

罗华玲, 林海霞, 朱敏凤, 等. 佛手外皮和果肉的 HPLC 指纹图谱及多成分定量对比分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 309-316. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050324

LUO Hualing, LIN Haixia, ZHU Minfeng, et al. Comparative Analysis Between Scarfskin and Scarcocarp of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle by HPLC Fingerprints and Multi-components Content Determination[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 309-316. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050324

· 分析检测 ·

佛手外皮和果肉的 HPLC 指纹图谱及多成分定量对比分析

罗华玲^{1,2}, 林海霞^{1,2}, 朱敏凤^{1,2,*}, 杨丽娟^{1,2}, 王霞³

(1. 乐山市食品药品检验检测中心, 四川乐山 614000;

2. 四川省药品监督管理局中药质量研究重点实验室, 四川乐山 614000;

3. 四川金林药业有限公司, 四川乐山 614000)

摘要:目的: 选取 16 批次佛手的外皮和果肉作为研究对象, 研究二者的差异性。方法: 采用 HPLC 分别建立了佛手外皮和果肉指纹图谱, 并进行了多成分的含量测定。结果: 果肉中标定了 8 个共有峰, 外皮中标定了 18 个共有峰, 指认了 6 种成分, 分别是东莨菪内酯、滨蒿内酯、橙皮苷、香叶木苷、5,7-二甲氧基香豆素、佛手苷内酯。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件进行相似度评价分析, 乐山市内佛手外皮和果肉与各自的对照图谱相似度较好, 均大于 0.90; 而同一批次佛手外皮和果肉的相似度非常低只有 0.10~0.35。在此基础上, 对 6 种指认的成分进行了含量测定, 佛手外皮中, 检出 6 种指认的成分, 其中 5,7-二甲氧基香豆素、香叶木苷含量较高; 而果肉中橙皮苷、香叶木苷含量较高, 其余 4 种成分未检出。结论: 通过 HPLC 指纹图谱及多成分定量分析, 发现佛手外皮和果肉的成分及含量存在显著性的差异, 利用这些特点, 可以将佛手外皮和果肉分别应用于不同的领域, 以达到资源利用最大化的目的; 同时所建立的方法可用于佛手质量的控制, 并为佛手资源的合理高效的开发利用提供了技术支撑。

关键词:佛手, 外皮, 果肉, HPLC 指纹图谱, 含量测定, 质量控制

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)06-0309-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050324



本文网刊:

Comparative Analysis Between Scarfskin and Scarcocarp of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle by HPLC Fingerprints and Multi-components Content Determination

LUO Hualing^{1,2}, LIN Haixia^{1,2}, ZHU Minfeng^{1,2,*}, YANG Lijuan^{1,2}, WANG Xia³

(1. Sichuan Leshan Food and Drug Inspection Center, Leshan 614000, China;

2. Sichuan Medical Products Administration Key Laboratory for Quality Research of Traditional Chinese Medicine, Leshan 614000, China;

3. Sichuan Jinlin Pharmaceutical Co., Ltd., Leshan 614000, China)

Abstract: Objective: The scarfskin and scarcocarp of 16 batches of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle were collected as the research objects to find out the differences between scarfskin and scarcocarp. Methods: The fingerprints of scarfskin and scarcocarp of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle were established by HPLC, and the content of multicomponents was determined respectively. Result: Eight common peaks were picked up in scarcocarp, 18 in scarfskin, and six constituents were identified as scopoletin, scoparone, hesperidin, diosimin, 5,7-dimethoxy coumarin and bergapten. The similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine was employed for

收稿日期: 2022-05-27

基金项目: 乐山市科技计划项目 (20SZD079)。

作者简介: 罗华玲 (1982-), 女, 硕士, 中级工程师, 研究方向: 中药及中成药的检验分析, E-mail: 357142650@qq.com。

* 通信作者: 朱敏凤 (1985-), 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 中药及中成药的检验分析, E-mail: 316263318@qq.com。

similarity analysis. The scarfskin and scarcocarp of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle in Leshan City had good similarity with their respective reference fingerprints, both greater than 0.90. The similarity between the scarfskin and scarcocarp of the same batch of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle was very low, only 0.10 to 0.35. On this basis, the contents of six identified components were determined. In the scarfskin of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle six components were detected, and the contents of 5,7-dimethoxy coumarin and diosimin were higher. But the contents of hesperidin and diosimin in the scarcocarp were higher, and the other four components were not detected. Conclusion: Through HPLC fingerprint and quantitative analysis of multiple components, it was found that there were significant differences in composition and content between scarfskin and scarcocarp. With these characteristics, the scarfskin and scarcocarp of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle could be used in different fields to maximize the use of resources. At the same time, the established method could be used for quality control of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle, and would provide technical support for rational and efficient development and utilization of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle resources.

Key words: *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle; scarfskin; scarcocarp; HPLC fingerprint; content determination; quality control

佛手为芸香科植物佛手(*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle)的干燥果实,佛手中含多种化学成分,含黄酮类、香豆素类、糖类、挥发油、柠檬苦素及氨基酸类物质等,主要成分为黄酮类、香豆素类和挥发油^[1],具有疏肝理气、和胃止痛等功效,主治胸胁胀痛、胃脘痞满、食少呕吐、咳嗽痰多等症状,收载于《中国药典》2020年版一部^[2]。据文献报道,以四川和广东的佛手种植面积最大,产量最高^[3]。四川佛手因为产量大、质量好,在国内外市场畅销,形成了川佛手道地品牌,作为四川道地中药材和药食同源的品种,具有较大的经济价值^[4]。

近年来对佛手的研究主要集中于挥发油^[5-6]、浸出物^[7]、多成分的定量分析^[8-9]、佛手指纹图谱的建立^[10-13]等。指纹图谱在中药质量评价中被广泛地应用,可充分地体现中药中各成分分布的状况,目前采用指纹图谱的方法评价佛手的成分及含量的文献较多^[14-18]。

本文参照佛手质量标准(2020年版《中国药典》一部)进行橙皮苷含量测定时,发现同批次不同果之间、及同一果之间(因外皮与果肉的占比不同)的含量差异较大。因此本研究拟以果实不同部位的角度入手,通过建立指纹图谱,以评价佛手外皮与果肉、及不同产区的异同,同时探究外皮和果肉的化学成分及含量的差异性,为佛手资源的充分开发利用提供技术支持,为完善佛手的质量评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

佛手 来源信息详见表1;甲醇、乙醇 分析纯,成都科龙化工试剂厂;蒸馏水 实验室制备;东莨菪内酯、滨蒿内酯、橙皮苷、香叶木苷、5,7-二甲氧基香豆素、佛手苷内酯对照品 含量大于98%,成都普思生物科技科技股份有限公司。

Altus10液相色谱仪 珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司;Kromasil液相色谱柱(100-5-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)) 瑞典阿克苏诺贝尔(Akzo Nobel)

表1 佛手样品信息

Table 1 Informations of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle

样品号	采收日期	果色(成熟度)	产地
S1	2021年7月28日	黄果	乐山夹江县
S2	2021年7月28日	青果	乐山夹江县
S3	2021年8月12日	青果夹带少许黄色	乐山五通桥
S4	2021年8月12日	青果	乐山五通桥
S5	2021年8月26日	黄果	乐山犍为县
S6	2021年8月26日	黄果	乐山犍为县
S7	2021年9月6日	黄果	乐山沐川县
S8	2021年9月6日	青果	乐山沐川县
S9	2021年9月15日	青果	乐山沙湾区
S10	2021年9月15日	青果	乐山沙湾区
S11	2021年9月20日	黄果	广东肇庆
S12	2021年9月20日	青果	广东肇庆
S13	2021年9月26日	黄果	云南昆明
S14	2021年9月26日	黄果	云南昆明
S15	2021年9月26日	黄果	福建泉州
S16	2021年9月26日	青果	福建泉州

公司;XS205DU型电子分析天平 梅特勒托利多仪器上海有限公司;ULUP-11-10超纯水机 成都超纯水科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 液相色谱条件 色谱柱:Kromasil 100-5-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1 mol/L乙酸铵(B),梯度洗脱(0~60 min, 5% A→90% A; 60~62 min, 90% A→5% A; 62~68 min, 5% A);流速:1 mL·min⁻¹;柱温30℃;进样量:10 μL。

1.2.2 溶液的制备

1.2.2.1 混合对照品储备液的制备 精密称定各对照品,分别加甲醇制成含东莨菪内酯0.4649 mg/mL、滨蒿内酯对照品0.4190 mg/mL、橙皮苷对照品0.5218 mg/mL、香叶木苷对照品0.5057 mg/mL、5,7-二甲氧基香豆素对照品0.4677 mg/mL、佛手苷内酯对照品0.1706 mg/mL;依次精密吸取上述储备液0.8、

0.8、8.0、8.0、8.0、1.0 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得混合对照品储备液(含东莨菪内酯 14.8768 $\mu\text{g/mL}$ 、滨蒿内酯对照品 13.4096 $\mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷对照品 166.976 $\mu\text{g/mL}$ 、香叶木苷对照品 161.8176 $\mu\text{g/mL}$ 、5,7-二甲氧基香豆素对照品 149.6496 $\mu\text{g/mL}$ 、佛手苷内酯对照品 6.8241 $\mu\text{g/mL}$)。

1.2.2.2 供试品的制备 取鲜佛手并将其外皮和果肉分离, 于烘箱中 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘至水分低于 10.0%, 分别取外皮和果肉各 0.5 g, 打粉(过三号筛), 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 回流 1 h, 放冷, 用甲醇补足减少的重量, 摇匀, 过滤, 即得。按照同样方法制备不含供试品的阴性对照溶液。

1.2.3 系统适用性与专属性试验 精密吸取混合对照品溶液(“1.2.2.1”项)、供试品溶液和阴性对照溶液(“1.2.2.2”项)各 10 μL , 按“1.2.1”项下色谱条件进样测定, 所得实验数据应符合相关要求。

2 结果与分析

2.1 指纹图谱研究方法学考察

2.1.1 参照峰的选择 2020 年版《中国药典》以橙皮苷作为单指标性成分用以评价佛手的质量^[1], 橙皮苷在色图谱中分离度好, 峰面积较高, 稳定性好, 因此将其作为色谱参照峰(S), 计算获取各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。

2.1.2 精密度试验 取供试品(编号 S1)制备溶液, 按“1.2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 分别记录 6 次进样的色谱图, 计算各个共有峰面积和相对保留时间的 RSD, 发现供试品中的各个共有峰相对峰面积 RSD 为 0.52%~1.75%; 相对保留时间 RSD 为 0.35%~1.88%, 均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.1.3 重复性试验 取供试品(编号 S1)粉末 6 份, 按“1.2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“1.2.1”项下色谱条件对 6 份样品分别进样测定, 计算各个共有峰面积和相对保留时间的 RSD, 发现供试品中的各个共有峰相对峰面积 RSD 为 1.36%~3.75%; 相对保留时间 RSD 为 0.78%~3.12%, 均小于 4.0%, 表明本实验方法重复性良好。

2.1.4 稳定性试验 取供试品(编号 S1)溶液, 于室温下分别放置 0、2、4、8、12、24 h 时按“1.2.1”项下色谱条件对以上 6 份样品进样测定(分别平行测定 3 次)。分别计算 6 次测定中 6 种成分的峰面积和相对保留时间的 RSD, 发现供试品中的各个共有峰相对峰面积 RSD 为 0.41%~2.68%; 相对保留时间 RSD 为 0.053%~0.47%, 均小于 3.0%, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.2 指纹图谱的构建

2.2.1 16 批次佛手外皮和果肉的指纹图谱构建 取 16 批次佛手外皮和果肉, 分别按“1.2.2.2”项下方法制备成供试品溶液, 按“1.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录供试品色谱图, 导出 HPLC 数据图谱, 并导

入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版)》软件, 分别选择供试品(编号 S1)佛手的外皮和果肉作为参照图谱, 时间窗宽度 0.3, 选取多个特征峰进行多点校正, 自动峰匹配, 佛手外皮的指纹图谱标定了 18 个共有峰, 佛手果肉的指纹图谱标定了 8 个共有峰, 分别生成佛手果皮和果肉的对照指纹图谱, 见图 1。佛手外皮中同时指认了 6 个峰, 其中峰 8、11、13、14、15、16 分别为东莨菪内酯、滨蒿内酯、橙皮苷、香叶木苷、5,7-二甲氧基香豆素、佛手苷内酯; 佛手果肉中同时指认了 8 个共有峰, 其中峰 6、7 分别为橙皮苷、香叶木苷。而将同一批次的佛手的外皮和果肉进行指纹图谱相似度评价, 发现共有峰有 4 个, 分别是外皮色谱图中的峰 1、5、13、14。由于各成分在外皮和果肉中含量值相差较大, 导致二者的相似度非常低。通过直观比较对照图谱可知, 橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素是区别佛手的外皮与果肉的差异性物质。

2.2.2 指纹图谱相似度分析 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版)》软件计算佛手的外皮与果肉与各自的对照指纹图谱相似度结果, 以及同一批次佛手的外皮与果肉的相似度结果。分别将佛手的外皮指纹图谱及果肉指纹图谱进行叠加(见图 1), 指纹图谱的相似度结果见表 2。结果表明, 佛手外皮中成分多含量丰富, 5,7-二甲氧基香豆素的含量最高; 10 批次乐山市内佛手的外皮的对照指纹图谱的相似度结果在 0.90 以上, 6 批次外省佛手中云南地区的外皮的对照指纹图谱的相似度偏低, 其余在 0.90 以上; 而佛手果肉中成分较少, 橙皮苷含量最高, 东莨菪内酯、滨蒿内酯、5,7-二甲氧基香豆素及佛手苷内酯成分在果肉中缺失; 10 批次乐山市内佛手的果肉对照指纹图谱的相似度在 0.90 以上, 6 批次外省佛手中肇庆地区的果肉的对照指纹图谱的相似

表 2 16 批次佛手的外皮与果肉相似度评价

Table 2 Similarity evaluation of scarfskin and scarcocarp of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle from 16 batches

外皮供试品	相似度	果肉供试品	相似度
R(S1)	1	R(S1)	1
S2	0.971	S2	0.971
S3	0.942	S3	0.924
S4	0.927	S4	0.968
S5	0.923	S5	0.955
S6	0.924	S6	0.967
S7	0.953	S7	0.973
S8	0.971	S8	0.982
S9	0.936	S9	0.918
S10	0.904	S10	0.965
S11	0.926	S11	0.848
S12	0.913	S12	0.815
S13	0.753	S13	0.965
S14	0.748	S14	0.979
S15	0.948	S15	0.949
S16	0.962	S16	0.936
外皮对照图谱1.000		果肉对照图谱1.000	

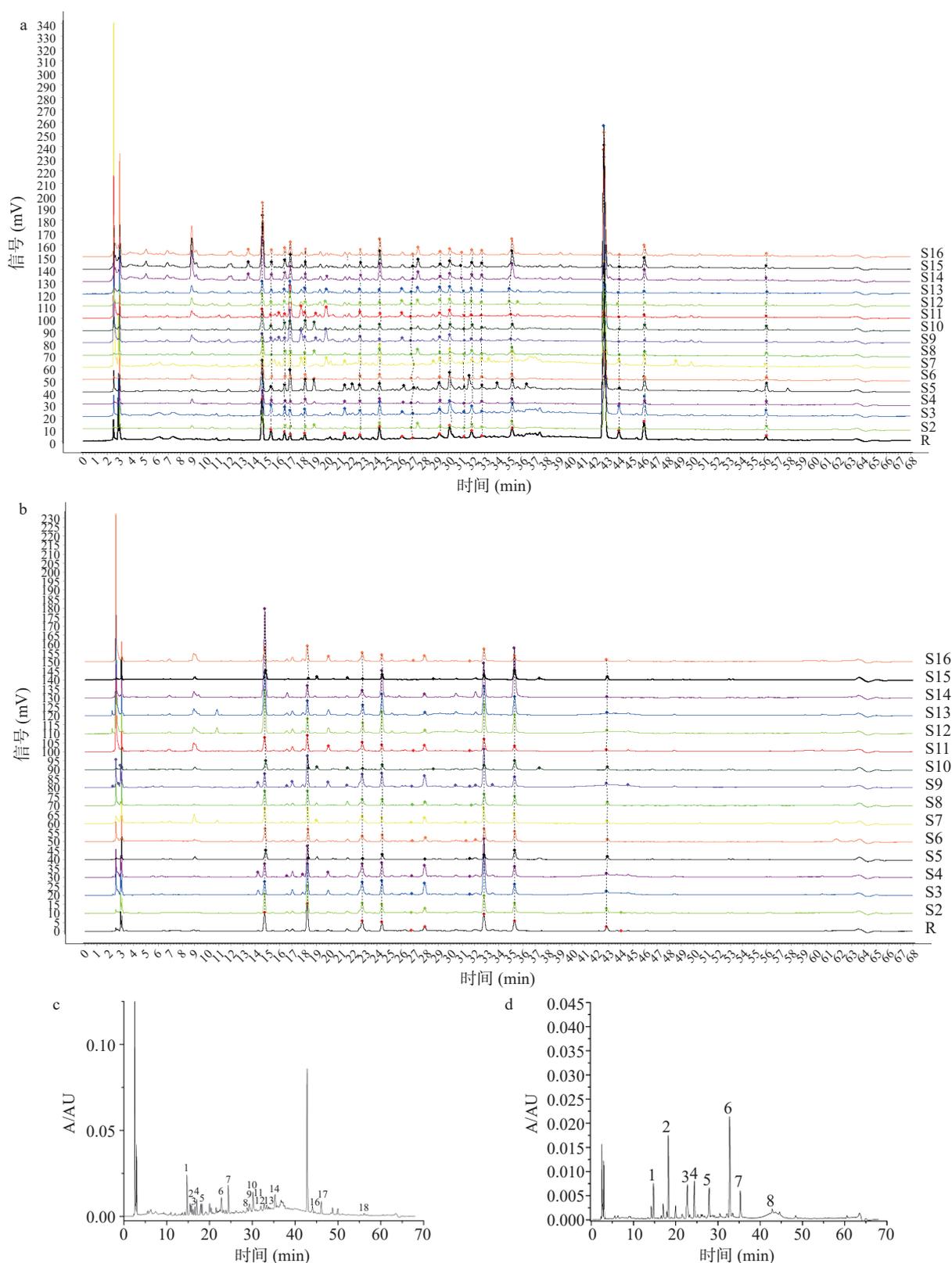


图1 16批次佛手外皮和果肉的HPLC指纹图谱共有模式

Fig.1 Common pattern of HPLC fingerprints of scarfskin and scarcocarp of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle

注: a. 16批次佛手外皮HPLC指纹图谱共有模式; b. 16批次佛手果肉HPLC指纹图谱共有模式; c. 佛手外皮HPLC指纹图谱; d. 佛手果肉HPLC指纹图谱。

度偏低,其余在0.9以上;而同一批次佛手的外皮与果肉的相似度计算结果非常低,只有0.10~0.35,原因是佛手外皮与果肉的成分及含量存在显著差异,导致相似度计算结果偏低。

2.3 佛手的外皮与果肉中各成分的含量测定

采用HPLC法建立了佛手的外皮与果肉的指纹图谱,外皮中指认了6个指标性成分,果肉中指认了2个指标性成分,为了进一步明确佛手的外皮与果肉

中各指标性成分的含量及差异性, 本研究建立了同时测定外皮与果肉中各指标性成分含量测定的方法。据文献报道, 佛手中成分比较高的是三类物质, 分别是黄酮类、香豆素类及挥发油^[1,19]。通过用文献中报道的含量较高的部分指标性成分的对照品进行匹配, 发现只有 6 种成分, 最终确定对佛手中外皮与果肉中的 6 种成分(东莨菪内酯、滨蒿内酯、橙皮苷、香叶木苷、5,7-二甲氧基香豆素、佛手苷内酯)进行同时测定, 见图 2。

2.3.1 含量测定方法学考察

2.3.1.1 线性关系考察 精密量取“1.2.2.1”项下对照品贮备液, 加甲醇稀释成 5 个浓度, 各精密吸取 10 μL , 在“1.2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行回归, 结果见表 3, 表明各成分在各自范围内线性关系良好。

表 3 线性回归方程
Table 3 Linear regression equation

成分名称	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)
东莨菪内酯	$Y=16549X+2763.8$	1.0000	0.1860~14.8768
滨蒿内酯	$Y=13096X+744.2$	0.9999	0.1676~13.4096
橙皮苷	$Y=20915X-36296$	1.0000	2.0872~166.976
香叶木苷	$Y=8908X+7089$	1.0000	2.02272~161.8176
5,7-二甲氧基香豆素	$Y=18707X+29157$	0.9998	1.8706~149.6496
佛手苷内酯	$Y=15288X+397$	0.9998	0.0853~6.8241

2.3.1.2 精密性试验 精密吸取“1.2.2.1”项下混合对照品溶液 10 μL , 按“1.2.1”项下色谱条件重复进样 6 次。结果, 东莨菪内酯、滨蒿内酯、橙皮苷、香叶木苷、5,7-二甲氧基香豆素、佛手苷内酯峰面积的 RSD 分别为 0.85%、1.02%、0.46%、0.58%、0.52%、1.36%($n=6$), 表明仪器精密性良好。

2.3.1.3 稳定性试验 取同一批次供试品(编号 S1)溶液, 于室温下分别放置 0、2、4、8、12、24 h 时按“1.2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 东莨菪内酯、滨蒿内酯、橙皮苷、香叶木苷、5,7-二甲氧基香豆素、佛手苷内酯峰面积的 RSD 分别为 1.04%、0.97%、0.48%、0.64%、0.42%、1.25%($n=6$), 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.3.1.4 重复性试验 取同一批次供试品(编号 S1)适量, 共 6 份, 按“1.2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“1.2.2.2”项下色谱条件进样测定, 测得东莨菪内酯、滨蒿内酯、橙皮苷、香叶木苷、5,7-二甲氧基香豆素、佛手苷内酯含量的 RSD 分别为 1.58%、1.41%、0.95%、0.99%、1.08%、1.43%, 表明本方法重复性良好。

2.3.1.5 加样回收率试验 取已知含量的同一批次供试品(编号 S1)0.5 g, 精密称定, 共 6 份, 精密加入混合对照品储备液(含东莨菪内酯 14.8768 $\mu\text{g/mL}$ 、滨蒿内酯对照品 13.4096 $\mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷对照品 166.976 $\mu\text{g/mL}$ 、香叶木苷对照品 161.8176 $\mu\text{g/mL}$ 、

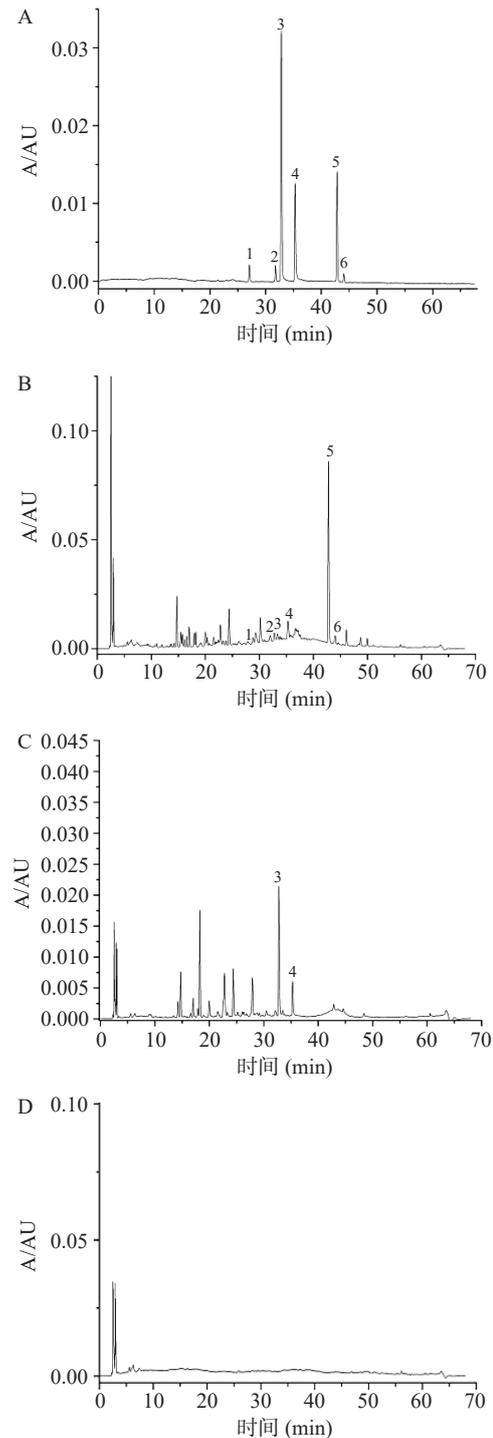


图 2 佛手外皮和果肉的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of scarp skin and scarpocarp of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle

注: 1. 东莨菪内酯; 2. 滨蒿内酯; 3. 橙皮苷; 4. 香叶木苷; 5. 5,7-二甲氧基香豆素; 6. 佛手苷内酯。A. 混合对照品溶液; B. 夹江地区佛手外皮供试品溶液; C. 夹江地区佛手果肉供试品溶液; D. 阴性供试品。

5,7-二甲氧基香豆素对照品 149.6496 $\mu\text{g/mL}$ 、佛手苷内酯对照品 6.8241 $\mu\text{g/mL}$) 10 mL, 按“1.2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“1.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果见表 4。

2.3.2 16 批次佛手外皮与果肉的含量测定 分别取 16 批次佛手供试品, 按“1.2.2.2”项下方法制备供试

表4 加样回收率试验结果

Table 4 Test results of sample addition recovery

成分	取样量 (g)	样品含量 (μg/g)	加入量 (μg/g)	测得量 (μg/g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
东莨菪内酯	0.5001	40.01	148.77	191.23	101.65	100.45	1.06
	0.4981	39.85	148.77	188.75	100.09		
	0.4998	39.98	148.77	188.19	99.62		
滨蒿内酯	0.5012	129.31	134.10	128.25	95.64	94.36	1.20
	0.5033	129.85	134.10	126.03	93.98		
	0.4986	128.64	134.10	125.33	93.46		
橙皮苷	0.5004	140.11	1669.76	1712.19	94.15	92.25	1.79
	0.5106	142.97	1669.76	1667.11	91.45		
	0.4978	139.38	1669.76	1662.10	91.15		
香叶木苷	0.5047	868.08	1618.18	2494.35	100.50	99.74	1.17
	0.4956	852.43	1618.18	2460.21	98.39		
	0.4967	854.32	1618.18	2491.44	100.32		
5,7-二甲氧基香豆素	0.4928	737.23	1496.50	1395.49	93.25	93.25	1.18
	0.4893	731.99	1496.50	1378.96	92.15		
	0.4896	732.44	1496.50	1412.02	94.35		
佛手苷内酯	0.5013	14.04	68.24	63.50	93.05	93.05	1.61
	0.5008	14.02	68.24	64.52	94.55		
	0.4975	13.93	68.24	62.48	91.56		

品溶液,在“1.2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法计算各组分的含量,结果见表5。

2.3.3 含量测定结果与分析 从表5可以看出,佛手外皮中5,7-二甲氧基香豆素、香叶木苷含量较高,其余成分含量较少;而果肉中橙皮苷、香叶木苷含量较高,其余4种成分未检出。

从佛手外皮与果肉指纹图谱的建立,到多成分的含量测定,可以发现佛手的外皮与果肉的成分及含量存在显著的差异,而成分的不同必然会导致生物效应的差异,利用佛手外皮与果肉的差异,可以将其应用于不同的领域,以达到资源利用最大化的目的。

2.3.4 波长的选择 采用紫外可见分光光度计,分别对东莨菪内酯、滨蒿内酯、橙皮苷、香叶木苷、5,7-二甲氧基香豆素、佛手苷内酯6种标准物质溶液进行扫描(190~400 nm),结果显示:橙皮苷在284 nm有最大吸收;5,7-二甲氧基香豆素、佛手苷内酯在320 nm吸收值最大;东莨菪内酯、滨蒿内酯、香叶木苷在350 nm有最大吸收。将6种标准物质的混合溶液于3个不同波长(284、320、350 nm)下扫描,结果显示在320 nm条件下,色谱峰较多,各峰吸收值良好,故选择320 nm作为指纹图谱的检测波长。多成分含量测定要求检测波长为最大吸收波长,故含量测定中选择284 nm作为橙皮苷的检测波长;320 nm作为5,7-二甲氧基香豆素、佛手苷内酯的检测波长;350 nm作为东莨菪内酯、滨蒿内酯、香叶木苷的检测波长。

3 讨论与结论

3.1 指纹图谱分析

从相似度计算的结果显示乐山市内的佛手的外皮与果肉与各自对照图谱的相似度均大于0.90,表明乐山本地区不同批次间相似度较好,而外省佛手的

表5 各地佛手外皮与果肉各成分含量测定结果(% , n=3)

Table 5 Determination of contents in scarfskin and scarcocarp of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle from different provenances (% , n=3)

编号	含量(% , RSD<2.0%)						
	东莨菪内酯	滨蒿内酯	橙皮苷	香叶木苷	5,7-二甲氧基香豆素	佛手苷内酯	
外皮	S1	0.004	0.0129	0.014	0.086	0.748	0.0014
	S2	0.0039	0.0114	0.015	0.081	0.624	0.0011
	S3	0.0011	0.0011	0.003	0.053	0.660	0.0009
	S4	0.0008	0.0007	0.005	0.049	0.616	0.0007
	S5	0.0012	0.0094	0.007	0.057	0.458	0.0013
	S6	0.0040	0.0104	0.008	0.052	0.402	0.0011
	S7	0.0015	0.0062	0.006	0.062	0.673	0.0007
	S8	0.0021	0.0055	0.007	0.071	0.582	0.0006
	S9	0.0010	0.0007	0.010	0.037	0.321	0.0009
	S10	0.0011	0.0011	0.008	0.037	0.329	0.0011
	S11	0.0035	0.0044	0.013	0.130	0.729	0.0011
	S12	0.0043	0.0035	0.008	0.104	0.656	0.0013
	S13	0.0055	0.0309	0.002	0.023	0.222	0.0008
	S14	0.0048	0.0314	0.002	0.032	0.257	0.0007
	S15	0.0044	0.0176	0.062	0.095	0.728	0.0015
	S16	0.0045	0.0153	0.075	0.087	0.682	0.0017
果肉	S1	/	/	0.118	0.051	/	/
	S2	/	/	0.103	0.046	/	/
	S3	/	/	0.097	0.075	/	/
	S4	/	/	0.087	0.085	/	/
	S5	/	/	0.064	0.025	/	/
	S6	/	/	0.060	0.030	/	/
	S7	/	/	0.087	0.075	/	/
	S8	/	/	0.113	0.025	/	/
	S9	/	/	0.133	0.072	/	/
	S10	/	/	0.125	0.063	/	/
	S11	/	/	0.151	0.443	/	/
	S12	/	/	0.168	0.518	/	/
	S13	/	/	0.058	0.205	/	/
	S14	/	/	0.055	0.162	/	/
	S15	/	/	0.0420	0.037	/	/
	S16	/	/	0.0430	0.043	/	/

外皮对照图谱相似度除云南地区的偏低外,福建与肇庆的都在0.90以上;外省佛手的果肉对照图谱相似度除肇庆地区的偏低外,福建与云南的都在0.90以上。从佛手的外皮与果肉的对照指纹图谱可知,佛手的外皮的图谱标定的色谱峰数目较多,包含果肉中标定的4个峰,更直观表明外皮与果肉所含化学成分种类及含量的不一致。

3.2 多成分定量分析

为进一步比较佛手的外皮与果肉化学成分含量的变化,本研究在建立的指纹图谱基础上对16批次佛手的外皮与果肉中的6个指标性成分进行含量测定,结果发现橙皮苷和5,7-二甲氧基香豆素的含量在佛手的外皮与果肉中存在显著差异;橙皮苷含量在果肉中较高,而5,7-二甲氧基香豆素的含量在外皮中较高;测定结果还发现,同一产地的黄果外皮中5,7-二甲氧基香豆素的含量明显高于青果的(约3~5倍);而青果果肉中橙皮苷的含量明显高于黄果的(约0.5~3倍)。

3.3 推广应用

橙皮苷为二氢黄酮苷类化合物^[20], 已经被证明具有多种药理活性如抗氧化、抗炎镇痛、免疫调节、抗肿瘤等^[21], 为了提高佛手在这方面的治疗作用, 可以选取佛手的果肉, 且宜选用青果; 5,7-二甲氧基香豆素属于香豆素类化合物, 具有抗感染、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗血栓生成、抗菌等药理活性, 香豆素类化合物抗肿瘤作用已成为一个研究热点, 具有很高的药用价值^[22]。另外, 香豆素类化合物具有芳香气味, 可作为香料、增香剂等, 也应用于食品、塑料制品等产品中^[23], 那么要让佛手在这些领域能发挥很好的价值, 就可以选取佛手的外皮, 且宜选用黄果。

通过 HPLC 指纹图谱及多成分进行定量分析, 发现佛手外皮和果肉的成分及含量存在显著性的差异, 利用这些特点, 可以将佛手外皮和果肉分别应用于不同的领域, 以达到资源利用最大化的目的。本研究所建立的 HPLC 指纹图谱和多成分进行同时定量分析的方法, 可用于佛手的质量控制, 并为合理充分利用佛手的药用价值提供了数据支撑。

参考文献

- [1] 李春宇, 袁贞, 余春洁, 等. 佛手化学成分和药理活性的研究进展[J]. 食品与药品, 2022, 24(2): 187-192. [LI C Y, YUAN Z, SHE C J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of *Citri sarcodactylis* fructus[J]. Food and Drug, 2022, 24(2): 187-192.]
- [2] 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: 185-186. [National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Part 1. Beijing: Chemical Industry Press, 2020: 185-186.]
- [3] 张桂芳, 徐鸿华. 佛手种质资源研究概况[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(1): 69-72. [ZHANG G F, XU H H. Review on germplasm research of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle [J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2007, 24(1): 69-72.]
- [4] 万德光, 彭成, 赵军宁. 四川道地中药材志[M]. 四川: 四川科学技术出版社, 2005: 320-326. [WAN D G, PENG C, ZHAO J N. Sichuan genuine Chinese Materia Medica[M]. Sichuan: Sichuan Science and Technology Press, 2005: 320-326.]
- [5] 罗忻映, 李培, 何兵, 等. 气相色谱-一测多评法同时测定佛手挥发油中 6 种成分的含量[J]. 中国药房, 2021, 32(16): 1995-2001. [LUO X Y, LI P, HE B, et al. Simultaneous determination of 6 components in volatile oil from *Citrus medica* by GC-QAMS[J]. China Pharmacy, 2021, 32(16): 1995-2001.]
- [6] 赵永艳, 张军银, 彭腾, 等. 不同产地佛手的挥发油成分比较分析[J]. 中国药房, 2020, 31(4): 423-428. [ZHAO Y Y, ZHANG J Y, PENG T, et al. Comparative analysis of the components of volatile oil in *Citrus medica* from different producing areas[J]. China Pharmacy, 2020, 31(4): 423-428.]
- [7] 王吉文, 黄燕俊, 胡倩倩, 等. 不同采收期及加工方法广佛手中浸出物、橙皮苷含量分析[J]. 海峡药学, 2022, 34(4): 54-57. [WANG J W, HUANG Y J, HU Q Q, et al. Analysis of the content of extracts and hesperidin in *Citrus sarcodactylis* from Guang-

- dong by different harvesting periods and processing methods[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2022, 34(4): 54-57.]
- [8] 曹士政, 赵登高, 马燕燕, 等. 一测多评法同时测定不同产地佛手中 6 种化学成分的含量[J]. 中南药学, 2022, 20(5): 1167-1172. [CAO S Z, ZHAO D G, MA Y Y, et al. Simultaneous determination of 6 chemical components in *Citrus medica* from different areas by quantitative analysis of multi-components with single marker method[J]. Central South Pharmacy, 2022, 20(5): 1167-1172.]
- [9] 魏莹, 陈珍, 杨兰, 等. HPLC 法同时测定不同产地佛手中 5 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(12): 2180-2184. [WEI Y, CHEN Z, YANG L, et al. Simultaneous determination of 5 components in fructus *Citri sarcodactylis* from different habitats by HPLC[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2017, 37(12): 2180-2184.]
- [10] 吴学峰, 周熙, 黄小兰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF MS 的广佛手指纹图谱建立及炮制前后成分差异分析[J]. 分析测试学报, 2022, 41(3): 299-308. [WU X F, ZHOU X, HUANG X L, et al. Construction of UPLC-Q-TOF MS fingerprints for fingered citron and its ingredient differences analysis before and after processing [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2022, 41(3): 299-308.]
- [11] 林乐维, 蒋林, 郝大庆, 等. 不同产地广佛手药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中成药, 2009, 31(12): 1805-1808. [LIN L W, JIANG L, HAO D Q, et al. HPLC fingerprint of fructus *Citri sarcodactylis* from Guangdong province[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2009, 31(12): 1805-1808.]
- [12] 余晓燕, 余艳, 陈小燕, 等. 中药材佛手的指纹图谱建立及在鉴别中的应用[J]. 泰州职业技术学院学报, 2021, 21(4): 84-86. [YU X Y, YU Y, CHEN X Y, et al. Establishment of fingerprint of *Citri sarcodactylis* fructus of traditional Chinese herbs and its application in identification and its application in identification[J]. Journal of Taizhou Polytechnic College, 2021, 21(4): 84-86.]
- [13] 李凤丽, 李进, 吴娇. 指纹图谱技术在中药领域研究中的应用现状[J]. 天津药学, 2014, 26(3): 52-57. [LI F L, LI J, WU J. Application of fingerprint technology in the field of traditional Chinese medicine[J]. Tianjin Pharmacy, 2014, 26(3): 52-57.]
- [14] 张瑞芳, 高幼衡, 崔红花, 等. 广佛手药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中草药, 2007, 38(7): 1075-1077. [ZHANG R F, GAO Y H, CUI H H, et al. Fingerprints of fructus *Citri sarcodactylic* from Guangdong by HPLC[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(7): 1075-1077.]
- [15] 刘盼, 雷素娟, 唐鹏, 等. 不同产地佛手 GC 指纹图谱及 4 种成分测定[J]. 中成药, 2018, 40(11): 2491-2496. [LIU P, LEI S J, TANG P, et al. Establishment of GC fingerprints of *Citrus medica* and determination of four constituents[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(11): 2491-2496.]
- [16] 贾智若, 裴渭静, 王雪艳, 等. 佛手散水煎剂高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 医药导报, 2013, 32(11): 1486-1490. [JIA Z R, PEI W J, WANG X Y, et al. HPLC fingerprint of Fushousan decoction[J]. Herald of Medicine, 2013, 32(11): 1486-1490.]
- [17] 李金玉, 贺文婷, 王喜英, 等. 不同采收期广佛手指纹图谱研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(14): 99-101. [LI J Y, HE W T, WANG X Y, et al. HPLC fingerprint of fructus *Citri sarcodactylis* in different picking times[J]. Journal of Anhui Agricultural Sci-

- ences, 2015, 43(14): 99-101.]
- [18] 刘盼, 雷素娟, 何兵, 等. 合江佛手两种香豆素含量测定及指纹图谱研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(3): 184-189. [LIU P, LEI S J, HE B, et al. Determination of two coumarins and fingerprint of fructus *Citri sarcodactylis* from Hejiang[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(3): 184-189.]
- [19] 赵秀玲. 佛手生理活性成分的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(21): 393-399. [ZHAO X L. Research progress of physiologically active compounds of bergamot[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(21): 393-399.]
- [20] 黄爱玲, 长义龙, 黄成, 等. 橙皮苷和橙皮素衍生物的合成及生物活性研究进展[J]. *药学进展*, 2018, 42(7): 527-536. [HUANG A L, CHANG Y L, HUANG C, et al. Research progress of synthesis and biological activity of hesperidin and hesperitin derivatives [J]. *Journal of Pharmaceutical Progress*, 2018, 42(7): 527-536.]
- [21] 李荣. 橙皮苷的抗炎免疫作用及部分机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2006. [LI R. Anti-inflammatory and immunomodulatory actions of hesperidin and its mechanism[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2006.]
- [22] 张韶瑜, 孟林, 高文远, 等. 香豆素类化合物生物学活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(6): 410-414. [ZHANG S Y, MENG L, GAO W Y, et al. Advances in biological activities of coumarin compounds[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, 30(6): 410-414.]
- [23] 韩熠, 张承明, 喻坤, 等. 食品及化妆品中香豆素和黄樟素类化合物分析方法研究进展[J]. *香料香精化妆品*, 2013(1): 45-49. [HAN Y, ZHANG C M, YU K, et al. Recent advances in analytical for coumarins and saftroles in food and cosmetics[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 2013(1): 45-49.]