

# UPLC 法结合灰色关联度分析及化学计量学评价不同产地枳壳质量

屈彬清<sup>1</sup>, 刘隆基<sup>1</sup>, 杨婧潇<sup>1</sup>, 罗 堃<sup>1</sup>, 王元清<sup>2</sup>, 刘瑞连<sup>1,3\*</sup>, 严建业<sup>1,4\*</sup>  
(1. 湖南中医药大学科技创新中心, 湖南 长沙 410208; 2. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南长沙 410004; 3. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006; 4. 湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208)

**摘要:** **目的** 建立 UPLC 法同时测定枳壳中圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、橙皮内酯、枸橼苷、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素的含量, 结合灰色关联分析和化学计量学对不同产地枳壳质量进行评价。**方法** 枳壳甲醇提取物的分析采用 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 10% 甲醇-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 ℃。采用灰色关联分析对不同产地枳壳中 12 种成分进行综合评价, 并结合聚类分析和质量波动分析对枳壳中 12 种成分含量差异进行评价。**结果** 12 种成分在各自范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.999\ 7$ ), 平均加样回收率 98.34%~99.55%, RSD 0.49%~2.98%。产地对枳壳中 12 种成分含量有一定影响。产自四川、湖南、江西、重庆的枳壳与最优参考序列相对关联度最高, 质量较好, 这与目前四川、湖南、江西作为枳壳的主产区相符合。聚类分析将 21 个产地枳壳样品分为 2 类。甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素、橙皮内酯含量在不同产地枳壳样品中波动较大。**结论** 该方法简便准确、重复性好, 可用于枳壳的质量控制与评价。

**关键词:** 枳壳; 含量测定; 灰色关联分析; 化学计量学; UPLC

**中图分类号:** R284.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2023)11-3663-08

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.11.026

## Quality evaluation of *Aurantii Fructus* from different regions by UPLC combined with grey correlation analysis and chemometrics

QU Bin-qing<sup>1</sup>, LIU Long-ji<sup>1</sup>, YANG Jing-xiao<sup>1</sup>, LUO Kun<sup>1</sup>, WANG Yuan-qing<sup>2</sup>,  
LIU Rui-lian<sup>1,3\*</sup>, YAN Jian-ye<sup>1,4\*</sup>  
(1. Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. School of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 3. The Hospital Affiliated to Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China; 4. Hunan Engineering Technology Research Center for Screening of Active Substance of Chinese Medicinal Plants, Changsha 410208, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish a UPLC method for the simultaneous determination of eriocitrin, neoeriocitrin, narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, meranzin, poncirin, sinensetin, nobiletin, tangeretin, auraptene in *Aurantii Fructus*, and to apply grey correlation analysis and stoichiometry in the comprehensive quality evaluation of *Fructus Aurantii* from different regions. **METHODS** The analysis of methanol extract from *Aurantii Fructus* was performed on a 30 ℃ thermostatic ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with the mobile phase comprising of 10% methanol-acetonitrile flowing at 0.5 mL/min in a gradient elution manner. *Aurantii*

收稿日期: 2022-11-17  
基金项目: 湖南省自然科学基金 (2020JJ4470); 湖南省中医药科研计划项目 (2021028); 湖南中医药大学重点学科中药学科 (校行发规字 [2023] 2 号)  
作者简介: 屈彬清 (2000—), 女, 硕士生, 从事中药制剂及质量控制研究。E-mail: 1085532357@qq.com  
\* 通信作者: 刘瑞连 (1980—), 女, 博士, 主任药师, 从事中药制剂、炮制、临床中药学研究。Tel: (0731) 89520241, E-mail: swhxjjdeb@163.com  
严建业 (1975—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药制剂及质量控制研究。Tel: (0731) 88458137, E-mail: yanjianye201@126.com

*Fructus* from different regions had their twelve constituents comprehensively evaluated by grey relational analysis, and content differences analyzed by the combination use of hierarchical cluster analysis and quality fluctuation analysis. **RESULTS** Twelve constituents showed good linear relationships within their own ranges ( $r \geq 0.999\ 7$ ), whose average recoveries were 98.34% – 99.55% with the RSDs of 0.49% – 2.98%. The impact of origin differences on the content of twelve constituents in *Aurantii Fructus* was observed, as those produced in Sichuan, Hunan, Jiangxi and Chongqing contributed the highest relative correlation with the optimal reference sequence and good quality. And this coincided with the fact that the current main production areas of *Aurantii Fructus* were in Sichuan, Hunan and Jiangxi. According to the stoichiometry result, 21 samples of *Aurantii Fructus* from different regions were categorized into two kinds by cluster analysis; and there existed significant content fluctuation in sinensetin, nobiletin, tangeretin, auraptene and meranzin. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control and evaluation of *Aurantii Fructus*.

**KEY WORDS:** *Aurantii Fructus*; content determination; grey relation analysis; chemometrics; UPLC

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实，具有理气宽中、行滞消胀的功效<sup>[1]</sup>，主要栽培于江西、四川、湖南等省<sup>[2]</sup>。现代研究表明，枳壳主要含有黄酮类、香豆素、挥发油类、生物碱等成分<sup>[3]</sup>。以柚皮苷、新橙皮苷为代表的二氢黄酮化合物具有抗氧化、抗炎抑菌、改善肠胃动力障碍<sup>[4]</sup>等作用；枳壳中柠檬烯等挥发油类具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤等作用<sup>[5]</sup>；枳壳中香豆素类成分对调节胃肠运动的乙酰胆碱酯酶有抑制作用<sup>[6]</sup>。2020 年版《中国药典》仅以柚皮苷、新橙皮苷的含量来控制枳壳的质量，不能反映其质量的全貌，有待进一步完善。

枳壳的含量测定多用 HPLC 法<sup>[7-9]</sup>，该方法耗时长灵敏度较低，而 UPLC 法具有更高的柱效，能大大缩短分析时间。灰色关联度分析法是根据因素之间发展趋势的相似或相异程度，衡量因素间关联程度的一种方法<sup>[10]</sup>，可充分利用较少的原始数据去挖掘规律，作为模糊系统研究手段已应用于中药药效评价<sup>[11]</sup>、炮制对谱效关系的影响研究<sup>[12-13]</sup>及不同产地和商品规格药材质量评价<sup>[14]</sup>等。化学计量学是利用数学、统计学方法系统研究化学测量值内涵的科学<sup>[15]</sup>。本实验首次将 UPLC 法和灰色关联度分析、化学计量学结合起来对不同产地枳壳进行综合质量评价，以期为客观评价与控制枳壳的质量提供依据。

## 1 材料

1.1 仪器 Waters ACQUITY 超高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；XS205DU 十万分之一分析天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；KQ5200DV 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Option

R7 ultra AN 超纯水系统（英国 ELGA LabWater 公司）。

1.2 试剂与药物 芸香柚皮苷（批号 MUST-16030408）、川陈皮素（批号 MUST-16070901）对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司；柚皮苷（批号 10552-201301）、橙皮苷（批号 10089-201203）、新橙皮苷（批号 10477-201203）对照品均购自南昌贝塔生物科技有限公司；圣草次苷（批号 13463-28-0）、新北美圣草苷（批号 13241-32-2）、橙皮内酯（批号 23971-42-8）、枸橼苷（批号 14941-08-3）、甜橙黄酮（批号 2306-27-6）、桔皮素（批号 481-53-8）、橙皮油素（批号 495-02-3）对照品均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司；纯度 $\geq 98\%$ 。甲醇、乙腈为色谱纯；其余试剂均为分析纯；水为超纯水。

21 批枳壳样品来源信息见表 1，经湖南中医药大学中药鉴定教研室龚力民副教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相 10% 甲醇（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~5 min，82%~75% A；5~10 min，75%~40% A；10~11 min，40%~5% A；11~12 min，5% A；12~16 min，5%~82% A）；体积流量 0.5 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长（0~1.5 min，318 nm；1.5~2.8 min，285 nm；2.8~5 min，300 nm；5~6 min，325 nm；6~7.8 min，285 nm；7.8~10.35 min，330 nm；10.35~10.8 min，290 nm；10.8~16 min，325 nm）；进样量 2 μL。

表 1 样品信息  
Tab. 1 Information of samples

编号	购买地点/产地	时间
S1	湖南沅江	2021 年 8 月
S2	湖南耒阳	2021 年 8 月
S3	湖南隆回	2021 年 8 月
S4	湖南湘潭	2021 年 8 月
S5	湖南涟源	2021 年 8 月
S6	湖南湘西	2021 年 8 月
S7	湖南汉寿	2021 年 7 月
S8	湖南安仁	2021 年 12 月
S9	湖南石门	2020 年 12 月
S10	湖南益阳益阳衫乡地	2021 年 7 月
S11	湖南益阳	2021 年 9 月
S12	江西新干	2021 年 10 月
S13	江西吉安	2021 年 9 月
S14	四川平武	2020 年 9 月
S15	安徽合肥	2021 年 9 月
S16	江西九江	2020 年 7 月
S17	江西赣州	2021 年 7 月
S18	江西萍乡	2020 年 6 月
S19	重庆江津	2021 年 7 月
S20	四川合江	2021 年 7 月
S21	浙江安吉	2021 年 7 月

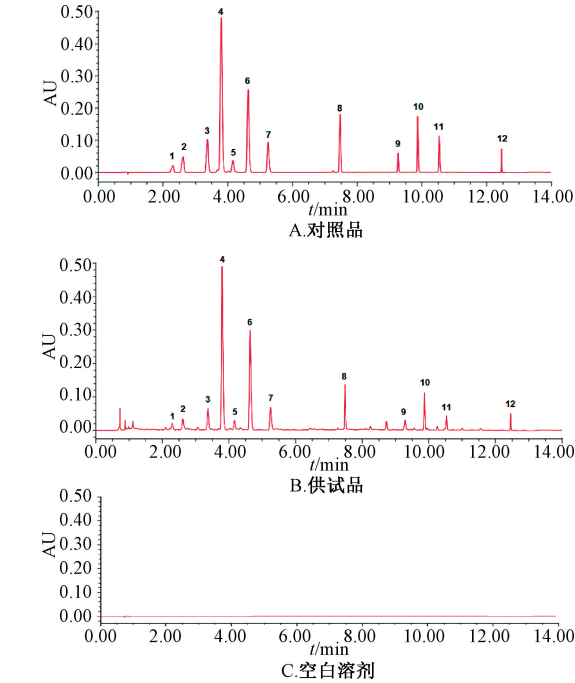
2.2 对照品溶液制备 分别精密称取各对照品适量，加甲醇稀释成分别含圣草次苷 9.75 μg/mL、新北美圣草苷 22.50 μg/mL、芸香柚皮苷 108.00 μg/mL、柚皮苷 450.00 μg/mL、橙皮苷 32.12 μg/mL、新橙皮苷 260.00 μg/mL、橙皮内酯 21.45 μg/mL、枸橼苷 52.50 μg/mL、甜橙黄酮 7.80 μg/mL、川陈皮素 16.00 μg/mL、桔皮素 15.75 μg/mL、橙皮油素 6.30 μg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取枳壳粗粉（过 2 号筛）约 0.5 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 40 mL，称定质量，超声（200 W，40 kHz）提取 45 min，取出，冷却至室温，称定质量，用甲醇补足减失的质量，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 取对照品、供试品、空白溶剂适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，各成分色谱峰分离度理想，显示了良好的专属性。

2.4.2 线性关系考察 分别精密称取圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、橙皮内酯、枸橼苷、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素对照品适量，混匀，加入甲醇稀释，得到一系列不同浓度的对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓



1. 圣草次苷 2. 新北美圣草苷 3. 芸香柚皮苷 4. 柚皮苷  
5. 橙皮苷 6. 新橙皮苷 7. 橙皮内酯 8. 枸橼苷 9. 甜橙黄酮  
10. 川陈皮素 11. 桔皮素 12. 橙皮油素
1. eriocitrin 2. neoeriocitrin 3. narirutin 4. naringin  
5. hesperidin 6. neohesperidin 7. meranzin 8. poncirin  
9. sinensetin 10. nobiletin 11. tangeretin 12. aурaptene

图 1 各成分 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of various constituents

度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
圣草次苷	Y=23 024X-5 317. 2	0. 999 8	0. 975~19. 500
新北美圣草苷	Y=13 330X-15 413	0. 999 7	2. 250~45. 000
芸香柚皮苷	Y=4 099. 8X-2 470. 6	0. 999 8	10. 800~216. 000
柚皮苷	Y=5 902. 2X-148 281	0. 999 8	45. 000~900. 000
橙皮苷	Y=6 684. 2X-12 475	0. 999 7	3. 212~64. 230
新橙皮苷	Y=4 944. 3X-65 151	0. 999 8	26. 000~520. 000
橙皮内酯	Y=16 914X-5 688. 1	0. 999 9	2. 145~43. 007
枸橼苷	Y=10 700X-23 713	0. 999 7	5. 250~105. 000
甜橙黄酮	Y=18 321X-6 289. 3	0. 999 9	0. 780~15. 600
川陈皮素	Y=21 462X-1 403. 1	0. 999 7	1. 600~32. 000
桔皮素	Y=15 400X-3 238	0. 999 9	1. 575~31. 500
橙皮油素	Y=13 939X-3 211. 3	0. 999 8	0. 630~12. 600

2.4.3 精密度试验 取同一份供试品溶液（S8），在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮

苷、新橙皮苷、橙皮内酯、枸橼苷、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素峰面积 RSD 分别为 0.42%、0.18%、0.40%、0.42%、0.29%、0.43%、0.27%、0.26%、0.27%、0.30%、1.26%、0.22%，表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液（S8），于 0、2、4、6、8、10、12 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、橙皮内酯、枸橼苷、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素峰面积 RSD 分别为 1.09%、0.66%、1.25%、0.49%、1.42%、0.25%、1.29%、2.81%、1.88%、2.75%、1.88%、2.82%，表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取枳壳粗粉 6 份（S8），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，测得圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、橙皮内酯、枸橼苷、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素含量 RSD 分别为 0.37%、0.23%、0.59%、

0.44%、0.22%、0.15%、0.79%、0.93%、1.41%、1.23%、1.37%、1.40%，表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的枳壳粗粉 6 份（S8），每份 0.25 g，精密称定质量，置于具塞锥形瓶中，分别精密加入各对照品溶液适量，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，计算回收率。结果，圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、橙皮内酯、枸橼苷、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素平均加样回收率（RSD）分别为 98.38%（0.97%）、99.02%（0.49%）、99.38%（0.86%）、99.42%（1.20%）、98.94%（0.84%）、99.53%（0.73%）、98.91%（2.06%）、99.55%（1.81%）、99.31%（2.92%）、99.30%（2.72%）、98.34%（2.98%）、99.27%（2.96%）。

2.5 样品含量测定 按“2.3”项下方法制备 21 批枳壳药材供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 3。

表 3 各成分含量测定结果（mg/g，n=2）

Tab. 3 Results of content determination for various constituents (mg/g, n=2)												
编号	圣草次苷	新北美圣草苷	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	橙皮内酯	枸橼苷	甜橙黄酮	川陈皮素	桔皮素	橙皮油素
S1	1.687	4.286	8.730	68.990	2.573	45.748	2.589	6.062	1.133	1.635	1.263	0.732
S2	1.596	3.579	7.695	60.993	2.209	35.108	2.175	4.878	1.017	1.648	1.200	0.506
S3	1.901	4.409	8.930	68.731	3.038	38.878	2.251	4.866	1.025	1.661	1.170	0.601
S4	1.445	3.802	8.491	64.010	4.370	36.339	2.494	4.740	1.114	1.765	1.197	0.723
S5	1.863	4.464	8.079	62.924	1.934	32.285	2.047	4.105	0.981	1.619	1.183	0.591
S6	1.473	3.505	7.765	61.865	2.334	35.916	2.502	5.094	1.106	1.770	1.228	0.700
S7	1.009	2.746	7.718	72.455	3.193	46.407	3.098	5.525	1.469	2.164	1.491	0.895
S8	1.882	4.105	11.068	87.551	6.290	43.833	2.090	8.147	0.954	1.870	1.039	0.670
S9	1.387	2.973	9.354	56.438	3.569	38.589	2.418	4.919	1.083	1.803	1.066	0.713
S10	1.639	3.186	8.843	63.711	2.734	39.193	1.651	5.217	0.630	1.288	0.337	0.072
S11	0.875	2.693	7.358	51.371	5.382	35.917	0.314	0.909	0.200	0.286	0.131	0.027
S12	1.279	4.360	4.931	69.892	1.820	44.493	3.017	4.021	1.225	1.531	1.067	0.353
S13	1.098	3.923	5.703	44.275	3.531	41.432	0.713	1.803	0.303	0.629	0.388	0.136
S14	1.703	3.690	11.818	73.667	2.618	40.750	2.494	4.641	0.831	1.470	1.013	0.629
S15	1.336	4.256	6.746	52.548	3.627	44.100	0.247	1.023	0.100	0.332	0.160	0.026
S16	0.914	3.093	8.107	51.914	4.752	39.147	0.610	2.597	0.305	0.572	0.339	0.100
S17	0.225	1.415	2.261	58.938	2.568	47.986	0.242	3.158	0.188	0.249	0.270	0.511
S18	0.819	3.544	6.185	46.932	3.442	42.767	0.239	0.705	0.095	0.310	0.187	0.038
S19	0.182	1.130	2.003	53.361	1.855	44.631	0.318	2.708	0.177	0.291	0.303	0.623
S20	1.069	3.962	8.544	82.898	4.631	47.451	1.780	8.888	1.074	1.753	1.061	0.692
S21	1.092	3.404	8.108	47.814	4.792	43.803	0.416	1.712	0.294	0.639	0.376	0.076
平均值	1.261	3.454	7.545	61.966	3.393	41.180	1.605	4.082	0.729	1.204	0.784	0.448

2.6 灰色关联度分析

2.6.1 样品数据集的建立 以“2.5”项下 12 种

成分为指标性成分，建立枳壳药材质量灰色模式识别数据集，结果见表 4。



表 4 样品数据集  
Tab. 4 Samples datasets

	编号	圣草次苷	新北美圣草苷	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	橙皮内酯	枸橼苷	甜橙黄酮	川陈皮素	桔皮素	橙皮油素
评价单元序列	S1	1.687	4.286	8.730	68.990	2.573	45.748	2.589	6.062	1.133	1.635	1.263	0.732
	S2	1.596	3.579	7.695	60.993	2.209	35.108	2.175	4.878	1.017	1.648	1.200	0.506
	S3	1.901	4.409	8.930	68.731	3.038	38.878	2.251	4.866	1.025	1.661	1.170	0.601
	S4	1.445	3.802	8.491	64.010	4.370	36.339	2.494	4.740	1.114	1.765	1.197	0.723
	S5	1.863	4.464	8.079	62.924	1.934	32.285	2.047	4.105	0.981	1.619	1.183	0.591
	S6	1.473	3.505	7.765	61.865	2.334	35.916	2.502	5.094	1.106	1.770	1.228	0.700
	S7	1.009	2.746	7.718	72.455	3.193	46.407	3.098	5.525	1.469	2.164	1.491	0.895
	S8	1.882	4.105	11.068	87.551	6.290	43.833	2.090	8.147	0.954	1.870	1.039	0.670
	S9	1.387	2.973	9.354	56.438	3.569	38.589	2.418	4.919	1.083	1.803	1.066	0.713
	S10	1.639	3.186	8.843	63.711	2.734	39.193	1.651	5.217	0.630	1.288	0.337	0.072
	S11	0.875	2.693	7.358	51.371	5.382	35.917	0.314	0.909	0.200	0.286	0.131	0.027
	S12	1.279	4.360	4.931	69.892	1.820	44.493	3.017	4.021	1.225	1.531	1.067	0.353
	S13	1.098	3.923	5.703	44.275	3.531	41.432	0.713	1.803	0.303	0.629	0.388	0.136
	S14	1.703	3.690	11.818	73.667	2.618	40.750	2.494	4.641	0.831	1.470	1.013	0.629
	S15	1.336	4.256	6.746	52.548	3.627	44.100	0.247	1.023	0.100	0.332	0.160	0.026
	S16	0.914	3.093	8.107	51.914	4.752	39.147	0.610	2.597	0.305	0.572	0.339	0.100
	S17	0.225	1.415	2.261	58.938	2.568	47.986	0.242	3.158	0.188	0.249	0.270	0.511
	S18	0.819	3.544	6.185	46.932	3.442	42.767	0.239	0.705	0.095	0.310	0.187	0.038
	S19	0.182	1.130	2.003	53.361	1.855	44.631	0.318	2.708	0.177	0.291	0.303	0.623
	S20	1.069	3.962	8.544	82.898	4.631	47.451	1.780	8.888	1.074	1.753	1.061	0.692
	S21	1.092	3.404	8.108	47.814	4.792	43.803	0.416	1.712	0.294	0.639	0.376	0.076
参考序列	平均值	1.261	3.454	7.545	61.966	3.393	41.180	1.605	4.082	0.729	1.204	0.784	0.448
	最优	1.901	4.464	11.818	87.551	6.290	47.986	3.098	8.888	1.469	2.164	1.491	0.895
	最差	0.182	1.130	2.003	44.275	1.820	32.285	0.239	0.705	0.095	0.286	0.131	0.026

2.6.2 原始数据规格化处理 设有  $n$  个样品，每个样品有  $m$  项评价指标，即组成评价单元序列  $\{X_{ik}\}$  ( $i=1, 2, 3, \cdots, n; k=1, 2, 3, \cdots, m$ ; 本实验中  $n=21, m=12$ )。由于评价指标之间存在测试单位不统一的问题，因此，按照  $Y_{ik}=X_{ik}/X_k$  对原始数据进行规格化处理，结果见表 5。公式中  $Y_{ik}$  为规格化处理后的数据， $X_{ik}$  为原始数据， $X_k$  为  $n$  个样品第  $k$  个指标的均值。

表 5 数据规格化处理结果  
Tab. 5 Results of data standardization

编号	圣草次苷	新北美圣草苷	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	橙皮内酯	枸橼苷	甜橙黄酮	川陈皮素	桔皮素	橙皮油素
S1	1.338	1.241	1.157	1.113	0.758	1.111	1.613	1.485	1.555	1.358	1.610	1.633
S2	1.266	1.036	1.020	0.984	0.651	0.853	1.355	1.195	1.395	1.369	1.530	1.128
S3	1.508	1.277	1.184	1.109	0.895	0.944	1.402	1.192	1.407	1.379	1.492	1.341
S4	1.146	1.101	1.125	1.033	1.288	0.882	1.554	1.161	1.528	1.466	1.526	1.613
S5	1.478	1.293	1.071	1.015	0.570	0.784	1.275	1.006	1.346	1.345	1.509	1.318
S6	1.169	1.015	1.029	0.998	0.688	0.872	1.559	1.248	1.517	1.470	1.566	1.562
S7	0.801	0.795	1.023	1.169	0.941	1.127	1.930	1.354	2.016	1.797	1.901	1.996
S8	1.493	1.188	1.467	1.413	1.854	1.064	1.302	1.996	1.309	1.553	1.325	0.336
S9	1.100	0.861	1.240	0.911	1.052	0.937	1.506	1.205	1.486	1.498	1.359	1.591
S10	1.300	0.923	1.172	1.028	0.806	0.952	1.029	1.278	0.865	1.070	0.430	0.161
S11	0.694	0.780	0.975	0.829	1.586	0.872	0.196	0.223	0.274	0.238	0.167	0.060
S12	1.015	1.262	0.654	1.128	0.536	1.080	1.880	0.985	1.681	1.272	1.361	0.788
S13	0.871	1.136	0.756	0.715	1.041	1.006	0.444	0.442	0.415	0.523	0.495	0.303
S14	1.351	1.068	1.566	1.189	0.771	0.990	1.554	1.137	1.140	1.221	1.292	1.403
S15	1.059	1.232	0.894	0.848	1.069	1.071	0.154	0.251	0.137	0.276	0.204	0.058
S16	0.725	0.896	1.074	0.838	1.400	0.951	0.380	0.636	0.419	0.475	0.432	0.223
S17	0.178	0.410	0.300	0.951	0.757	1.165	0.151	0.774	0.258	0.207	0.345	1.139
S18	0.650	1.026	0.820	0.757	1.014	1.039	0.149	0.173	0.130	0.258	0.238	0.085
S19	0.144	0.327	0.266	0.861	0.547	1.084	0.198	0.664	0.243	0.242	0.386	1.390
S20	0.848	1.147	1.132	1.338	1.365	1.152	1.109	2.177	1.474	1.456	1.353	3.101
S21	0.866	0.986	1.075	0.772	1.412	1.064	0.259	0.420	0.403	0.531	0.479	0.170
最优	1.508	1.293	1.566	1.413	1.854	1.165	1.930	2.177	2.016	1.797	1.901	3.101
最差	0.144	0.327	0.266	0.715	0.536	0.784	0.149	0.173	0.130	0.207	0.167	0.058

2.6.3 关联度计算 用灰色关联度进行评价时, 应选择其参考序列。设最优参考序列和最差参考序列分别为  $\{X_{sk}\}$  和  $\{X_{tk}\}$  ( $k=1, 2, 3, \dots, m$ )。设最优参考序列的各项指标是  $n$  个样品对应指标的最大值, 即  $\{X_{sk}\}$ ; 最差参考序列的各项指标是  $n$  个样品对应指标的最小值, 即  $\{X_{tk}\}$ 。按照  $Y_{sk}=X_{sk}/X_k$ 、 $Y_{tk}=X_{tk}/X_k$  对原始数据进行规格化处理。

按照  $\xi_{k(s)}^i = \frac{\Delta_{min} + \rho\Delta_{max}}{|Y_{ik} - Y_{sk}| + \rho\Delta_{max}}$ 、 $\xi_{k(t)}^i = \frac{\Delta'_{min} + \rho\Delta'_{max}}{|Y_{ik} - Y_{tk}| + \rho\Delta'_{max}}$  计算各评价单元序列相对最优 (差) 参考序列的差值, 式中,  $\Delta_{min} = \min |Y_{ik} - Y_{sk}|$ ,  $\Delta_{max} = \max |Y_{ik} - Y_{tk}|$ ,  $\rho$  为分辨系数, 一般取值 0.5。按照  $r_{i(s)} = \frac{1}{m} \sum_{k=1}^m \xi_{k(s)}^i$ 、 $r_{i(t)} = \frac{1}{m} \sum_{k=1}^m \xi_{k(t)}^i$  计算各评价单元相对于最优 (差) 参考序列的关联度。评价单元序列同时相对于最优参

考序列和最差参考序列按照  $r_i = \frac{r_{i(s)}}{r_{i(s)} + r_{i(t)}}$  计算各样品的相对关联度  $r_i$ , 并按  $r_i$  大小排序, 见表 6。相对于最优参考序列的关联度  $r_{i(s)}$  越大, 同时相对于最差参考序列的关联度  $r_{i(t)}$  越小, 则相对关联度就越高, 表明该评价单元序列越理想, 为最佳评价单元; 根据相对关联度的大小对评价单元序列进行质量排序, 相对关联度越高排序越靠前, 说明样品的质量评价越高,  $r_i$  排序结果可作为药材质量高低评价的依据。由表 6 可知, 关联度排名前的样品包括来源于湖南、四川、江西、重庆的样品, 说明这 4 个产地的样品质量较好, 这与湖南、四川、江西为枳壳的主产地及道地产区相吻合其中, S20 (四川合江) 的相对关联度最高, 说明 S20 在 21 批样品中综合质量最好; 而 S15 (安徽合肥) 相对关联度最小, 说明其综合质量差, 说明产地因素对其有效成分综合影响较大。关联度排后的样品不仅来源于浙江、安徽等地, 还有产自湖南益阳、江西九江、江西赣州、江西萍乡的样品, 这说明同一省份不同地区的样品质量可能存在差异性。

2.7 化学计量学分析

2.7.1 聚类分析 对 21 批枳壳样品采用 SPSS 21.0 数据统计软件进行聚类分析, 将 21 批样品的 12 种成分含量作为变量, 聚类方法为组间联接, 度量标准选择欧式平方距离, 结果见图 2。由此可知, 当类间距离范围为 20~25 时主要分为 2 类,

即 S1~S9、S12、S14、S20 分为 G1 组, S10~S11、S13、S15~S19、S21 为 G2 组。

表 6 各样品相对关联度质量优劣排序  
Tab. 6 Results for sequencing quality of the samples

编号	相对关联度	质量排序
S1	0.645 0	9
S2	0.652 0	8
S3	0.605 6	10
S4	0.740 1	6
S5	0.711 8	7
S6	0.769 6	4
S7	0.587 9	12
S8	0.596 7	11
S9	0.874 4	2
S10	0.303 5	17
S11	0.204 8	19
S12	0.764 6	5
S13	0.445 7	14
S14	0.579 5	13
S15	0.130 0	21
S16	0.385 2	15
S17	0.332 5	16
S18	0.146 2	20
S19	0.864 0	3
S20	0.897 4	1
S21	0.297 6	18

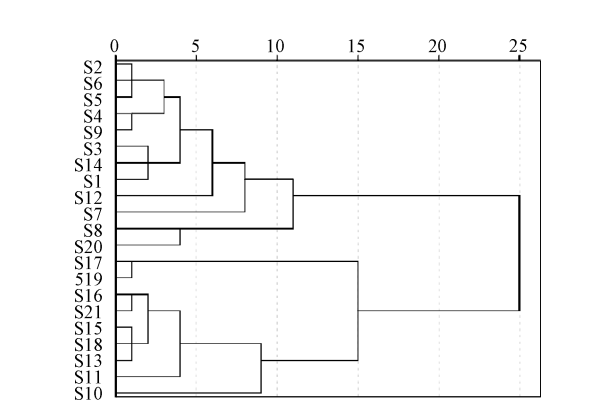


图 2 聚类分析树状图  
Fig. 2 Dendrograms of hierarchical cluster analysis

2.7.2 质量波动分析 为了探究各批次样品之间的质量波动性, 依据文献引入参数  $P$  值<sup>[16-17]</sup>, 对不同批枳壳药材质量进行评价, 公式为  $P = \frac{C_i}{\bar{C}_i}$ , 其中  $C_i$  表示给定化合物的含量, 而  $\bar{C}_i$  表示 21 批枳壳的平均含量。 $P$  值越靠近 1, 各批间的一致性就越好。一般而言, 当  $P$  值在 0.75~1.25 的范围内是可以接受的<sup>[16-17]</sup>。由图 3 可知, 甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素、橙皮内酯含量波动范

围较大，表明这些成分对枳壳的质量有较大影响。将质量波动分析的结果与聚类分析的结果相结合，发现 5 种成分含量较低的样品被分为 G2 组，而含量相对较高的样品被分在 G1 组，与聚类分析结果一致。

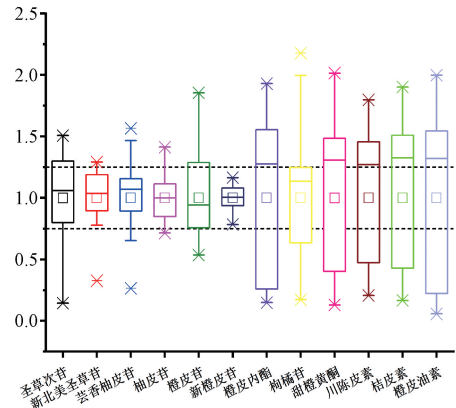


图 3 不同批样品 12 种成分的 Box-chart 图  
Fig.3 Box-chart diagram of 12 constituents in different batches of samples

3 讨论

3.1 指标成分选择 实验选取的 12 种成分中 10 种为黄酮类（圣草次苷、新北美圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷、甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素）、2 种为香豆素类（橙皮内酯、橙皮油素），分别具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎活性和调节胃肠道及抗抑郁作用<sup>[5,18]</sup>。王慧等<sup>[5]</sup>在文献分析基础上筛选出枳壳中黄酮类化合物（柚皮苷、新橙皮苷、芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素）、香豆素类化合物（水合橙皮内酯、橙皮内酯）、部分挥发油、生物碱等作为质量标志物。结合上述文献，在前期研究<sup>[7]</sup>的基础上，选取该 12 种成分作为考察指标。

3.2 测定方法选择 本实验考察了柱温（25、30、35℃）、体积流量（0.3、0.4、0.5 mL/min），结合分离度、色谱峰数目和峰形，最终确定柱温 30℃、体积流量 0.5 mL/min。再考察超声提取时间（30、45、60 min），发现超声提取 45 min，样品中 12 种成分提取相对完全，确定了样品提取时间。将单一对照品溶液经紫外分光光度计进行全波长扫描，结合样品的出峰顺序、分离度、色谱峰数目及峰形，确定了 318 nm、285 nm（圣草次苷、新北美圣草苷、枸橼苷）、300 nm（芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷）、325 nm（橙皮内酯、橙皮油素）、330 nm（甜橙黄酮、川陈皮素）、

290 nm（桔皮素）作为检测波长。

4 结论

2020 年版《中国药典》规定枳壳中含柚皮苷不得少于 4.0%，新橙皮苷不得少于 3.0%，本实验中所有样品均符合药典标准。本实验采用灰色关联分析、聚类分析与质量波动分析相结合对不同来源枳壳中 12 种成分进行综合评价，三者结果能够相互印证，聚类分析结果显示，将关联度排名前二的 S20、S9 与排名相邻的第 4~12 名的样品分为 G1 组；关联度排名靠后的第 14~21 名的样品分为 G2 组，显然结果是合理的；而其中关联度排名分别为第 3 名和第 13 名的 S19、S14 却分别分在了 G2、G1 组；通过质量波动分析发现，因为 S19 中甜橙黄酮、川陈皮素、桔皮素、橙皮油素、橙皮内酯含量远低于 G1 组而被分在 G2 组，而 S14 中这 5 种成分含量较高被分在了 G1 组；质量波动分析进一步验证了前者的准确性，体现了灰色关联分析、聚类分析及质量波动分析三者相结合的优势。

本实验建立了 UPLC 法测定枳壳中 12 种成分含量，并运用灰色关联分析与聚类分析对不同产地的枳壳中 12 种有效成分进行综合评价；再通过质量波动分析进一步验证，可判断枳壳药材质量的优劣，为综合评价枳壳质量提供依据。

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，2020：257-258.

[2] 赵奎君，郑玉忠，董婷霞，等. 不同产地枳壳药材 HPLC 指纹图谱及其柚皮苷、新橙皮苷和辛弗林含量分析[J]. 中国药学杂志，2011，46(12)：955-959.

[3] 季 忆，陈建真，陈建明. 枳壳黄酮类成分的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志，2010，17(11)：105-107.

[4] 李 灿，曾 娟，龙雨青，等. HPLC 指纹图谱结合多模式化学计量学方法评价枳壳药材质量[J]. 天然产物研究与开发，2022，34(4)：665-676.

[5] 王 慧，钟国跃，张寿文，等. 枳壳化学成分、药理作用的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊，2022，40(9)：184-192；284.

[6] 王 慧，黄友荪，梁燕青，等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学技术的枳壳适宜采收期研究[J]. 中国中药杂志，2022，47(12)：3175-3184.

[7] Lei Y T, Wang Y Q, Sun Z C, et. al. Quantitative analysis of multicomponents by single marker combined with HPLC fingerprint qualitative analyses for comprehensive evaluation of *Aurantii Fructus*[J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(7): 1382-1392.

[8] 田 芳，何小芳，谭梓君，等. 枳壳 HPLC 特征图谱及 6 个黄酮苷类成分含量测定[J]. 药物分析杂志，2020，40

(6): 1090-1096.

[ 9 ] 刘雅莉, 邓桂珠, 贤明华, 等. 枳壳炮制前后指纹图谱及主要黄酮类成分含量的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 113-118.

[10] 冯治国, 赵 祺, 朱 强, 等. 基于熵权法和灰色关联分析法评价安徽省不同产地黄精药材质量[J]. 中草药, 2021, 52(12): 3689-3695.

[11] 关 欣, 王鹤辰, 包永睿, 等. 灰色关联分析中药蒲公英不同部位对 RAW264.7 细胞的抑制作用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(11): 1354-1357.

[12] 帖晓燕, 戴海蓉, 辛国雄, 等. 基于灰色关联分析研究甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用谱效关系[J]. 中草药, 2021, 52(5): 1303-1311.

[13] 杨 超, 朱晓钗, 万浩婷, 等. 基于灰色关联分析方法研究炒酸枣仁镇静催眠作用谱效关系[J]. 中草药, 2021, 52(17): 5267-5274.

[14] 丁永胜, 罗 静, 赵程博文, 等. 基于 HPLC 法和灰色关联法评价不同产地、不同商品规格三七质量[J]. 中草药, 2020, 51(4): 1069-1075.

[15] 司明东, 李新蕊, 李亚楠, 等. 基于质量常数法和化学计量学的黄芪等级评价[J]. 中成药, 2021, 43(11): 3235-3239.

[16] Liu X S, Wu Z Z, Yang K, *et al.* Quantitative analysis combined with chromatographic fingerprint for comprehensive evaluation of Danhong injection using HPLC-DAD[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 76: 70-74.

[17] Gao F Y, Xu Z H, Wang W Z, *et al.* A comprehensive strategy using chromatographic profiles combined with chemometric methods; Application to quality control of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc[J]. *J Chromatography A*, 2016, 1466: 67-75.

[18] 刘欣媛, 嵇长久, 彭文文. 中药枳壳的化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(19): 1627-1631.

# 基于 HPLC-QAMS/GC 法联合多元统计分析及加权 TOPSIS 法评价广藿香质量

吴学辉<sup>1</sup>, 程心玲<sup>1</sup>, 潘艳琳<sup>1</sup>, 张晓斌<sup>2</sup>, 肖 钦<sup>1\*</sup>  
(1. 福建中医药大学附属人民医院药学部, 福建 福州 350004; 2. 福建省食品药品质量检验研究院, 福建 福州 350001)

**摘要:** **目的** 基于 HPLC-QAMS/GC 法多组分定量, 建立多元统计分析及加权 TOPSIS 模型, 对不同产地广藿香进行综合质量评价。**方法** HPLC-QAMS 法同时测定新西兰牡荆苷、紫葳新苷Ⅱ、毛蕊花糖苷、列当苷、异毛蕊花糖苷、鼠李素、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇、广藿香酮的含量。GC 法测定百秋李醇含量。主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 筛选影响广藿香化学成分差异的标志性成分。加权 TOPSIS 模型对广藿香整体质量进行分析和评价。**结果** 10 种成分在各自范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.999$ ), 平均加样回收率 96.85%~100.20%, RSD 0.67%~1.64%。毛蕊花糖苷、百秋李醇、广藿香酮、列当苷是影响广藿香产品质量的主要潜在标志物。18 批不同产地广藿香加权 TOPSIS 法质量评价贴近度 ( $D_n$ ) 分别为 0.382 1、0.512 9、0.512 5、0.535 8、0.535 7、0.358 8、0.536 5、0.548 3、0.206 3、0.178 2、0.142 6、0.117 4、0.716 9、0.749 5、0.664 5、0.738 1、0.623 4、0.582 1, 表明不同产地广藿香药材存在质量差异, 广东产的广藿香质量较优。**结论** 该方法操作便捷、结果准确, 可用于广藿香的综合质量评价。

**关键词:** 广藿香; 主成分分析 (PCA); 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA); 优劣解距离法 (TOPSIS); 质量评价; HPLC-QAMS/GC

**中图分类号:** R284.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2023)11-3670-08

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.11.027

收稿日期: 2023-01-11  
基金项目: 福建省科技厅引导性项目 (2018Y0042)  
作者简介: 吴学辉 (1973—), 男, 副主任药师, 从事药物质量评价、医院药学研究。Tel: (0591) 86250178  
\* 通信作者: 肖 钦 (1975—), 女, 主任药师, 从事研究医院药学研究。Tel: (0591) 83947159, E-mail: exff73@163.com