

木瓜、酒木瓜、光皮木瓜的 HPLC 指纹图谱鉴别

陈建真¹, 敖志辉¹, 陈 彬², 笈文娜¹, 吕圭源¹
(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: 目的 建立 HPLC 指纹图谱鉴别木瓜、酒木瓜、光皮木瓜。方法 该药物甲醇提取液的分析采用 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-甲醇-1% 冰醋酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 283 nm。结果 10 批样品 HPLC 指纹图谱有 7 个共有峰, 相似度均大于 0.9; 木瓜与酒木瓜的相似度大于 0.9, 木瓜与光皮木瓜的相似度为 0.6。结论 该方法准确稳定, 可用于木瓜的鉴别和质量评价。
关键词: 木瓜; 酒木瓜; 光皮木瓜; HPLC 指纹图谱
中图分类号: R282.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)02-0664-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.062

木瓜为蔷薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟果实, 味酸性温, 归肝、脾经, 具有舒筋活络、和胃化湿的功效, 用于治疗湿痹拘挛、腰膝关节酸重疼痛、暑湿吐泻、转筋痉挛、脚气水肿^[1]。临床上木瓜多经炮制后使用, 如酒制品具有引药上行、增强活血行气止痛等作用。木瓜种类繁多, 主要有皱皮木瓜、光皮木瓜 2 大类, 前者为木瓜的主流商品, 后者为木瓜的习用品或混用品, 为同属植物楤木 *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne 的干燥成熟果实^[2]。由于传统用药习惯的影响, 市场上常有将光皮木瓜作木瓜使用的情况, 影响木瓜的临床疗效。

木瓜和光皮木瓜含有三萜、有机酸、黄酮、多糖等成分^[2-4], 但在具体成分及成分含量上差异较显著。刘世尧等^[5]测定了木瓜和光皮木瓜总糖、可滴定酸、抗坏血酸、齐墩果酸、熊果酸、总黄酮、总皂苷等含量, 多数指标为木瓜高于光皮木瓜, 并采用模糊概率法进行综合评价, 表明木瓜综合品质明显高于光皮木瓜。齐红等^[6]利用 HPLC 转化波长法测定了木瓜属 5 种木瓜中齐墩果酸、熊果酸、绿原酸含量, 显示木瓜含量较高, 光皮木瓜含量较少。于晓亮等^[7]对木瓜和光皮木瓜绿原酸、齐墩果酸、熊果酸和总黄酮进行了测定, 表明在光皮木瓜中未检测到绿原酸, 且齐墩果酸含量极低, 总黄酮含量以木瓜较高, 光皮木瓜较少。刘晓棠等^[8]采用直接电位滴定法对总有机酸含量进行测定, 表明皱皮木瓜中含量高于光皮木瓜。Du 等^[9]采用 HPLC-DAD 法和 ESI-MS 法对 5 种木瓜含有的黄酮类成分进行研究, 表明表儿茶酸、原花青素在光皮木瓜和日本木瓜中含量较高, 皱皮木瓜次之。受炮制时间、温度和辅料等影响, 木瓜经炮制后所含部分成分含量会发生变化, 如齐墩果酸、绿原酸、熊果酸、咖啡酸、没食子酸和

皂苷^[10]。木瓜传统的药用评价是“味酸者为佳”, 有机酸是木瓜镇痛、抗炎等作用的重要有效成分, 包括脂溶性的三萜酸如齐墩果酸、熊果酸, 中等极性的酚酸如绿原酸、咖啡酸等, 水溶性有机酸如苹果酸、柠檬酸等^[11-12]。2020 年版《中国药典》一部以齐墩果酸和熊果酸的总含量控制木瓜的质量^[1], 为了建立木瓜多指标质量控制的方法, 本课题组在前期用 HPLC 法对木瓜及其酒制品中齐墩果酸、熊果酸和绿原酸含量测定的基础上^[13-14], 采用梯度洗脱法建立木瓜 HPLC 指纹图谱, 对木瓜、酒木瓜、光皮木瓜进行比较, 为木瓜的鉴别和质量评价提供实验依据。

1 材料
1.1 仪器 Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Milli-Q Synthesis A10 纯水仪 (美国 Millipore 公司); KQ5200B 型超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); XS105 型电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司)。
1.2 试剂与药物 10 批木瓜饮片、2 批光皮木瓜饮片经浙江省中医院陈建明主管药师鉴定为正品, 具体信息见表 1; 酒木瓜饮片为自制。绿原酸对照品 (中国食品药品检定研究院)。乙腈、甲醇为色谱纯; 其余试剂均为分析纯; 水为超纯水。
2 方法与结果
2.1 色谱条件 参考文献 [14] 报道, Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) - 甲醇 (B) - 1% 冰醋酸 (C), 梯度洗脱, 程序见表 2; 检测波长 283 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 5 μL。
2.2 对照品溶液制备 精密称取绿原酸对照品适量, 加甲醇制成质量浓度为 273.6 μg/mL 的溶液, 滤过, 取续滤液, 即得。

收稿日期: 2020-03-02
基金项目: 浙江省重点实验室项目 (2012E10002)
作者简介: 陈建真 (1965—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药活性成分研究及新药开发。Tel: (0571) 61768148, E-mail: chjz102@aliyun.com

表 1 木瓜信息

编号	品种	拉丁名	产地
S1	皱皮木瓜	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	安徽
S2	皱皮木瓜	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	湖北
S3	皱皮木瓜	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	福建
S4	皱皮木瓜	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	湖北
S5	皱皮木瓜	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	宣城
S6	皱皮木瓜	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	贵州
S7	皱皮木瓜	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	四川
S8	皱皮木瓜	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	浙江
S9	皱皮木瓜	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	广西
S10	皱皮木瓜	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	山东
S11	光皮木瓜	<i>Chaenomeles sinensis</i> (Thouin) Koehne	河南
S12	光皮木瓜	<i>Chaenomeles sinensis</i> (Thouin) Koehne	山东

表 2 梯度洗脱程序

时间/min	A 甲醇/%	B 乙腈/%	C 1%冰醋酸/%
0	4	6	90
16	8	12	80
30	12	18	70
45	32	48	20
60	36	54	10
70	36	54	10

2.3 供试品溶液制备 取不同批次木瓜饮片粉末各约 1 g，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加甲醇 50 mL，精密称定质量，超声提取 1 h，冷却至室温，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 吸取同一供试品溶液（S10），按“2.1”项色谱条件下进样测定 5 次，以 3 号峰（绿原酸）为参照，测得各共有峰相对保留时间 RSD 为 0~0.18%，相对峰面积 RSD 为 0~4.33%（除 2 号峰外其余均小于 3%），表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 吸取同一供试品溶液（S10），于 0、3、6、12、24 h 按照“2.1”项色谱条件下进样测定 5 次，以 3 号峰（绿原酸）为参照，测得各共有峰相对保留时间 RSD 为 0~0.37%，相对峰面积 RSD 为 0~2.93%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 称取同一批木瓜饮片粉末（S10）5 份，各约 1 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项色谱条件下进样测定 5 次，以 3 号峰（绿原酸）为参照，测得各共有峰相对保留时间 RSD 为 0~0.43%，相对峰面积 RSD 为 0~4.60%，表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱建立 称取 10 批木瓜饮片粉末约 1 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2004A 版）对 10 批样品进行分析，见图 1，共确定 7 个共有峰。与对照品比对后，可知 3 号峰为绿原酸，其含量较高、分离度较好，故选择其作为参照峰 [编号 3 (s)]，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积，结果

见表 3~4。由此可知，不同产地、批次样品主成分组成基本相同，但各成分含量存在差异，并且相似度均大于 0.9。

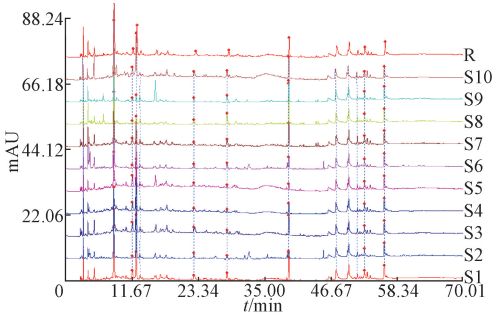


图 1 10 批样品 HPLC 指纹图谱

表 3 共有峰相对保留时间

编号	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7
S1	0.682	0.947	1.000	1.057	1.821	2.291	3.168
S2	0.678	0.941	1.000	1.054	1.833	2.277	3.135
S3	0.678	0.950	1.000	1.054	1.814	2.281	3.141
S4	0.678	0.950	1.000	1.055	1.814	2.319	3.138
S5	0.678	0.949	1.000	1.054	1.828	2.320	3.140
S6	0.679	0.946	1.000	1.055	1.837	2.285	3.150
S7	0.680	0.948	1.000	1.055	1.830	2.286	3.153
S8	0.679	0.937	1.000	1.055	1.832	2.289	3.159
S9	0.677	0.933	1.000	1.053	1.822	2.273	3.126
S10	0.670	0.956	1.000	1.053	1.791	2.244	3.035
RSD/%	0.46	0.72	0.00	0.11	0.74	0.96	1.18

表 4 共有峰相对峰面积

编号	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7
S1	1.494	0.411	1.000	0.147	0.247	0.316	0.644
S2	0.858	0.151	1.000	0.166	0.268	0.141	0.139
S3	0.648	0.220	1.000	0.107	0.212	0.087	0.246
S4	0.435	0.226	1.000	0.108	0.095	0.073	0.157
S5	0.975	0.456	1.000	0.186	0.214	0.101	0.138
S6	2.901	0.289	1.000	0.251	0.272	0.303	0.335
S7	2.253	0.502	1.000	0.283	0.217	0.548	0.703
S8	1.494	0.444	1.000	0.842	0.897	1.825	3.359
S9	3.289	0.704	1.000	1.032	0.761	1.491	2.307
S10	1.266	0.285	1.000	0.098	0.167	0.173	0.299

2.6 木瓜、酒木瓜 HPLC 图谱比较 称取酒木瓜饮片粉末约 1 g，精密称定，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，见图 2，它与木瓜的指纹峰数据见表 5，并且相似度均大于 0.9。由此可知，木瓜酒制前后共有峰数量一致，表明其成分种类无明显变化；但酒制品峰面积大于生品，与文献 [13, 15] 报道一致。

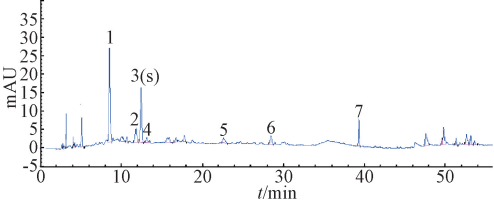


图 2 酒木瓜 HPLC 色谱图

表 5 木瓜、酒木瓜指纹峰保留时间和峰面积

峰号	木瓜		酒木瓜	
	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积
1	8.445	152.1	8.442	235.5
2	11.726	41.9	11.707	51.5
3(s)	12.381	101.8	12.354	165.3
4	13.089	14.9	13.069	23.5
5	22.548	25.1	22.527	27.2
6	28.368	32.1	28.360	30.2
7	39.220	65.5	39.221	53.1

2.7 木瓜、光皮木瓜 HPLC 图谱比较 称取光皮木瓜饮片粉末约 1 g，精密称定，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，见图 3，它与木瓜指纹峰数据见表 6，并且相似度均为 0.6。由此可知，光皮木瓜未检测到木瓜中原有的 2 号、3 号（绿原酸）、4 号峰，与文献 [7] 报道光皮木瓜中未检测到绿原酸一致。

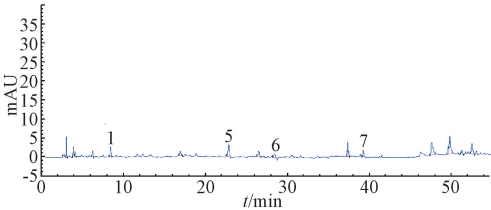


图 3 光皮木瓜 HPLC 色谱图

表 6 木瓜、光皮木瓜指纹峰保留时间

峰号	木瓜	光皮木瓜
	t_R/min	t_R/min
1	8.445	8.436
2	11.726	—
3(s)	12.381	—
4	13.089	—
5	22.548	22.869
6	28.368	28.421
7	39.220	39.243

3 讨论

3.1 色谱条件优化 本实验中考察了甲醇-乙腈-0.1%冰醋酸和甲醇-乙腈-0.1%磷酸的分离效果，确定了乙腈-甲醇-1%冰醋酸的梯度洗脱条件，色谱峰数目多，基线平稳，分离度较好。结合木瓜所含的化学成分，比较了 220、283、326 nm 等不同波长下的图谱，结果在 220 nm 处干扰较大，在 326 nm 处出峰数目较少，在 283 nm 处图谱所反映的信息较多，分离度较好，故选择 283 nm 作为测定波长。

3.2 供试品溶液制备方法的优化 采用水、乙醇、甲醇、80%甲醇、60%甲醇等不同溶剂进行提取，结果以甲醇提取所得的色谱峰较多，峰面积较大，故选用甲醇为提取溶剂。对超声和回流提取方法进行比较，表明两种方法所得图谱基本相似，由于超声提取方便省时，故选择超声提取。对提取时间进行考察，结果提取 1 h 比 45 min 所得的峰面积较大，故确定超声提取 1 h。

3.3 相似度结果分析 中药指纹图谱具有“整体性”与

“模糊性”的特点，HPLC 指纹图谱能较全面地反映所含成分的相对关系，能更好地鉴别中药品质及其炮制品，控制和评价药材的质量，为中药规范化炮制及其机制研究提供依据 [16-17]。相似度是反映不同样品之间相关性的重要参数，实验结果显示同一品种的木瓜因所含成分基本一致，故相似度较高，但由于受产地、生长环境、采收季节等影响含量不同，色谱峰面积存在差异。木瓜酒制后色谱峰位置基本相同，共有峰数目无变化，色谱峰面积有差异，表明酒制对木瓜中化学成分的影响主要在于改变成分间的比例关系，而对成分种类无明显影响，故相似度较高。光皮木瓜和木瓜系两个不同的品种，成分差异较大，故相似度较低，该指纹图谱可用于两者的鉴别。

3.4 对木瓜酒制工艺及其机制研究的意义 酒制升提是中药炮制理论的重要组成部分，酒制有引药上行，缓解药性的作用 [18]，酒制一方面使酒与药物协同发挥作用，增强活血通络作用，另一方面使药物有效成分易于煎出而增强疗效。酒制工艺条件如用酒量、炮制温度、时间等因素均会影响有效成分的溶出，导致质量不一，通过 HPLC 指纹图谱的相似性可用以反映木瓜酒制工艺是否稳定良好，从而保证饮片质量。实验结果表明木瓜酒制品的总峰面积大于生品的总峰面积，系因其所含的有机酸、萜类、黄酮等有效成分溶于乙醇，酒制后有利于成分溶出，从化学角度为酒制有利于疗效增强提供了依据。由于本实验所建立的指纹图谱仅能反映此色谱条件下的化学成分信息，酒制后其他成分含量及药效作用变化还有待深入研究。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：62-63.

[2] 杨蕾磊，靳李娜，陈科力. 木瓜及其同属植物化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国药师，2015，18（2）：293-295.

[3] 邹 妍，鄢海燕. 中药木瓜的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志，2019，46（7）：507-515.

[4] 尹震花，赵 晨，张娟娟，等. 光皮木瓜的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（9）：221-229.

[5] 刘世尧，白志川，李加纳. 皱皮木瓜与光皮木瓜品质多性状指标综合评价 [J]. 中国中药杂志，2012，37（7）：901-907.

[6] 齐 红，郭庆梅，李圣波，等. HPLC 转换波长法测定木瓜中绿原酸、齐墩果酸和熊果酸含量 [J]. 山东中医杂志，2014，33（3）：227-229.

[7] 于晓亮，王建华. 木瓜属植物果实中有效成分含量测定 [J]. 山东农业科学，2012，44（2）：48-51；54.

[8] 刘晓棠，张卫明，姜洪芳，等. 不同种类木瓜样品的总有机酸含量测定 [J]. 食品研究与开发，2010，31（1）：100-102.

[9] Du H, Wu J, Li H, et al. Polyphenols and triterpenes from *Chaenomeles* fruits: chemical analysis and antioxidant activities

assessment[J]. *Food Chem*, 2013, 141(4): 4260-4268.

[10] 魏 婷, 何先元. 木瓜炮制与质量分析研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(28): 180-181.

[11] 周亚菁, 查日维, 谢晓梅, 等. 宣木瓜总有机酸的提取和纯化工艺优化[J]. 中成药, 2015, 37(3): 664-666.

[12] 张 勇, 张 玲, 谢晓梅. 一测多评法同时测定木瓜中 2 种常见三萜酸[J]. 中成药, 2013, 35(4): 770-773.

[13] 陈建真, 敖志辉, 陈建明. 不同产地木瓜及其酒制品中绿原酸的 HPLC 含量测定研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(1): 86-88.

[14] 陈建真, 敖志辉, 陈建明, 等. 不同产地和品种木瓜及其酒制品中齐墩果酸和熊果酸的含量测定研究[J]. 中华中

医药学刊, 2011, 29(10): 2194-2196.

[15] 王光宁, 廖华卫, 陈 权, 等. 木瓜饮片 HPLC 指纹图谱的研究及不同炮制品的比较[J]. 中药材, 2013, 36(11): 1758-1761.

[16] 邓 翀, 郑 洁, 宋小妹. 指纹图谱结合响应面法研究醋制南五味子炮制工艺[J]. 中成药, 2012, 34(8): 1563-1567.

[17] 王红阳, 钟佩芸, 梁家怡, 等. 制枳壳 HPLC 指纹图谱与小肠推动作用的谱效关系[J]. 中成药, 2021, 43(3): 750-754.

[18] 盛 政, 赵焕君, 何紫涵, 等. 酒制升提理论的形成发展和临床应用[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(11): 198-201.

柑橘属同源药对青皮-枳壳的薄层色谱鉴别

牛露露¹, 刘 磊¹, 李瑶瑶¹, 朴成玉¹, 王子丹², 吴修红^{1*}
(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150000; 2. 哈尔滨济仁中医医院, 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要: **目的** 建立柑橘属同源药对青皮、枳壳的薄层色谱鉴别方法。**方法** 对青皮、枳壳的薄层色谱条件进行考察, 确定最优鉴别方法。**结果** 青皮、枳壳可以采用相同的供试品制备方法和薄层色谱条件加以鉴别, 即经乙酸乙酯超声制备供试品, 采用聚酰胺薄层板点样, 以二氯甲烷-丙酮-甲醇(5:1:1.5)为展开剂, 展距 10 cm, 室温(20~25℃)下展开, 3%三氯化铝乙醇溶液为显色剂, 在紫外光灯(365 nm)下检视; 色谱斑点清晰, 分离度良好, 阴性对照无干扰。**结论** 该方法操作简便, 定性特征明显, 重复性好, 适用于理气和胃颗粒中青皮和枳壳的薄层鉴别。

关键词: 青皮; 枳壳; 药对; 薄层色谱鉴别

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)02-0667-05

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2022. 02. 063

药对介于中药与方剂之间, 包含药对配伍、药对成方、药对组拆。青皮、枳壳是疏肝、理气、消积、利胆方剂中的常用药对^[1-2], 两者同为芸香科植物药材^[3], 因此含有大量相同或相似的化学成分^[4]。这些相同或相似的化学成分虽然在青皮、枳壳中的含量各不相同, 但仍给两者的薄层定性鉴别带来一定干扰。根据 2020 年版《中国药典》规定, 枳壳药材项下薄层色谱鉴别的对照指标为柚皮苷和新橙皮苷, 青皮药材项下薄层色谱鉴别的对照指标为橙皮苷, 而橙皮苷和新橙皮苷属于同分异构体, 化学极性相似, 比移值(R_f)相近, 荧光斑点经常重合, 无法很好地分开, 常给含有青皮-枳壳药对的成方制剂的薄层鉴别带来极大困难。本文通过查阅《中国药典》成方制剂和单味制剂部分所载青皮和枳壳的薄层鉴别方法, 归纳整理其供试品制备及展开方法, 并选取部分代表性方法进行“青皮”“枳壳”的鉴别, 优化其供试品制备方法^及展开方法。理气和胃颗

粒由柴胡、郁金、白芍、瓦楞子、牡蛎、黄连、清半夏、青皮、枳壳、川楝子、厚朴组成, 具有行气解郁、和胃降逆功效^[5]。以理气和胃颗粒作为研究对象, 以期建立一种青皮-枳壳药对供试品制备方法简单, 斑点分离度良好, 荧光显色清晰, 重现性良好的薄层鉴别方法。

1 青皮、枳壳的薄层鉴别

1.1 方法

1.1.1 青皮 以“青皮对照药材”“橙皮苷”为关键词, 对 2020 年版《中国药典》进行搜索, 剔除可能形成干扰的含陈皮和橘红的方剂, 将搜索到的成方制剂名称、供试品制备方法、薄层固定相、展开系统、显色剂、检视波长等信息录入 Excel 软件中, 采用 Cytoscape 3.7.2 软件将以上信息进行可视化。

1.1.2 枳壳 以“枳壳对照药材”“柚皮苷”为关键词, 对 2020 年版《中国药典》进行搜索, 剔除可能形成干扰的

收稿日期: 2020-12-12
基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81803995)
作者简介: 牛露露(1996—), 女, 硕士生, 从事中药药效物质基础及代谢组学研究。Tel: 15101221704, E-mail: 15101221704@163.com
* 通信作者: 吴修红(1978—), 女, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础及代谢组学研究。Tel: (0451) 87266806, E-mail: wxh8088@163.com