

基于化学计量学的麸炒枳实与烫枳实比较研究

蔡文君¹, 石敬依², 林文栋¹, 罗容^{1*} (1.首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2.北京市隆福医院药剂科, 北京 100010)

摘要: 目的 利用指纹图谱与化学计量学进行麸炒枳实和烫枳实的质量评价及比较研究, 为临床选择使用枳实 2 种饮片提供部分科学依据。方法 依据中国药典 2020 年版和《北京市中药饮片炮制规范》(2008 年版)炮制麸炒枳实与烫枳实 2 种饮片, 采用超高效液相色谱法分别建立 2 种饮片的指纹图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件进行相似度分析, 利用化学计量学进行 2 种饮片指纹图谱中 14 个共有成分及辛弗林的比较研究, 并对 2 种饮片中已指认的 9 个成分进行定量分析与比较。结果 麸炒枳实和烫枳实与各自对照指纹图谱相似度>0.9, 同一批次麸炒枳实与烫枳实相似度>0.9。与对照品比对指认出芸香柚皮苷、柚皮苷、野漆树苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素 8 个共有峰。聚类分析结果显示 2 种饮片无明显聚类。PCA 分析显示麸炒枳实与烫枳实不能完全区分为 2 类。VIP 法筛选出对区分麸炒枳实和烫枳实影响较大的 7 个成分, 分别是柚皮素、柚皮苷、野漆树苷、X8、橙皮素、川陈皮素、X1。定量分析结果显示, 与麸炒枳实组比较, 烫枳实组中柚皮苷含量较低, 野漆树苷、柚皮素含量较高, 且有显著性差异。结论 本研究建立了麸炒枳实与烫枳实的定量指纹图谱及黄酮类多成分含量测定的质量评价方法, 研究结果可为临床选择使用枳实 2 种饮片提供部分科学依据。

关键词: 麸炒枳实; 烫枳实; 指纹图谱; 化学计量学; 黄酮类成分; 辛弗林

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)11-1395-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.11.002

引用本文: 蔡文君, 石敬依, 林文栋, 等. 基于化学计量学的麸炒枳实与烫枳实比较研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(11): 1395-1403.

Comparative Study Between Bran Stir-fried and Sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus Based on Chemometrics

CAI Wenjun¹, SHI Jingyi², LIN Wendong¹, LUO Rong^{1*} (1.School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2.Department of Pharmacy, Beijing Longfu Hospital, Beijing 100010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To carry out the quality evaluation and comparative study of bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus by using fingerprints and chemometrics, which provide some scientific basis for clinical selection and use of the two decoction pieces. **METHODS** According to Chinese Pharmacopoeia 2020 edition and "Beijing Traditional Chinese Medicine Processing Standards" (2008 edition), two kinds of decoction pieces of bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus were processed. The quantitative fingerprints of the two kinds of decoction pieces were established by ultra-high performance liquid chromatography. The similarity analysis was carried out by the software "Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System". The 14 common components and synephrine in the fingerprints were compared by chemometrics in the two decoction pieces. And the 9 identified components were quantitatively analyzed and compared by chromatography. **RESULTS** The similarity of the fingerprints of the bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus with their respective controls was greater than 0.9, and the similarity of the same batch of bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus was greater than 0.9. By comparing with the reference substance, 8 common peaks of narirutin, naringin, rhoifolin, hesperidin, neohesperidin, naringenin, hesperetin and nobiletin were identified. The results of cluster analysis showed that there was no obvious clustering of the two decoction pieces. PCA analysis showed that bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus could not be completely distinguished into two categories. The VIP method screened out 7 components that had a greater impact on the distinction between bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus, namely naringenin, naringin, rhoifolin, X8, hesperetin, nobiletin and X1. The results of quantitative analysis showed that compared with the bran stir-fried Aurantii Fructus Immaturus, the content of naringin in the sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus was lower, and the contents of rhoifolin and naringenin were higher, all of which were significantly different. **CONCLUSION** The quantitative fingerprints of bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus and the quality evaluation method for the determination of flavonoids multi-component content are established. The results of the study could provide some scientific basis for the clinical selection of the two decoction pieces of Aurantii Fructus Immaturus.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973431)

作者简介: 蔡文君, 女, 硕士生 E-mail: caiwenjun97@ccmu.edu.cn

*通信作者: 罗容, 女, 博士, 副教授, 硕导 E-mail: luorong@

ccmu.edu.cn

KEYWORDS: bran stir-baked *Aurantii Fructus Immaturus*; sand-heated *Aurantii Fructus Immaturus*; fingerprint; chemometrics; flavonoids; synephrine

枳实(*Aurantii Fructus Immaturus*)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^[1], 始载于《神农本草经》, 列为中品, 味苦, 性寒, 具有破气消积、化痰散痞的功效^[1-2]。枳实中含有黄酮类、生物碱、挥发油等成分^[3]。

枳实生品药性峻烈, 炮制后可缓和药性, 增强健脾理气的功效^[4]。临床上常用的麸炒枳实收载于中国药典 2020 年版^[1]和《北京市中药饮片炮制规范》(2008 年版)^[5]。北京地区除了使用麸炒枳实, 还常使用烫枳实, 《北京市中药饮片切制规范》(1974 年版)^[6]中收载了烫枳实的性状特征和应用等内容。《北京市中药饮片炮制规范》(1986 年版)^[7]与现行版《北京市中药饮片炮制规范》(2008 年版)^[5]也一直收载烫枳实。一直以来医师在临床使用中不区分烫枳实和麸炒枳实。目前对枳实饮片的质量研究多集中于麸炒枳实的质量评价研究^[8-10], 对烫枳实质量深入研究的报道较少。对枳实饮片的质量评价主要利用含量测定的方法^[8-12], 目前尚无文献报道 2 种饮片的质量比较研究。可见临床上不区别使用两者的科学依据尚显不足。单一成分不能全面反映中药质量, 指纹图谱能反映中药化学成分整体情况, 并已得到广泛应用^[13-15]。

本研究依据中国药典 2020 年版麸炒法^[1]和《北京市中药饮片炮制规范》(2008 年版)烫枳实炮制工艺^[5], 以经过鉴定的枳实药材为原材料, 分别炮制了麸炒枳实与烫枳实 2 种饮片。在课题组前期已经建立的枳实肉和瓢中 6 个成分的 UPLC 定量分析指纹图谱^[16]基础上对该色谱条件的洗脱梯度进行优化, 建立 2 种饮片的指纹图谱, 采用指纹图谱相似度研究结合化学计量学分析, 比较 2 种饮片的成分差异。同时对所含 8 个黄酮类成分及辛弗林进行定量分析, 为 2 种枳实饮片的质量评价和比较提供部分科学数据, 以期为临床选择使用麸炒枳实和烫枳实提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪及四元泵、柱温箱、DAD 检测器, Agilent 1200 型高效液相色谱仪及四元泵、柱温箱、VWD 检测器均来自美国 Agilent 公司; 国家标准检验筛四号筛 65 目(北京

春耀仪器筛筛有限公司); RT-04 高速粉碎机(弘荃机械企业有限公司); TP3102 电子天平(美国丹佛公司); BT25S 十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TES 1327K 红外测温仪、NR-81531B 表面热电偶均来自台湾泰仕仪表有限公司; C21-21K01 电磁炉(美的公司); HW SY11-K 水浴锅(北京市长风仪器仪表公司)。

1.2 样品信息

实验所用样品购于安国和亳州药材市场, 经国医大师金世元教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L.的干燥幼果。麸炒枳实依据中国药典 2020 年版^[1]收载方法炮制, 以 F 为前缀进行编号。烫枳实依据《北京市中药饮片炮制规范》(2008 年版)^[5]收载方法炮制, 以 T 为前缀进行编号。样品编号及信息见表 1。

表 1 样品信息表

Tab. 1 Samples information

枳实药材 编号	麸炒枳实 编号	烫枳实 编号	购买地	产地
S1	F1	T1	安国药材市场	湖南
S2	F2	T2	安国药材市场	湖南
S3	F3	T3	安国药材市场	湖南
S4	F4	T4	安国药材市场	湖南
S5	F5	T5	安国药材市场	湖南
S6	F6	T6	安国药材市场	江西
S7	F7	T7	安国药材市场	江西
S8	F8	T8	安国药材市场	湖南
S9	F9	T9	安国药材市场	湖南
S10	F10	T10	安国药材市场	江西

1.3 材料

甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 Fisher 公司); 对照品芸香柚皮苷(上海源叶生物科技有限公司, 批号: B21634-20 mg; 纯度 \geq 98.0%); 对照品: 柚皮苷(批号: PS001113; 纯度 $>$ 98.0%)、野漆树苷(批号: PS001023; 纯度 $>$ 98.0%)、橙皮苷(批号: PS010615; 纯度 $>$ 98.0%)、新橙皮苷(批号: PS000969; 纯度 $>$ 98.0%)、柚皮素(批号: PS010355, 纯度 $>$ 98.0%)、橙皮素(批号: PS000219; 纯度 $>$ 98.0%)、川陈皮素(批号: PS000224; 纯度 $>$ 98.0%)、辛弗林(批号: PS000966; 纯度 $>$ 98.0%)均购自成都普思生物科技股份有限公司; 磷酸(分析纯, 北京

化工厂,批号:20180615);十二烷基磺酸钠(批号:20120328)、磷酸二氢钾(批号:20130319)均购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

根据前期研究基础^[16-17],对黄酮类成分色谱检测方法进行梯度优化,条件如下:Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);Waters VanGuard ACQUITY UPLC HSS T3 预柱(2.1 mm×5 mm, 1.8 μm);水(含0.2%磷酸)(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~8 min, 95%→80%A; 8~18 min, 80%→75%A; 18~21 min, 75%→60%A; 21~28 min, 60%→0%A; 28~35 min, 0%→95%A);检测波长 330 nm;流速 0.3 mL·min⁻¹;柱温 30 ℃;0.22 μm 微孔滤膜;进样量 2 μL,自动进样。

辛弗林检测色谱条件参考文献^[16-17]进行。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取芸香柚皮苷、柚皮苷、野漆树苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素对照品适量,精密称定,置于量瓶中,加甲醇制成各对照品储备液,质量浓度分别为 1.53, 13.68, 1.17, 0.806, 8.784, 1.58, 1.37, 1.20 mg·mL⁻¹。取辛弗林对照品适量,精密称定,置于量瓶中,加甲醇制成质量浓度为 2.938 mg·mL⁻¹的对照品储备液。取各对照品储备液制成含芸香柚皮苷 0.153 mg·mL⁻¹、柚皮苷 0.076 mg·mL⁻¹、野漆树苷 0.15 mg·mL⁻¹、橙皮苷 0.082 6 mg·mL⁻¹、新橙皮苷 0.073 2 mg·mL⁻¹、柚皮素 0.158 mg·mL⁻¹、橙皮素 0.137 mg·mL⁻¹、川陈皮素 0.120 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液,取辛弗林对照品储备液制成 0.113 mg·mL⁻¹对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品 0.5 g(过四号筛),精密称定,置三角瓶中,加蒸馏水 10 mL,100 ℃回流提取 1 h,过滤,残渣加水 10 mL,回流再提取 1 h,过滤,将 2 次滤液合并转移至蒸发皿中,浓缩至约 10 mL,转移至 25 mL 量瓶中,水定容至 25 mL,作为供试品溶液。

2.3 对照品和供试品溶液的测定

取“2.2.1”项下混合对照品溶液、辛弗林对照品溶液,取麸炒枳实(编号:F1, F10)、烫枳实(编号:T3, T10)按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,色谱图见图 1~2。

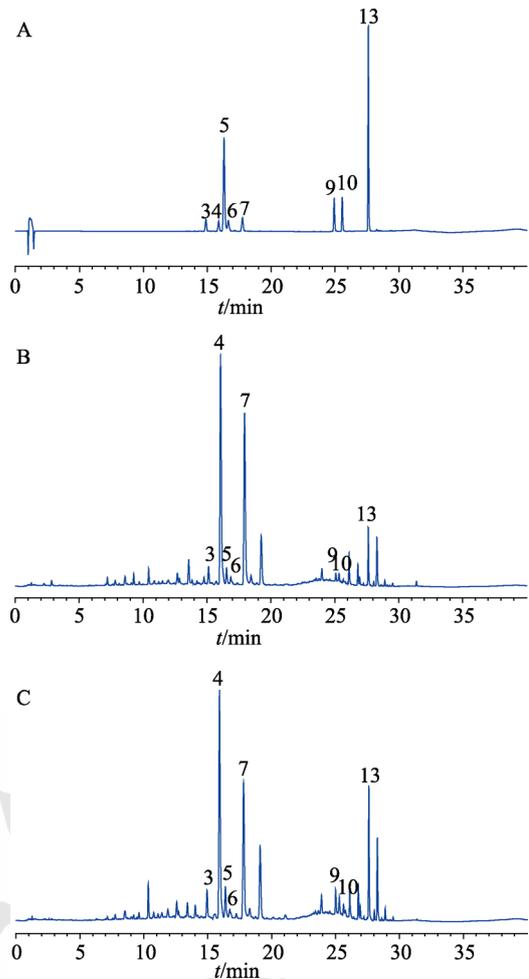


图 1 混合对照品、麸炒枳实与烫枳实黄酮类成分的 UPLC 色谱图

A-混合对照品溶液;B-麸炒枳实(F1);C-烫枳实(T3);3-芸香柚皮苷;4-柚皮苷;5-野漆树苷;6-橙皮苷;7-新橙皮苷;9-柚皮素;10-橙皮素;13-川陈皮素。

Fig. 1 UPLC chromatograms of flavonoids in mixed reference solution, bran stir-fried and sand-scalded *Aurantii Fructus Immaturus*

A-mixed reference solution; B-bran stir-fried *Aurantii Fructus Immaturus*(F1); C-sand-scalded *Aurantii Fructus Immaturus*(T3); 3-naringin; 4-naringenin; 5-rhoifolin; 6-hesperidin; 7-neohesperidin; 9-naringenin; 10-hesperetin; 13-nobiletin.

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取“2.2.1”项下制得的各对照品储备液,以甲醇分别稀释至如下浓度。芸香柚皮苷对照品储备液稀释配制成质量浓度分别为 0.183 6, 0.367 2, 0.550 8, 0.734 4, 0.918 0 mg·mL⁻¹;柚皮苷对照品储备液稀释配制成质量浓度分别为 1.520 0, 4.560 0, 7.600 0, 10.640 0, 13.680 0 mg·mL⁻¹;野漆树苷对照品储备液稀释配制成质量浓度分别为 0.017 6, 0.052 6, 0.087 8, 0.122 8, 0.158 0 mg·mL⁻¹;橙皮苷对照品储备液稀释配制成质量浓度分别为 0.060 4, 0.181 4, 0.302 2, 0.423 2,

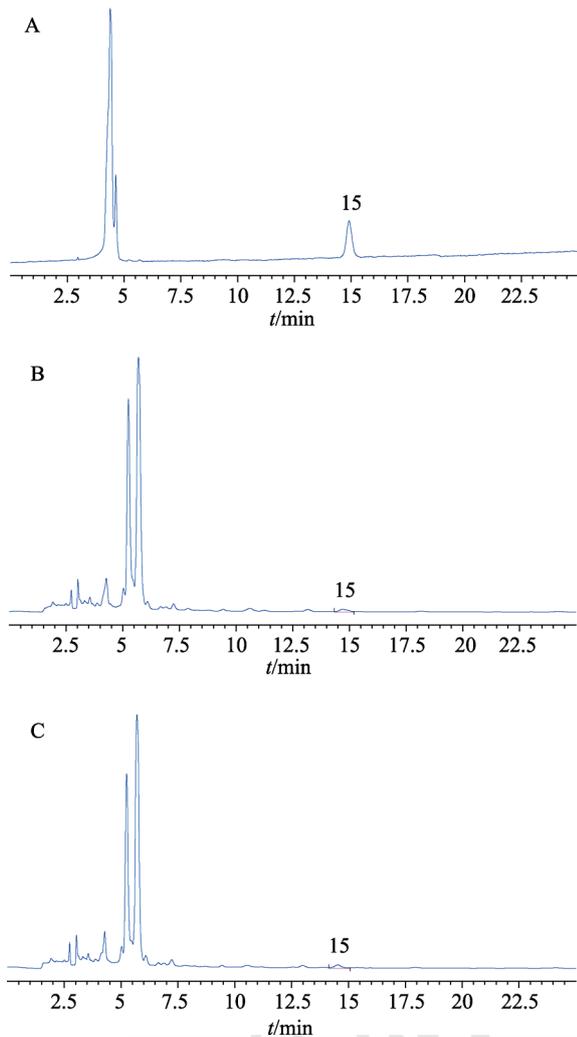


图2 辛弗林对照品、麸炒枳实与烫枳实中辛弗林的HPLC色谱图

A-辛弗林对照品溶液; B-麸炒枳实(F10); C-烫枳实(T10); 15-辛弗林。

Fig. 2 HPLC chromatograms of synephrine in reference solution, bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus

A-reference solution of synephrine; B-bran stir-fried Aurantii Fructus Immaturus(F10); C-sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus(T10); 15-synephrine.

0.544 0 mg·mL⁻¹; 新橙皮苷对照品储备液稀释配制成质量浓度分别为 1.464 0, 2.928 0, 4.392 0, 5.856 0, 7.320 0, 8.784 0 mg·mL⁻¹; 柚皮素对照品储备液稀释配制成质量浓度分别为 0.015 8, 0.047 4, 0.079 0, 0.110 6, 0.142 2, 0.173 8 mg·mL⁻¹; 橙皮素对照品储备液稀释配制成质量浓度分别为 0.006 8, 0.020 6, 0.034 2, 0.048 0, 0.061 6, 0.075 4, 0.089 0 mg·mL⁻¹; 川陈皮素对照品储备液稀释配制成质量浓度分别为 0.024 0, 0.072 0, 0.120 0, 0.168 0, 0.216 0, 0.264 0, 0.312 0 mg·mL⁻¹; 辛弗林对照品储备液稀释配制成质量浓度分别为 0.226 0, 0.678 0, 1.130 0, 1.582 0, 2.034 0, 2.486 0,

2.938 0 mg·mL⁻¹。按“2.1”项下色谱条件进样,以质量浓度 $X(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制回归方程,结果见表2。

表2 回归方程及 r 值

Tab. 2 Regression equation and r value

成分	回归方程	r 值	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
芸香柚皮苷	$Y=493.52X+1.11$	0.999 9	0.183 6~0.918 0
柚皮苷	$Y=571.27X+44.925$	0.999 9	1.520 0~13.680 0
野漆树苷	$Y=6\ 314X-5.51$	0.999 9	0.017 6~0.158 0
橙皮苷	$Y=1\ 349.9X+4.32$	1.000	0.060 4~0.544 0
新橙皮苷	$Y=899.26X+46.213$	0.999 9	1.464 0~8.784 0
柚皮素	$Y=2\ 327.9X+2.361\ 4$	0.999 9	0.015 8~0.173 8
橙皮素	$Y=2\ 023.9X+0.806\ 3$	0.999 9	0.006 8~0.089 0
川陈皮素	$Y=15\ 042X+1.773\ 2$	0.999 9	0.024 0~0.312 0
辛弗林	$Y=411.63X+4.984\ 8$	1.000	0.226 0~2.938 0

2.4.2 仪器精密度试验 取 S10 干燥样品 1 份,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,记录指纹图谱。以柚皮苷色谱峰分离良好,峰面积适中,确定以柚皮苷为参照峰,计算各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.24%~2.89%,相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.24%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 称取同一批 S6 干燥粉末 6 份,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件测定,记录指纹图谱,以柚皮苷为参照峰,计算各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.86%~4.50%,相对保留时间的 RSD 为 0.13%~0.55%,表明方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取 S10 干燥粉末 1 份,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样,记录指纹图谱,以柚皮苷为参照峰,计算各共有峰相对峰面积的 RSD 为 1.08%~3.86%,相对保留时间的 RSD 为 0.10%~0.87%,表明在该条件下供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 分别精密称取已知含量的 S3 样品干燥粉末 6 份,每份约 0.25 g,分别精密加入等同于药材样品含量芸香柚皮苷、柚皮苷、野漆树苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素和川陈皮素的对照品,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样,计算各成分的平均加样回收率及 RSD。结果表明,芸香柚皮苷、柚皮苷、野漆树苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、

橙皮素和川陈皮素平均加样回收率分别为 96.29%, 101.27%, 95.57%, 105.57%, 96.81%, 96.87%, 100.77%, 104.71%; RSD 分别为 0.57%, 0.52%, 6.72%, 0.30%, 3.27%, 0.91%, 5.61%, 3.84%。

2.5 麸炒枳实与烫枳实指纹图谱的建立及相似度评价

各取 10 批次麸炒枳实与烫枳实粉末分别按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录各样品色谱图,导出 UPLC 指纹图谱,中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)软件分析。选择 F1 作为麸炒枳实的参照图谱,选择 T1 作为烫枳实的参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度为 0.3 min,选定多个特征峰进行多点校正,自动匹配。确定了 14 个共有峰,分别生成麸炒枳实和烫枳实的共有模式特征图谱,通过与对照品比对,指认其中 8 个色谱峰,分别为芸香柚皮苷、柚皮苷、野漆树苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素,见图 3;得到麸炒枳实和烫枳实的叠加指纹图谱,见图 4~5。

采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)软件计算指纹图谱相似度,结果见表 3。结果显示,计算 10 批麸炒枳实指纹图谱与对照图谱的相似度在 0.957~0.999,最低值为 0.957(F10 号样品),最高值为 0.999(F5 号样品)。计算 10 批烫枳实指纹图谱与对照图谱的相似度在 0.955~0.998,最低值为 0.955(T3 号样品),最高值为 0.998(T2 号样品)。10 批麸炒枳实指纹图谱与对照图谱的相似度>0.9,10 批烫枳实指纹图谱与对照图谱的相似度>0.9,不同批次样品相似度较好。同一批次麸炒枳实与烫枳实指纹图谱相似度>0.9,同一批次的 2 种饮片相似度较好。

2.6 基于化学计量学的麸炒枳实与烫枳实比较

为了进一步对麸炒枳实与烫枳实进行比较,以麸炒枳实与烫枳实的 15 个共有峰峰面积(指纹图谱中 14 个共有成分和辛弗林)作为变量,采用主成分分析(principal component analysis, PCA)、聚类分析和偏最小二乘判别分析方法,对 10 批次麸炒枳实与烫枳实进行了比较。

2.6.1 PCA 将 10 批次麸炒枳实和 10 批次烫枳实的 15 个共有峰峰面积导入 SPSS 16.0 软件和 SIMCA 14.1 软件进行 PCA 分析,得到 15 个共有峰在 10 批次麸炒枳实和 10 批次烫枳实中的得分图和载荷图。用 SPSS 16.0 软件计算其特征值和方

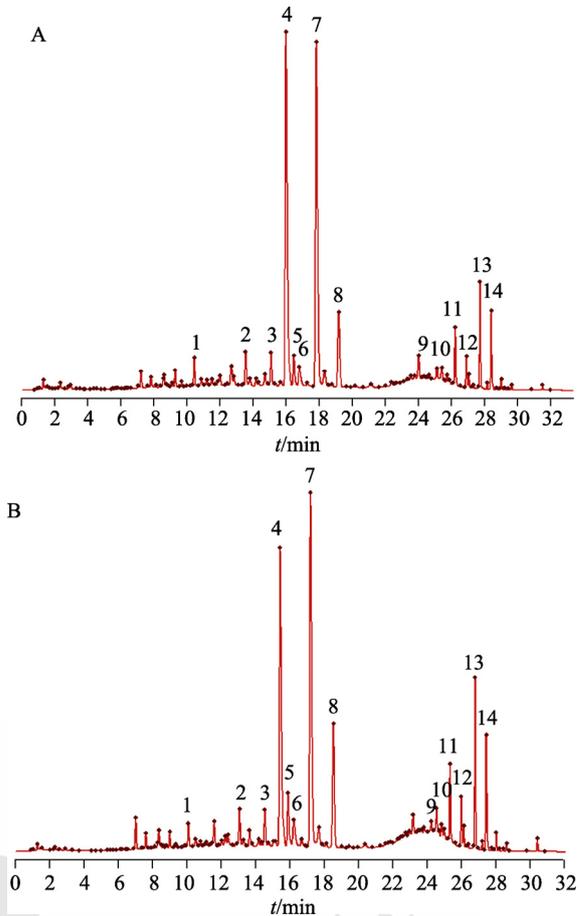


图 3 麸炒枳实与烫枳实的 UPLC 指纹图谱共有模式 A-麸炒枳实; B-烫枳实; 3-芸香柚皮苷; 4-柚皮苷; 5-野漆树苷; 6-橙皮苷; 7-新橙皮苷; 9-柚皮素; 10-橙皮素; 13-川陈皮素; 1, 2, 8, 11, 12, 14 为未知成分。

Fig. 3 Reference fingerprint of UPLC fingerprints of bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus A-bran stir-fried Aurantii Fructus Immaturus; B-sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus; 3-narirutin; 4-naringin; 5-rhoifolin; 6-hesperidin; 7-neohesperidin; 9-naringenin; 10-hesperetin; 13-nobiletin; 1, 2, 8, 11, 12, 14 were unknown components.

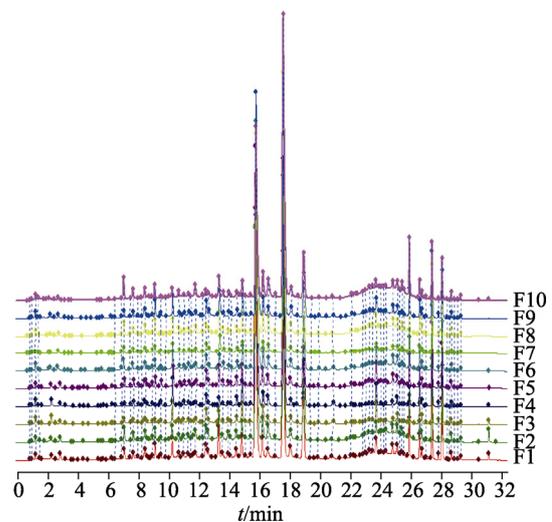


图 4 麸炒枳实指纹图谱叠加图谱

Fig. 4 Superposition of fingerprints of bran stir-fried Aurantii Fructus Immaturus

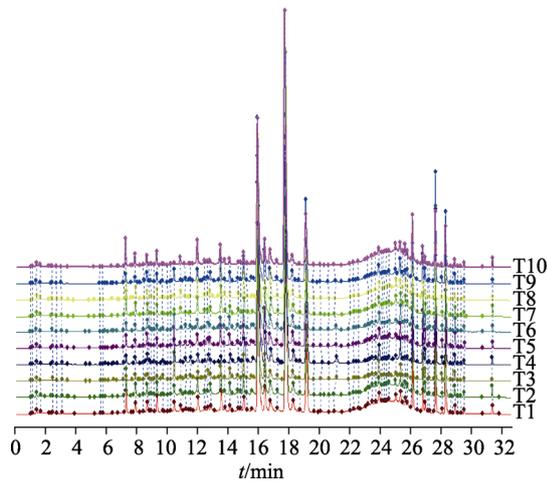


图5 烫枳实指纹图谱叠加图谱

Fig. 5 Superposition of fingerprints of sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus

表3 10批麸炒枳实与10批烫枳实相似度结果

Tab. 3 Similarity evaluation of 10 batches of bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus

样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度
F1	0.994	T1	0.997	F1 vs T1	0.970
F2	0.990	T2	0.998	F2 vs T2	0.986
F3	0.972	T3	0.955	F3 vs T3	0.987
F4	0.962	T4	0.971	F4 vs T4	0.960
F5	0.999	T5	0.991	F5 vs T5	0.950
F6	0.991	T6	0.997	F6 vs T6	0.956
F7	0.993	T7	0.983	F7 vs T7	0.985
F8	0.987	T8	0.983	F8 vs T8	0.996
F9	0.994	T9	0.981	F9 vs T9	0.966
F10	0.957	T10	0.970	F10 vs T10	0.998
麸炒枳实对照图谱	1.00	烫枳实对照图谱	1.00	麸炒枳实 vs 烫枳实对照图谱	0.979

差贡献率,以特征值>1为标准,结合表4得到3个主成分的特征值分别为40.905%,31.240%,9.975%,累计贡献率达82.119%,模型预测良好,所提取的3个主成分能代表指纹图谱中的15个共有峰信息,能够基本反映麸炒枳实与烫枳实饮片的质量。10批次麸炒枳实和10批次烫枳实的PCA得分图见图6,结果显示麸炒枳实组内离散程度较小,烫枳实组内离散程度较大,麸炒枳实组与烫枳实组不能完全区分为2类。2种饮片的PCA载荷图见图7,X3、X5、X9、X10、X13、X8、X11、X12、X14对主成分1的影响大,X6、X7、X10、X15、X2、X11对主成分2的影响大,X4、X1对主成分3的影响大。

2.6.2 聚类分析 将10批次麸炒枳实和10批次烫枳实的15个共有峰峰面积导入SPSS 26.0软件,

表4 主成分分子的特征值、方差贡献率和累计方差贡献率
Tab. 4 Eigenvalues, variance contribution rates and cumulative variance contribution rates of principal components

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	6.136	40.905	40.905
2	4.686	31.240	72.145
3	1.496	9.975	82.119

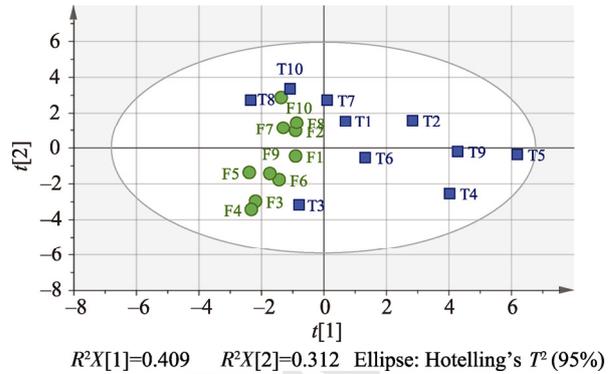


图6 10批麸炒枳实和10批烫枳实的主成分得分图

Fig. 6 PCA score plot from 10 batches of bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus

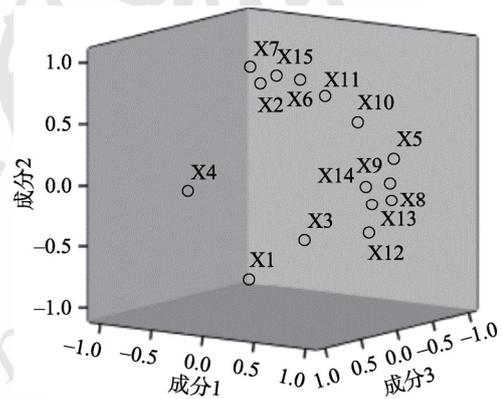


图7 10批麸炒枳实和10批烫枳实的载荷图

X3-芸香柚皮苷; X4-柚皮苷; X5-野漆树苷; X6-橙皮苷; X7-新橙皮苷; X9-柚皮素; X10-橙皮素; X13-川陈皮素; X15-辛弗林; X1、X2、X8、X11、X12、X14为未知成分。

Fig. 7 Loadings plot from 10 batches of bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus

X3-narirutin; X4-naringin; X5-rhoifolin; X6-hesperidin; X7-neohesperidin; X9-naringenin; X10-hesperetin; X13-nobiletin; X15-synephrine; X1, X2, X8, X11, X12, X14 were unknown components.

采用组间均联法,以欧式平方距离为测度进行系统聚类分析。聚类分析结果见图8。当分类距离为20时,F3、F4、T3、T4、T5、T9聚成一类,其余聚为一大类。当分类距离为10时,F3、F4、T3、T4、T5、T9聚成一类,F9、T6、F1、F6、F5聚为一类,其余聚为一大类。聚类分析结果显示20批次样品未按照炮制方法聚为2类,10批次麸炒枳实和10批次烫枳实的组内与组间离散程度较小,麸炒枳实与烫枳实的整体组分无明显差异。

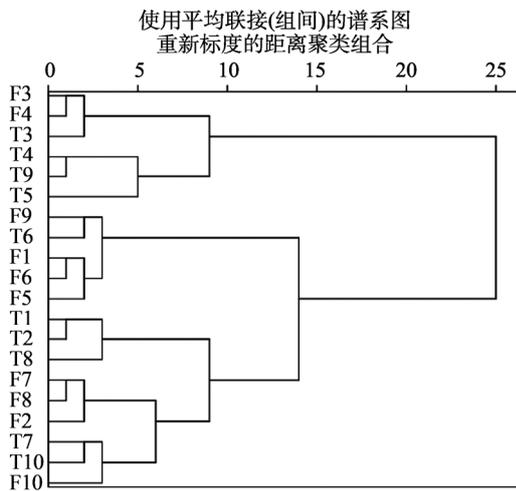


图 8 10 批麸炒枳实和 10 批烫枳实的系统聚类分析
Fig. 8 Hierarchical cluster analysis from 10 batches of bran stir-fried and sand-scalded *Aurantii Fructus Immaturus*

2.6.3 偏最小二乘法回归分析(partial least squares discriminate analysis, PLS-DA) 为了更好地比较 2 种饮片, 本研究采用 PLS-DA 建立分类模型。将 10 批次麸炒枳实和 10 批次烫枳实的 15 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行 PLS-DA 分析。模型验证参数可知, 数据矩阵的解释率参数 $R^2X=0.388$, 模型区分参数 $R^2Y=0.613$, 模型预测参数 $Q^2=0.505$, 表明建立的模型较稳定, 预测能力较好。得分图见图 9, 可知麸炒枳实和烫枳实无明显分离, 与 PCA 得分图结果一致。为进一步确认不同炮制品的主要差别, 采用 PLS-DA 考察变量重要性投影值(variable importance in projection, VIP), VIP 值越大表明该变量对模型越重要, 通常将 $VIP>1$ 的变量视为模型的重要标记^[18], 本研究筛选出 7 个对区分麸炒枳实和烫枳实的有重要作用的共有峰, 结果见图 10, 影响大小依次为柚皮素、柚皮苷、野漆树苷、X8、橙皮素、川陈皮素、X1, VIP 值依次是 1.568 28, 1.513 41, 1.444 89, 1.374 07, 1.295 72, 1.074 13, 1.071 95。

2.7 麸炒枳实与烫枳实 2 种饮片 9 种成分含量测定结果比较

按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液, 每批平行 2 份, 按“2.1”项下色谱条件进样, 分别测定芸香柚皮苷、柚皮苷、野漆树苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素和辛弗林的含量。测定结果见表 5~6 及图 11。与麸炒枳实组比较, 烫枳实组中柚皮苷含量较低, 野漆树苷、柚皮素含量较高, 均有显著性差异。

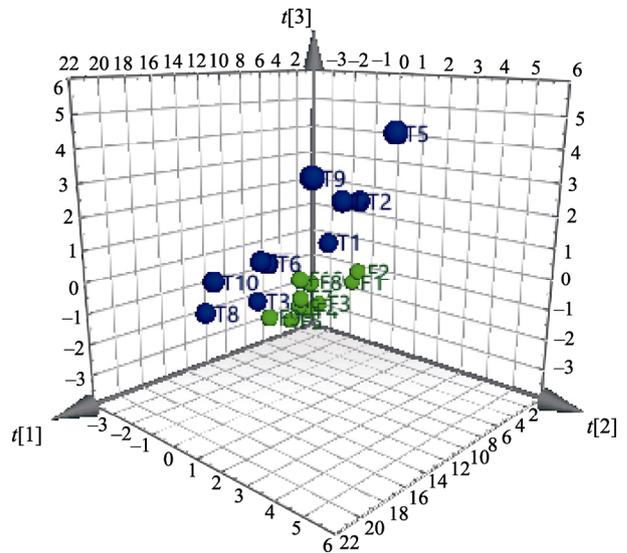


图 9 麸炒枳实和烫枳实的 PLS-DA 3D 得分图
Fig. 9 PLS-DA score 3D plot from 10 batches of bran stir-fried and sand-scalded *Aurantii Fructus Immaturus*

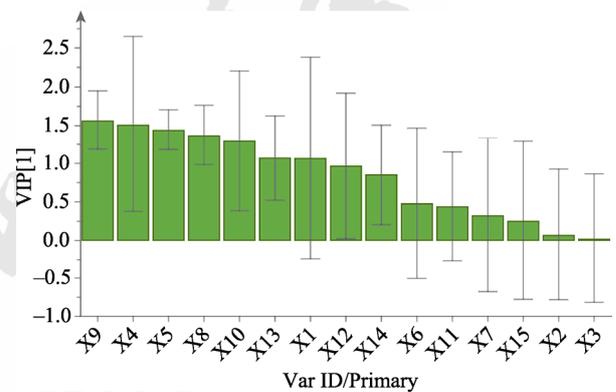


图 10 10 批麸炒枳实和烫枳实 PLS-DA 模型中 15 个色谱峰的 VIP

Fig. 10 VIP of 15 chromatographic peaks in PLS-DA model from 10 batches of bran stir-fried and sand-scalded *Aurantii Fructus Immaturus*

表 5 麸炒枳实中 9 种成分质量分数(n=2)

Tab. 5 Content determination result of bran stir-fried *Aurantii Fructus Immaturus*(n=2) %

编号	芸香柚皮苷	柚皮苷	野漆树苷	橙皮苷	新橙皮苷	柚皮素	橙皮素	川陈皮素	辛弗林
F1	1.47	21.01	0.12	0.36	10.50	0.10	0.06	0.11	0.89
F2	1.42	17.05	0.13	0.60	14.08	0.11	0.08	0.12	0.43
F3	1.43	15.39	0.10	0.21	5.80	0.12	0.03	0.10	0.45
F4	1.69	14.90	0.08	0.29	5.16	0.12	0.04	0.08	0.40
F5	1.48	20.32	0.11	0.42	11.82	0.12	0.02	0.10	0.49
F6	1.77	21.27	0.13	0.45	9.96	0.13	0.04	0.10	0.63
F7	1.56	19.26	0.12	0.60	15.23	0.16	0.04	0.11	0.96
F8	1.51	17.06	0.13	0.69	14.67	0.17	0.04	0.11	1.01
F9	1.46	18.87	0.12	0.37	9.26	0.14	0.04	0.11	0.47
F10	1.26	14.09	0.16	0.77	16.26	0.14	0.05	0.09	1.15

表 6 烫枳实中 9 种成分质量分数(n=2)

Tab. 6 Content determination result of sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus(n=2) %

编号	芸香柚皮苷	柚皮苷	野漆树苷	橙皮苷	新橙皮苷	柚皮素	橙皮素	川陈皮素	辛弗林
T1	1.16	14.36	0.16	0.48	11.83	0.20	0.06	0.13	0.97
T2	1.52	13.67	0.19	0.57	10.89	0.21	0.08	0.16	0.59
T3	1.39	12.62	0.13	0.19	5.04	0.15	0.04	0.12	0.20
T4	1.93	12.88	0.20	0.53	6.61	0.25	0.04	0.17	0.57
T5	1.64	14.09	0.25	0.55	9.91	0.26	0.08	0.22	0.57
T6	1.59	18.09	0.17	0.49	10.02	0.22	0.06	0.14	0.71
T7	1.20	14.08	0.16	0.65	14.66	0.19	0.08	0.12	0.97
T8	1.72	13.48	0.11	0.99	11.98	0.14	0.07	0.08	1.19
T9	2.01	13.90	0.20	0.52	7.48	0.25	0.12	0.18	0.60
T10	0.97	11.94	0.17	0.62	14.26	0.16	0.09	0.08	1.23

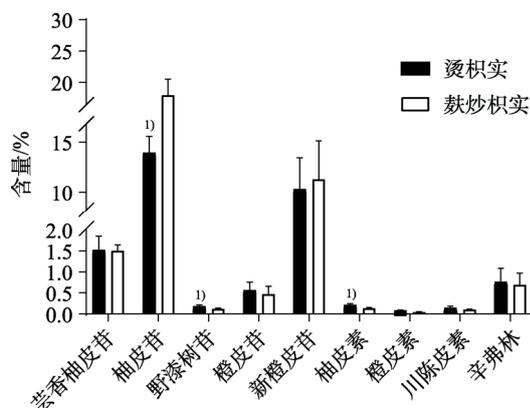


图 11 麸炒枳实与烫枳实中 9 种成分含量($\bar{x} \pm s$, $n=10$)与麸炒枳实比较, $^{1)}P < 0.01$ 。

Fig. 11 Contents of 9 components in bran stir-fried and sand-scalded Aurantii Fructus Immaturus($\bar{x} \pm s$, $n=10$) Compared with bran stir-fried Aurantii Fructus Immaturus, $^{1)}P < 0.01$.

3 讨论

3.1 流动相的选择

文献报道^[13,16,19-24]枳实黄酮类成分分离的流动相系统的选择主要有乙腈-水(含 0.1%磷酸)、乙腈-水(含 0.2%磷酸)、乙腈-水(含 0.2%冰醋酸)。冰醋酸有挥发性,调节系统 pH 作用减弱,各成分间分离效果较差;磷酸不挥发,可稳定调节 pH。当选用 0.2%磷酸水系统时,柚皮苷、野漆树苷、橙皮苷 3 个成分间的分离度优于 0.1%磷酸水系统的分离度,最终选择乙腈-水(含 0.2%磷酸)系统作为 UPLC 指纹图谱的条件。

3.2 麸炒枳实与烫枳实化学成分的差异

对 10 批次麸炒枳实与 10 批次烫枳实分别建立指纹图谱,指出芸香柚皮苷、柚皮苷、野漆树苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素 8 个成分,指纹图谱相似度显示 2 种饮片

整体组分基本一致。为进一步比较 2 种饮片,采用化学计量学结合多成分含量测定对 2 种饮片进行统计分析。PCA 结果显示麸炒枳实与烫枳实不能完全区分为 2 类,烫枳实组内离散程度较高,这可能与烫枳实炮制过程的温度较高有关。烫枳实炮制过程温度较高,不同批次间枳实烫制时微小的温度变化可能会引起饮片成分含量的变化。后续研究中拟利用红外测温仪全程记录炮制过程温度变化,进一步研究温度对 2 种饮片的成分含量的变化。通过 VIP 法筛选出 7 个对区分 2 种饮片贡献度较大的成分,分别是柚皮素、柚皮苷、野漆树苷、X8、橙皮素、川陈皮素、X1,但含量测定结果显示仅柚皮苷、野漆树苷和柚皮素的含量在 2 种饮片中明显不同,其余成分含量均无明显差异。3 种含量有显著差异的成分的 VIP 值均 > 1.4,以 $VIP > 1$ ^[18]作为筛选差异变量条件,具有一定局限性。此外,含量测定结果显示烫枳实中野漆树苷含量高于麸炒枳实,麸炒枳实和烫枳实中柚皮素和柚皮苷的含量不同,一高一低,可能和 2 种成分的转化有关^[25]。野漆树苷^[26-27]、柚皮素^[25]及柚皮苷^[25]具有较强的药理活性,含量差异对药效是否产生影响还需结合药理学实验进一步研究。本研究只指出 9 个成分,其余成分还需结合质谱技术进一步解析。

本研究采用指纹图谱结合化学计量学分析方法比较麸炒枳实和烫枳实 2 种饮片,建立了麸炒枳实与烫枳实的指纹图谱及黄酮类多成分含量测定的质量评价方法,研究结果可为临床选择使用枳实 2 种饮片提供部分科学依据。在后续研究中可结合药理学实验,开展 2 种饮片的药效学研究,进一步完善枳实饮片的质量评价体系。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 258.
- [2] 袁松. 彩色图解《神农本草经》[M]. 北京: 北京联合出版公司, 2015: 270.
- [3] ZHANG X J, ZHAO L Y, LI J H, et al. Research review on Fructus Aurantii Immaturus[J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医药学报), 2021, 49(1): 94-100.
- [4] MA J Q, ZHAO X Y, LIU Y Y, et al. Research progress of bran fried traditional Chinese medicine[J]. J Clin Nurs Res(广东药科大学学报), 2021, 37(2): 163-166.
- [5] 北京市药品监督管理局. 北京市中药饮片炮制规范[S]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 257.
- [6] 北京市卫生局. 北京市中药饮片切制规范(下)[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1974: 42.
- [7] 北京市卫生局. 北京市中药炮制规范[S]. 北京: 北京市卫

- 生局, 1986: 251.
- [8] PENG Z C, CAI S K, LUO S N, et al. Study on processing technology and quality analysis of Stir-Fried Fructus Aurantii with bran[J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药科大学学报), 2021, 37(3): 66-73.
- [9] PENG F F, LIN G M, ZANG B R. Analysis of differential chemical compositions of Aurantii Fructus Immaturus before and after stir-frying with bran and chemical compositions of wheat bran after processing by UPLC-Q-TOF-MS^E[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(24): 144-152.
- [10] YUAN D J, WU Q D, WU X R. Analysis of the volatile oil constituents from crude and bran-stiring Zhishi(Fructus Aurantii Immaturus) by gas chromatograph-mass spectrometer[J]. China J Chin Med(中医学报), 2013, 28(8): 1175-1177.
- [11] OUYANG R, ZHOU X B, PI X H. Comparison of the contents of hesperidin in raw Fructus Aurantii Immaturus and its processed products[J]. China Pharm(中国药房), 2004, 15(1): 57-58.
- [12] HUANG X L, CHEN Y Y, YAO A M, et al. Study on the contents of effective components in Fructus Aurantii Immaturus and its processed products by HPLC[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2013, 41(9): 141-143.
- [13] QI H W, XU X, WEN R, et al. An HPLC fingerprint research on *Citrus aurantium* based on chemical pattern recognition technology[J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2021(1): 72-78.
- [14] ZHAO Z F, ZHOU T, WU A, et al. Establishment of the UPLC fingerprint of classical herbal prescription Huanglian Decoction and determination of the contents of 6 components[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(24): 2859-2867.
- [15] ZHEN Y Q, FENG Y, TIAN W, et al. Wavelength switching of UPLC fingerprint and chemical pattern recognition of different medical parts of *Lonicera japonica*[J]. Acupunct Res(中草药), 2019, 50(18): 4449-4454.
- [16] SHI J Y, CAI W J, LIN W D, et al. Comparison between peel and pulp of Aurantii Fructus Immaturus by UPLC fingerprint and multicomponent quantitative analysis[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(17): 4446-4455.
- [17] XU J D, ZHANG H, SHI J Y, et al. Effects of different storage time on the quality of immature fruit of *Citrus aurantium*[J]. Eval Anal Drug Use Hosp China(中国医院用药评价与分析), 2020, 20(4): 397-402.
- [18] ZHU J, YUAN E, MOU J Y, et al. Analysis of influence of Jiangxi characteristic processing technology on chemical compositions of Aurantii Fructus based on UPLC-Q/TOF-MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(16): 142-153.
- [19] JIA F X, WANG X J, LUO R. Study on HPLC chromatographic fingerprint method for simultaneous determination of six flavonoid components in Aurantii Fructus Immaturus from *citrus aurantium* L[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2016, 34(12): 2917-2920.
- [20] ZENG H L, LIU Z L, SONG Z Q, et al. Study on HPLC fingerprint and chemical constituent difference of different species of Aurantii Fructus Immaturus[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(17): 3272-3278.
- [21] 邓可众, 陈虹, 熊艺, 等. 不同产地及不同采收期江枳实的UPLC指纹图谱研究[J]. 中药材, 2017, 40(9): 2051-2054.
- [22] LI J, LI R F, ZHANG Y B, et al. Optimization of hydrothermal extraction process of the flavonoids from Fructus Aurantii Immaturus by central composite design and response surface method[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(8): 1462-1469.
- [23] GAO X M, CHI Y M, ZHANG W, et al. Application of fingerprint combined with QAMS in quality evaluation of Aurantii Immaturus Fructus[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(9): 2548-2556.
- [24] YUAN H J, LI W, ZHU Y F, et al. Study on fingerprint of Zhishi-Xiebai-Guizhi Decoction by HPLC and determination of 10 index components[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(9): 2448-2459.
- [25] XIONG W N, HUANG M Q, LIANG J Q, et al. *In vitro* metabolism of naringin by human intestinal microflora[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(12): 69-71.
- [26] GAO S L, LU Y Y, AN L J, et al. Study on the protective effect of rhoifolin against hepatic injury induced by triptolide[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2012, 28(6): 18-20.
- [27] ZHU T L, WANG H X, CHEN J B, et al. Separation and purification of flavonoids from different citrus fruits and their antioxidant activities[J]. J Zhejiang Univ Agric Life Sci(浙江大学学报: 农业与生命科学版), 2021(6): 704-718.

收稿日期: 2022-02-07

(本文责编: 沈倩)