

制枳壳 HPLC 指纹图谱与小肠推动作用的谱效关系

王红阳¹, 钟佩芸², 梁家怡¹, 周敏贤¹, 陈 康¹, 夏 荃^{1*}

(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 暨南大学, 广东 广州 510632)

摘要: **目的** 研究制枳壳 HPLC 指纹图谱与小肠推动作用的谱效关系。**方法** HPLC 法建立生、制枳壳指纹图谱, 以小鼠小肠推进率为药效指标, 通过灰色关联分析、正交偏最小二乘法 (OPLS) 进行研究, 并采用 HPLC-Q-TOF-MS 法鉴定药效活性成分。**结果** 与空白组比较, 生、制枳壳对小鼠小肠推动均有促进作用 ($P<0.05$)。生枳壳中有 7 种成分与药效密切相关 (关联度 >0.75), 变量投影重要性 (VIP) 均 >1.0 的成分有 6 种, 其中 X_5 (新圣草苷)、 X_8 (橙皮苷)、 X_9 (新橙皮苷) 与药效呈正相关; 制枳壳中与药效高相关的成分有 13 种, 其中 X_3 (柚皮黄素)、 X_{15} (伞形花内酯)、 X_{16} (异牡荆素)、 X_{17} (新圣草苷)、峰 19、峰 26 与小肠推动呈高度正相关性。**结论** 生、制枳壳均可显著促进小鼠小肠推动, 但前者主要活性成分为黄酮苷类, 而后者集中在黄酮苷元、香豆素类。

关键词: 制枳壳; HPLC 指纹图谱; 小肠推动作用; 谱效关系; 灰色关联分析; 正交偏最小二乘法 (OPLS)

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)03-0750-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.036

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、行滞消胀等功效^[1], 其炮制品种较多^[2]。2015 年版《中国药典》载收了枳壳、麸炒枳壳, 并将柚皮苷、新橙皮苷作为含量测定的指标成分。

制枳壳^[3]作为广东等岭南地区习用的炮制品种, 采用了浸泡、发酵、蒸制等一系列步骤的独特工艺, 能较好地缓和生品峻烈之性, 避免损气、耗气之弊, 在当地广泛应用。但目前对制枳壳的研究较少, 仅涉及炮制前后其化学成分变化, 尽管有学者对其指纹图谱进行了研究^[4], 但尚未涉及其药效及物质基础, 存在成分变化与药效研究分离的问题。课题组前期研究发现, 枳壳经发酵、蒸制后, 柚皮苷、新橙皮苷、挥发油等药效成分含量均有所降低^[5], 但临床疗效依旧显著, 故推测炮制品发挥药效的主要成分可能与生品不同, 其药效评价及物质基础有待进一步考察。

灰色关联分析^[6-7]是目前谱效关系研究中应用较广泛的方法, 但存在易受分辨系数影响的缺点, 并且不能反映相关的正负性, 故实际分析时很多学者更趋向于采用 2 种及 2 种以上方法联合应用^[8]。正交投影偏最小二乘法 (OPLS)^[9]是一种改进的偏最小二乘法, 在分析多因素模型时能有效去除预测矩阵中与因变量无关的信息, 改善了模型的解释性和真实性, 被广泛应用于模型验证, 可很好地弥补灰色关联度分析方法的不足。因此, 本实验在建立生、

制枳壳指纹图谱的基础上, 通过联合应用灰色关联分析与 OPLS 进行谱-效关联, 旨在探讨制枳壳小肠推动作用的药效物质, 为相关基础研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器 LC-20A 高效液相色谱系统、Inertsil ODS-3 高效液相色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) (日本岛津公司); Triple TOF 5600 超高效液相色谱仪-飞行时间质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司)。

1.2 试剂 橙皮苷 (110721-201617, 20 mg, 纯度 96.1%)、柚皮苷 (110722-201714, 20 mg, 纯度 93.4%)、新橙皮苷 (111857-201703, 20 mg, 纯度 99.2%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 柚皮素 (BWB50920, 20 mg, 纯度 $\geq 98\%$)、橙皮素 (BWB50172, 20 mg, 纯度 $\geq 98\%$)、川陈皮素 (BWB0620, 20 mg, 纯度 $\geq 98\%$) 对照品均购自北京世纪奥科生物技术有限公司。枸橼酸莫沙必利分散片 (180902) 购自成都康弘药业集团股份有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯 (德国默克公司); 其他试剂均为分析纯。

1.3 药物 枳壳经广州中医药大学中药鉴定教研室张丹雁教授鉴定为酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实, 具体信息见表 1。制枳壳制备方法为将生品 (编号 S1~S10) 除去杂质及瓢核, 洗净, 浸至七成透, 取出, 发酵 3~4 d, 洗净, 蒸 4~6 h, 闷一夜, 至内部呈紫褐色时取出, 切片, 干燥, 即得, 编号 S11~S20^[3]。

收稿日期: 2020-05-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873003); 广东省科技计划项目 (2017A020213012)

作者简介: 王红阳 (1994—), 女, 硕士, 从事中药炮制工艺与机理研究。Tel: 15521249329, E-mail: 15521249329@163.com

* 通信作者: 夏 荃 (1971—), 女, 博士, 教授, 从事中药炮制工艺与机理研究。Tel: 13929598771, E-mail: xia@gzucm.edu.cn

表 1 样品信息

编号		产地	来源
生枳壳	制枳壳		
S1	S11	湖南	耒阳市
S2	S12	江西	江西江中药饮片有限公司
S3	S13	浙江	佛山南海里水中药加工厂
S4	S14	浙江	佛山南海里水中药加工厂
S5	S15	江西	广州至信药业股份有限公司
S6	S16	江西	宜春市虎下镇
S7	S17	江西	宜春市经楼镇
S8	S18	江西	宜春市刘公镇
S9	S19	湖南	佛山南海区里水中药加工厂
S10	S20	浙江	衢州市

1.4 动物 264 只 SPF 级昆明种小鼠，雌雄各半，体质量（20±2）g，由广州中医药大学实验动物中心提供，实验动物合格证号 44005800006682，动物实验许可证号 SYXK（粤）2013-0085。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱建立

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取柚皮苷、新橙皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 分别含上述成分 80 μg 的溶液，即得。

2.1.2 供试品溶液制备 取本品粗粉约 1 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入 90 mL 甲醇，称定质量，加热回流 1.5 h，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.3 色谱条件 参考文献 [10] 报道。Inertsil ODS-3 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-水（含 0.1% 磷酸）（B），梯度洗脱（0~10 min，5%~6% A；10~20 min，6%~15% A；20~75 min，15%~27% A；75~120 min，27%~65% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 25 ℃；检测波长 283 nm。色谱图见图 1。

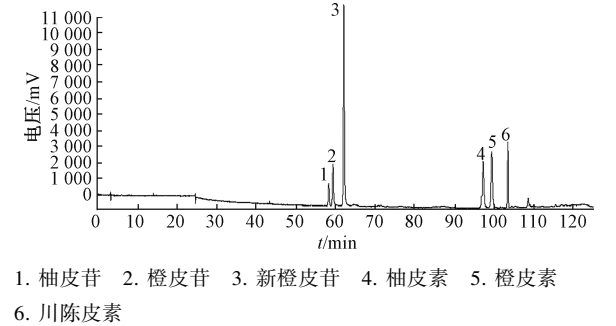


图 1 各成分 HPLC 色谱图

2.1.4 质谱条件 电喷雾 ESI 离子源，负离子模式扫描；检测范围 50~1 200 Da；喷雾电压 5 500 eV；离子源温度 550 ℃；去簇电压 100 V；二级碰撞电压±45 V。

2.1.5 图谱生成 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.3”项色谱条件下进样测定，将 10 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2008A 版），以 S6 为参照，采用平均数法得到指纹图谱及对照指纹图

谱，见图 2~3，发现各批样品相似度均>0.95，表明其质量稳定。

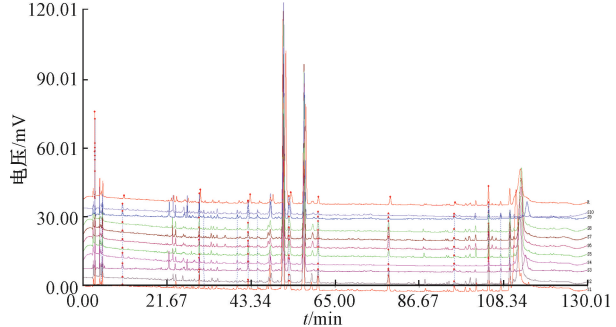


图 2 生枳壳指纹图谱、对照图谱

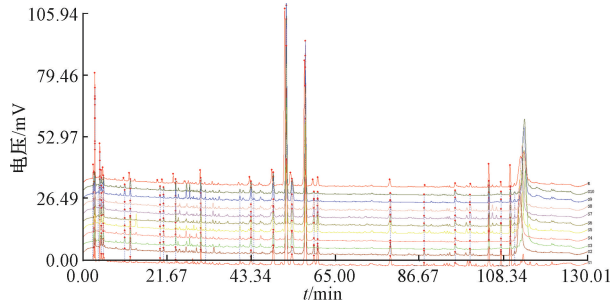


图 3 制枳壳指纹图谱、对照图谱

2.1.6 方法学考察 取供试品溶液（S10），在“2.1.3”项下色谱条件进样测定 6 次，测得各共有峰相对峰面积 RSD 均<3%，表明仪器精密度高。按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份，在“2.1.3”项色谱条件下进样，测得各共有峰相对峰面积 RSD 均<3%，表明该方法重复性良好。按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、6、12、24 h 在“2.1.3”项色谱条件下进样测定 6 次，测得各共有峰相对峰面积 RSD 均<3%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 HPLC-Q-TOF-MS 数据采集 见图 4。

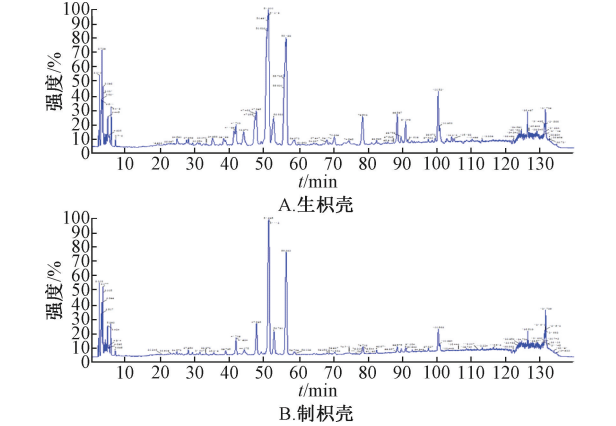


图 4 样品总离子流图（正离子）

2.2 药效学实验

2.2.1 药液制备 取生、制枳壳各 500 g，加 10 倍量水浸泡 30 min，煎煮 30 min，纱布过滤，残渣加 8 倍量水煎煮 20 min，

合并水煎液，减压抽滤，将滤液浓缩至生药量1 g/mL，即得。

2.2.2 分组及给药 小鼠适应性喂养 3 d 后，随机分为 22 组，每组 12 只，分别为空白组、阳性组（10 mg/kg 枸橼酸莫沙必利）、10 个生枳壳组（4 g/kg）、10 个制枳壳组（4 g/kg）。给药组按 0.2 mL/10 g 剂量灌胃，空白组灌胃给予相应体积蒸馏水，每天 1 次，连续 4 d。

2.2.3 小肠推进实验 小鼠末次给药前禁食不禁水 14 h，末次给药 1 h 后灌胃给予营养性半固体糊，每只 0.6 mL，5 min 后脱颈处死，分离肠胃，测量幽门到盲肠部全长及半固体糊推进前沿的距离，计算小肠推进率，公式为推进率=（幽门到指示前沿距离/幽门至回盲肠全部距离）×100%^[11]，通过 SPSS 22.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析，结果见表 2。由此可知，与空白组比较，生、制枳壳组对小鼠小肠推进能力均有不同程度的促进作用（ $P<0.05$ ），但组间比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表 2 生、制枳壳对小鼠小肠推进能力的影响（ $\bar{x}\pm s$ ）				
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	病例数/ 只	推进率/%	组内平均推 进率/%
空白组	—	8	46.89±6.27	46.89±6.27
阳性组	0.01	8	59.03±3.04*	59.03±3.04**
生枳壳组	4	80	62.99±12.16**	62.05±3.66**
制枳壳组	4	80	64.26±8.18**	61.02±4.58**

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 3 小肠推动作用与生枳壳色谱峰峰面积的相关度（关联系数>0.75）

关联序	峰号	关联系数	t_R /min	m/z	检测离子	二级碎片离子
1	8(橙皮苷)	0.858 0	53.691	611	[M+H] ⁺	242,286,301,343,489
2	9(新橙皮苷)	0.840 2	57.139	611	[M+H] ⁺	242,286,301,343,489
3	2	0.833 9	30.223	—	[M+H] ⁺	—
4	7(柚皮苷)	0.796 3	52.010	580	[M+H] ⁺	242,286,301,343,489
5	5(新圣草苷)	0.777 9	43.020	596	[M+H] ⁺	135,151,235,287,339,459,595
6	6(柚皮芸香苷)	0.765 9	48.651	581	[M+H] ⁺	242,286,301
7	3	0.752 6	33.337	—	[M+H] ⁺	—

表 4 小肠推动作用与制枳壳色谱峰峰面积的相关度（关联系数>0.75）

关联序	峰号	关联系数	t_R /min	m/z	检测模式	二级碎片离子
1	22(橙皮苷)	0.876 8	53.614	611	[M+H] ⁺	242,286,301,343,489
2	3(柚皮黄素)	0.868 2	4.678	418	[M+H] ⁺	125,128,129,127,237,417
3	31	0.862 9	113.089	—	[M+H] ⁺	—
4	16(异牡荆素)	0.852 6	40.874	431	[M+H] ⁺	249,283,282,311,323,341,431
5	23(新橙皮苷)	0.820 9	57.050	611	[M+H] ⁺	286,301,343
6	18	0.819 8	45.365	—	[M+H] ⁺	—
7	21(柚皮苷)	0.815 1	51.981	581	[M+H] ⁺	151,271,459,339,313,339,459,579
8	17(新圣草苷)	0.813 2	42.983	596	[M+H] ⁺	153,163,195,289,355,219
9	19	0.795 6	48.628	—	[M+H] ⁺	—
10	20(野漆树苷)	0.792 0	50.157	537	[M+H] ⁺	269,268,577
11	25	0.782 0	65.574	—	[M+H] ⁺	—
12	26(花椒毒酚)	0.770 2	74.293	202	[M+H] ⁺	101,117,145,173,201
13	15(伞形花内酯)	0.764 5	40.139	163	[M+H] ⁺	105,117,121,133
14	24(橙皮素 7-O-葡萄糖苷)	0.750 7	59.181	465	[M+H] ⁺	164,242,286,301

2.3 灰色关联分析

2.3.1 数据无量纲化处理 采用 DPS7.05 软件，原始数据采用初值化变换法。以小肠推进率的药效指标为母序列，记为 $\{X_0(t)\}$ ；生、制枳壳特征峰的峰面积作为子序列，记为 $\{X_i(t)\}$ 。

2.3.2 绝对差序列、关联系数计算 经数据变换的母序列标记为 $\{X_0(k)\}$ ，子序列记为 $\{X_i(k)\}$ ， $k=t$ 时两者关联系数 $L_{0i}(k)$ 可由以下公式计算。其中， $\Delta_{0i}(t)$ 表示 2 个比较序列的绝对差，即 $\Delta_{0i}(t) = |x_0(t) - x_i(t)|$ ($1 \leq i \leq m$)； $\Delta_{\min}$ 、 $\Delta_{\max}$ 分别表示所有比较序列各时间点绝对差中的最小值、最大值； ρ 为分辨系数，通常取 0.5。

$$L_{0i}(t) = \frac{\Delta_{\min} + \rho \Delta_{\max}}{\Delta_{0i}(t) + \rho \Delta_{\max}}$$

2.3.3 关联度计算 按下式计算各比较序列与参考序列关联系数的平均值，以反映两者关联关系。其中， r_{0i} 为子序列与母序列的关联度， n 为子序列的长度即数据个数。

$$r_{0i} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n L_{0i}(k)$$

2.4 药效高相关色谱峰指认 通过 Peakview、Markerview 软件对 UPLC-Q-TOF-MS 数据进行预处理，基于文献研究和 chemspider、HMD 公共数据库进行成分分析，结果见表 3~4。

2.5 偏最小二乘法（OPLS-DA）判别分析

2.5.1 数据标准化处理 采用 SIMCA-P14.1 软件，分别将表 2、4 中的色谱峰进行标准化处理。

2.5.2 生枳壳谱效关系的 OPLS-DA 分析 以标准化处理的特征峰峰面积为自变量 X ，各组小鼠小肠推进率为因变量 Y_1 ，采用 SIMCA-P14.1 软件进行 OPLS 回归分析，见图

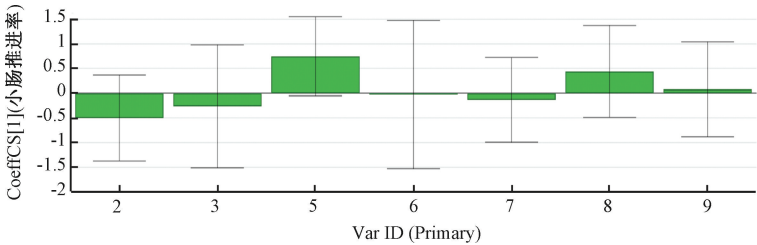


图 5 生枳壳谱效相关性的标准化回归系数

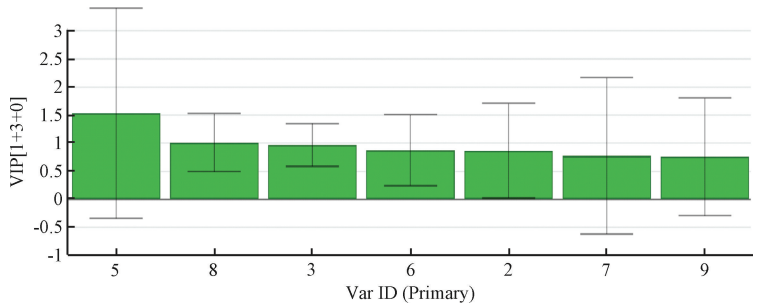


图 6 生枳壳各药效相关峰对小肠推动作用的贡献

2.5.3 制枳壳谱效关系的 (OPLS-DA) 分析 以标准化处理特征峰峰面积为自变量 X ，各组小鼠小肠推进率为因变量 Y_2 ，采用 SIMCA-P14.1 软件进行 OPLS 回归分析，见图 7~8。由此可知， X_3 (柚皮黄素)、 X_{15} (伞形花内酯)、 X_{16}

(异牡荆素)、 X_{17} (新圣草苷)、 X_{19} 、 X_{26} 均与小肠推进率呈正相关，其中 X_3 、 X_{15} 的 VIP 值均 >1 ，表明两者为制枳壳主要活性成分。

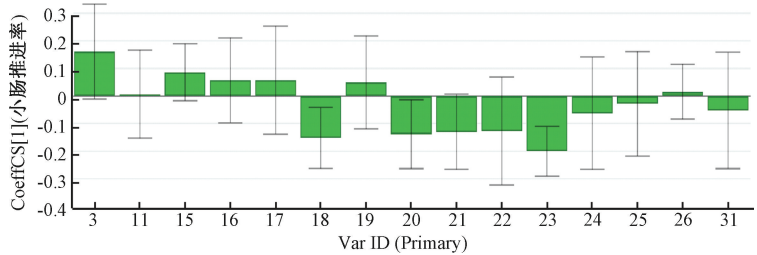


图 7 制枳壳谱效相关性的标准化回归系数

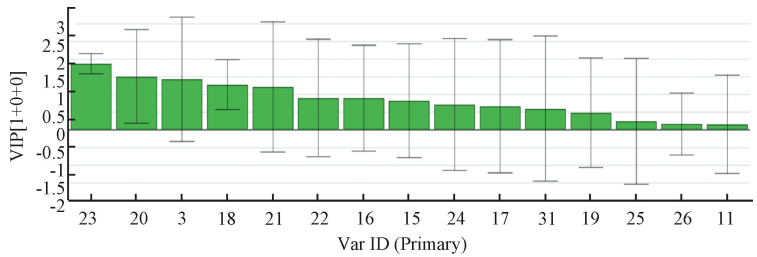


图 8 制枳壳各药效相关峰对小肠推动作用的贡献

3 讨论

本实验发现，制枳壳药效高相关成分明显多于生枳壳，而且种类存在较大差异。生枳壳中橙皮苷、新圣草苷、新橙皮苷与药效呈正向高相关性，与目前发现的促胃肠动力主要成分基本一致^[12-14]，说明所建立谱效关系可靠。

在制枳壳的 OPLS 模型中，柚皮素、新橙皮素与药效表

现出高度正相关性，而部分苷类，尤其是橙皮苷、新橙皮苷则与表现出负相关性。其原因可能为 (1) 柚皮苷、新橙皮苷是枳壳中含量较高的黄酮类成分，两者均含有分子量较大的双糖结构，亲脂性低，在消化道内不易被吸收^[15]，从生物利用度和活性来讲，黄酮苷类的生物活性低于对应的苷元；(2) 制枳壳在发酵过程中柚皮苷、橙皮苷在微生

物群的作用下水解，含量降低，同时脱去糖基转化成柚皮素、新橙皮素等苷元，使得对应苷元含量明显升高，而苷元脂溶性较大，有利于经小肠吸收进入血液循环，能较快地达到所需血药浓度，并发挥其药效作用。

胃肠运动同时受到神经系统、内分泌激素的调控，是极为复杂、高度协调的神经-肌肉活动^[16]。本研究发现，生、制枳壳虽然在药效相关性成分上差异明显，但两者对正常小鼠的促小肠推动作用并无显著差异，提示它们可能有不同的促小肠运动作用机制。对慢性胃肠功能障碍的患者而言，糖苷类成分可能更难以被吸收利用，而制枳壳中黄酮苷元有更好的生物利用度，从而疗效更强，可能是临床上以其组方治疗脾虚体弱患者的原因。因此，需建立相应的病理状态动物模型或进行临床研究，从多个角度进行更深入的探讨，并且枳壳炮制后的作用表现在多个方面，如缓和烈性与燥性等，有待进一步探讨。

虽然制枳壳作为岭南地区习用药被广泛使用，但广东省中药饮片炮制规范尚未建立其含量测定的方法及标准，不利于质量控制及评价。本实验发现，制枳壳胃肠推动药效成分远多于生枳壳，而且种类不同，故以柚皮苷、新橙皮苷等 2015 年版《中国药典》规定的指标成分对制枳壳质量进行评价不够合适。今后，可从制枳壳未知药效相关成分的分离、结构鉴定及药效评价入手，为该炮制品物质基础和质量控制的研究奠定基础。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：246.

[2] 祝 婧，叶喜德，吴江峰，等. 枳壳炮制历史沿革及炮制品现代研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（20）：191-199.

[3] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药饮片炮制规范[S]. 广州：广东科技出版社，1984：192.

[4] 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.

[5] 夏 荃，鲍 倩，梁家怡，等. 岭南特色炮制工艺对枳壳挥发油成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（5）：13-19.

[6] 林梦雅，张玉萍，李 雅，等. 基于灰色关联度分析的丹参提取物抗炎作用谱效关系研究[J]. 中草药，2017，48（16）：3447-3452.

[7] 卿勇军，刘 文，杜 平，等. 基于灰色关联度分析戊己丸对胃蛋白酶抑制作用的谱效关系[J]. 中草药，2017，48（16）：3390-3395

[8] 贾富霞，罗 容，王秀娟. 谱效关系研究方法在中药研究中的应用进展[J]. 北京中医药，2015，34(12)：996-1000.

[9] 瞿领航，曹国胜，涂济源，等. 基于灰色关联度与正交偏最小二乘法分析的苍术挥发油燥性谱效关系研究[J]. 中草药，2019，50(1)：150-156.

[10] 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.

[11] 齐美欣，苏 婷，姜文月，等. 柴胡疏肝散有效部位对功能性消化不良大鼠胃肠动力的影响[J]. 中药药理与临床，2019，35(3)：15-19.

[12] Tan W X, Li Y, Wang Y, *et al.* Anti-coagulative and gastrointestinal motility regulative activities of *Fructus Aurantii Immaturus* and its effective fractions. [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 244-252.

[13] 谭舒舒，陈海芳，宋玉鹏，等. 枳壳及其主要活性成分对脾虚模型大鼠血清胃泌素、血浆乙酰胆碱、胃动素、P 物质和血管活性肠肽的影响[J]. 时珍国医国药，2017，28（5）：1037-1040.

[14] 易徐航，夏放高，陈海芳，等. 枳壳中黄酮苷类成分对正常小鼠小肠推进的影响[J]. 时珍国医国药，2015，26（2）：278-280.

[15] 潘亚平，张振海，丁冬梅，等. 黄酮类化合物肠道细菌生物转化的研究进展[J]. 中国中药杂志，2013，38（19）：3239-3245.

[16] 李小雯，郑松柏. 促胃肠动力药物安全性研究现状[J]. 中国新药与临床杂志，2015，34(9)：657-661.