

不同产地枳壳药材中 12 种有效成分的主成分分析和判别分析

陈 欢, 高 萌, 罗小泉, 陈海芳, 袁金斌*, 杨武亮*

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘 要: 目的 采用主成分分析和判别分析对不同产地枳壳药材中 12 种有效化学成分的 HPLC 的含量测定结果进行分析比较, 以鉴别区分其产地来源。方法 以异柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橘皮内酯、柚皮素、橙皮素、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素及葡萄糖苷为指标, 用 HPLC 法进行含量测定, 并对其含量进行主成分分析和判别分析。结果 主成分分析结果表示各产地的枳壳药材具有一定的相似性, 且江西产地的枳壳药材含量较为稳定; 判别分析结果表明, 江西樟树、宜春, 湖南沅江、怀化和浙江金华、兰溪产地的枳壳样品可以区分开来, 而江西新干和浙江金华、兰溪产地的枳壳样品有重叠。结论 本方法简单、方便、可靠, 可用于初步筛选出适合枳壳生长的地区, 以期为进一步阐述枳壳药材的道地性奠定基础。

关键词: 枳壳; HPLC; 主成分分析; 道地性; 判别分析; 异柚皮苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 水合橘皮内酯; 柚皮素; 橙皮素; 橘皮内酯; 马尔敏; 川陈皮素; 橘皮素; 葡萄糖苷

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)14-3433-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.025

Principal component analysis and discriminant analysis of 12 effective chemical constituents in *Aurantii Fructus* from different areas

CHEN Huan, GAO Meng, LUO Xiao-quan, CHEN Hai-fang, YUAN Jin-bin, YANG Wu-liang

Key Laboratory of Modern Preparation of TCM of Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To analyze and compare the contents of 12 effective chemical constituents in *Aurantii Fructus* from different areas, and identify their source of origin by using principal component analysis and discriminant analysis. **Methods** Using isonaringin, narigin, hesperidin, neohesperidin, meranzin hydrate, naringin, hesperidin, meranzin, marmin, nobiletin, tangeretin, and auraptene as index, HPLC method was used to determine the content, and the average percentage content was analyzed by principal component analysis and discriminant analysis. **Results** Principal component analysis results showed that *Aurantii Fructus* from different areas had certain similarities, and the content of *Aurantii Fructus* from Jiangxi Province was relatively stable. Discriminant analysis results showed that the samples from Zhangshu, Yichun, Yuanjiang, Huaihua, Jinhua, and Lanxi could be distinguished, while the samples from Xin'gan in Jiangxi, Jinhua, and Lanxi in Zhejiang overlapped. **Conclusion** This method is simple, convenient and reliable, which can be used to screen out the suitable areas for the growth of *Aurantii Fructus*, so as to lay a foundation for explaining the authenticity of *Aurantii Fructus*.

Key words: *Aurantii Fructus*; HPLC; principal component analysis; geoherbalism; discriminant analysis; isonaringin; narigin; hesperidin; neohesperidin; meranzin hydrate; naringin; hesperidin; meranzin; marmin; nobiletin; tangeretin; auraptene

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, 主产于江西、湖南、重庆、浙江等地区, 以江西枳壳的质量为最佳, 是江西省四大“道地药材”之一, 主要含有黄酮类、生物碱类、挥发油类以及香豆素类等有效成分, 具有理气宽中、行滞消胀的功效^[1-2]。目前文献对于枳壳

“道地性”的研究只是简单地做过一些资源调查^[3-6]、遗传学^[7-8]和分子生物学方面^[9-10]的研究, 没有更进一步的揭示枳壳道地性的内涵。要揭示其道地性内涵, 首先就要对药材的产地进行区分。而化学成分是中药产生生物效应的物质基础, 活性成分含量及成分群之间的配比又与药材产地密切相关, 故可从

收稿日期: 2019-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81760680); 国家自然科学基金项目 (81860698); 江西省自然科学基金资助项目 (20171BAB205098)

作者简介: 陈 欢 (1992—), 女, 药物分析硕士研究生。Tel: 13767097420 E-mail: 997393666@qq.com

*通信作者 袁金斌 (1971—), 理学博士, 教授, 研究方向为中药物质基础与质量控制。E-mail: kings2008@163.com

杨武亮, 男, 教授, 主要从事中药质量评价与新药研究。Tel: (0791)7118659 E-mail: yangwuliang@163.com

化学成分入手,对枳壳药材产地来源进行区分。根据前期实验研究结果^[11-15]和文献数据,选取了 12 个有效成分,分别为异柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橘皮内酯、柚皮素、橙皮素、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素及葡萄内酯为含量测定指标。上述成分基本涵盖了枳壳的化学成分类型,它们的含量变化基本能反映枳壳化学成分的整体变化。为了区分枳壳药材的产地来源,笔者对不同产地的枳壳药材进行了分析,采用 HPLC 法同时测定枳壳中异柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橘皮内酯、柚皮素、橙皮素、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素及葡萄内酯 12 种有效化学成分的含量,运用 PAS T3.19 软件和 SPSS 20.0 软件对其结果进行主成分分析和判别分析,为进一步探讨药材的道地性提供理论基础和参考。

1 材料

1.1 仪器

1260 高效液相色谱仪(包括四元泵、在线脱气机、自动进样器、DAD 检测器和色谱工作站,美国 Agilent 公司);十万分之一电子天平(Sartorius AG)。

1.2 药材与试剂

对照品柚皮苷(批号 110722-201815)、橙皮苷(批号 110721-201818)和新橙皮苷(批号 111857-201703)购于中国食品药品检定研究院;异柚皮苷、水合橘皮内酯、柚皮素、橙皮素、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素和葡萄内酯(实验室自制,质量分数不低于 98%);甲醇(色谱纯);水为双蒸水;其他试剂均为分析纯。枳壳样品经江西中医药大学药用植物教研室赖学文教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实,样品来源见表 1。

2 方法

2.1 枳壳供试品溶液的制备

称取枳壳粉末 1.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶

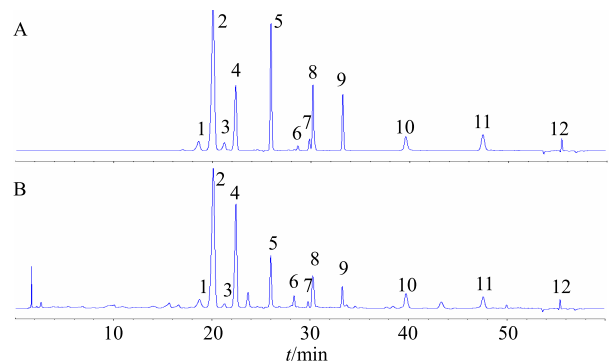
中,精密加入甲醇 25 mL,水浴回流 1 h。趁热滤过,滤液至 25 mL 量瓶中,定容至刻度,过 0.45 μm 微孔有机滤膜,取续滤液,备用。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别取减压干燥至恒定质量的异柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橘皮内酯、柚皮素、橙皮素、橘皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘皮素和葡萄内酯对照品适量,分别置量瓶中配制成母液,再分别精密吸取适量上述母液,置同一 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得含异柚皮苷 91.26 μg/mL、柚皮苷 1 445.80 μg/mL、橙皮苷 65.15 μg/mL、新橙皮苷 404.40 μg/mL、水合橘皮内酯 26.68 μg/mL、柚皮素 8.06 μg/mL、橙皮素 20.20 μg/mL、橘皮内酯 30.66 μg/mL、马尔敏 24.29 μg/mL、川陈皮素 12.07 μg/mL、橘皮素 10.46 μg/mL 及葡萄内酯 4.56 μg/mL 的混合对照品溶液,摇匀,备用。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Hypersil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-水(B)(冰乙酸调至 pH 3)梯度洗脱,0 min, 25%A; 0~24 min, 25%~40%A; 24~35 min, 40%~62%A; 35~44 min, 62%A; 44~50 min, 62%~85%A; 50~60 min, 85%~100%A; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 330 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL^[16]。在上述色谱条件下,色谱图见图 1。



1-异柚皮苷 2-柚皮苷 3-橙皮苷 4-新橙皮苷 5-水合橘皮内酯 6-柚皮素 7-橙皮素 8-橘皮内酯 9-马尔敏 10-橘皮素 11-川陈皮素 12-葡萄内酯
1-isonaringin 2-naringin 3-hesperidin 4-neohesperidin 5-naringin 6-hesperidin 7-meranzin hydrate 8-meranzin 9-marmin 10-nobiletin 11-tangeretin 12-auraptene

图 1 混合对照品 (A) 和枳壳样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 Quantitative determination of 12 active ingredients in *Aurantii Fructus* by HPLC

表 1 样品来源

Table 1 Origin of sample

组别	序号	来源
1	ZS (1~69)	江西樟树
2	XG (70~174)	江西新干
3	YC (175~190)	江西宜春
4	CQ (191~212)	重庆纂江、江津
5	HN (213~256)	湖南沅江、怀化
6	ZJ (257~267)	浙江兰溪、金华

3 结果与分析

3.1 枳壳药材有效化学成分的 HPLC 含量测定

采用 HPLC 法测定枳壳药材中的有效成分,并计算其含量。《中国药典》2015 年版以柚皮苷和新橙皮苷为指标成分,规定柚皮苷($C_{27}H_{32}O_{14}$)含量不得少于 4.0%,新橙皮苷($C_{28}H_{34}O_{15}$)不得少于 3.0%。由测定结果可知,各个产地的枳壳药材由于批号不同,其含量也有所不同。故计算出各个产地的平均含量,如表 2 所示。从表 2 中可

以看出,浙江金华、兰溪产地的枳壳样品的柚皮苷含量与药典规定的相差较大,而江西樟树、新干、宜春,重庆江津、纂江,湖南沅江、怀化产地的枳壳药材的柚皮苷和新橙皮苷平均含量基本符合药典规定。由此可见,江西樟树、新干和湖南沅江、怀化产地的枳壳药材的有效成分含量变化不大;而重庆纂江、江津和浙江兰溪、金华产地的枳壳药材的有效成分含量变化很大,且大部分样品未达到药典要求。

表 2 不同产地的枳壳药材 12 个有效化学成分含量

Table 2 Contents of 12 effective chemical constituents of *Aurantii Fructus* from different habitats by HPLC

产地	质量分数/%					
	异柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	水合橘皮内酯	柚皮素
江西樟树	0.36	5.30	0.28	4.60	0.09	0.06
江西新干	0.36	4.09	0.29	3.46	0.09	0.08
江西宜春	0.30	3.79	0.30	4.11	0.10	0.05
重庆纂江、江津	0.41	6.47	0.30	2.37	0.06	0.05
湖南沅江、怀化	1.93	5.07	1.85	3.49	0.10	0.09
浙江兰溪、金华	0.32	2.97	0.11	3.73	0.08	0.04

产地	质量分数/%					
	橙皮素	橘皮内酯	马尔敏	川陈皮素	橘皮素	葡萄内酯
江西樟树	0.09	0.05	0.05	0.05	0.04	0.02
江西新干	0.09	0.07	0.04	0.04	0.05	0.01
江西宜春	0.09	0.06	0.03	0.03	0.01	0.01
重庆纂江、江津	0.06	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02
湖南沅江、怀化	0.08	0.06	0.04	0.04	0.07	0.04
浙江兰溪、金华	0.08	0.04	0.03	0.03	0.04	0.01

3.2 不同产地枳壳药材有效成分主成分分析

主成分分析是一种有效的数据降维分析法,通过降维可以排除众多化学信息中相互重叠的信息,其计算原则是将原始变量进行线性组合产生一组新的变量,即一组主成分(PC)^[17]。对表 1 中所有样品测定

结果运用 Past 3.19 进行主成分分析,得到各成分方差贡献率图,如图 2 所示,可以看出第 1、2 个主成分的方差贡献率分别为 71.45%、14.81%,累积方差贡献率为 86.26%,说明这 2 个主成分能够基本还原 HPLC 色谱信息,所以确定前 2 个主成分作为分析对象。

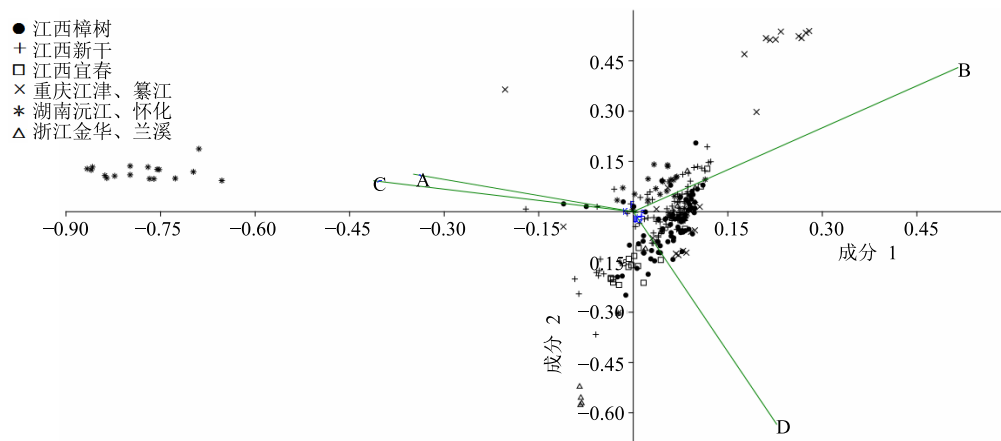


图 2 各成分方差贡献率

Fig. 2 Variance contribution rate of each component

主成分个数确定之后,就要分析各个产地在当中的分布情况,来区分枳壳药材的产地来源。根据主成分得分情况,以主成分 1 作为横坐标,主成分 2 作为纵坐标,绘制主成分得分图,如图 3 所示,可以很清楚地看到江西、湖南、重庆和浙江产地的枳壳药材在图中均有交叉,但江西樟树、新干和宜春产地的枳壳药材在得分图中的分布较为集中,而且重庆江津、纂江,湖南沅江、

怀化,浙江金华、兰溪产地的枳壳药材在得分图中的分布较为扩散。

由于各产地的枳壳在主成分分析图上区分度并不是很明显,可在此基础上,将其进行判别分析,结果如图 4 所示,根据各产地的组质心分布情况可知,江西樟树、宜春,湖南沅江、怀化和浙江金华、兰溪产地的枳壳样品基本可以区分开来,但江西新干和浙江金华、兰溪产地的枳壳样品有小部分重叠。

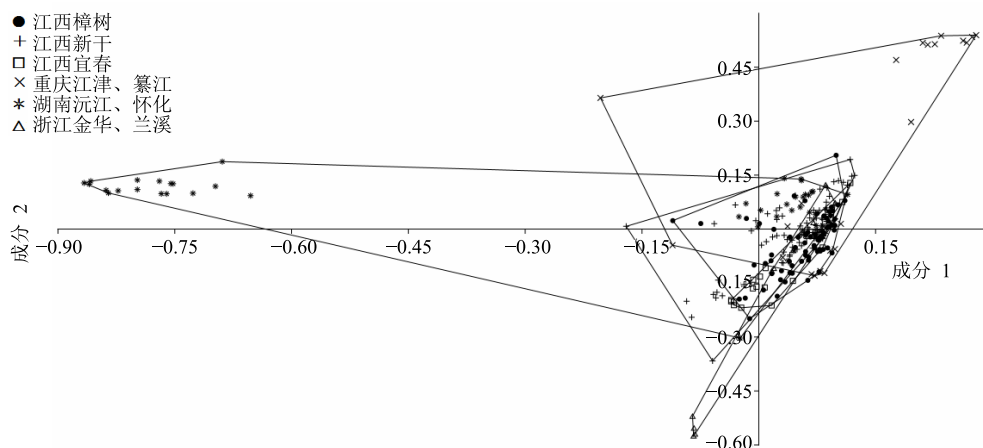


图 3 各有效成分主成分分析得分图

Fig. 3 PCA scores of effective chemical components

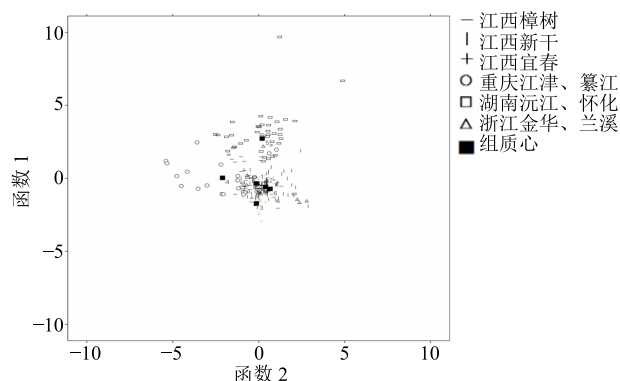


图 4 各产地判别图

Fig. 4 Distinguishing maps of different origins

4 讨论

化学成分是中药产生生物效应的物质基础,活性成分含量及成分群之间的配比又与药材原植物种类、药材产地的气候、生态环境、采收时间、药材的炮制加工等密切相关。笔者对枳壳主产地江西、湖南、浙江和重庆产的枳壳药材中上述 12 种有效成分进行了 HPLC 含量测定。其含量测定结果可知江西樟树、新干、宜春,重庆江津、纂江和湖南沅江、怀化产地的枳壳药材的有效成分含量变化

不大;而浙江兰溪、金华产地的枳壳药材的有效成分含量变化很大。由原始数据可知,重庆江津、纂江,湖南沅江、怀化和浙江兰溪、金华产地的柚皮苷和新橙皮苷含量最大值和最小值相差很大,而江西产地的枳壳药材各成分含量相对稳定。

在本实验中,选取了 12 种有效化学成分进行分析,相对来说比较复杂,需要找到一种方法将其进行降维,而主成分分析的目的之一是用少量的主成分来描述多种指标之间的联系。判别分析则是在分类确定的条件下,根据某一研究对象的各种特征值判别其类型归属问题的一种多变量统计分析方法^[18]。故可运用主成分分析法将其进行降维,再结合判别分析进一步进行分类。运用 PAST 和 SPSS 软件对其结果进行主成分分析和判别分析,由主成分分析结果可知,江西、重庆、湖南和浙江产地的枳壳药材均有所交叉,但江西 3 个产地的较为集中,而重庆、湖南和浙江产地的相对较为分散;由判别分析结果可知,江西新干和湖南产地的枳壳药材有所重叠。这说明各产地的枳壳药材存在一定的相似性。而含测结果表示,江西产地的枳壳药材各成分含量相对稳定。相对于重庆、湖南和浙江而言,江

西的环境可能更适合枳壳药材的生长。

现如今,市面上很多商家以次充好、以假乱真的现象层出不穷,有些药材根本无法用肉眼去判断其好坏,故需要借助其他的手段去判定。药材的质量是影响其临床疗效最直接和最重要的原因之一。不同产地的药材受不同的地理环境、生物学因素和人为因素的影响,其化学成分的种类和含量也存在着差异^[19],故药材的质量控制就显的极为重要。药材的质量控制是保证中药安全、有效、稳定、可靠,实现中药现代化、产业化及国际化的核心问题,也是中药生产过程中目前存在问题最多的环节^[20]。中药的化学成分相对复杂,其药效并非是哪一种单一有效成分的作用,也不是几种有效成分的简单相加,中药发挥疗效往往是需要其多种成分之间进行合适的配伍配比。对于中药的质量标准的建立,仅仅采用其中一种或某几种有效成分作为指标往往缺乏全面性,同时也达不到中医药理论的要求。笔者对不同产地的枳壳多个指标成分进行了研究,对于推动中医药发展和阐述药材道地性提供合理的科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘贤旺,黄璐琦,刘 华,等. 江枳壳种质资源的系统 [A] // 全国第八届天然药物资源学术研讨会论文集 [C]. 南京:中国自然资源学会天然药物资源专业委员会,2008.
- [3] 刘德旺,谷彩梅,杨庆珍,等. 内蒙古地区道地药材蒙古黄芪资源调查及产地适宜性 [J]. 应用生态学报, 2016, 27(3): 838-844.
- [4] 夏至,张红瑞,高致明. 河南道地药材资源的区域分布及中药区划探讨 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(6): 2921-2923.
- [5] 孙宇章,郭兰萍,朱文泉,等. 道地药材茅苍术的资源遥感监测 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 353-356.
- [6] 任德权,索风梅,陈士林. 道地药材的产地适宜性研究 [J]. 中药现代中药, 2005, 7(9): 4-6.
- [7] 王晓玥,宋经元,谢彩香,等. RNA-Seq 与道地药材研究 [J]. 药学报, 2014, 49(12): 1650-1657.
- [8] 冯学锋,胡世林,郭宝林,等. 黄芩种群遗传多样性初步研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2002, 2(4): 38-43.
- [9] 黄璐琦,郭兰萍,胡 娟,等. 道地药材形成的分子机制及其遗传基础 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(20): 2303-2303.
- [10] 黄璐琦,陈美兰,肖培根. 中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 494-496.
- [11] 胡源祥,陈海芳,宋玉鹏,等. HPLC 法测定酸橙枳壳和枸橘枳壳中黄酮苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(12): 2162-2166.
- [27] 张金莲,罗雪晴,颜冬梅,等. HPLC 法同时测定枳壳中伞形花内酯等 9 种成分的量 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3406-3410.
- [12] 胡源祥,谭舒舒,陈海芳,等. HPLC 法同时测定绿衣枳壳中水合橘皮内酯、橘皮内酯、马兜铃和葡萄内酯的含量 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(10): 1200-1203.
- [13] 李正红,陈海芳,骆利平,等. 江枳壳不同采收期活性成分 HPLC 含量测定 [J]. 中药材, 2013, 36(1): 28-31.
- [14] 王发英,徐 欢,杨武亮,等. 枳壳质量标准研究 [J]. 中成药, 2009, 31(12): 1897-1901.
- [15] 罗小泉,李姗姗,陈海芳,等. 江西道地药材枳壳 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(24): 2949-2953.
- [16] 张 黎,刘 刚,李 伦,等. FTIR 结合主成分分析对棕榈科植物鉴别研究 [J]. 光散射学报, 2013, 25(1): 98-102.
- [17] 王静娜. 浅析判别分析法的应用 [J]. 经济管理: 文摘版, 2016, 13(4): 294-294.
- [18] 唐仕欢,杨洪军,黄璐琦. 论自然环境因子变化对中药药性形成的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 126-128.
- [19] 闫 丹,江敏瑜,王云红,等. 一测多评法在玄参药材质量控制中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4892-4898.