

衢枳壳黄酮类成分调节胃肠动力的谱效关系研究

冯敬骞¹, 宋剑锋², 赵四清³, 徐礼萍², 张文婷⁴, 雷美康⁵(1.衢州职业技术学院医学院, 浙江 衢州 324000; 2.衢州市食品药品检验研究院, 浙江 衢州 324002; 3.常山县胡柚研究院, 浙江 衢州 324200; 4.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 5.衢州出入境检验检疫局综合技术服务中心, 浙江 衢州 324000)

摘要: 目的 研究衢枳壳甲醇提取物的 HPLC 指纹图谱及其调节胃肠动力的谱效关系。方法 采用小肠炭末推进模型和离体回肠收缩模型得到调节胃肠动力的药效结果, 经 LC-MS 分析并指认衢枳壳甲醇提取物中的各色谱峰, 运用多元回归分析(multiple regression analysis, MRA)和双变量相关分析(bivariate correlation analysis, BCA), 将衢枳壳甲醇提取物的药效数据与指纹图谱共有峰的相对峰面积相关联, 分析谱效相关性。结果 采用 LC-MS 指认出 12 个色谱峰, 经 MRA 和 BCA, 得出谱效方程($Y_1=52.379-0.255X_2+0.335X_3-4.499X_4+4.308X_5+0.750X_6$, $R^2=0.959$; $Y_2=0.250+0.0135X_2+0.0230X_3+0.0769X_6$, $R^2=0.921$), 其中 5 个是相关峰, 2 个色谱峰呈现极显著的相关性。采用不同样品代入谱效方程做拟合验证后, 该拟合方程的预测值与实测值的拟合误差均 <3%。结论 衢枳壳甲醇提取物中芸香柚皮苷(峰 2)、柚皮苷(峰 3)、柚皮素(峰 4)、橙皮苷(峰 5)、新橙皮苷(峰 6)可能是衢枳壳中调节胃肠动力的效应物质, 其中柚皮苷(峰 3)和新橙皮苷(峰 6)呈现极显著的相关性, 与调节胃肠动力密切相关。

关键词: 衢枳壳; 调节胃肠动力; 谱效关系

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)17-2241-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.17.011

引用本文: 冯敬骞, 宋剑锋, 赵四清, 等. 衢枳壳黄酮类成分调节胃肠动力的谱效关系研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(17): 2241-2245.

Study on Spectrum-activity Relationship of Flavonoids in Qu Aurantii Fructus for Regulation of Gastrointestinal Motility

FENG Jingqian¹, SONG Jianfeng², ZHAO Siqing³, XU Liping², ZHANG Wenting⁴, LEI Meikang⁵(1.School of Medicine, Quzhou College of Technology, Quzhou 324000, China; 2.Quzhou Institute for Food and Drug Control, Quzhou 324002, China; 3.Huyou Institute of Changshan County, Quzhou 324200, China; 4.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 5.Quzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Quzhou 324000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the spectrum-activity relationships between the HPLC fingerprints and the regulation of gastrointestinal motility activity of flavonoids in Qu Aurantii Fructus methanol extract. **METHODS** The models of intestinal carbon propulsion and contraction models of isolated ileum were established to obtain the efficacy results of regulating gastrointestinal motility. The LC-MS was used to identify the components of Qu Aurantii Fructus methanol extract. Multivariate regression analysis(MRA) and bivariate correlation analysis(BCA) were used to associate efficacy data of Qu Aurantii Fructus methanol extract with the relative peak area of the fingerprint common peak to analyze the spectral effect correlation. **RESULTS** The 12 components were identified by LC-MS, studied by MRA and BCA, to obtain the spectrum efficiency equation ($Y_1=52.379-0.255X_2+0.335X_3-4.499X_4+4.308X_5+0.750X_6$, $R^2=0.959$; $Y_2=0.250+0.0135X_2+0.0230X_3+0.0769X_6$, $R^2=0.921$). It was showed five peaks were the correlated peaks, and 2 of them were significantly correlated. After fitting verification for different samples substituted into the spectrum-activity equation, the fitting error between the predicted value and the measured value of the fitting equation was <3%. **CONCLUSION** Naringin(peak 2), naringin(peak 3), naringenin(peak 4), hesperidin(peak 5) and neohesperidin(peak 6) in Qu Aurantii Fructus methanol extract may be the material foundation in Qu Aurantii Fructus methanol extract for regulation of gastrointestinal motility, in which naringin(peak 3) and neohesperidin(peak 6) are significant correlation.

KEYWORDS: Qu Aurantii Fructus; regulation of gastrointestinal motility; spectrum-activity relationship

衢枳壳为芸香科植物常山胡柚 *Citrus changshan-huyou* Y. B. Chang 的干燥未成熟果实, 收载于《浙江省中药炮制规范(2015年版)》^[1]。笔者所在课题组对常山胡柚进行了多年的研究, 发现其与中国药典 2020 年版收载的枳壳品种在化学成

分和药理作用方面均无显著差异, 相关研究结果已形成论文和科技成果发表^[2-4]。2018 年, 衢枳壳分别入选了“衢六味”和“新浙八味”品种, 加大了对其药用功能的研究和开发力度, 但其发挥理气宽中的药效物质基础未见阐明, 化学成分与调

作者简介: 冯敬骞, 男, 硕士, 副教授 E-mail: fengjingqian@126.com

节胃肠动力之间的谱效相关性也未见文献报道。

前期,本课题组分别对水煎、甲醇提取、乙酸乙酯提取等不同溶剂提取所得的提取物进行了药效筛选,发现衢枳壳甲醇提取物对调节胃肠动力的效果最佳。本研究拟建立衢枳壳甲醇提取物的 HPLC 指纹图谱,采用小肠炭末推进模型和离体回肠收缩模型考察衢枳壳甲醇提取物调节胃肠动力的作用,并将指纹图谱获得的色谱峰信息与药效数据进行相关分析,探索其中的谱效关系,以期为衢枳壳甲醇提取物调节胃肠动力的药效物质基础研究提供依据,促进衢枳壳的开发和利用。

1 仪器与试剂

衢枳壳采自浙江衢州市常山县,由常山县胡柚研究院赵四清高级农艺师采集并鉴定为常山胡柚 *Citrus Changshan-huyou* Y.B.Chang 的未成熟果实。分别采自常山县大宝山、太公山、鹭山小翠山、凤家山 5 个不同地点,每点 2 个样,分别记为 S1~S10。圣草次苷(批号:CDGB-89194;纯度>98%)、橙皮油内酯(批号:CDA-281288;纯度>98%)购自上海安谱实验科技股份有限公司;芸香柚皮苷(批号:131208;纯度>98%)、柚皮素(批号:130908;纯度>98%)、桔皮素(批号:130708;纯度>98%)、川陈皮素(批号:130108;纯度>98%)购自四川省维克奇生物科技有限公司;柚皮苷(批号:110722-201312;含量按 94.7%计)、橙皮苷(批号:110721-201316;含量按 95.3%计)、新橙皮苷(批号:111857-201102;含量按 99.6%计)、木犀草素(批号:111520-201006;纯度>98%)均购自中国药品生物制品检定研究院;橙皮内酯水合物(批号:BBP00486;纯度>98%)、橙皮内酯(批号:BBP00392;纯度>98%)均购于云南西力生物技术有限公司。甲醇、乙腈均为色谱纯,甲醇(提取用)、磷酸、甲酸、乙酸均为分析纯,均购自中国医药集团上海化学试剂公司;水为重蒸水(自制)。

6430 液相色谱-三重四级杆质谱联用仪、1260 高效液相色谱仪、G1316A 系列柱温箱、G1314B 可变波长检测器、G1311C 系列泵系统均购自美国 Agilent 公司;pa2251 电子分析天平(德国赛多利斯公司);4020P 超声波清洗器(韩国 JAC 公司)等。

ICR 小鼠,清洁级,♀♂各半,110 只,由浙江省实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(浙)2014-0001]。豚鼠:普通级,♀♂随机,共 10 只,由无锡市惠山江甫实验动物场提供[动物

生产许可证号:SCXK(苏)2009-0005]。

2 方法与结果

2.1 样品及溶液的制备

2.1.1 样品的制备 取采集所得的样品 S1~S10,分别对半切开,60℃下烘干,粉碎,过 3 号筛。取粉末 10 g,精密称定,加适量甲醇,置具塞锥形瓶中,超声提取 2 次,每次 100 mL,过滤,合并滤液,减压浓缩,干燥,得到衢枳壳甲醇提取物,4℃冰箱保存,备用。

2.1.2 样品溶液的制备 取样品 10 g,精密称定,加适量甲醇,置具塞锥形瓶中,超声提取 2 次,收集提取液,减压浓缩,得到衢枳壳甲醇提取物,4℃冰箱保存,备用。精密称取衢枳壳甲醇提取物 5.0 mg,加甲醇溶解至 25 mL,备用。各样品用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得样品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取采集所得的样品 S1~S10,分别对半切开,60℃烘干,粉碎,过 3 号筛。取粉末 10 g,精密称定,加适量甲醇,置具塞锥形瓶中,超声提取 2 次,每次 100 mL,过滤,合并滤液,减压浓缩,干燥,得到衢枳壳甲醇提取物,4℃冰箱保存,备用。精密称取衢枳壳甲醇提取物 5.0 mg,加甲醇溶解至 25 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.1.4 混合对照品溶液的制备 分别精密称取 12 种对照品于合适的量瓶中,加入甲醇溶解定容,得到单个对照品储备液。精密移取适量对照品储备液于同一量瓶中,加入甲醇溶液稀释至刻度,最终得到每 1 mL 中含圣草次苷 36.22 μg、芸香柚皮苷 38.28 μg、柚皮苷 372.85 μg、柚皮素 28.56 μg、橙皮苷 34.48 μg、新橙皮苷 368.5 μg、水合橙皮内酯 1.86 μg、木犀草素 4.62 μg、橙皮内酯 4.16 μg、川陈皮素 1.22 μg、桔皮素 1.05 μg、橙皮油内酯 0.98 μg 的混合对照品溶液。

2.2 不同批次的衢枳壳样品指纹图谱的建立及方法学考察

2.2.1 色谱条件 采用 Agilent Extend C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液, B 相为乙腈,梯度洗脱(0~2 min, 10%B; 2~5 min, 10%→18%B; 5~10 min, 18%B; 10~25 min, 18%→20%B; 25~45 min, 20%→50%B; 45~65 min, 50%→100%B);流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 10 μL^[5]。峰面积外标法定量。理论板数按柚皮苷峰计算≥4 000,分离度均>1.5,对称因子

0.95~1.05。

2.2.2 仪器精密度试验 按“2.1.3”项下方法制备 S3 的供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,测得各色谱峰的相对保留时间 RSD 为 0.043%~0.180%,相对峰面积 RSD 为 0.211%~0.282%,表明仪器的精密度良好。

2.2.3 重复性试验 精密称取 S3 6 份,按“2.2.1”项下色谱条件测定,测得各色谱峰的相对保留时间 RSD 为 0.057%~0.504%,相对峰面积 RSD 为 1.202%~2.812%,表明方法的重复性良好。

2.2.4 稳定性试验 精密吸取衢枳壳甲醇提取物供试品溶液 10 μ L,按“2.2.1”项下色谱条件,分别在 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,测得各色谱峰的相对保留时间 RSD 为 0.057%~0.471%,相对峰面积 RSD 为 1.616%~2.981%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 指纹图谱的建立 按“2.2.1”项下的色谱条件建立 HPLC 色谱,将所得的色谱数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版),建立不同批次衢枳壳甲醇提取物的融合指纹图谱,对 10 批衢枳壳甲醇提取物指纹图谱的相关参数进行多点校正,完成全谱色谱峰的匹配,并以中位数法生成对照图谱。

2.3 LC-MS 分析

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Extend C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相 A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为乙腈,梯度洗脱(0~2 min, 10%B; 2~5 min, 10% \rightarrow 18%B; 5~10 min, 18%B; 10~25 min, 18% \rightarrow 20%B; 25~45 min, 20 \rightarrow 50%B; 45~65 min, 50 \rightarrow 100%B);流速 1.0 mL \cdot min⁻¹;进样量 5 μ L。

2.3.2 质谱条件 ESI 模式,正离子电压 3 kV,锥孔电压 60 V,源温 120 $^{\circ}$ C,脱溶剂气温度 500 $^{\circ}$ C,脱溶剂气体积流量 800 L \cdot h⁻¹;负离子电压 2.5 kV,锥孔电压 40 V,源温 120 $^{\circ}$ C,脱溶剂气温度 500 $^{\circ}$ C,脱溶剂气体积流量 800 L \cdot h⁻¹。

建立了不同批次衢枳壳甲醇提取物的指纹图谱,数据处理采用国家药典委员会提供的中药指纹图谱相似度评价软件对其进行相似度分析,并生成对照模式指纹图谱(记为 S 模)。确定了 10 批衢枳壳甲醇提取物的 HPLC 指纹图谱共有模式图,结果见图 1,并与混合对照品的色谱图及 LC-MS 二级质谱信息比对,指认出指纹图谱的各共有峰,确定了衢枳壳甲醇提取物中 12 个特征峰

的成分。衢枳壳甲醇提取物样品 LC-MS 的 TIC 图,结果见图 2,经分析 LC-MS 碎片信息,并与对照品数据比对,得到 12 个特征峰对应成分的化合物信息^[5-8],结果见表 1。以峰 1 为内标物,计算得到量化的色谱峰相对峰面积数据,按出峰顺序分别标记为 X₁, X₂, ……X₁₂,得出 10 批衢枳壳甲醇提取物样品的指纹图谱相似度数据,结果见表 2。

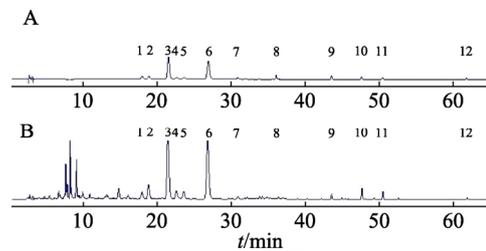


图 1 混合对照品(A)及提取物(B)的 HPLC 指纹图谱

1-圣草次苷; 2-芸香柚皮苷; 3-柚皮苷; 4-柚皮素; 5-橙皮苷; 6-新橙皮苷; 7-橙皮内酯水合物; 8-木犀草素; 9-橙皮内酯; 10-川陈皮素; 11-桔皮素; 12-橙皮油内酯。

Fig. 1 HPLC fingerprint for mixed standard(A) and extract(B) 1-eriocitrin; 2-narirutin; 3-naringin; 4-naringenin; 5-hesperidin; 6-neohesperidin; 7-meranzin hydrate; 8-luteolin; 9-meranzin; 10-nobiletin; 11-tangeretin; 12-auraptene.

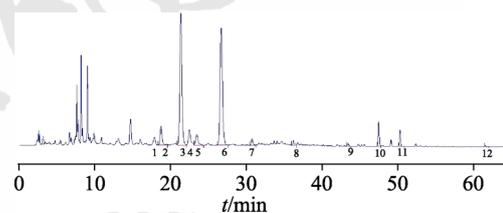


图 2 衢枳壳甲醇提取物的 TIC 图

1-圣草次苷; 2-芸香柚皮苷; 3-柚皮苷; 4-柚皮素; 5-橙皮苷; 6-新橙皮苷; 7-橙皮内酯水合物; 8-木犀草素; 9-橙皮内酯; 10-川陈皮素; 11-桔皮素; 12-橙皮油内酯。

Fig. 2 TIC chromatograms of Qu Aurantii Fructus methanol extract

1-eriocitrin; 2-narirutin; 3-naringin; 4-naringenin; 5-hesperidin; 6-neohesperidin; 7-meranzin hydrate; 8-luteolin; 9-meranzin; 10-nobiletin; 11-tangeretin; 12-auraptene.

表 1 衢枳壳甲醇提取物样品的化合物信息

Tab. 1 Compounds information of Qu Aurantii Fructus methanol extract

序号	t/min	母离子峰 (m/z)	子离子(主要碎片)(m/z)	推测化合物	分子式
1	18.88	595.0	287.2, 150.9	圣草次苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅
2	19.14	581.0	152.8, 146.9	芸香柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄
3	21.87	579.3	271.0, 151.0	柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄
4	22.56	271.1	151.0, 119.1	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
5	23.71	611.2	303.2, 177.0	橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅
6	26.85	609.2	301.0, 286.0	新橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅
7	31.09	278.3	260.2, 153.1, 67.1	水合橙皮内酯	C ₁₅ H ₁₈ O ₅
8	36.25	243.0	189.0, 130.9	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
9	43.84	260.2	188.7	橙皮内酯	C ₁₅ H ₁₆ O ₄
10	47.65	403.2	373.1, 353.7	川陈皮素	C ₂₁ H ₂₂ O ₈
11	50.43	373.2	357.5, 343.1	桔皮素	C ₂₀ H ₂₀ O ₇
12	61.95	298.3	173.5	橙皮油内酯	C ₁₉ H ₂₂ O ₃

表 2 10 批衢枳壳甲醇提取物的 HPLC 指纹图谱量化色谱峰的数据

Tab. 2 Quantitative fingerprint data of ten Qu Aurantii Fructus methanol extract HPLC fingerprint

样品 批次	相对峰面积												相似 度
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	
S1	1.00	1.34	9.67	1.19	1.18	12.34	0.04	0.05	0.10	0.17	0.05	0.03	0.946
S2	1.00	1.62	11.33	1.20	1.20	11.05	0.04	0.04	0.10	0.25	0.04	0.03	0.949
S3	1.00	1.63	10.65	1.17	1.17	10.37	0.04	0.04	0.08	0.16	0.05	0.03	0.970
S4	1.00	1.47	10.84	1.18	1.18	12.26	0.05	0.05	0.12	0.21	0.05	0.04	0.968
S5	1.00	1.39	7.98	1.20	1.20	8.92	0.04	0.06	0.12	0.22	0.07	0.04	0.938
S6	1.00	1.50	11.89	1.20	1.19	14.19	0.06	0.06	0.11	0.23	0.06	0.04	0.943
S7	1.00	1.46	10.41	1.17	1.17	11.85	0.04	0.05	0.09	0.15	0.05	0.03	0.969
S8	1.00	1.51	10.85	1.17	1.16	11.44	0.04	0.06	0.08	0.16	0.06	0.04	0.963
S9	1.00	1.60	7.72	1.15	1.15	7.23	0.03	0.03	0.07	0.13	0.03	0.02	0.935
S10	1.00	1.36	10.42	1.15	1.14	9.67	0.05	0.05	0.07	0.13	0.05	0.03	0.951
S模	1.00	1.49	10.18	1.18	1.17	10.93	0.04	0.05	0.09	0.18	0.05	0.03	1.000

2.4 不同批次的衢枳壳样品调节胃肠动力的药效实验

2.4.1 小鼠小肠炭末推进试验 取 ICR 小鼠, 体质量随机区组设计, 按不同的衢枳壳样品分组给药, 共分 11 组, 每组 10 只。按“2.1.1”项下方法制备衢枳壳甲醇提取物样品, 精密称取衢枳壳甲醇提取物 2.5 g 置量瓶中, 加 0.5%CMC-Na 溶液至 25 mL, 即得浓度为 0.10 g·mL⁻¹ 的衢枳壳甲醇提取物样品液, 拟灌胃给药, 正常组灌胃给予等体积的生理盐水。给药体积均按体质量折算为 10 mL·kg⁻¹。各组小鼠每日灌胃 1 次, 连续 1 周。末次给药 1 h 后, 将每只已禁食(不禁水)18 h 的小鼠灌胃给予炭末推进指示剂 0.8 mL, 20 min 后脱颈椎处死, 迅速取出小肠(幽门至回盲部), 轻轻剥离肠系膜后将小肠拉成直线, 测量小肠全长及幽门至黑色半固体糊前沿的距离, 计算各试验样品对小鼠小肠炭末推进率(Y₁)^[3], 药效数据见表 3。

2.4.2 豚鼠离体回肠收缩试验 取成年豚鼠 10 只, 制备豚鼠的离体回肠标本, 取近盲肠部约 10 cm 回肠, 置于盛有充好氧气的冷台式(Tyrode's)液中, 离体组织灌流, 调节恒温平滑肌槽, 将张力换能器与生物信号采集处理系统连接, 定标砝码 2.0 g, 张力负荷 1.0 g。通过计算机采集张力曲线, 采样间隔设定为 5 ms。各样品液的每个剂量均进行 10 次实验。通过计算机采集张力曲线, 计算各试验样品对豚鼠离体回肠收缩的效应值(Y₂)^[3], 药效数据见表 3。

2.5 谱效关系分析

2.5.1 谱效多元回归分析 利用 SPSS 软件中多元线性回归分析模块进行处理(保留 P<0.05 的各因素), 以量化色谱峰的相对峰面积数据为自变量(X), 以小肠炭末推进率和离体回肠收缩的效应值为应变量(Y₁, Y₂), 以多元线性回归法进行逐步回归,

表 3 10 批衢枳壳甲醇提取物调节胃肠动力的药效数据 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Tab. 3 Pharmacodynamic data of ten batches of Qu Aurantii Fructus methanol extract in regulating gastrointestinal motility ($\bar{x} \pm s$, n=10)

样品	调节胃肠动力药效数据	
	小肠炭末推进率(Y ₁)/%	离体回肠收缩的效应值(Y ₂)/cm
S1	62.87±9.78	0.71±0.17
S2	59.92±7.17	0.74±0.15
S3	59.17±7.06	0.67±0.11
S4	61.93±7.37	0.74±0.11
S5	55.14±7.70	0.63±0.12
S6	63.06±8.57	0.79±0.12
S7	60.57±4.18	0.72±0.13
S8	61.58±5.53	0.75±0.11
S9	53.85±8.43	0.61±0.12
S10	59.64±7.05	0.66±0.12

建立方程。筛选出对药效有显著贡献的色谱峰^[9-11], 建立调节胃肠动力的谱效方程, 结果见表 4。

2.5.2 双变量相关分析 采用 SPSS 软件中双变量相关分析, 得到各成分的相关系数及其 P 值。

有 5 个共有峰与药效数据呈现较大相关, 其中 2 个峰呈极显著相关。双变量相关分析的结果与谱效方程的结果一致, 结果见表 5。

表 4 谱效方程

Tab. 4 Spectral equations

应变量	谱效方程	R ²
小肠炭末推进率	$Y_1=52.379-0.255X_2+0.335X_3-4.499X_4+4.308X_5+0.750X_6$	0.959
离体回肠收缩效应值	$Y_2=0.250+0.0135X_2+0.0230X_3+0.0769X_6$	0.921

表 5 相对峰面积与药理数据的双变量相关分析

Tab. 5 Bivariate correlation analysis on areas of relative peak area and pharmacological data

峰号	化合物名称	小肠炭末推进率		离体回肠收缩效应值	
		相关系数	P 值	相关系数	P 值
2	芸香柚皮苷	-0.767	0.035	0.715	0.039
3	柚皮苷	0.826	0.003	0.893	0.001
4	柚皮素	0.726	0.028	0.609	0.028
5	橙皮苷	0.713	0.047	0.688	0.036
6	新橙皮苷	0.782	0.008	0.784	0.007
7	水合橙皮内酯	0.424	0.222	0.587	0.074
8	木犀草素	0.416	0.232	0.368	0.295
9	橙皮内酯	0.042	0.907	0.133	0.714
10	川陈皮素	0.170	0.639	0.320	0.368
11	桔皮素	0.406	0.232	0.367	0.294
12	橙皮油内酯	0.418	0.232	0.386	0.259

2.6 拟合方程的验证

课题组另行采集了常山不同基地的衢枳壳样品进行验证试验(记为 V_n), 按“2.2”和“2.3”项计算得到量化的色谱峰相对峰面积数据 X, 按“2.4”项实测得到药效数据 Y₁ 和 Y₂, 见表 6, 将 X 代入该拟合方程计算得到预测值 Y_f, 并将预测值 Y_f 与实测值 Y 进行比较, 计算拟合误差均<3.0%, 验证了谱效方程的适用性。

表 6 谱效方程的验证结果

Tab. 6 Verification results of spectral equations

样品	相对峰面积												实测值		预测值		拟合误差/%	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	Y_1	Y_2	Y_{1f}	Y_{2f}	Y_{1e}	Y_{2e}
V1	1	1.43	10.85	1.16	1.15	12.01	0.04	0.04	0.11	0.18	0.05	0.02	62.52±7.35	0.72±0.17	64.392 0	0.731 3	2.99	1.57
V2	1	1.57	11.18	1.23	1.21	12.42	0.04	0.03	0.12	0.25	0.05	0.02	63.07±6.17	0.73±0.12	64.717 9	0.748 0	2.61	2.47
V3	1	1.53	11.03	1.19	1.16	11.65	0.05	0.04	0.09	0.17	0.04	0.02	63.02±6.19	0.71±0.13	64.064 9	0.730 4	1.66	2.88
V4	1	1.49	10.96	1.18	1.28	11.99	0.04	0.06	0.09	0.16	0.06	0.05	63.62±6.26	0.72±0.14	64.868 6	0.734 3	1.96	1.99
V5	1	1.55	9.82	1.16	1.11	10.89	0.04	0.04	0.07	0.14	0.03	0.02	62.18±6.82	0.67±0.13	63.004 0	0.689 4	1.33	2.90
V6	1	1.49	9.91	1.19	1.13	11.42	0.05	0.05	0.08	0.19	0.05	0.02	62.09±6.58	0.68±0.12	63.398 1	0.700 1	2.11	2.95

3 讨论

笔者所在课题组前期将衢枳壳采用不同提取溶剂提取分别得到水煎物、乙酸乙酯提取物、甲醇提取物,发现甲醇提取物对调节胃肠动力的效果最佳,为进一步确定其中的主要有效成分,采用 LC-MS 进行成分指认。后期还将对甲醇提取物中所含的化合物进行提取、分离和结构鉴定,并分别检验各化合物对调节胃肠动力的影响,以便能更好地确认药效物质基础。

拟合方程中的 X_n 代表对应的成分,表明衢枳壳中相应色谱峰代表的化学成分能显著提高正常小鼠的小肠炭末推进率,并能显著抑制豚鼠离体回肠的自主收缩,考虑到在做拟合方程时,将各成分逐一加入计算并优化,在计算得出结果时发现,从数据上看增加成分后的药效数值增大,而且比简单的累加要大,推测这些成分可能发挥协同作用,课题组将进一步通过实验来验证其可能的协同效应。

因考虑到在做 HPLC 检测时采用紫外检测器可能会带来部分无紫外吸收的成分被忽略的问题,在此基础上做了质谱检测,使无紫外吸收的成分也能体现在色谱图上,并做了对比,发现 2 个检测器所检测的成分基本一致。

来自衢枳壳甲醇提取物的多个色谱峰与药理活性呈现较强的相关性,即芸香柚皮苷(峰 2)、柚皮苷(峰 3)、柚皮素(峰 4)、橙皮苷(峰 5)、新橙皮苷(峰 6)的相关系数均 $>0.6(P<0.05)$,其中峰 3、6 的相关系数最大,且呈现极显著($P<0.01$),推测相应峰所代表的化合物具有显著调节胃肠动力的作用,说明上述化合物确实对调节胃肠动力的作用有较大贡献。

双变量分析及多元回归分析是研究多变量相关性的有效手段,通过将色谱峰所代表的化学成分的信息与药效结果信息相关联,借助谱效相关的研究手段,可以为发现药效物质基础提供依据。在实验过程中,经多元线性回归,筛选出对调节胃肠动力有显著贡献的色谱峰,建立调节胃肠动力的谱效方程,从而依据谱效方程和特征图谱的

数据,计算得出调节胃肠动力的效应值,推测出样品对调节胃肠动力的效果,为衢枳壳的进一步开发提供参考。

REFERENCES

- [1] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范(2015 年版)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 180-182.
- [2] XU L P, SONG J F, ZHAO S Q, et al. Pharmacodynamic comparison of qi regulating and depression dispersing between *Citrus Changshan-Huyou* and *Aurantii Fructus* from different sources[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2016, 22(7): 156-160.
- [3] SONG J F, FENG J Q, HU J H, et al. Study on the dynamic changes of three contents in *Citrus Changshan Huyou* fruit in different growth periods[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2014, 31(12): 1474-1478.
- [4] 宋剑锋, 衢枳壳的合理采收及药用资源开发[Z]. 浙江省衢州市食品药品检验研究院, 2017-09-01. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?FileName=SNAD00001782920&DbName=SNAD2019>.
- [5] YUE C, MA L K, SONG J F, et al. Establishment of the HPLC fingerprints of *Citrus Changshan-Huyou* and analysis of its characteristic components[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2018, 35(8): 1217-1220.
- [6] FANG J, WU X N, JIANG J P, et al. Related analysis between antioxidant activities and HPLC fingerprint of flavonoids in *Citrus Changshan-huyou* Y. B. Peels[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2018, 35(10): 1489-1493.
- [7] MIN P, ZHAO Q C, GAO Y J, et al. The chemical constituents of *Citrus changshan-huyou* Y. B. Chang[J]. *Chin J Med Chem(中国药物化学杂志)*, 2010, 20(2): 129-132.
- [8] ZHAO X M, YE X Q, ZHU D Y. Isolation and identification of chemical constituents from peels of *Citrus Changshan-huyou* Y. B. Chang[J]. *J Peking Univ(Health Sci)(北京大学学报: 医学版)*, 2009, 41(5): 575-577.
- [9] XU P C, SHOU D, WU R J, et al. Study on the spectrum-effect relationship between GC-MS fingerprint and antioxidant activity of volatile oil from *atractylodis macrocephalae rhizoma*[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2019, 36(11): 1322-1327.
- [10] LYU S W, DONG S Y, GUO Y Y, et al. Advance in application of data analysis technique in spectrum-effect relationship of traditional Chinese medicines[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2015, 21(15): 226-230.
- [11] HAO P S, FAN J Y, GENG S Q, et al. Application progress of data analysis techniques in the research of antioxidant spectrum-effect relationship for traditional Chinese medicine[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2019, 36(7): 877-884.

收稿日期: 2021-11-16

(本文责编: 李艳芳)