

佛手指纹图谱的建立及抗氧化谱效关系研究

何江^{1,2}, 尚芳红^{1,3*}, 李隆云^{1,4*}, 宋旭红^{1,4}, 阳勇¹, 张小梅¹, 魏江平¹, 吴振^{1,3}, 崔广林^{1,4}

1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

2. 重庆医科大学 中医药学院, 重庆 400016

3. 中药健康学重庆市重点实验室, 重庆 400016

4. 中国中医科学院中药资源中心 重庆分中心, 重庆 400065

摘要: 目的 采用 HPLC 指纹图谱与抗氧化活性相关联, 建立谱-效关系, 旨在分析筛选佛手 *Citrus medica* var. *sarcodactylis* 抗氧化活性的有效成分。方法 采集 24 批次佛手药材的指纹图谱, 在对照图谱相似度评价均大于 0.880 的基础上, 结合聚类热图及主成分分析法 (PCA) 对指纹图谱数据进行研究; 采用 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除法评价佛手 24 批次样品的抗氧化活性; 通过灰色关联度法对 24 批次佛手共有峰与其抗氧化能力指标进行关联性分析, 综合评价筛选有效成分。结果 从 24 批次佛手样品指纹图谱中确定了 17 个共有峰, 通过对照品比对法指认了其中 10 个化合物。聚类热图分析与抗氧化结果显示, 24 批次佛手大致被分为 3 类; 且均有较好的抗氧化活性, 并呈浓度依赖性, 其中 S16 的抗氧化活性最强。综合灰色关联度分析和综合评分结果, F16 (香叶木素)、F11、F12 (5,7-二甲氧基香豆素) 和 F8 (橙皮苷) 化合物可能是反映佛手药效的重要特征峰, 与主成分中展现的重要峰信息基本一致。结论 通过佛手 24 批次 HPLC 指纹图谱与抗氧化活性之间的相关性分析, 可为挖掘佛手的有效成分以及药材质量控制提供参考。

关键词: 佛手; 指纹图谱; 抗氧化; 谱效关系; 有效成分; 香叶木素; 5,7-二甲氧基香豆素; 橙皮苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)23-7841-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.027

Establishment of fingerprints and spectrum-effect relationship of antioxidant activity of *Citri Sarcodactylis Fructus*

HE Jiang^{1,2}, SHANG Fang-hong^{1,3}, LI Long-yun^{1,4}, SONG Xu-hong^{1,4}, YANG Yong¹, ZHANG Xiao-mei¹, WEI Jiang-ping¹, WU Zhen^{1,3}, CUI Guang-lin^{1,4}

1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

2. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

3. Chongqing Key Laboratory of Chinese Medicine & Health Science, Chongqing 400016, China

4. Chongqing Sub-Center of National Resources Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Chongqing 400065, China

Abstract: Objective The HPLC fingerprints were correlated with the antioxidant activity to establish a spectrum-effect relationship, aiming to analyze and screen the active ingredients with the antioxidant activities of Foshou (*Citri Sarcodactylis Fructus*) (*Citrus medica* var. *sarcodactylis*). **Methods** The fingerprint profiles of 24 batches of *Citri Sarcodactylis Fructus* were collected, and the fingerprint data were studied by combining the clustering heat map and principal component analysis (PCA) method on the basis of the similarity evaluation of the control profiles, which were all greater than 0.880. The antioxidant activities of 24 batches of *Citri Sarcodactylis Fructus* samples were evaluated by the DPPH and ABTS radical scavenging methods; The correlation analysis of the 24 batches of *Citri Sarcodactylis Fructus* common peaks with their antioxidant capacity indexes was carried out by the gray correlation method to

收稿日期: 2023-08-15

基金项目: 重庆市基本科研业务费项目 (cstc2021jxjl-jbky10004); 农业部国家中药材产业技术体系 (CARS-21); 重庆市技术创新与应用发展重点专项项目 (cstc2021jscx-dxwtBX0011, CSTB2022TIAD-KPX0094)

作者简介: 何江, 女, 本科, 研究方向为中药质量评价研究。E-mail: 410254397@qq.com

*通信作者: 尚芳红, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为中药药效物质基础与质量评价研究。E-mail: shangfh2006@163.com

李隆云, 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药材良种选育与规范化生产技术。E-mail: lilongyun8688@163.com

comprehensively evaluate the screened active ingredients. **Results** Seventeen common peaks were identified from the fingerprint profiles of 24 batches of *Citri Sarcodactylis Fructus* samples, and 10 of which were identified by the control comparison method. The clustering heat map analysis and antioxidant test results showed that the 24 batches of *Citri Sarcodactylis Fructus* were roughly classified into three categories, and all of them had good antioxidant activity and showed concentration dependence, among which S16 had the strongest antioxidant activity. Combining the results of gray correlation analysis and comprehensive scoring, the compounds F16 (diosmetin), F11, F12 (5,7-dimethoxycoumarin), and F8 (aurantiamarin) maybe important characteristic peaks reflecting the efficacy of *Citri Sarcodactylis Fructus*, which were basically consistent with the information of important peaks exhibited in the main components. **Conclusion** By analyzing the correlation between the antioxidant activity of 24 batches of *Citri Sarcodactylis Fructus* and the HPLC fingerprint profiles, this study can serve as a guide for identifying active ingredients and quality control of *Citri Sarcodactylis Fructus*.

Key words: *Citri Sarcodactylis Fructus*; fingerprinting; antioxidant; spectrum-effect relationship; active ingredient; diosmetin; 5, 7-dimethoxycoumarin; aurantiamarin

佛手 *Citri Sarcodactylis Fructus* 为芸香科柑橘属植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实^[1-3], 其性味辛、苦、酸、温, 归肝、脾、胃、肺经。佛手临床上常用于治疗肝胃气滞、胃脘痞满、胸胁胀痛、咳嗽痰多、食少呕吐等症, 具有和胃止痛、理气疏肝、祛湿化痰的功效^[3], 是一种药食同源中药^[4]。佛手主要分布于热带、亚热带区域, 我国浙江、广东、广西、四川、重庆、云南等地均有种植^[5]。由于佛手地域分布较广, 且受采收季节、加工炮制方法、贮藏等诸多因素影响, 佛手质量参差不齐。《中国药典》2020 年版收载了佛手药材, 但仅对其有效成分橙皮苷 ($C_{28}H_{34}O_{15}$) 进行了限定^[3]。中药具有多成分、多靶点、多途径的协同调控作用, 且活性单体多样, 作用机理复杂。目前, 单一的指标很难全面、科学和客观地反映中药成分的整体性、复杂性和有效性。随着对佛手药理和药效物质基础的深入研究, 目前迫切需要建立适合于佛手药材的质量评价体系。佛手主要含有黄酮类、香豆素类、多糖、挥发油类、无机元素等多种化学成分^[6-7], 现代药理研究揭示佛手除了传统功效外, 还具有抑菌^[8-9]、抗氧化^[10]、抗肿瘤^[11]等多种活性。研究表明, 佛手中的黄酮和香豆素类化合物都具有抗氧化^[12-13]药理活性, 二者也被不同研究者选为佛手质量的主要评价指标。魏莹等^[14]采用 HPLC 同时测定佛手中柚皮苷、橙皮苷、6,7-二甲氧基香豆素、5,7-二甲氧基香豆素以及佛手柑内酯等 5 种成分的含量, 用于评价不同产地的佛手药材质量。崔广林等^[15]建立 HPLC 法同时测定川佛手中木犀草素、6,7-二甲氧基香豆素、茛菪亭、5,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、橙皮苷、槲皮素、阿魏酸等 8 种成分的含量, 并结合主成分分析和聚类分析, 探讨不同产地川佛手药材的质量差异。钟艳梅等^[16]采用超高效液相色谱

仪联用四级杆飞行时间质谱仪 (UPLC/Q-TOF-MS) 分析鉴定 10 个不同产地的佛手药材, 初步推测共 6,7-二甲氧基香豆素、5,7-双乙酰基-8-甲基香豆素、5-甲氧基-8-羟基补骨脂素、7-羟基-6-甲氧基香豆素等香豆素类成分和橙皮苷、三羟基-二甲氧基黄酮等黄酮苷类成分可能是区分 10 批药材的关键性成分。郑振兴等^[17]建立了不同产地佛手药材的 HPLC 指纹图谱, 通过正交偏最小二乘法-判别分析筛选得到影响佛手质量的差异性成分主要有 5,7-二甲氧基香豆素、6,7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯和香叶木苷。综上所述, 上述评价指标的选取, 均缺乏与临床疗效相关联, 难以更科学合理地反应佛手的内在品质。

中药指纹图谱可以较好地反映中药材的化学成分和特性, 并能评价其质量的稳定性和一致性。但是, 指纹图谱所反映的成分并不都是有效成分, 且未实现与药效相关联, 以此用于评价中药质量的优劣存在局限性和不准确性^[18,28]。中药谱效学是将化学指纹图谱信息与药效学结果进行合理的模式识别, 明确有效成分的组成和活性贡献程度, 从而对中药进行质量评价^[19-20]。查阅文献发现, 目前采用指纹图谱定性分析佛手的化学成分已有报道^[17,21], 但是目前国内外对其研究大多集中于佛手的指纹图谱建立以及含量测定, 而对佛手的谱效关系研究尚未见报道。基于此, 本课题拟建立佛手的 HPLC 指纹图谱, 并采用相似度评价、聚类热图分析、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 完善佛手的质量评价体系; 通过 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除法, 对佛手 24 批次样品的抗氧化性进行评价, 采用灰色关联度法 (grey relational analysis, GRA) 将佛手的指纹图谱与其抗氧化活性进行相关性分析, 以期挖掘出佛手抗氧化性活性的有效成分,

为其未来的资源开发与利用提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪 (DAD 检测器, 日本岛津); ReadMax1200 光吸收全波长酶标仪 (上海闪谱生物科技有限公司); VGT-2013QT 超声波清洗机 (广东固特超声股份有限公司); Milli-QIntegral5 型纯水仪 (美国 Millipore 公司); QL-901 型涡旋仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); H3-18K 型高速离心机 (湖南可成仪器设备有限公司); BSA224S 型万分之一电子天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司); CPA225-D 型十万分之一电子天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

1.2 药物与试剂

无水乙醇 (分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 冰醋酸 (色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 甲醇 (色谱纯, 德国 (Merck 公司); 过硫酸钾 (分析醇, 上海麦克林生化科技有限公司); 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS, 上海麦克林生化科技有限公司); 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基 (DPPH, 上海源叶生物科技有限公司); 维生素 C 片 (VC, 批号 20221232, 华中药业股份有限公司); 橙皮苷 (批号 MUST-22112914)、佛手柑内酯 (批号 MUST-22101710)、6,7-二甲氧基香豆素 (批号 MUST-22062008)、5,7-二甲氧基香豆素 (批号 MUST-23020301)、7-羟基-6-甲氧基香豆素 (批号 MUST-23012702)、7-羟基香豆素 (批号 MUST-22100504)、木犀草素 (批号 MUST-22072315)、槲皮素 (批号 MUST-22042012)、香叶木素 (批号 MUST-22062017)、柚皮苷 (批号 MUST-22062911) 均购自成都曼斯特生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$ 。所有药材均经重庆市中药研究院中药生药研究所的瞿显友研究员鉴定为芸香科植物佛手 *C. medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实, 其样品来源信息如表 1 所示。

2 方法

2.1 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 分别称取适量的 7-羟基-6-甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、6,7-二甲氧基香豆素、柚皮苷、橙皮苷、5,7-二甲氧基香豆素、槲皮素、木犀草素、佛手柑内酯和香叶木素等对照品, 加甲醇溶解并稀释至 10 mL, 制备得到质量浓度为 1.0 mg/mL 的混合对照品溶液, 摇匀, 滤过, 取续滤液,

表 1 样品信息

Table 1 Sample information of 24 batches of finger citron

编号	产地	批号	采购地点
S1	四川乐山	200507	重庆北碚御和药房
S2	四川雅安	220601	重庆众妙药业有限公司
S3	四川乐山	220801	重庆康迪药业有限公司
S4	广东	220601	湖北黄冈金贵中药产业发展有限公司
S5	四川乐山	211103	重庆康迪药业有限公司
S6	四川乐山	211101	重庆亚锋药业有限公司
S7	四川名山	200301	四川启隆中药饮片有限公司
S8	广东肇庆	220501	四川光然中药材饮片有限公司
S9	重庆忠县	202203	重庆市帆瑞农业有限公司
S10	浙江金华	202302	浙江金华市金东区赤松镇山口村
S11	重庆垫江	230222	重庆垫江区桂溪街道石岭村
S12	浙江金华	230213	浙江金华市金东区婺城区
S13	重庆开州	230222	重庆开州佛手基地
S14	广东肇庆	202309	河北安国聚草香中药材
S15	广西博白	202309	河北安国聚草香中药材
S16	云南大理	202201	云南罗宝塔中药行
S17	云南洱源	202202	云南旺角中药行
S18	云南大理	202204	云南杜欣药材行
S19	云南瑞丽	202205	云南宇林中药行
S20	广东肇庆	202206	云南丰茂药行
S21	云南临沧	202207	云南金宇中药材行
S22	广西	202208	云南勇鑫中药行
S23	山东鄄城	202209	山东省菏泽市鄄城县彭楼镇舜王城中药材市场
S24	重庆潼南	202210	重庆市潼南区地旺农业有限公司

放置在 4 °C 冰箱中, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 取 1 g 佛手药材粉末 (过 5 号筛), 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶, 精密加入 50 mL 无水乙醇, 称定质量, 静置 40 min, 超声 1 h, 放冷, 再称定质量, 将减少的质量补齐, 离心 (8640 r/min) 10 min, 然后滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 色谱条件 Amethyst C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇 (A) -0.2% 冰醋酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 20%~25% A; 10~20 min, 25%~35% A; 20~30 min, 35%~40% A; 30~50 min, 40%~42% A; 50~60 min, 42%~60% A; 60~75 min, 60%~70%; 75~85 min, 70%~85% A; 85~90 min, 85%~20% A。体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L; 柱温 30 °C;

检测波长为 345 nm。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度考察 取样品 S9 适量, 精密称定, 按“2.1.2”项下制备佛手供试品溶液, 注入高效液相色谱仪, 平行进样 6 次, 记录各峰面积, 并计算 RSD。结果对照品各峰保留时间及峰面积的 RSD 值均小于 2.9%, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱分析测试要求。

2.2.2 重复性试验 取样品 S9 适量, 共 6 份, 精密称定, 按照上述条件制备供试品溶液, 注入高效液相色谱仪, 测定样品中各对照品的量, 并计算 RSD 值。结果对照品各峰保留时间及峰面积的 RSD 值均小于 2.8%, 表明方法重复性良好。

2.2.3 稳定性试验 取样品 S9 适量, 按照上述条件制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12 h 进样, 考察其稳定性, 并计算 RSD 值。结果对照品各峰保留时间及峰面积的 RSD 值均小于 2.8%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3 指纹图谱的建立及共有峰的标定

2.3.1 佛手指纹图谱采集 将 HPLC 色谱数据结果导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版本) 中进行处理以及分析, 生成 24 批佛手指纹叠加图及对照指纹图谱, 标定共有峰。

2.3.2 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版本), 以平均值方法, 选取 0.1 秒的时间窗口, 以 S9 作为参照图谱, 对 24 个批次的佛手类药材进行分析, 并对其相似性进行评估。

2.4 聚类热图分析

以 24 批佛手的 17 个共有峰峰面积为原始数据, 导入迈维代谢科研绘图网站对原始数据进行 Z-score 标准化处理, 同时选择按行和列对数据进行聚类处理并绘制聚类热图。

2.5 主成分分析

以共有峰峰面积作为变量, 导入 SPSS Statistics 20 版软件进行 PCA, 选择“分析”模式下的降维处理进行协方差矩阵提取的因子分析, 计算相关系数的主成分特征值和方差贡献率。

2.6 抗氧化活性考察

2.6.1 DPPH 自由基清除率

(1) 待测样品液的制备: 按照“2.1.2”项下方法制备样品溶液, 分别吸取 0.2、0.4、0.8、1.6、2.0、4 mL, 移至 10 mL 量瓶中, 用无水乙醇稀释并定容, 摇匀, 制成质量浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0、

2.0 g/mL 的待测样品液。

(2) DPPH 无水乙醇溶液的配制: 取 3.95 mg DPPH, 用无水乙醇将其溶解并定容至 50 mL, 即得。

(3) DPPH 自由基清除率的测定: 参照罗旭洸等^[22]方法, 按以下步骤操作。分别吸取 100 μ L 不同浓度的待测液与等体积 DPPH 乙醇溶液混合、100 μ L 不同浓度的待测液与等体积无水乙醇混合、100 μ L 无水乙醇与等体积 DPPH 乙醇溶液混合 (各 5 份), 置 96 孔板混匀仪振荡 1 min, 室温避光静置 30 min, 用酶标仪测定 517 nm 处的吸光度, 其值分别为 A_1 、 A_2 、 A_0 。以 VC 作阳性对照, 按公式计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

2.6.2 ABTS 自由基清除率

(1) 待测样品液的制备: 同“2.6.1”项下方法。

(2) ABTS 溶液和过硫酸钾溶液的配制: 称取 0.384 1 g ABTS 试剂、3.784 5 g 过硫酸钾, 用蒸馏水配制得到 7 mmol/L 的 ABTS 溶液和 140 mmol/L 的过硫酸钾溶液。

(3) ABTS 自由基储备液配制: 取 5 mL ABTS 试剂与 88 μ L 过硫酸钾溶液混匀, 室温、避光静置 15 h 以上。

(4) ABTS 自由基工作液: 用蒸馏水将其稀释至相应浓度, 使其 A 值在 734 nm 波长下为 0.70 ± 0.02 。

(5) ABTS 自由基清除率的测定: 参照 Ayyanna 等^[23]方法, 同 DPPH 自由基清除率的试验方法操作, 分别吸取 100 μ L 不同浓度的待测液与等体积 ABTS 自由基工作液混合、100 μ L 不同浓度的待测液与等体积无水乙醇混合、100 μ L 无水乙醇与等体积 ABTS 工作液混合 (各 5 份), 置 96 孔板混匀仪振荡 1 min, 室温避光静置 30 min, 用酶标仪测定 734 nm 处的吸光度, 其值分别为 A_1 、 A_2 、 A_0 。以 VC 作阳性对照, 计算公式如下。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

2.6.3 数据分析与统计 测定和分析结果采用 Excel 进行数据处理, 然后利用 SPSS Statistics 20 软件, 并结合 Probit 模型计算半数抑制浓度 (IC_{50})。最后采用 Graphpad Prism 8.0 软件绘图, 并分析不同产地佛手的抗氧化活性。

2.7 佛手指纹图谱与抗氧化活性的灰色关联度分析

2.7.1 佛手共有峰与抗氧化活性的关联度分析 参考序列设置为清除 DPPH 自由基和清除 ABTS 自

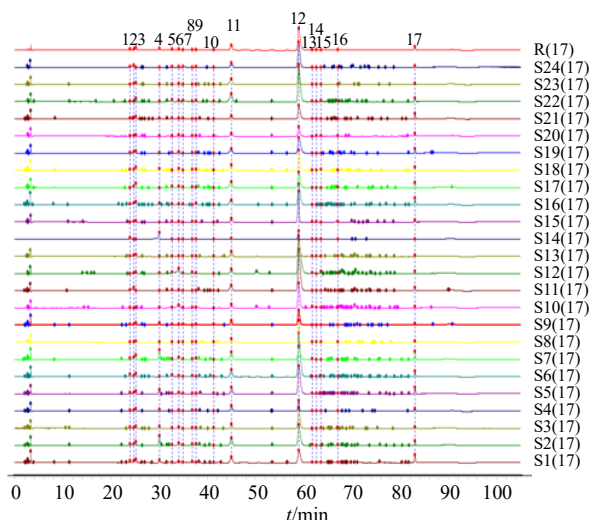
由基的 IC_{50} 值, 而 17 个共有峰峰面积作为比较序列, 进行 GRA 分析, 共有峰用 F1~F17 表示。参考文献方法^[24], 计算佛手共有峰与抗氧化活性的关联度。

2.7.2 排关联序 将 17 个比较序列对清除 DPPH 自由基和清除 ABTS 自由基的 IC_{50} 值的关联度, 按照其大小顺序排序, 形成关联序, 它可以直接体现比较序列对参考序列的“贡献”大小。根据这些特征峰, 可以找出与中药功效相关的特征峰。

3 结果

3.1 HPLC 指纹图谱的生成与相似度、共有峰的分析

3.1.1 佛手指纹图谱的生成与共有峰分析 24 批佛手的指纹叠加图及对照指纹图谱见图 1, 同时以 S9 号佛手为参照样品, 采用 Mark 峰位匹配法对 17 个共有峰进行校正。通过 HPLC 色谱图对所述混合对照物进行定位, 并指出 10 种成分, 分别是 7-羟基香豆素 (1 号峰)、7-羟基-6-甲氧基香豆素 (2 号峰)、6,7-二甲氧基香豆素 (4 号峰)、柚皮苷 (6 号峰)、橙皮苷 (8 号峰)、5,7-二甲氧基香豆素 (12 号峰)、槲皮素 (13 号峰)、佛手柑内酯 (14 号峰)、木犀草素 (15 号峰)、香叶木素 (16 号峰), 色谱图见图 2、3。



1-7-羟基香豆素 2-7-羟基-6-甲氧基香豆素 4-6,7-二甲氧基香豆素 6-柚皮苷 8-橙皮苷 12-5,7-二甲氧基香豆素 13-槲皮素
14-佛手柑内酯 15-木犀草素 16-香叶木素
1-7-hydroxycoumarin 2-scopoletin 4-6,7-dimethoxycoumarin
6-naringin 8-aurantiamarin 12-5,7-dimethoxycoumarin
13-quercetin 14-bergapten 15-luteolin 16-diosmetin

图 1 24 批佛手样品 HPLC 指纹图谱叠加图谱

Fig.1 Overlapping HPLC fingerprints of 24 batches of finger citron

3.1.2 相似度的分析 24 批佛手样品的相似度为 0.880~0.998, 表明相似度良好 (表 2)。

3.2 热图分析结果

由图 4 可知, 24 批佛手大致可聚为 3 类, 其中 S12 (浙江金华)、S10 (浙江金华) 聚为 I 类; S20 (广东肇庆)、S8 (广东肇庆高要区)、S14 (广东肇庆)、S15 (广西博白) 可聚为 II 类; S19 (云南端丽)、S4 (广东)、S3 (四川乐山)、S9 (重庆忠县)、S23 (山东鄄城)、S13 (重庆开州)、S21 (云南临沧)、S24 (重庆潼南)、S18 (云南大理巍山)、S1 (四川乐山)、S11 (重庆垫江)、S6 (四川乐山)、S17 (云南洱源)、S16 (云南大理巍山)、S22 (广西)、S7 (四川名山县)、S2 (四川雅安市石棉县)、S5 (四川乐山) 聚为 III 类。

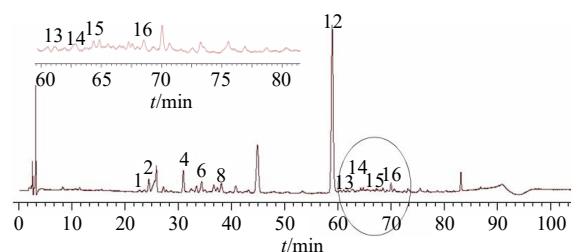


图 2 佛手样品的 HPLC 图

Fig.2 HPLC of finger citron sample

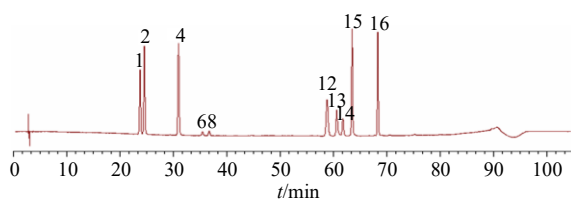


图 3 混合对照品的 HPLC 图

Fig.3 HPLC of the mixed control

表 2 24 批次佛手相似度分析

Table 2 Similarity results of 24 batches of *Citri Sarcodactylis Fructus*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.938	S13	0.997
S2	0.957	S14	0.991
S3	0.998	S15	0.989
S4	0.964	S16	0.995
S5	0.998	S17	0.979
S6	0.996	S18	0.997
S7	0.880	S19	0.996
S8	0.994	S20	0.997
S9	0.995	S21	0.99
S10	0.989	S22	0.997
S11	0.990	S23	0.996
S12	0.988	S24	0.994

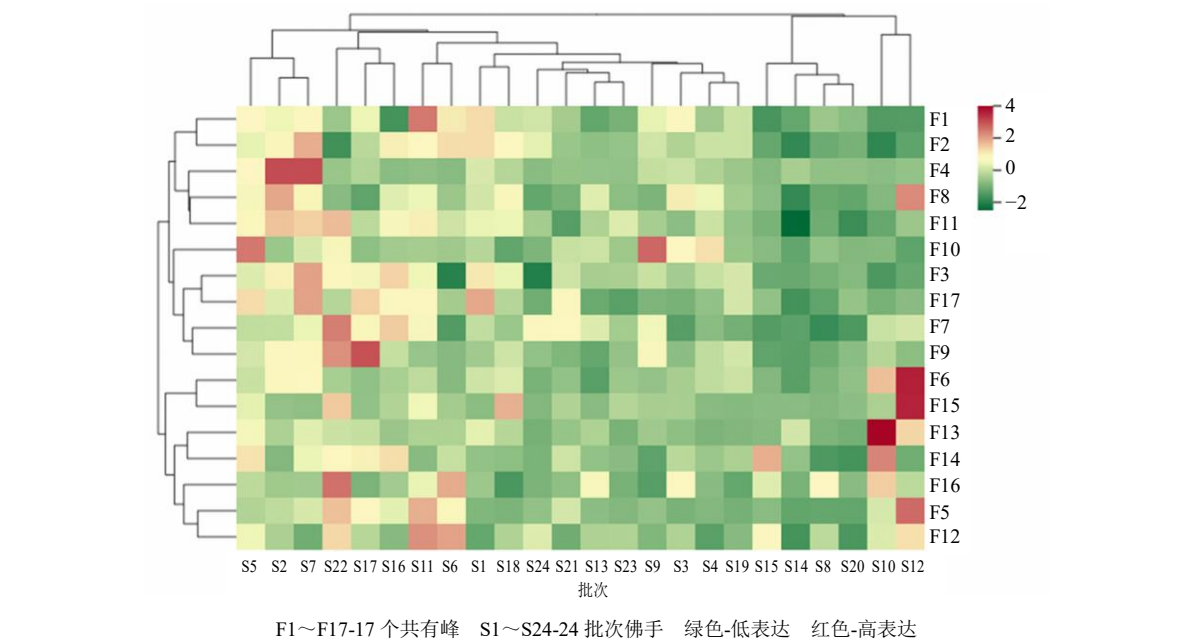


图 4 24 批次佛手药材的 17 个共有峰峰面积聚类热图

Fig. 4 Heat map of peak area clustering of 17 common peaks of 24 batches of *Citri Sarcodactylis Fructus*

3.3 主成分分析结果

3.3.1 主成分及方差贡献率分析 利用 PCA 得到了 2 个主成分，其方差累积贡献率 (96.995%) 和碎石图结果显示，这 2 个主成分可以代表 17 个共有峰的绝大部分信息，可作为评价佛手药材品质的依据之一 (表 3 和图 5)。

表 3 特征值和方差贡献率

Table 3 Eigenvalue and variance contribution rate

成分	初始特征值		
	总计	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	82 629 137 216.000	90.786	90.786
2	5 650 858 668.000	6.209	96.995
3	1 088 132 182.000	1.196	98.190
4	69 9471 353.000	0.769	98.959
5	518 192 199.500	0.569	99.528
6	175 385 245.400	0.193	99.721
7	65 752 911.830	0.072	99.793
8	61 702 162.080	0.068	99.861
9	46 372 528.990	0.051	99.912
10	21 967 590.870	0.024	99.936
11	20 526 446.160	0.023	99.958
12	13 636 608.050	0.015	99.973
13	11 805 579.330	0.013	99.986
14	6 679 648.839	0.007	99.994
15	5 020 911.684	0.006	99.999
16	439 953.442	0	100.000
17	222 061.247	0	100.000

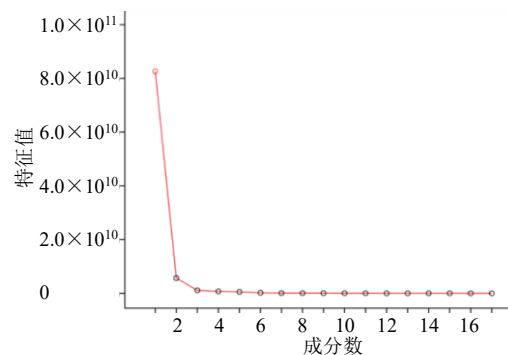


图 5 碎石图

Fig. 5 Macadam figure

3.3.2 载荷图和旋转成分矩阵分析 在因子载荷矩阵中，各指标的系数绝对值越大，表明其对主成分的影响越大^[25]。结合载荷图和因子荷载矩阵分析，其结果表明，F12、F5、F16 在主成分 1 中的载荷量最大；F11、F4、F3、F17、F2 在主成分 2 中的载荷量最大 (载荷量大于 0.6)，可分别反映主成分 1、2 的大部分信息。(图 6 和表 4)。

3.3.3 佛手样品综合评分排序 将 24 批次佛手的 17 个共有峰峰面积标准化处理后进行综合评价，参考文献^[18]计算综合得分，得到公式 $F = 0.154 76 y_1 + 0.262 99 y_2$ (F 为综合得分， y 为主成分得分)。结果表明，不同批次佛手的主成分分析分析排序是 $S7 > S22 > S12 > S5 > S7 > S16 > S11 > S10 > S2 >$

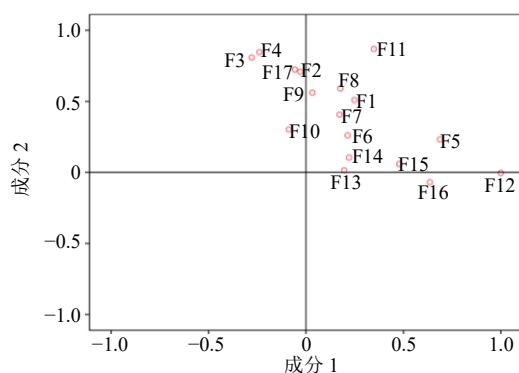


图 6 载荷图

Fig. 6 Loading plot

表 4 因子荷载矩阵

Table 4 Factor loading matrix

项目	荷载	
	1	2
F12	1.000	-0.004
F5	0.688	0.232
F16	0.636	-0.069
F15	0.478	0.060
F14	0.221	0.105
F13	0.196	0.014
F11	0.349	0.869
F4	-0.239	0.846
F3	-0.279	0.808
F17	-0.057	0.724
F2	-0.030	0.709
F8	0.177	0.591
F9	0.033	0.561
F1	0.248	0.509
F7	0.172	0.407
F10	-0.088	0.302
F6	0.213	0.260

S17>S1>S18>S3>S21>S9>S13>S15>S4>S24>S19>S23>S8>S20>S14, 其中川佛手、金佛手综合得分靠前, 且排名也和聚类分析结果相似(表 5)。

3.4 抗氧化活性结果

本研究分别考察了 24 批次佛手对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力。佛手醇提液对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除率, VC 为阳性对照。结果显示, 佛手 S1~S24 批次佛手均具有较好的抗氧化活性, 但均弱于 VC。不同批次佛手醇提液质量浓

表 5 主成分得分、综合得分及排序

Table 5 Principal component scores, comprehensive scores and rankings

编号	主成分 1	主成分 2	综合得分	排序
S1	1.980	0.068	0.324	8
S2	1.697	1.417	0.635	5
S3	-0.232	-0.340	-0.125	14
S4	-0.752	-0.355	-0.210	15
S5	1.416	2.585	0.899	3
S6	2.663	1.524	0.813	4
S7	3.122	1.994	1.008	1
S8	-1.758	-2.574	-0.949	22
S9	0.109	0.263	0.086	12
S10	-1.420	0.912	0.020	13
S11	0.476	0.054	0.088	11
S12	-0.730	1.531	0.290	9
S13	-1.419	-0.466	-0.342	17
S14	-2.167	-3.629	-1.290	24
S15	-1.690	-1.275	-0.597	21
S16	0.866	1.236	0.459	6
S17	0.555	1.129	0.383	7
S18	0.540	0.054	0.098	10
S19	-0.135	-1.304	-0.364	18
S20	-1.695	-3.163	-1.094	23
S21	0.124	-0.878	-0.212	16
S22	0.096	3.615	0.965	2
S23	-1.158	-1.233	-0.503	20
S24	-0.489	-1.165	-0.382	19

度从 0.1 mg/mL 增加到 2.0 mg/mL, 其对 DPPH 自由基清除率均逐渐上升(图 7)。其中, 样品 S16(云南大理)清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 为 2.493 mg/mL, DPPH 自由基清除率最大, 从 13.85%增加到了 39.67%, 该样品的清除率浓度在 2.0 mg/mL 时与 0.01 mg/mL 的阳性对照物(VC)相当; 24 批样品中, 样品 S4(广东)清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 为 5.625 mg/mL, 此时的清除率相对最低, 从 7.56%增加到了 16.60%。该样品在 2.0 mg/mL 时对 DPPH 的清除能力接近 VC(0.01 mg/mL)的 45.82%。通过不同批次佛手 DPPH 的 IC₅₀ 值排序, 发现其清除能力大小依次为 S16>S23>S12>S3>S17>S13>S2>S18>S21>S1>S7>S22>S5>S24>S19>S11>S6>S9>S10>S20>S14>S15>S8>S4。

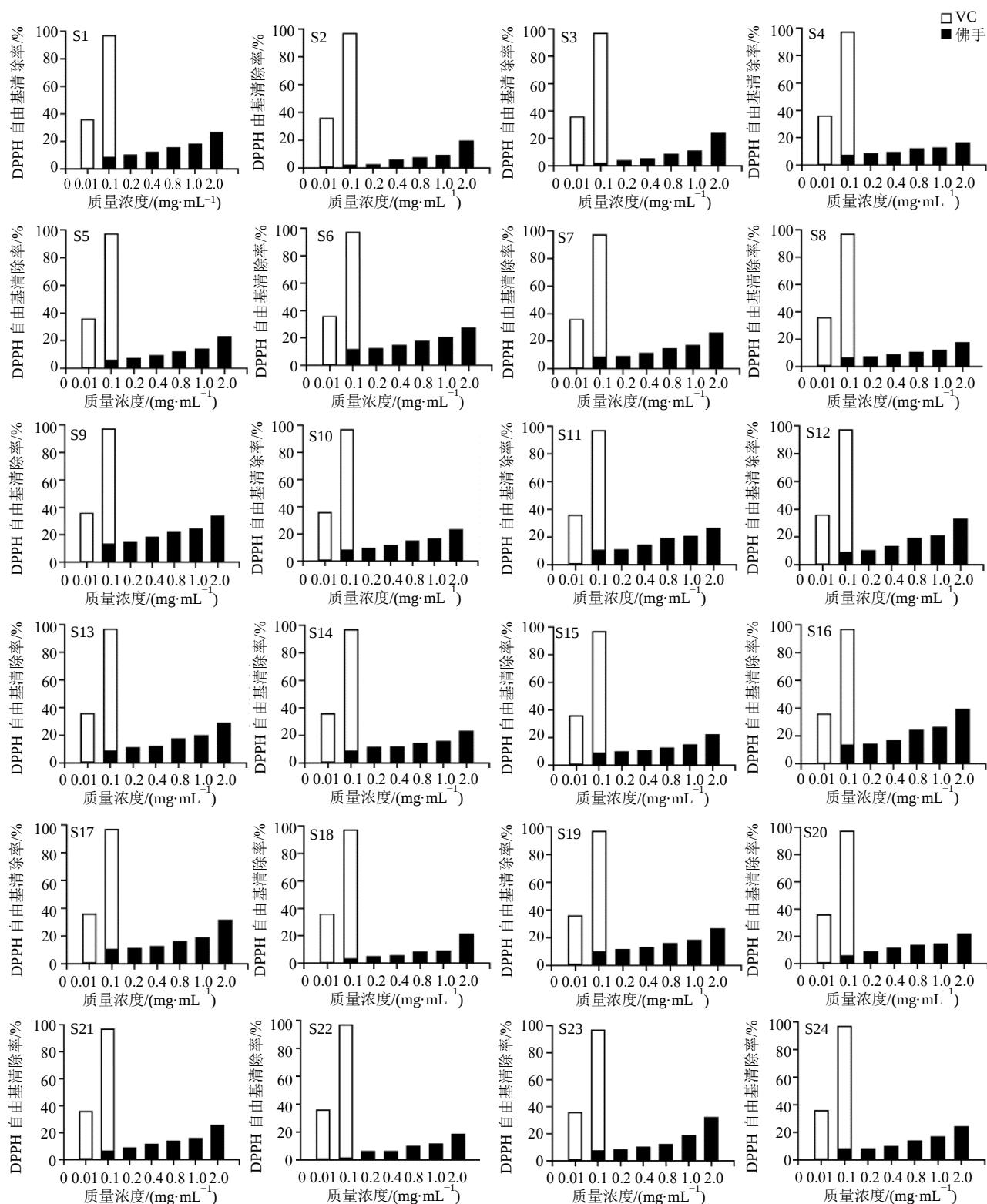


图 7 24 批次佛手样品清除 DPPH 自由基活性

Fig.7 DPPH radical scavenging activities of 24 batches of *Citri Sarcodactylis Fructus* samples

通过清除 ABTS 自由基实验发现,佛手的 S1~S24 样品清除 ABTS 自由基作用随着浓度升高而增强(图 8)。其中,样品 S16(云南大理)清除 ABTS

自由基的 IC₅₀ 为 1.574 mg/mL, ABTS 自由基清除率最大,从 15.34%增加到了 53.94%,其样品在 2.0 mg/mL 时对 ABTS 的清除能力接近 VC 在 0.1 mg/mL

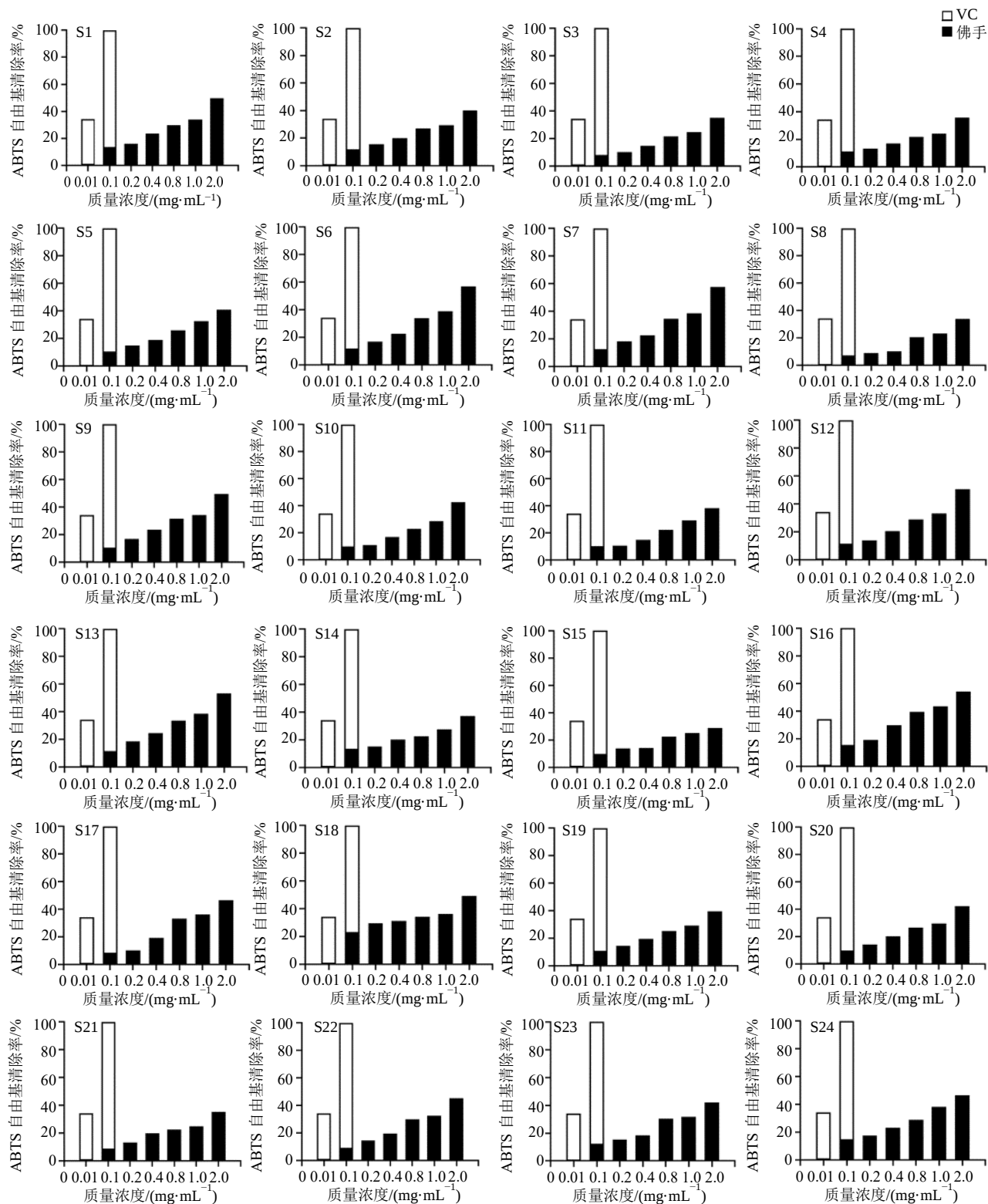


图 8 24 批次佛手样品清除 ABTS 自由基活性

Fig. 8 ABTS radical scavenging activities of 24 batches of *Citri Sarcodactylis Fructus* samples

浓度时清除率的 53.95%；24 批样品中，样品 S4（广东）清除 ABTS 自由基的 IC_{50} 为 2.725 mg/mL，此时的清除率相对最低，从 11.19%增加到了 35.76%，

该样品的清除率浓度在 2.0 mg/mL 时对 ABTS 的清除能力接近 VC（0.1 mg/mL）的 35.76%。综上，其清除能力大小依次为 S16>S7>S6>S13>S24>

S12>S9>S17>S1>S22>S18>S23>S10>S20>S5>S11>S2>S19>S15>S3>S8>S14>S21>S4。结合以上试验结果发现, S16 的抗氧化活性最强, S4 的抗氧化活性最弱(表 6)。此外, 佛手样品对 DPPH、ABTS 自由基的清除能力具有浓度相关性。

表 6 抗氧化活性测定结果

Table 6 Determination of antioxidant activities

样品	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	
	DPPH	ABTS
VC	0.014	0.015
S1	3.467	1.890
S2	3.320	2.401
S3	2.965	2.582
S4	5.625	2.725
S5	3.599	2.266
S6	3.696	1.600
S7	3.488	1.584
S8	4.846	2.588
S9	3.833	1.873
S10	3.945	2.210
S11	3.671	2.389
S12	2.809	1.858
S13	3.203	1.697
S14	4.229	2.706
S15	4.248	2.455
S16	2.493	1.574
S17	3.066	1.882
S18	3.348	2.048
S19	3.644	2.406
S20	3.975	2.226
S21	3.418	2.707
S22	3.593	2.028
S23	2.769	2.204
S24	3.619	1.798

3.5 佛手指纹图谱与抗氧化活性间的灰色关联度分析

实验结果可知, 其中有 14 个共有峰清除 DPPH 和 ABTS 2 种自由基活性的关联度均大于 0.8 (1、2、3、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、17 号峰), 有较高的关联度, 表明佛手中的多个组分可能对抗氧化性具有协同增效作用。各共有峰清除 DPPH 自由基的关联序为 F16>F11>F12>F14>

F9>F6>F10>F7>F8>F3>F2>F13>F1>F17>F5>F15>F4; 清除 ABTS 自由基的关联序: F11>F16>F14>F12>F9>F6>F8>F10>F3>F7>F2>F13>F17>F1>F5>F15>F4。结合关联序和主成分分析^[25], 可综合得出 F16、F11 和 F12 号峰是与佛手抗氧化作用关联度较大的色谱峰, 说明这 3 个峰是反映其药效的重要特征峰, 对抗氧化活性贡献较大(表 7)。

表 7 佛手共有峰与抗氧化活性的关联度

Table 7 Correlation between common peaks and antioxidant activities of *Citri Sarcodactylis Fructus*

关联序	峰号	清除 DPPH 自由基 活性的关联度	关联序	峰号	清除 ABTS 自由基 活性的关联度
1	F16	0.879	1	F11	0.874
2	F11	0.874	2	F16	0.873
3	F12	0.868	3	F14	0.870
4	F14	0.868	4	F12	0.866
5	F9	0.847	5	F9	0.849
6	F6	0.847	6	F6	0.842
7	F10	0.842	7	F8	0.839
8	F7	0.838	8	F10	0.832
9	F8	0.838	9	F3	0.832
10	F3	0.834	10	F7	0.828
11	F2	0.827	11	F2	0.820
12	F13	0.819	12	F13	0.812
13	F1	0.804	13	F17	0.810
14	F17	0.802	14	F1	0.806
15	F5	0.799	15	F5	0.803
16	F15	0.771	16	F15	0.769
17	F4	0.758	17	F4	0.763

4 讨论

4.1 指纹图谱研究

在建立 HPLC 指纹图谱过程中, 进行全波长(190~400 nm)扫描, 发现在 254 nm 波长处, 槲皮素和佛手柑内酯的吸收最强; 在 283 nm 波长处, 橙皮苷和柚皮苷的吸收最强; 5,7-二甲氧基香豆素、6,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、7-羟基甲氧基香豆素、木犀草素和香叶木素在 345 nm 波长处均有最大吸收, 且 10 个对照品在此波长下均有较好的吸收, 因此, 最终确定 345 nm 作为建立指纹图谱的检测波长。本实验前期考察了多种流动相(甲醇-水溶液、甲醇-0.1%冰醋酸溶液、甲醇-0.2%冰醋

酸溶、甲醇-0.1%磷酸溶液等)对色谱峰的影响,并以稳定的基线、良好的分离效果及峰形为条件,最终选择甲醇-0.2%冰醋酸溶液作为流动相。在方法学考察时,发现样品放置室温 24 h 后,7-羟基香豆素、7-羟基甲氧基香豆素和 6,7-二甲氧基香豆素 3 种香豆素类化合物在 345 nm 波长下均无吸收,推测上述 3 个成分在 24 h 后已降解。因此,佛手供试品溶液样品放置 24 h 后已不稳定,尽可能在 12 h 内检测。

4.2 聚类分析

指纹图谱采集和相似度评价结果发现,不同产地 24 批次的佛手共得到 17 个共有峰,其相似度均在 0.880 之上,表明它们所含的化学成分相似,质量较稳定。聚类分析是一种多元统计分析方法,能对样品或指标进行分类,且能简便直观地观察其数据特征。通过聚类热图分析,24 批次佛手大致分为 3 类。我国目前佛手主要栽植地为浙江、四川、重庆、云南、广东、广西等,其商品规格大致可分为金佛手(浙江)、川佛手(四川、重庆、云南)、广佛手(广东、广西)^[26]。这与聚类热图分析的结果大致相似,相同产地聚为一类。但在第Ⅲ类中样品 S4(广东)、S22(广西)、S23(山东鄄城)与川佛手聚为一类,分类存在产地交叉情况,推测原因可能是由不同的海拔、气候、日照、土壤等地理环境因素所致。因此,佛手类药材的产地并不能完全反映其品质,还需要综合考虑其化学成分的含量。

4.3 抗氧化活性评价

本研究采用体外自由基清除法,以清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基活性的 IC_{50} 来评价 24 批次佛手中药材的抗氧化性差异。 IC_{50} 越小,表明抗氧化能力越强^[27]。结果表明,24 批次佛手对清除 DPPH、ABTS 自由基的效果较好,且呈浓度相关性。其中,川佛手和金佛手抗氧化性活性较广佛手高,由此说明,不同产地之间存在一定差异。不同批次之间,S16 的抗氧化活性最强,但其综合得分排序不是最高,说明 S16 中含有低含量的高活性成分。

4.4 谱效关联

GRA 在中药品质评估中的应用,主要是以样品中的各个指数组分为量化数据,对评估比较序列(共同峰峰面积)和参考序列(IC_{50})之间的关联度进行计算,并以此为依据对评估单元进行排序^[28]。为了更深层次地探究佛手指纹图谱共有峰与抗氧化活性之间的关系,本研究利用 GRA 对其谱-效关系

进行分析,以关联度的大小为依据,可以初步确定每个峰对应的化学成分与其抗氧化活性之间的关系。关联度越大,表示化学成分与抗氧化作用之间的关联越大,反之则表示关联越小^[25,29]。研究结果表明,佛手的抗氧化活性与指纹图谱中 17 个共有峰的关联度大部分都达到 0.8 以上,说明佛手发挥抗氧化活性是多成分共同作用的效果。综合分析关联序和主成分分析结果,发现 F16(香叶木素)、F11(未知成分)和 F12(5,7-二甲氧基香豆素)可能是反映其抗氧化活性的重要特征峰,另外,F8(橙皮苷)是《中国药典》2020 年版中规定佛手的指标性成分,其关联度在 0.83 左右,关联性较好。因此,上述 4 个成分可作为佛手抗氧化活性的有效成分。本研究基于谱效关系的研究方法,利用佛手的化学成分与抗氧化活性关联程度,来筛选与药效相关的质控指标,为佛手药材的质量控制研究提供了更全面的参考。本研究初步筛选所得的有效成分香叶木素、5,7-二甲氧基香豆素、F11(未知成分)以及橙皮苷,有待采用严格规范的单体抗氧化活性动物实验和细胞实验来进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 曹瑞,郝二伟,杜正彩,等. 广佛手化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9): 135-145.
- [2] 潘媛,陈大霞,李隆云. 川佛手不同发育时期的比较转录组学分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5169-5176.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 396.
- [4] Luo X G, Wang J, Chen H Q, et al. Identification of flavonoids from finger citron and evaluation on their antioxidative and antiaging activities [J]. *Front Nutr*, 2020, 7: 584900.
- [5] 周良云,蔡启忠,刘长征,等. 广佛手 UDP-鼠李糖合成酶基因的克隆及功能鉴定 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 5005-5011.
- [6] 李旺君,张戴英,孟江,等. 佛手的炮制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(14): 262-269..
- [7] 胡瀚文,赵永艳,杨天龙,等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 的川佛手化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 148-155.
- [8] Gao Z P, Zhong W M, Chen K Y, et al. Chemical composition and anti-biofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle against *Listeria monocytogenes* [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 144:

- 112036.
- [9] Zhang H X, Lou Z X, Chen X H, *et al.* Effect of simultaneous ultrasonic and microwave assisted hydrodistillation on the yield, composition, antibacterial and antibiofilm activity of essential oils from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* [J]. *J Food Eng*, 2019, 244: 126-135.
- [10] Wu Z, Li H, Yang Y, *et al.* Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity [J]. *Ind Crops Prod*, 2013, 46: 311-316..
- [11] Navarra M, Femia A P, Romagnoli A, *et al.* A flavonoid-rich extract from bergamot juice prevents carcinogenesis in a genetic model of colorectal cancer, the Pirc rat (F344/NTac-Apc^{am1137}) [J]. *Eur J Nutr*, 2020, 59(3): 885-894.
- [12] Liu J Y, Li L, Wu W, *et al.* Green extraction of active ingredients from finger citron using subcritical water and assessment of antioxidant activity [J]. *Ind Crops Prod*, 2023, 200: 116821.
- [13] 吴学峰, 谢斌, 黄晓兰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF MS 技术快速鉴定蒸制广佛手化学成分 [J]. 质谱学报, 2021, 42(3): 207-217.
- [14] 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.
- [15] 崔广林, 李隆云, 谭均, 等. 不同产地川佛手中 8 种化学成分的分析与评价 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(2): 250-260.
- [16] 钟艳梅, 田庆龙, 肖海文, 等. 不同产地佛手药材的化学成分比较研究 [J]. 中南药学, 2014, 12(1): 63-66.
- [17] 郑振兴, 胡瀚文, 曾利, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 174-180.
- [18] 孔德喧, 陈运中, 朱映睿, 等. 虎杖 HPLC 指纹图谱及抗痛风性关节炎活性谱效关系研究 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 569-574.
- [19] Chen Y R, Pan G J, Xu W F, *et al.* Spectrum-effect relationship study between HPLC fingerprints and antioxidant activity of *Sabia parviflora* [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1140: 121970.
- [20] 黄广伟, 陈淮臣, 刘渝, 等. 基于灰色关联度和偏小二乘回归分析的芩苏胶囊抑菌谱效关系研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(6): 1060-1069.
- [21] 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.
- [22] 罗旭洗. 广佛手黄酮成分鉴定、抗炎活性研究及果酱开发 [D]. 广州: 华南农业大学, 2020.
- [23] Ayyanna R, Ankaiah D, Arul V. Anti-inflammatory and antioxidant properties of probiotic bacterium *Lactobacillus mucosae* AN₁ and *Lactobacillus fermentum* SNR1 in wistar albino rats [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 3063.
- [24] 张萌, 邓家刚, 韦玮, 等. 广山楂 HPLC 指纹图谱建立及其活血化瘀作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 601-607.
- [25] 黄艳菲, 蔡旭, 冉波, 等. 基于谱效关系的藏药材全缘叶绿绒蒿全草(非花入药部位)抗氧化质量标志物初步研究 [J]. 中草药, 2020, 51(17): 4521-4530.
- [26] 张思获, 杨海燕, 曾俊, 等. 佛手的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3510-3514.
- [27] 黎珊, 高明, 陈康, 等. 蒸制时间对佛手主要成分与抗氧化活性的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(4): 821-824.
- [28] 李欢, 翟秉涛, 范好, 等. 基于谱效关系的太白樗木质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(18): 4757-4764.
- [29] 杨耘, 卢雪蕊, 宋平顺, 等. 甘草 HPLC 指纹图谱及抗氧化活性的谱效关系 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(4): 607-617.

[责任编辑 时圣明]