

橘核的HPLC指纹图谱研究及聚类分析

罗 静^{1*}, 何中燕^{1,2}, 裴 瑾^{1#}, 康亚兰¹, 刘 薇¹(1.成都中医药大学中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室, 成都 611137; 2.四川科伦药物研究院有限公司, 成都 610071)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0419-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.43

摘 要 目的:建立橘核的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为Dikma C₁₈,流动相为乙腈-0.3%磷酸水溶液(梯度洗脱),柱温为30℃,流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,进样量为20 μl。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对18个批次的橘核进行分析,计算18批样品共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积,并采用类平均法为聚类方法对样品进行归类。结果:橘核药材的指纹图谱共包含有11个共有峰,其中9号峰为柠檬苦素。18个批次橘核药材与对照图谱的相似度均>0.90。聚类分析结果显示,市售橘核样品和自采橘核样品归为两类,表明采集方式对橘核药材各成分的含量有影响。结论:该研究方法和所获得的指纹图谱具有较好的重复性,可作为橘核药材的鉴定和质量评价依据。

关键词 橘核;质量控制;指纹图谱;高效液相色谱法;聚类分析

Study on HPLC Fingerprint of *Citrus reticulata* and Their Cluster Analysis

LUO Jing¹, HE Zhong-yan^{1,2}, PEI Jin¹, KANG Ya-lan¹, LIU Wei¹(1.Key Lab of TCM Resources Research and Development, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2.Sichuan Kelun Pharmaceutical Institute Co., Ltd., Chengdu 610071, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of active ingredients in *Citrus reticulata*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Dikma C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.3% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 210 nm and column temperature was set at 30℃. The sample size was 20 μl. TCM chromatogram fingerprint similarity evaluation system was used to analyze 18 batches of *C. reticulata*, and calculate relative retention time and relative peak area of common fingerprint peak of 18 batches of sample. The samples were classified by group-average method of clustering analysis. RESULTS: There were 11 common peaks of fingerprint, among which the 9th peak was limonin. The similarity of 18 batches of *C. reticulata* to control chromatogram was above 0.90. Results of cluster analysis divided *C. reticulata* into commercially available sample and self-served sample, which indicated collection means affected the content of each component in *C. reticulata*. CONCLUSIONS: The method and fingerprint show good reproducibility, and can provide reference for identification and quality evaluation of *C. reticulata*.

KEYWORDS *Citrus reticulata*; Quality control; Fingerprint; HPLC; Cluster analysis

橘核为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟种子,具有理气、散结、止痛的功效,临床主要用于治疗急性乳腺炎、乳腺增生^[1]等疾病,具有较高的药用价值^[2-3]。有研究表明,橘核的主要有效组分为柠檬苦素类似物^[4],该类化合物具有抗肿瘤^[5-6]、抗病毒^[7]、镇痛、消炎、催眠镇静^[8]等多种作用,有良好的开发应用前景。

柑橘属植物也是世界上最重要的经济作物之一,该属的分类、进化和重要栽培(杂)种的起源等问题目前尚没有统一的观点^[9]。2010年版《中国药典》(一部)仅收录了橘核的“性状”“横切面鉴别”等项的鉴别方法^[10],尚无全面的质量控制标准。为此,本研究收集了广西玉林、河北安国、成都荷花池、安徽亳州等国内几个主要药材市场的11批橘核样品以及7批不同品种的自采橘核样品,采用高效液相色谱(HPLC)法建立了

不同产地、不同品种18批橘核药材的指纹图谱^[11],以期橘核的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪,配有DAD二极管阵列检测器、Chemstation 色谱工作站(美国安捷伦公司);KQ 5200E型超声机(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);千分之一电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

柠檬苦素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110800-201205);诺米林对照品(四川维克奇生物科技有限公司,批号:121010,纯度≥98%);乙腈为色谱纯,石油醚、甲醇为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

18批橘核药材来源见表1。所有药材样品均经成都中医药大学药学院药植与鉴定教研室裴瑾教授鉴定为橘 *C.*

* 硕士研究生。研究方向:中药资源开发与利用。E-mail: xiaojing.er123@163.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药品种品质与资源。电话:028-61800127。E-mail: peixin@163.com

reticulata Blanco 或其栽培变种的干燥成熟种子。

表 1 18 批橘核药材来源

Tab 1 Source of 18 batches of *C. reticulata*

样品编号	柑橘品种	购买/采集地点	产地	购买/采集时间
JH01	椪柑	广东清平中药材市场	广东佛山	2010.09
JH02	椪柑	广西玉林药材市场	广西	2010.11
JH03	椪柑	广西玉林药材市场	广西	2010.11
JH04	椪柑	河北安国药材市场	四川	2010.10
JH05	椪柑	四川成都荷花池中药材市场	四川	2010.11
JH06	椪柑	湖南邵阳市药材市场	湖南邵阳	2010.11
JH07	椪柑	苏州市春晖堂药业有限公司	江苏	2010.10
JH08	椪柑	安徽亳州药材市场	江西	2010.11
JH09	椪柑	浙江磐安中药材交易市场	浙江衢州	2010.10
JH10	椪柑	浙江磐安中药材交易市场	浙江衢州	2010.10
JH11	椪柑	浙江中医药大学中药饮片厂	浙江	2010.09
JH12	椪柑	四川简阳市	四川简阳	2010.01
JH13	椪柑	四川成都龙泉区	四川成都	2011.03
JH14	椪柑	四川阆中县	四川阆中	2011.02
JH15	福橘	四川洪雅县	四川洪雅	2011.02
JH16	福橘	四川金堂县	四川金堂	2010.10
JH17	福橘	重庆铜梁县	重庆铜梁	2011.02
JH18	福橘	四川安岳县	四川安岳	2011.02

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Dikma C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.3% 磷酸水溶液, 梯度洗脱程序见表 2; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 210 nm; 进样量: 20 μl。

表 2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure

时间, min	乙腈, %	0.3% 磷酸水溶液, %
0	5	95
6	9	91
15	20	80
45	35	65
70	60	40

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取柠檬苦素、诺米林对照品各适量, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液 取橘核样品粉末 (过 3 号筛) 约 1 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入石油醚 (60~90 ℃) 20 ml, 超声脱脂 20 min 后, 弃去石油醚液, 残渣加甲醇 20 ml, 超声提取 30 min, 滤过, 取续滤液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 精密吸取“2.2”项下供试品溶液、对照品溶液及甲醇各 20 μl, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果, 供试品溶液与对照品溶液在相同保留时间处有相同的色谱峰, 溶剂甲醇无干扰。

2.3.2 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 10 μl, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 记录峰面积。结果, 柠檬苦素、诺米林峰面积的 RSD 分别为 1.03%、1.02%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液适量, 于制备 0、2、4、8、12 h 时分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 柠檬苦素、诺米林峰面积的 RSD 分别为 1.70%、1.29%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批橘核药材样品 (JH07) 共 6 份, 按

“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 柠檬苦素、诺米林峰面积的 RSD 分别为 1.85%、1.66%, 表明本法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立与分析

2.4.1 指纹图谱的测定 取 18 批橘核药材样品各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 得特征指纹色谱峰, 详见图 1。将不同批次橘核药材的指纹图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(研究版), 结果发现, 18 批橘核药材共有的特征峰有 11 个。以柠檬苦素参照物为内标, 确定柠檬苦素 (9 号峰) 为参照峰。样品指纹图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积值分别见表 3、表 4。

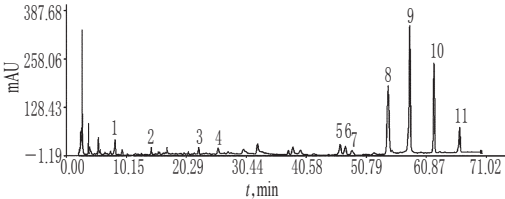


图 1 特征指纹色谱峰

Fig 1 Common peaks of HPLC fingerprint

表 3 样品指纹图谱共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of fingerprint common peak

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
JH01	0.142	0.248	0.386	0.441	0.798	0.813	0.832	0.937	1.000	1.070	1.144
JH02	0.142	0.249	0.385	0.440	0.797	0.812	0.831	0.937	1.000	1.070	1.145
JH03	0.142	0.249	0.386	0.441	0.797	0.812	0.831	0.937	1.000	1.071	1.146
JH04	0.143	0.248	0.386	0.442	0.798	0.813	0.833	0.937	1.000	1.070	1.145
JH05	0.142	0.247	0.385	0.442	0.797	0.812	0.832	0.937	1.000	1.071	1.145
JH06	0.143	0.248	0.385	0.441	0.797	0.812	0.832	0.937	1.000	1.070	1.145
JH07	0.143	0.249	0.385	0.440	0.796	0.811	0.831	0.937	1.000	1.071	1.146
JH08	0.142	0.248	0.386	0.442	0.798	0.813	0.836	0.937	1.000	1.070	1.145
JH09	0.143	0.249	0.385	0.440	0.797	0.812	0.831	0.937	1.000	1.071	1.146
JH10	0.142	0.249	0.385	0.441	0.797	0.812	0.832	0.937	1.000	1.071	1.145
JH11	0.143	0.249	0.385	0.441	0.798	0.813	0.831	0.937	1.000	1.070	1.145
JH12	0.142	0.247	0.386	0.442	0.797	0.812	0.836	0.938	1.000	1.071	1.145
JH13	0.142	0.247	0.386	0.442	0.798	0.813	0.836	0.937	1.000	1.071	1.146
JH14	0.143	0.248	0.386	0.442	0.796	0.811	0.835	0.937	1.000	1.071	1.145
JH15	0.142	0.248	0.386	0.442	0.798	0.813	0.836	0.937	1.000	1.070	1.145
JH16	0.142	0.248	0.386	0.443	0.798	0.813	0.837	0.937	1.000	1.070	1.145
JH17	0.142	0.248	0.386	0.443	0.798	0.813	0.832	0.937	1.000	1.070	1.145
JH18	0.142	0.247	0.386	0.443	0.798	0.813	0.833	0.937	1.000	1.070	1.145
RSD (%)	0.34	0.31	0.13	0.22	0.09	0.09	0.26	0.03	0	0.05	0.04

2.4.2 相似度分析 18 批橘核药材的 HPLC 指纹图谱见图 2。经计算, 各个样品图谱与对照品图谱的相似度均 > 0.90, 表明所建立的指纹图谱技术指标稳定、重复性好, 不同产地橘核的主成分基本相同。相似度分析结果见表 5。

2.4.3 聚类分析 以欧氏距离作为相似程度指标, 对 18 批橘核样品色谱峰的相对保留时间及相对峰面积数据进行分析, 采用类平均法为聚类方法对样品进行归类, 结果见图 3。

由图 3 可见, 橘核药材依据其指纹图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积被聚为两大类: 第一大类包括所有市售橘核样品 (JH01~JH11)。第二大类为自采橘核样品 (JH12~JH18)。说明采集方式的不同对橘核药材各成分的含量有影响。第一大类又被聚为两组, 第一组包括广东、四川、江西等地所产的橘核样品, 第二组包括广西、湖南、江苏、浙江等地所产的橘核样品。可见, 不同产地的土壤、海拔和其他气候条件

表4 样品指纹图谱共有峰的相对峰面积值

Tab 4 Relative peak area of fingerprint common peak

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
JH01	0.080	0.041	0.036	0.021	0.115	0.092	0.029	0.717	1.000	0.675	0.162
JH02	0.106	0.030	0.047	0.028	0.102	0.082	0.062	0.565	1.000	0.551	0.202
JH03	0.084	0.032	0.037	0.038	0.091	0.069	0.077	0.801	1.000	0.599	0.204
JH04	0.098	0.024	0.050	0.043	0.158	0.138	0.020	0.583	1.000	0.576	0.176
JH05	0.067	0.047	0.034	0.039	0.012	0.012	0.017	0.998	1.000	0.404	0.230
JH06	0.077	0.024	0.060	0.055	0.019	0.022	0.146	0.620	1.000	0.156	0.137
JH07	0.114	0.027	0.059	0.044	0.089	0.036	0.057	0.797	1.000	0.169	0.197
JH08	0.098	0.024	0.054	0.037	0.112	0.068	0.068	0.543	1.000	0.325	0.180
JH09	0.078	0.034	0.033	0.016	0.047	0.040	0.100	0.639	1.000	0.459	0.240
JH10	0.081	0.034	0.043	0.024	0.076	0.058	0.032	0.506	1.000	0.418	0.187
JH11	0.127	0.020	0.051	0.042	0.136	0.107	0.046	0.555	1.000	0.525	0.167
JH12	0.098	0.063	0.013	0.150	0.180	0.168	0.027	0.819	1.000	0.999	0.188
JH13	0.153	0.058	0.019	0.049	0.228	0.232	0.021	1.178	1.000	1.031	0.187
JH14	0.161	0.059	0.019	0.047	0.243	0.240	0.022	1.205	1.000	1.051	0.191
JH15	0.113	0.067	0.012	0.117	0.254	0.211	0.027	1.044	1.000	0.918	0.191
JH16	0.134	0.027	0.015	0.186	0.155	0.144	0.034	0.976	1.000	0.788	0.196
JH17	0.134	0.027	0.016	0.113	0.183	0.158	0.064	0.774	1.000	0.795	0.171
JH18	0.121	0.028	0.011	0.131	0.186	0.153	0.030	0.786	1.000	0.639	0.154

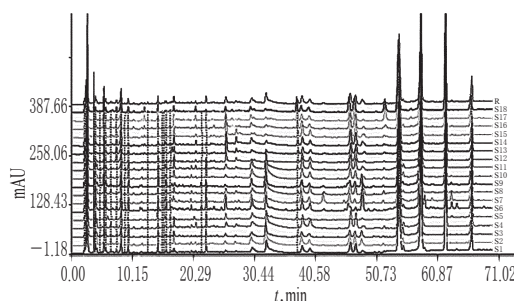


图2 18批橘核药材的HPLC指纹图谱

S1~S18.1~18批橘核药材;R:对照图谱

Fig 2 Fingerprint of 18 batches of *C. reticulata*S1-S18.1-18 batches of *C. reticulata*; R:reference fingerprint

表5 18批橘核药材的相似度分析结果

Tab 5 Analysis of the similarity of 18 batches of *C. reticulata*

样品编号	相似度	样品编号	相似度	样品编号	相似度
JH01	0.993	JH07	0.925	JH13	0.980
JH02	0.958	JH08	0.961	JH14	0.983
JH03	0.980	JH09	0.968	JH15	0.986
JH04	0.979	JH10	0.965	JH16	0.974
JH05	0.967	JH11	0.978	JH17	0.946
JH06	0.927	JH12	0.976	JH18	0.942

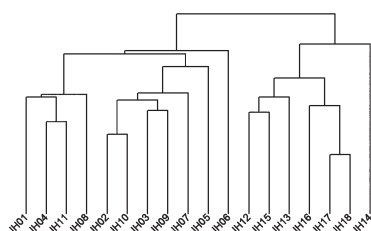


图3 18批橘核药材HPLC指纹图谱的聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis of HPLC fingerprint of 18 batches of *C. reticulata*

等对于橘核中有效成分柠檬苦素和诺米林的含量有一定的影响。第二大类又被聚为两组,第一组为桤柑的种子,第二组为

橘橘的种子,表明不同品种柑橘的种子在柠檬苦素和诺米林的含量上也显示出差异。

3 讨论

由于橘核药材中含柠檬苦素、黄酮类等成分,因此本研究将橘核样品经石油醚脱脂、甲醇提取后,制备成供试品溶液注入HPLC仪进样分析。笔者曾选择210、254、300 nm等波长对橘核样品进行测定,结果发现,以210 nm作为检测波长的色谱图基线平稳、分离效果好、峰数较多,所反映的化学信息较多;而其他波长检测到的色谱图有基线漂移现象。因此,本研究最终选择210 nm作为检测波长。因橘核药材所含成分较为复杂,各种类型的化合物极性差别较大,故本研究采用梯度洗脱的方式。笔者曾比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.3%磷酸水溶液等流动相系统,结果表明采用乙腈-0.3%磷酸水溶液梯度洗脱可使样品得到更好的分离,且色谱峰峰形较好,故选用该系统为流动相。

综上所述,本研究所收集的18批橘核样本的HPLC指纹图谱较为相似,说明橘核药材在化学成分上比较稳定;用于指纹图谱分析的药材的共有色谱峰相似系数均在0.90以上,表明本研究结果可作为橘核药材的鉴定和质量评价的依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:356.
- [2] 周婉婷.求药不如求食[M].上海:上海科学技术出版社,2010:142.
- [3] 蔡护华,桥永文男.柑桔果实中柠檬苦素类化合物的研究现状与展望[J].植物学报,1996,38(4):328.
- [4] 薛殿凯.橘核可治病[J].家庭中医药,2008(3):59.
- [5] Maneerat W, Laphookhieo S, Koysomboon S, et al. Anti-malarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from chisocheton siamensis[J]. *Phytomedicine*, 2008, 5(4):1.
- [6] Genupur A, Rajjesu JL, Srinivasan N, et al. Synthesis and cytotoxicity of novel isomeric C-seco limonoids [J]. *Eur J Medl Chem*, 2006, 41(8):997.
- [7] Xie F, Zhang M, Zhang CF, et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from *Melia toosendan* fruit[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(3):463.
- [8] 罗永忠,潘利华.柠檬苦素类似物的研究与应用进展[J].饮料工业,2008,11(1):6.
- [9] 谢让金,周志钦,邓烈.真正柑橘果树类植物基于 AFLP 分子标记的分类与进化研究[J].植物分类学报,2008,46(5):682.
- [10] 何中燕,裴瑾,莫书蓉,等.不同橘核炮制品中柠檬苦素和诺米林的测定[J].中成药,2011,33(10):1761.
- [11] 苏亚平,周海妹,展学孔,等.HPLC法测定夏天无薄膜衣片中原阿片碱的含量[J].中国药房,2010,21(36):3445.

(收稿日期:2014-01-21 修回日期:2014-10-02)

(编辑:孙冰)