(P<0.05),表明柚皮苷含量可能受样品成熟度或基原影响;未成熟组佛手柑内酯含量明显高于近成熟组(P<0.05),幼果组与未成熟组、近成熟两组均无显著性差异,暂无法判断样品成熟度、基原、产地等因素对该成分含量的影响程度。3 组样品野漆树苷、异欧前胡素含量均无显著性差异,但随成熟度增加而呈减少的趋势。

表 4 20 批化橘红中 4 种化学成分含量(n=2)

Table 4 Content of 4 chemical composition for 20 batches of Citri Grandis Exocarpium(n=2)

编号	柚皮苷 /(mg·g <sup>-1</sup> )	野漆树苷 /(mg·g <sup>-1</sup> )	佛手柑内酯 /(μg·g <sup>-1</sup> )	异欧前胡素 /(mg·g <sup>-1</sup> )
S1	74.03	5.07	47.35	0.50
S2	65.25	10.33	160.00	1.47
S3	58.48	12.00	134.46	1.43
S4	56.45	3.72	91.10	0.40
S5	62.50	10.32	101.60	1.10
S6	48.54	3.95	385.81	0.41
S7	123.26	18.72	91.32	1.49
S8	51.57	5.52	132.11	0.95
S9	60.29	6.62	98.54	0.93
S10	75.75	9.96	155.33	0.91
S11	128.89	0.40	40.00	0.55
S12	81.21	3.61	304.45	0.54
S13	78.01	7.51	61.28	1.20
S14	62.62	2.52	277.51	0.43
S15	158.55	7.52	144.95	0.77
S16	176.11	4.33	49.97	1.10
S17	361.67	3.13	11.27	0.41
S18	318.99	1.22	10.11	0.46
S19	190.59	5.01	9.96	0.42
S20	103.78	1.65	9.93	0.42



注：同一化学成分不同字母标记表示存在显著性差异， $P < 0.05$

图 6 不同成熟度化橘红中 4 种化学成分含量显著性差异柱状图

Figure 6 Significant-difference-histogram of content of 4 chemical compositions for Citri Grandis Exocarpium with different maturity

### 3 讨论

**3.1 样品前处理及色谱条件** 2020 年版《中国药典》化橘红项下含量测定方法仅针对柚皮苷单个化学成分，而指纹图谱研究需要尽可能多地反映化学成分

的种类与数量，因此在该基础上比较了 70% 甲醇、甲醇、70% 乙醇和乙醇等提取溶剂，发现甲醇作为提取溶剂时，色谱峰数量及丰度最佳，其原因可能是化橘红既含有极性较大的黄酮苷类成分，又含有极性较小的香豆素类成分，而甲醇对高极性和低极性有机物均有较好的溶解性。《中国药典》方法针对柚皮苷单个化学成分，采用加热回流的提取方式使该成分尽可能地提取完全。本研究则从整体情况考虑，通过对比超声和加热回流两种提取方式及提取时间，发现在拟定检测波长下，提取方式对各目标成分的提取效率影响不大，且提取时间超过 30 min 后峰面积无明显增加，因此最终确认超声提取 30 min 作为前处理方法。流动相方面，考察了甲醇-0.1% 甲酸、甲醇-0.1% 冰醋酸、乙腈-0.1% 冰醋酸等流动相，以目标色谱峰的分离度及理论塔板数为参考指标，确认最佳流动相为甲醇-0.1% 冰醋酸。通过紫外吸收光谱 210 ~ 400 nm 全波长扫描 3 维图，在兼顾色谱峰数量及相对丰度的前提下，最终确认检测波长为 320 nm。

**3.2 UPLC 指纹图谱及化学模式识别分析** 本研究建立了 20 批化橘红 UPLC 指纹图谱并进行了相似度评价，再用化学模式识别方法对 18 个共有峰数据进行识别和分类。聚类分析可明确区分产于梅州的光橘红 S17、S18 和其余 18 批样品，亦可基本区分毛橘红和光橘红；PCA 结果与聚类分析结果基本一致，可相互印证；OPLS-DA 结果则进一步证明了上述分析结果的准确性，并筛选出了 3 个差异性标志物——柚皮苷、峰 7 和野漆树苷。柚皮苷具有镇咳、祛痰等作用<sup>[17]</sup>，与化橘红的功能主治密切相关。野漆树苷具有抗肿瘤、抗氧化和降血压等多种药理作用<sup>[18]</sup>；而峰 7 对应化学成分未知，后续相关研究可重点关注该成分。

**3.3 含量测定研究** 在成分指认的基础上对柚皮苷、野漆树苷、佛手柑内酯、异欧前胡素等成分进行含量测定研究。由于柚皮苷含量远高于其余 3 种成分，因此相对于指纹图谱研究，含量测定时将取样量减少至 0.1 g 进行供试品溶液的制备，以减少柚皮苷对照品的消耗。同时，为兼顾其余 3 种成分的含量测定，将供试品溶液浓缩 10 倍以保证研究数据的准确度。测定结果显示，除 S7、S11 外，毛橘红柚皮苷含量介于 4.85%~8.12%，S7、S11 和所有光橘红 (S15-S20) 的柚皮苷含量均高于 10%，该数据与 OPLS-DA 二维散点图中 S7 和 S11 的分布位置及 VIP

分析确认的质量差异标志物均可相互印证, 加上不同分组间柚皮苷含量显著性差异分析结果, 表明柚皮苷含量是影响化橘红质量的重要化合物, 也是区分毛橘红和光橘红的重要因素之一。

本研究建立的化橘红 UPLC 指纹图谱, 结合化学模式识别技术, 系统地阐明了化橘红药材的内在质量特征及不同品种样品的差异性, 筛选出可能导致差异的 3 个标志物, 并对柚皮苷、野漆树苷、佛手柑内酯、异欧前胡素等 4 种化学成分进行了含量测定研究, 可为化橘红质量控制及药效物质研究提供参考。

### 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: 76-77.
- [2] 韩寒冰, 张敏, 魏国程, 等. 南药化橘红花果叶中挥发油成分比较分析[J]. 中医药导报, 2018, 24(7): 33-36.
- [3] 钟广智, 谭俊青, 陈昭. UHPLC-MS法同时测定化橘红中三个黄酮类成分[J]. 海峡药学, 2020, 32(7): 52-55.
- [4] 谢辉, 陈亚, 雷爱玲, 等. SPE-HPLC-DAD法同时检测柑橘药用资源中黄酮类和川陈皮素成分[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(8): 1365-1371.
- [5] 牛艳, 王磊, 黄晓君, 等. 化橘红香豆素类的化学成分[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2012, 33(5): 501-505, 515.
- [6] 侯秀娟, 沈勇根, 徐明生, 等. 响应曲面法优化微波萃取化橘红多糖[J]. 中国食品学报, 2013, 13(3): 101-109.
- [7] 侯秀娟. 化橘红多糖的提取纯化、体外抗氧化及生物活性的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
- [8] 钟仁兴, 丁子禾, 杨燕妮, 等. 基于网络药理学分析的橘红痰咳液主治“痰、咳、喘”的药效物质基础与作用机制研究[J]. 药学报, 2020, 55(9): 2134-2144.
- [9] 侯秀娟, 沈勇根, 徐明生, 等. 化橘红多糖对小鼠消炎、止咳及化痰功效的影响研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(06): 1227-1229, 1206.
- [10] 姚乐辉. 化橘红多糖抗氧化能力及抗疲劳作用的研究[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(4): 95-100.
- [11] 吕安雯, 张雅男, 舒尊鹏, 等. 化橘红多糖对环磷酰胺所致免疫损伤小鼠脾脏抗氧化能力的影响[J]. 化学工程师, 2018, 32(12): 79-81.
- [12] 董宏坡, 江明树, 朱伟杰. 化橘红多糖对小鼠的免疫调节作用[J]. 中成药, 2010, 32(3): 491-493.
- [13] 陈小红, 陈康, 潘超美, 等. 化橘红药材商品规格等级标准分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 23-28.
- [14] 吴万征, 蔡伟明, 李朝晖. 化橘红有效部位指纹图谱的研究[J]. 中药材, 2015, 38(6): 1194-1196.
- [15] 王铁杰, 宋茜, 江坤, 等. 毛橘红与光橘红的HPLC药效指纹图谱比较研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 896-902.
- [16] 黄润平, 林彤, 刘主洁, 等. 气相指纹图谱结合化学计量学在化橘红分类中的应用[J]. 中药材, 2021, 44(8): 1895-1900.
- [17] 李沛波, 王永刚, 吴灏, 等. 柚皮苷及其苷元柚皮素的呼吸系统药理作用研究概述[J]. 药学研究, 2020, 39(5): 249-255.
- [18] 张刊, 张双双, 张百霞. 化橘红黄酮类化学成分研究进展[J]. 医学研究与教育, 2017, 34(5): 60-65.

(编辑: 梁进权)