

基于化学计量学方法结合正交偏最小二乘判别分析的陈皮饮片 HPLC 指纹图谱研究

周 欣¹, 张 琳², 毛 婵¹, 康 希², 曲 彤³, 王云红⁴, 杨荣平^{1*}

1. 西南大学药学院, 重庆 400715

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

3. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712083

4. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

摘要:目的 建立陈皮饮片 HPLC 指纹图谱分析方法, 为其质量控制提供技术参考。方法 采用 HPLC 法建立 17 批陈皮饮片的指纹图谱, 通过聚类分析 (cluster analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least square discriminate analysis, OPLS-DA) 对指纹图谱进行评价。结果 建立了陈皮饮片指纹图谱, 相似度均>0.9, 确定了 25 个共有峰, 其中 14 个峰的变量投影重要性 (variable importance projection, VIP) 均>1, 通过与对照品谱图比对, 确定了 13 号峰为芸香柚皮苷、14 号峰为橙皮苷、23 号峰为川陈皮素、24 号峰为 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、25 号峰为桔皮素。结论 该方法简单可靠, 可用于陈皮饮片鉴别和质量控制。

关键词: 陈皮饮片; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析; 芸香柚皮苷; 橙皮苷; 川陈皮素; 桔皮素
中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)09-2194-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.027

HPLC fingerprints research on decoction pieces of *Citri Reticulatae* Pericarpium based on chemometrics methods combined with orthogonal partial least square discriminate analysis

ZHOU Xin¹, ZHANG Lin², MAO Chan¹, KANG Xi², QU Tong³, WANG Yun-hong⁴, YANG Rong-ping¹

1. College of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Shaanxi University of Chinese medicine, Xianyang 712083, China

4. Chongqing Academy of Chinese Traditional Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the fingerprints analysis of decoction pieces of tangerine peel, so as to provide reference for the quality control of it. **Methods** Fingerprints of 17 batches of decoction pieces of tangerine peel were established by HPLC and evaluated by cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least square discriminate analysis (OPLS-DA). **Results** The method of fingerprint of decoction pieces of tangerine peel was established, the similarities were greater than 0.9. There were 25 common peaks in the HPLC fingerprint, of which variable importance projection (VIP) of 14 peaks were greater than 1. Compared with the spectrogram of reference substances, peak 13 was narirutin, peak 14 was hesperidin, peak 23 was nobiletin, peak 24 was 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxy flavone, and peak 25 was hesperetin. **Conclusion** This simple and reliable method can be used for the identification and quality control of decoction pieces of *Citri Reticulatae* Pericarpium.

Key words: decoction pieces of *Citri Reticulatae* Pericarpium; fingerprints; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least square discriminate analysis; narirutin; hesperidin; nobiletin; hesperetin

收稿日期: 2018-11-29

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-CQ-46)

作者简介: 周 欣, 女, 硕士研究生, 从事中药新制剂、新剂型及新技术的研究与应用。Tel: 13340289746 E-mail: 1152218064@qq.com

*通信作者 杨荣平, 女, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药新制剂、新剂型及新技术的研究与应用。

Tel: (023)89029068 E-mail: yangrp@cqxndx.com

陈皮系芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮，分为“陈皮”和“广陈皮”。具有理气健脾，燥湿化痰的功效，用于脘腹胀满、食少吐泻、咳嗽痰多^[1]，陈皮传统用于消化系统和呼吸系统疾病^[2]，现代药理学研究表明，陈皮具有改善心脑血管疾病的作用，如调血脂、抗血栓、抗动脉粥样硬化、心脑血管保护等，以及其他作用如抗氧化、抗肿瘤、抗炎、神经保护等^[3-4]。

目前有较多学者研究了陈皮及广陈皮的指纹图谱，但多数是从方法学层面考察指纹图谱条件^[5-9]。本实验采用 HPLC 法建立 17 批陈皮饮片指纹图谱，确定 25 个共有峰，基于化学计量学方法 [聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA)] 进行多变量化学模式识别研究^[10-13]，结合正交偏小二乘判别分析 (OPLS-DA) 过滤与模型分类不相关的正交信号，更好地区分组间差异，并找到导致差异的标志物^[14-15]，可作为陈皮饮片鉴别和质量控制的重要手段之一。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 高效液相色谱仪 (配有四元泵，DAD 检测器，美国 Thermo-fisher 公司)；CPA-225D 型电子天平 (十万分之一)、BS224S 型电子天平 (万分之一)，德国 Sartorius 公司；SCQ[®]-数控加热超声波清洗机 (上海声彦超声波仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品芸香柚皮苷 (批号 P1207548)、橙皮苷 (批号 P1212250)、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 (批号 P1287971) 均购自上海泰坦科技股份有限公司；川陈皮素 (批号 pcl-#-Ta109)、桔皮素 (批号 pcl-#-N0408) 均购自成都普菲德生物技术有限公司，以上对照品质量分数 ≥ 98%；陈皮饮片共 17 批，样品信息见表 1，经重庆市中药研究院秦松云研究员鉴定为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮。乙腈、甲醇均为色谱纯 (美国 TEDIA 公司)；水为自制超纯水；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Synchronis C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，流动相为甲醇 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B)，梯度洗脱 (0~15 min, 20%~25% A；15~35 min, 25%~45% A；35~45 min, 45%~45% A；

表 1 17 批样品信息

Table 1 Samples information from 17 batches

样品编号	产地	批号	厂家
S1	浙江	170601	安徽谓博中药股份有限公司
S2	浙江	1705001	河北全泰药业有限公司
S3	福建	1705110162	亳州市沪谯药业有限公司
S4	广东	17092601	国药乐仁堂河北药业有限公司
S5	江西	170801CP447	河北万修药业有限公司
S6	广东	170301	安徽方氏制药有限公司
S7	浙江	170914	亳州市永刚饮片有限公司
S8	浙江	170603	安徽谓博中药股份有限公司
S9	四川	170602	安徽谓博中药股份有限公司
S10	江西	170701	安徽新盛中药饮片有限公司
S11	江西	151001	山西维康堂中药饮片有限公司
S12	四川	17100601	重庆中药饮片厂有限公司
S13	四川	170301	四川原上草中药饮片有限公司
S14	四川	17062402	安国市久旺药业有限公司
S15	四川	170815	四川省中药饮片有限责任公司
S16	四川	1706019	四川新荷花中药饮片股份有限公司
S17	四川	1704109	四川新荷花中药饮片股份有限公司

45~60 min, 45%~75% A；60~80 min, 75%~95% A)。体积流量 1 mL/min，柱温 40 ℃，检测波长 330 nm，进样体积 10 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、桔皮素适量，精密称定，于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，制成含芸香柚皮苷 0.817 mg/mL、橙皮苷 1.554 mg/mL、川陈皮素 0.231 mg/mL、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 0.226 mg/mL、桔皮素 0.214 mg/mL 的溶液，即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取陈皮饮片粉末 (过 2 号筛) 1.0 g，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，精密称定，超声提取 30 min，补足减失质量，摇匀，滤过，滤液经 0.22 μm 滤膜滤过，即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一批 (S17) 供试品，按“2.2.2”项下方法制备，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测得 25 个共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.67%，相对峰面积 RSD 均小于 2.28%，表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一批 (S17) 供试品，按“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，测得 25 个共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1.04%，相对峰面积 RSD 均小于

2.61%，表明重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一批 (S17) 供试品，按“2.1.3”项下方法制备，按“2.1”项下色谱条件于 0、4、8、12、20、24 h 测定，测得 25 个共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.85%，相对峰面积 RSD 均小于 2.97%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 陈皮饮片指纹图谱的建立及共有峰的鉴定

按“2.2.2”项下方法制备 17 批供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，得到 17 批陈皮饮片样品 HPLC 指纹图谱，见图 1。将其全部导入《中药色谱特征图谱相似度评价系统软件》(2012 版)，设定 S1 为参照图谱，采用中位数法生成共有模式图，共确定 25 个共有色谱峰，见图 2。通过与对照品图谱对照，指认其中 5 个色谱峰，即峰 13 为芸香柚皮苷、峰 14 为橙皮苷、峰 23 为川陈皮素、峰 24 为 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、峰 25 为桔皮素。

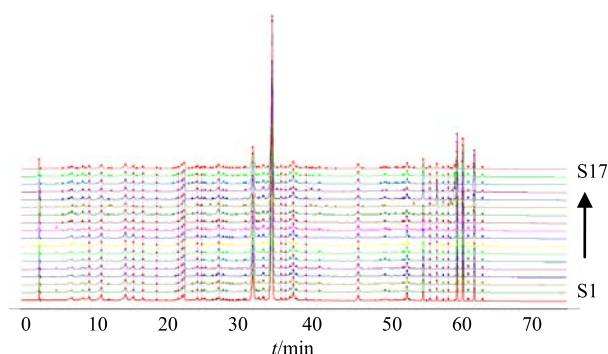


图 1 陈皮饮片的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of decoction pieces of tangerine peel

2.5 共有峰的相对峰面积和相对保留时间

以峰 14 (S) 为对照峰，计算其他 24 个共有峰的相对峰面积和相对保留时间，结果见表 2、3。

2.6 指纹图谱相似度评价

以 17 批样品指纹图谱共有模式为对照，计算各批次样品相似度，结果见表 4。S12 的相似度为 0.981，S13 的相似度为 0.951，S15 的相似度为 0.954，其余批号相似度均大于 0.992。

2.7 聚类分析

以 25 个共有峰峰面积为变量，导入 SPSS 22.0 软件，选择平方欧式距离为测度进行聚类分析，结果见图 3。当分类距离为 6 时，可分为 3 类，S8、S9、S4、S14、S2、S11、S1、S7、S16、S17、S3、S5、S6、S10 聚为一类，S13、S15 聚为一类，

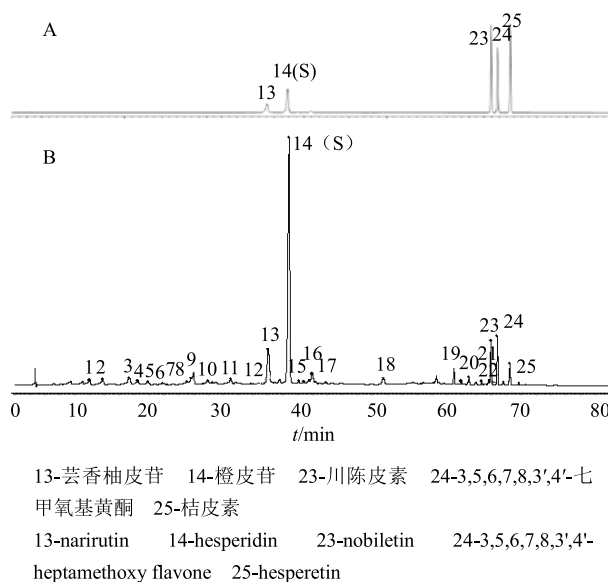


图 2 混合对照品色谱图 (A) 及陈皮饮片 HPLC 指纹图谱共有模式 (B)

Fig. 2 Chromatogram of mixed reference substances (A) and common pattern of HPLC fingerprints of decoction pieces of tangerine peel (B)

S12 为一类。聚类趋势与相似度评价基本一致。

2.8 PCA

主成分分析是在尽可能保持原有数据信息的前提下，通过降维处理达到简化指标的目的。本实验将 17 批样品的 25 个共有峰峰面积导入 SPSS 22.0 软件，计算相关系数矩阵、特征值和方差贡献率，进行 PCA，并将特征值大于 1 的成分提取出来，得到数个主成分，结果见表 5、6。

由表 5 可知，前 6 个主成分特征值大于 1，对方差的累积贡献率为 91.397%，因此陈皮饮片的多个成分可以简化为 6 个主成分进行分析。载荷的绝对值越大，对主成分的贡献越大。由表 6 可知，峰 14、21、24 在主成分 1 上有较高的载荷，峰 9、20、22、23、25 在主成分 2 上有较高的载荷，峰 1、5、7、12 在主成分 3 上有较高的载荷，峰 16、18 在主成分 4 上有较高的载荷，峰 3、4 在主成分 5 上有较高的载荷（载荷绝对值大于 0.8）。参照对照品谱图，可以知道峰 13 为芸香柚皮苷，峰 14 为橙皮苷，峰 23 为川陈皮素，峰 24 为 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮，峰 25 为桔皮素。

2.9 OPLS-DA

OPLS-DA 是在 PLS-DA 基础上发展的算法，相较于 PLS-DA 而言，将 X 变量中的系统变异分解为 2 部分，即同 Y 线性相关的部分和同 Y 正交。

表2 17批样品共有峰相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks of 17 batches of samples

共有峰	相对峰面积																	均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17		
1	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.06	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	37.62
2	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.05	0.05	0.04	0.03	0.09	0.03	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	32.23
3	0.06	0.05	0.05	0.04	0.07	0.05	0.05	0.07	0.07	0.05	0.05	0.11	0.09	0.05	0.08	0.05	0.06	0.06	29.02
4	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.05	0.04	0.03	0.04	0.02	0.03	0.03	25.00
5	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.08	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	70.59
6	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	48.66
7	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	38.18
8	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	16.74
9	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	0.04	0.04	0.06	0.08	0.04	0.08	0.03	0.03	0.04	37.08
10	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.04	0.03	0.02	0.03	0.01	0.01	0.02	39.97
11	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	22.55
12	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.02	0.04	0.02	0.09	0.05	0.04	0.06	0.04	0.04	0.04	48.35
13	0.18	0.18	0.18	0.18	0.20	0.20	0.19	0.18	0.17	0.19	0.22	0.25	0.18	0.19	0.20	0.18	0.20	0.19	10.14
14 (S)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
15	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	37.56
16	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02	0.01	51.76
17	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	7.35
18	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	27.95
19	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	7.48
20	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	48.58
21	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.16	0.01	0.05	0.01	0.01	0.02	146.85
22	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	66.20
23	0.08	0.08	0.08	0.09	0.08	0.10	0.07	0.09	0.09	0.10	0.09	0.09	0.24	0.08	0.31	0.08	0.08	0.11	60.30
24	0.11	0.11	0.13	0.14	0.12	0.14	0.10	0.12	0.13	0.14	0.12	0.13	0.09	0.12	0.11	0.10	0.11	0.12	13.29
25	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.04	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.12	0.05	0.23	0.05	0.05	0.06	70.51

表3 17批样品共有峰相对保留时间

Table 3 Relative retention time of common peaks of 17 batches of samples

共有峰	相对保留时间																	均值	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17		
1	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.25	0.27	1.83
2	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.30	0.32	1.45
3	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.40	0.42	0.97
4	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.43	0.45	0.84
5	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.47	0.48	0.73
6	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.53	0.54	0.58
7	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.62	0.63	0.42
8	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.65	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.63	0.64	0.40
9	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.64	0.65	0.47
10	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.71	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.71	0.70	0.70	0.32
11	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.71	0.72	0.27
12	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.78	0.79	0.78	0.79	0.79	0.78	0.79	0.21
13	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.16
14 (S)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.10
15	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	0.09
16	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.06	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.06	1.05	0.10
17	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.08	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.08	1.08	0.06
18	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	0.10
19	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1.35	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1.35	1.35	0.18
20	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.65	1.63	0.27
21	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.68	1.66	0.27
22	1.70	1.70	1.70	1.71	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.72	1.71	0.28
23	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.76	1.74	0.29
24	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.76	1.78	1.76	0.29
25	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.83	1.81	0.30

表 4 17 批陈皮饮片样品的相似度分析结果

Table 4 Similarity of common peaks of 17 batches of samples

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.992	S10	0.992
S2	0.992	S11	0.992
S3	0.992	S12	0.981
S4	0.992	S13	0.951
S5	0.992	S14	0.993
S6	0.992	S15	0.954
S7	0.992	S16	0.992
S8	0.992	S17	0.992
S9	0.992		

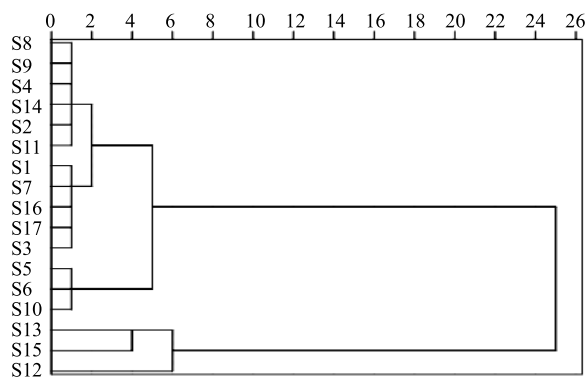


图 3 17 批陈皮饮片聚类分析树状图

Fig. 3 Cluster analysis dendrogram of 17 batches of samples

表 5 特征值与贡献率

Table 5 Eigen values and contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	9.410	37.642	37.642
2	5.926	23.703	61.345
3	3.054	12.216	73.561
4	1.932	7.727	81.287
5	1.485	5.941	87.228
6	1.042	4.169	91.397
7	0.688	2.752	94.149
8	0.567	2.269	96.418
9	0.291	1.165	97.583
10	0.214	0.855	98.438
11	0.136	0.544	98.982
12	0.111	0.443	99.425
13	0.060	0.239	99.664
14	0.052	0.208	99.873
15	0.018	0.073	99.945
16	0.014	0.055	100.000

随着正交变异组分的增加, 将提供更多的解释性和减少结果的误差^[14]。本实验将 17 批样品的 25 个共有峰峰面积导入 SIMCA-P13.0 软件, 进行 OPLS-DA, 获得相应模型。其模型质量参数 R^2_X 为 0.991, R^2_Y 为 0.999, Q^2 为 0.957。从得分矩阵图

表 6 旋转后公共因子载荷矩阵

Table 6 Public factor loading matrix after rotation

峰号	载荷					
	1	2	3	4	5	6
24	0.857	-0.327	-0.156	-0.102	-0.120	0.014
21	-0.834	0.278	-0.392	-0.039	-0.013	0.141
14	0.800	-0.360	-0.235	0.217	0.176	0.170
19	0.780	-0.410	-0.202	0.306	0.104	-0.086
13	0.778	-0.449	0.032	0.144	0.079	0.292
17	0.766	-0.224	-0.086	0.267	0.140	0.462
22	-0.259	0.955	0.017	0.056	-0.036	-0.017
25	-0.115	0.952	-0.007	0.211	-0.081	-0.141
23	-0.300	0.918	-0.138	0.156	-0.092	-0.037
9	-0.413	0.849	-0.082	-0.161	-0.142	0.048
20	-0.453	0.841	-0.191	0.034	-0.004	0.087
5	-0.041	-0.177	0.954	0.043	0.107	0.071
12	-0.320	-0.013	0.874	0.109	-0.027	-0.073
7	0.161	-0.044	0.856	0.030	0.237	0.051
1	0.139	-0.164	0.835	-0.166	0.401	0
6	-0.646	0.109	0.681	-0.112	0.078	0.163
8	0.322	-0.259	-0.658	0.349	0.103	-0.058
2	0.416	-0.227	0.593	-0.057	0.543	-0.061
16	0.011	0.134	-0.054	0.866	0.081	0.095
18	0.333	0.172	0.124	0.856	0.049	0.066
10	-0.239	0.467	0.417	-0.550	0.011	-0.114
3	-0.139	-0.010	0.194	0.141	0.938	-0.148
4	0.142	-0.125	0.160	0.015	0.910	0.094
11	0.323	-0.302	0.414	0.051	0.056	0.773
15	-0.149	0.329	-0.204	0.464	-0.321	0.687

(图 4-A) 可看出, 3 组样品聚类良好, 分离显著。结合变量重要性投影 (VIP) 法, 筛选出具有统计学意义的 14 个差异标志物 ($VIP > 1$, 图 4-B), 其影响程度依次为峰 6 > 峰 14 > 峰 24 > 峰 20 > 峰 23 > 峰 19 > 峰 9 > 峰 17 > 峰 13 > 峰 22 > 峰 1 > 峰 5 > 峰 25 > 峰 21, 其载荷图见图 5-A (图中每 1 个点代表 1 个化合物, 偏离中心越远, 表明其对模型的贡献越大)。运用统计推断分析进一步验证鉴别模型^[16], 图

5-B 为 OPLS-DA 模型置换验证图, 图中 Q^2 为累积交叉有效性, Q^2 值越大表示模型预测能力越好; R^2 为累积方差值, 表示原始数据被用于建立新的 OPLS-DA 判别模型的解释率, R^2 值越大模型解释能力越强。 R^2 和 Q^2 的截距值分别为 0.458 和 -0.759, 所有位于左边的 R^2 和 Q^2 值均低于其最右边的值, 且 Q^2 的回归线截距为负值, 说明建立的 OPLS-DA 模型没有出现过拟合现象, 具有较好的预测能力。

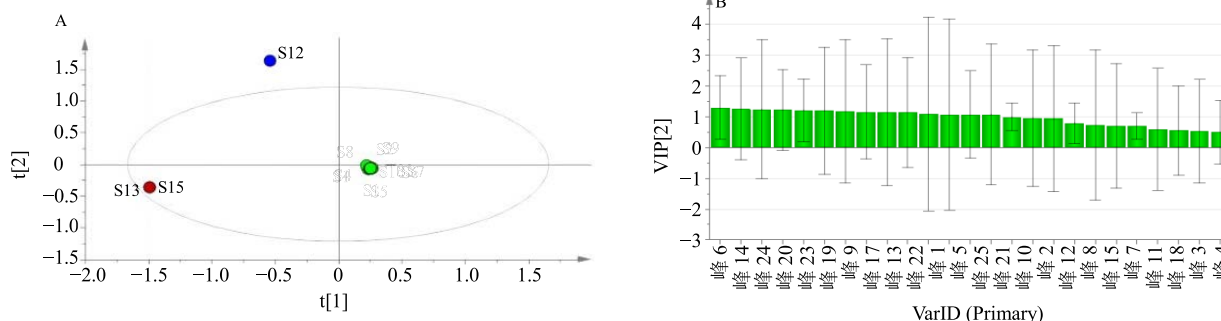


图 4 OPLS-DA 得分散点 (A) 和 VIP (B) 图

Fig. 4 OPLS-DA score scatter (A) and VIP (B) plot

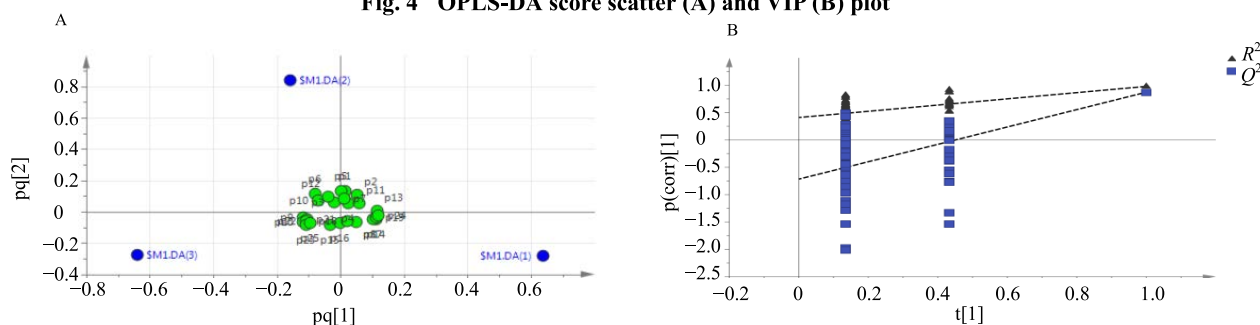


图 5 载荷散点 (A) 和 OPLS-DA 模型置换验证 (B) 图

Fig. 5 Diagram of loading scatter plot (A) and OPLS-DA model replacement verification (B)

3 讨论

多元统计分析方法包括探索性分析和验证性分析, 也称为无监督和有监督的统计方法。无监督的统计方法包括 PCA、CA、非线性映射等; 有监督的统计方法包括偏最小二乘分析 (PLS)、偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)、OPLS-DA 等^[17]。一般先进行无监督的 PCA, 观察样本之间是否有分类趋势, 再采用 PLS-DA 或 OPLS-DA 进行模式识别, 显示样本之间的差异主要由哪些变量引起。OPLS-DA 可以控制与 Y 正交或无关的 X 变量的变化, 更利于模式识别, 因此本实验选择 OPLS-DA 进行模式识别。

通过 VIP 法, 筛选出个差异标志峰, 并鉴定出其中影响较大的化学成分, 剩下的峰则需要通过液相-质谱联用或其他手段进一步确定。而这些

差异标志峰与陈皮饮片的药理药效之间是否呈正相关关系, 也需进一步研究。

陈皮饮片中含有多种化学成分, 测定 1 个或几个指标成分往往具有局限性, 不能充分反映其质量, 因此建立全面系统的特征性指纹图谱是评价和控制质量的有效方法。通过化学计量法 (CA、PCA), 表明陈皮饮片具有明显分类趋势, 结合 OPLS-DA, 可以看出导致收集到的不同陈皮饮片之间有差异而分类的标志性化学成分, 筛选出 14 个差异标志峰, 并鉴定出其中 5 个影响较大的化学成分, 即芸香柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、桔皮素, 可以较为直观地反映陈皮饮片质量及特征图谱。

本实验考察了样品提取方法, 发现纯甲醇超声处理提取峰较完全且峰面积较大, 因此选择超

声提取方式。考察了流动相系统（甲醇-0.1%磷酸水、甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸水等），发现甲醇-0.1%磷酸水系统为更优的指纹图谱条件。通过相似度分析、CA、PCA、OPLS-DA 模式识别等分析方法结果相互印证，对所收集到的批陈皮饮片进行分类并筛选出共有的特征成分和影响其质量关键的色谱峰，为陈皮饮片鉴别和质量控制提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [2] 俞静静, 苏洁, 吕圭源, 等. 陈皮抗心脑血管疾病相关药理研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3127-3132.
- [3] 李柯柯, 任顺成. 陈皮中黄酮类化合物的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(17): 221-224.
- [4] 张科卫, 陈文星, 薛丹丹. 陈皮饮片的质量控制 [J]. 中成药, 2014, 36(7): 1489-1492.
- [5] 封宇飞, 张宏武, 邹忠梅, 等. 陈皮饮片高效液相指纹图谱研究 [J]. 中国药业, 2012, 21(24): 28-31.
- [6] 张素中, 黄月纯, 魏刚. 广陈皮 HPLC 指纹图谱的方法学研究 [J]. 中药材, 2008, 31(2): 217-219.
- [7] 黄月纯, 魏刚. 广陈皮 HPLC 指纹图谱的建立与药材鉴定中的应用研究 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 275-277.
- [8] 郭念欣, 李颖春, 谢伟桥, 等. 广陈皮与陈皮 HPLC 指纹图谱的建立与鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 90-93.
- [9] 黄月纯, 方琴, 蔡庆群, 等. 广东产不同来源陈皮 HPLC 指纹图谱的比较研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(6): 458-461.
- [10] 胡继藤, 唐铁鑫, 刘韬, 等. GC-MS 结合化学计量学方法鉴别不同产地与种源陈皮的研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(7): 1665-1667.
- [11] 杨冉冉, 姬蕾, 李二文, 等. 鸡血藤的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4530-4536.
- [12] 马赟, 王起文, 蔡静, 等. 聚类分析和主成分分析法研究甜味胶蓝黄酮类成分 HPLC 指纹图谱 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 63-67.
- [13] 王元清, 韩彬, 向荣, 等. 总量统计矩结合聚类分析与主成分分析评价虎杖饮片一致性与差异性 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2863-2869.
- [14] 曹亚楠, 白雪, 赵钢, 等. UPLC 指纹图谱结合化学计量学的多产地藜麦质量控制 [J]. 食品科学, 2017, 38(20): 286-291.
- [15] 魏德祥, 黄彩华, 雷雯. 中外体育用品上市公司盈利能力的特征分析与预测模型构建-基于 PLS 回归和 OPLS-DA 方法的分析 [J]. 体育科学, 2012, 32(10): 12-19.