

不同产地川佛手中 8 种化学成分的分析与评价

崔广林^{1,2,3}, 李隆云^{1,2,3*}, 谭 均^{1,2,3}, 张 应^{1,2,3}

¹重庆市中药研究院; ²重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心;

³中国中医科学院中药资源中心重庆分中心, 重庆 400065

摘要:建立 HPLC 法同时测定不同产地川佛手中木犀草素、6,7-二甲氧基香豆素、荜苈亭、5,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、橙皮苷、槲皮素、阿魏酸 8 种成分含量的方法。采用 Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.2% 冰醋酸水溶液进行梯度洗脱, 流速 1 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 322 nm。在该色谱条件下, 川佛手中 8 种成分分离良好, 平均加样回收率为 91.22% ~ 96.52%, RSD < 5.0%。不同产地的川佛手中 8 种成分含量存在差异, 部分成分之间存在相关性, 样品聚为 3 类。产于四川省宜宾市长宁县老翁镇的川佛手质量最优。该方法可为川佛手的资源开发利用、质量控制以及安全评价提供参考依据。

关键词:川佛手; HPLC; 含量测定; 相关性分析; 主成分分析; 聚类分析

中图分类号: R284.1; R914.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)2-0250-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.2.011

Analysis and evaluation of eight active ingredients in *Fructus Citris Sarcodactylis* from different regions

CUI Guang-lin^{1,2,3}, LI Long-yun^{1,2,3*}, TAN Jun^{1,2,3}, ZHANG Yin^{1,2,3}

¹Chongqing Academy of Chinese Materia Medica; ²Chongqing Engineering Research Center for

Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica; ³Chongqing Sub-center of

National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Chongqing 400065, China

Abstract: To establish a HPLC method for the simultaneous determination of Luteolin, 6,7-dimethoxycoumarin, Scopoletin, 5,7-dimethoxy coumarin, 7-hydroxy coumarin, Hesperidin, Quercetin, Ferulic acid in *Fructus citris sarcodactylis* from different regions. Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used, with methanol-0.2% glacial acetic acid as the mobile phases in gradient elution mode. The column temperature was 30 °C, with flow rate 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 322 nm. The eight kinds of active ingredients components in *Fructus citris sarcodactylis* were separated well in the chromatographic conditions. The average recoveries were between 91.22% -96.52%, RSD < 5.0%. There were differences in the contents of eight components in 48 species. There was a correlation between some active ingredients. The samples of medicinal materials from 48 producing area could be divided into 3 categories. The quality of *Fructus citris sarcodactylis* from Lao weng town, changning county, yibin city, sichuan province was the best. This study on active ingredients in *Fructus citris sarcodactylis* can be used to provide guidance for the quality control and safety evaluation.

Key words: *Fructus citris sarcodactylis*; HPLC; determination; correlation analysis; principal component analysis; cluster analysis

佛手是芸香科柑橘属植物佛手 (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle) 的干燥果实, 按其产地

主要分为川佛手、广佛手和浙佛手, 具有舒肝理气、和胃止痛、燥湿化痰的功效, 用于治疗肝胃气滞, 胸胁胀痛, 胃脘痞满, 食少呕吐, 咳嗽痰多等病症^[1]。川佛手主要分布在四川盆地边缘地区, 主产于四川合江、宜宾、沐川、犍为、乐山及重庆等地^[2]。佛手含香豆素、黄酮和酚酸等活性成分^[3], 其中香豆素类化合物包括 6,7-二甲氧基香豆素、荜苈亭、5,7-二

收稿日期: 2018-06-02 接受日期: 2018-12-18

基金项目: 重庆市现代特色效益中药材产业技术体系建设项目 (2017-[5]号); 重庆市科技研发基地项目 (cstc2014ptjdl0001); 国家中药材产业技术体系项目 (CARS-21); 重庆市中药材产业技术体系建设项目 (2018-[5]号)

* 通信作者 Tel: 86-23-89029118; E-mail: lilongyun8@163.com

甲氧基香豆素、7-羟基香豆素等,具有抗菌、抗肿瘤、平滑肌松弛、抗凝血和光敏等作用^[4]。黄酮类成分中,橙皮苷具有抗氧化、抗炎等药理活性^[5],《中国药典》(2015 版)将其作为药材质量控制的主要指标成分;槲皮素具有抗癌、抗氧化、抗纤维化和抗炎等作用^[6];木犀草素是一种天然黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化、消和保护神经系统等作用^[7]。酚酸类成分中,阿魏酸具有很强的抗氧化和抗炎活性^[8]。目前,人们对佛手化学成分进行了一些研究^[9-18],但多集中在广佛手和金佛手,且涉及指标较少。佛手药材现行质量标准较为简单,仅以单一成分橙皮苷为佛手药材的质量评价,难以全面反映药材真实品质。且川佛手的产地广泛,在不同生长环境和地理位置,可能导致其质量良莠不齐,成分有差异。为了更好的综合比较、评价不同产地川佛手的质量,本实验首次以木犀草素、6,7-二甲氧基香豆素、萹苳亭、5,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、橙皮苷、槲皮素、阿魏酸 8 种成分为指标,进行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,旨在为制定川佛手药材的质量标准提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 LC-20 AT 型 HPLC(包括 DGU-20 A5 检测器、LC-20 AT 泵、SIL-20 A 自动进样器、SPD-M20 A 二极管氙灯、CTO-20 A 柱温箱)(日本岛津公司),BS223 S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),GZX-GF 型电热恒温鼓风干燥箱(上海龙跃

仪器设备有限公司);KQ(250DB 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品木犀草素(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST(14120224,纯度 $\geq 99\%$)、6,7-二甲氧基香豆素(上海源叶生物有限公司,批号 15011524,纯度 $\geq 98\%$)、萹苳亭(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-14081804,纯度 $\geq 98\%$)、5,7-二甲氧基香豆素(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-14070501,纯度 $\geq 99\%$)、7-羟基香豆素(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-14120715,纯度 $\geq 98\%$)、橙皮苷(上海源叶生物有限公司,批号 14092432,纯度 $\geq 97\%$)、槲皮素(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST(14082610,纯度 $\geq 98\%$)、阿魏酸(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-14012214,纯度 $\geq 99\%$)冰醋酸和甲醇为色谱纯(TEDIA 公司),其余试剂为分析纯,水为纯净水。

1.3 样品

试验所用药材样品 2015 年采自川佛手主产区重庆和四川,共 48 份,采集地信息见表 1。每个采样点随机选择 10 株无明显病虫害的佛手植株,采集成熟果实后混匀,洗净表面的杂质,晾干,再切成薄片,置于电热恒温鼓风干燥箱中,50 °C 烘干打粉,过 60 目筛备用。全部样品均由重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定,为芸香科柑橘属植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle 的果实。

表 1 川佛手样品来源

Table 1 The origin of *Fructus citris sarcodactylis*

样品号 Sample No.	产地 Areas	样品号 Sample No.	产地 Areas
1	重庆市垫江县	25	四川省宜宾市屏山县富荣镇撕栗村
2	重庆市万州区甘宁镇	26	四川省宜宾市长宁县老翁镇
3	重庆市万州区新乡镇	27	四川省乐山市沐川县高笋乡
4	重庆市石柱县沿溪镇	28	四川省乐山市沐川县沐溪镇
5	重庆市石柱县黎场乡	29	四川省乐山市沐川县新凡乡
6	重庆市石柱县黎场乡秀才村	30	四川省乐山市沐川县炭库乡
7	重庆市梁平县城北乡两路村	31	四川省乐山市犍为县铁炉乡
8	重庆市梁平县礼让镇	32	四川省乐山市犍为县新民镇
9	重庆市梁平县复平乡	33	四川省石棉县新民乡
10	重庆市梁平县紫照乡	34	四川省石棉县草科乡
11	四川省合江县榕山镇	35	四川省石棉县田湾乡

续表 1 (Continued Tab. 1)

样品号 Sample No.	产地 Areas	样品号 Sample No.	产地 Areas
12	重庆市江津区石蟆镇	36	四川省石棉县天湾乡幸福村
13	四川省合江县白鹿镇	37	四川省泸定县得妥乡
14	四川省合江县石龙镇	38	四川省汉源县洪福乡
15	四川省安岳县龙台镇龙西村	39	四川省荣经县新添乡
16	四川省安岳县天马乡	40	四川省德阳市中江县太平乡
17	四川省合川县草街镇	41	四川省绵阳市安县花该镇
18	四川省宜宾市宜宾县蕨溪镇	42	四川省南充南部县永红乡
19	四川省宜宾市宜宾县蕨溪镇大坪村	43	四川省南充市顺庆区灯台乡
20	四川省宜宾市宜宾县蕨溪镇正华村	44	重庆市云阳县养鹿新合村
21	四川省宜宾市宜宾县蕨溪镇石坪村	45	重庆市云阳县龙角镇
22	四川省宜宾市宜宾县蕨溪镇后坝村	46	重庆市云阳县养鹿同发村
23	四川省宜宾市屏山县屏山镇金象村	47	重庆市云阳县养鹿桐林村
24	四川省宜宾市屏山县富荣镇撕栗村	48	重庆市云阳县养鹿中山村

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.2% 冰醋酸水溶液 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 90% A; 5 ~ 10 min, 90% ~ 75% A; 10 ~ 18 min, 75% A; 18 ~ 30 min, 75% ~ 70% A; 30 ~ 40 min, 70% ~ 60% A; 40 ~ 60 min, 60% ~ 30% A; 90% A, 保持 5 min), 流速 1 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C, 检测波长 322 nm。色谱图见图 1。

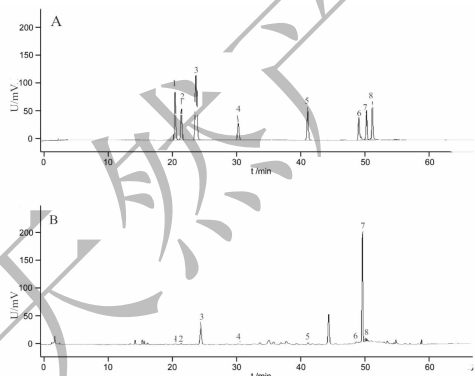


图 1 混合对照品 (A) 与样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards (A) and sample (B)

注: 1. 7-羟基香豆素 2. 苘蓉亭 3. 阿魏酸 4. 6,7-二甲氧基香豆素 5. 橙皮苷 6. 槲皮素 7. 5,7-二甲氧基香豆素 8. 木犀草素。

Note: 1. 7-hydroxy coumarin 2. Scopoletin 3. Ferulic acid 4. 6,7-dimethoxy coumarin 5. Hesperidin 6. Quercetin 7. 5,7-dimethoxy coumarin 8. Luteolin.

2.2 对照品溶液的制备

精密称取木犀草素、6,7-二甲氧基香豆素、苘蓉亭、5,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、橙皮苷、槲皮素、阿魏酸对照品各 3 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 静置, 得质量浓度为 0.3 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取佛手粉末 (过 100 目筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 密塞, 称定质量; 静置 1 h, 超声提取 40 min, 冷却, 称定质量, 用甲醇补足缺失的质量, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液, 即得。

2.4 线性关系的考察

精密吸取 2.2 项下木犀草素、6,7-二甲氧基香豆素、苘蓉亭、5,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、橙皮苷、槲皮素、阿魏酸对照品溶液各 1 mL, 置于 10 加容量瓶中, 定容至刻度, 混匀, 静置, 制样。分别以 4、8、12、16、20 μL 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以峰面积为 Y 纵坐标, 对照品含量 X 为横坐标进行线性回归, 各被测成分回归方程和线性范围见表 2。结果表明, 8 种成分在一定质量浓度范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取同一对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果木犀草素、6,7-二甲氧基香豆素、苘蓉亭、5,7-二甲氧基香豆素、7-羟

基香豆素、橙皮苷、槲皮素、阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 4.526%、2.946%、1.971%、2.455%、0.805%、3.728%、1.10%、1.321%，表明精密度较好。

表 2 川佛手中 8 种成分的线性关系考察

Table 2 Results of linear ranges of eight active ingredients in *Fructus citris sarcodactylis*

成分 Compound	保留时间 Retention time	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/mL}$)
木犀草素 Luteolin	20.484	$Y = 2.9412e-06X + 0.1090$	0.9998	1.987 ~ 9.941
6,7-二甲氧基香豆素 6,7-Dimethoxy coumarin	21.446	$Y = 2.9412e-06X + 0.1285$	0.9999	1.544 ~ 7.632
萸荭亭 Scopoletin	23.717	$Y = 2.9412e-06X + 0.0954$	0.9999	1.683 ~ 8.389
5,7-二甲氧基香豆素 5,7-Dimethoxy coumarin	30.311	$Y = 5.8824e-06X + 0.1087$	0.9999	1.785 ~ 8.923
7-羟基香豆素 7-Hydroxy coumarin	41.129	$Y = 8.8235e-06X + 0.0971$	0.9999	1.725 ~ 8.580
橙皮苷 Hesperidin	49.131	$Y = 4.4118e-06X + 0.3951$	0.9995	1.873 ~ 2.835
槲皮素 Quercetin	50.346	$Y = 2.9412e-06X + 0.1021$	0.9999	1.550 ~ 7.662
阿魏酸 Ferulic acid	51.196	$Y = 4.4118e-06X + 0.1865$	0.9997	1.961 ~ 9.800

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液,分别于 2、4、6、8、12 h 按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果木犀草素、6,7-二甲氧基香豆素、萸荭亭、5,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、橙皮苷、槲皮素、阿魏酸的峰面积的 RSD 分别为 4.514%、1.161%、2.148%、4.148%、0.941%、4.921%、1.303%、2.098%,说明供试品在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验

称取佛手粉末约 0.5 g,共 6 份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果木犀草素、6,7-二甲氧基香豆素、萸荭亭、5,7-二甲氧基香豆

素、7-羟基香豆素、橙皮苷、槲皮素、阿魏酸含量的 RSD 分别为 4.088%、3.048%、1.915%、4.427%、1.525%、4.936%、3.074%、3.103%,说明方法重复性好。

2.8 加样回收率试验

精密称取 35 号佛手样品 6 份,每份约 0.5 g,精密称取 7-羟基香豆素、萸荭亭、阿魏酸、6,7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、槲皮素、5,7-二甲氧基香豆素、木犀草素分别为 4、2、1.6、1.0、13.2、3.5、27.5、8.5 mg 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,加入混合标准品溶液 1 mL,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样检测,计算各成分的平均加样回收率,结果见表 3,表明本方法的回收率良好。

表 3 加样回收率试验结果

Table 3 Recoveries of eight components

成分 Component	样品中含量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Detected amount	回收率 Recovery	平均回收率 Average recovery	RSD
7-羟基香豆素 7-Hydroxy coumarin	0.4	0.40	0.76	91.21	91.96	1.84
	0.41	0.40	0.77	90.82		
	0.42	0.40	0.79	93.45		
	0.41	0.40	0.77	90.17		
	0.4	0.40	0.78	94.58		
	0.4	0.40	0.77	91.51		

续表 3(Continued Tab. 3)

成分 Component	样品中含量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Detected amount	回收率 Recovery	平均回收率 Average recovery	RSD
莨菪亭 Scopoletin	0.2	0.20	0.38	92.47	91.22	2.12
	0.21	0.20	0.39	90.87		
	0.2	0.20	0.38	87.85		
	0.19	0.20	0.37	90.56		
	0.2	0.20	0.38	92.41		
阿魏酸 Ferulic acid	0.2	0.20	0.39	93.15	93.29	4.91
	0.16	0.16	0.30	90.21		
	0.17	0.16	0.32	94.13		
	0.16	0.16	0.32	101.25		
	0.16	0.16	0.31	90.87		
6,7-二甲氧基香豆素 6,7-Dimethoxy coumarin	0.17	0.16	0.32	94.79	96.52	3.31
	0.16	0.16	0.30	88.49		
	0.1	0.10	0.20	96.51		
	0.11	0.10	0.21	98.14		
	0.1	0.10	0.19	93.48		
橙皮苷 Hesperidin	0.1	0.10	0.19	92.76	93.53	2.66
	0.1	0.10	0.20	101.51		
	0.1	0.10	0.20	96.72		
	1.32	1.32	2.59	96.54		
	1.33	1.32	2.55	92.78		
槲皮素 Quercetin	1.32	1.32	2.59	96.42	93.12	2.31
	1.31	1.32	2.51	90.76		
	1.32	1.32	2.55	93.46		
	1.32	1.32	2.52	91.22		
	0.35	0.35	0.69	96.66		
5,7-二甲氧基香豆素 5,7-Dimethoxy coumarin	0.36	0.35	0.69	95.2	96.36	4.52
	0.35	0.35	0.69	97.41		
	0.35	0.35	0.65	86.74		
	0.35	0.35	0.66	89.54		
	0.35	0.35	0.68	93.15		
木犀草素 Luteolin	2.75	2.75	5.40	96.51	93.08	2.28
	2.75	2.75	5.38	95.74		
	2.75	2.75	5.45	98.14		
	2.75	2.75	5.32	93.48		
	2.75	2.75	5.30	92.76		
	2.75	2.75	5.54	101.51	93.08	2.28
	0.85	0.85	1.65	94.52		
	0.86	0.85	1.65	93.13		
	0.85	0.85	1.62	90.75		
	0.85	0.85	1.67	96.42		
	0.85	0.85	1.63	91.21	93.08	2.28
	0.85	0.85	1.64	92.45		

2.9 样品含量测定

按“2.3”项下的方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,测定不同产地川佛手样品中7-羟基香豆素、苕荭亭、阿魏酸、6,7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、槲皮素、5,7-二甲氧基香豆素、木犀草素的含量。

试验结果表明,48批来自不同产地的川佛手药材中8种有效成分的含量存在差异,其中5,7-二甲氧基香豆素和橙皮苷在样品中含量较高,6,7-二甲氧基香豆素在样品中含量较低。具体如表4所示。

表4 48个产地川佛手中8种成分含量测定结果(mg/g, n=3)

Table 4 Contents of eight components from 48 habitats of *Fructus citris sarcodactylis* (mg/g, n=3)

样品号 Sample No.	7-羟基香豆素 7-hydroxy coumarin	苕荭亭 Scopoletin	阿魏酸 Ferulic acid	6,7-二甲氧基香豆素 6,7-Dimethoxy coumarin	橙皮苷 Hesperidin	槲皮素 Quercetin	5,7-二甲氧基香豆素 5,7-Dimethoxy coumarin	木犀草素 Luteolin
1	0.35	0.19	0.21	0.06	2.18	0.31	5.84	0.84
2	0.50	0.18	0.17	0.10	2.04	0.26	13.70	1.19
3	0.29	0.31	0.33	0.07	2.05	0.21	5.42	1.00
4	0.55	0.23	0.27	0.10	2.28	0.37	15.75	0.80
5	0.31	0.30	0.72	0.14	5.05	0.43	6.41	0.57
6	0.18	0.17	0.17	0.05	0.73	0.21	5.76	0.77
7	0.30	0.16	0.71	0.11	2.76	0.29	18.26	0.81
8	0.36	0.24	0.31	0.08	2.19	0.31	7.63	0.87
9	0.47	0.29	0.18	0.11	2.43	0.32	8.03	0.82
10	0.41	0.23	0.18	0.09	1.32	0.37	16.50	0.88
11	0.32	0.14	0.23	0.06	1.27	0.29	9.52	0.58
12	0.29	0.10	0.23	0.06	0.91	0.24	14.26	0.88
13	0.44	0.33	0.18	0.05	1.09	0.39	2.50	0.94
14	0.30	0.14	0.21	0.05	1.11	0.28	8.73	0.85
15	0.44	0.16	0.43	0.18	1.80	0.40	7.71	0.85
16	0.64	0.20	0.26	0.25	3.99	0.19	7.42	0.77
17	0.45	0.18	0.31	0.09	1.93	0.31	3.36	0.90
18	0.65	0.31	0.42	0.19	2.33	1.04	10.08	0.79
19	0.59	0.25	0.24	0.31	5.46	0.24	6.85	0.94
20	0.83	0.10	0.22	0.11	5.63	0.84	7.61	0.22
21	1.14	0.13	0.15	0.32	5.52	1.17	13.31	0.76
22	1.22	0.23	0.72	0.44	7.08	0.70	14.85	0.47
23	0.58	0.12	0.16	0.09	2.14	0.46	10.76	0.64
24	1.01	0.27	0.49	0.19	5.48	0.68	18.12	0.75
25	1.00	0.28	0.45	0.20	6.00	0.75	20.68	0.98
26	1.60	0.29	1.17	0.78	3.95	1.07	20.80	0.49
27	0.75	0.41	0.53	0.24	3.67	0.72	6.09	0.32
28	0.84	0.22	0.21	0.37	4.70	0.33	11.39	0.44
29	0.62	0.22	0.33	0.20	8.73	0.41	3.53	0.24
30	0.96	0.36	0.83	0.39	5.82	0.85	7.96	0.58
31	0.84	0.26	0.28	0.28	3.85	0.58	10.93	0.41
32	0.99	0.13	1.57	0.45	8.33	1.06	22.55	0.59
33	0.92	0.31	0.33	0.12	2.86	0.56	3.32	0.50
34	0.45	0.10	0.62	0.15	3.33	0.47	3.42	0.45

2.11 同产地川佛手品质的主成分分析

2.11.1 主成分分析

以 48 份川佛手药材的 8 种化学成分检测结果为基础,通过 DPS v16.05 数据处理系统,采用主成分分析法得到各个主成分的特征值、方差贡献率、累计方差贡献率及对应的特征向量(表 6)。其中特征值表示了对应主成分能够描述原有信息的多少,由表 6 可知主成分 1 和主成分 2 特征值均大于 1,其中第 1 主成分的方差贡献率为 49.53%,第 2 主成分的方差贡献率为 15.59%,累计方差贡献率达 65.12

%,具有较强的信息代表性,因此,提取前 2 个主成分代替原 8 个成分指标评价川佛手药材的品质,以达到降维的目的。决定第一主成分大小的主要是 6,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、槲皮素和橙皮苷 4 个性状分量,其中 6,7-二甲氧基香豆素特征向量达 0.447,是佛手药材质量分级的最主要指标。决定第二主成分大小的主要是木犀草素和 5,7-二甲氧基香豆素。由此可以看出,6,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、槲皮素、橙皮苷、木犀草素和 5,7-二甲氧基香豆素 6 种成分是川佛手的特征成分。

表 6 8 个主成分的特征向量、特征值、贡献率及累积贡献率

Table 6 The eigenvector, eigenvalue, account and total account of 8 PCAs

项目 Item	主成分 1 Component 1	主成分 2 Component 2	主成分 3 Component 3	主成分 4 Component 4	主成分 5 Component 5	主成分 6 Component 6	主成分 7 Component 7	主成分 8 Component 8
7-羟基香豆素 7-Hydroxy coumarin	0.443	0.053	0.006	-0.411	-0.237	-0.283	-0.011	0.704
莨菪亭 Scopoletin	0.180	-0.082	0.938	0.161	-0.029	0.065	-0.223	-0.008
阿魏酸 Ferulic acid	0.341	0.059	-0.144	0.788	0.334	-0.099	0.133	0.317
6,7-二甲氧基香豆素 6,7-Dimethoxy coumarin	0.447	0.001	-0.011	-0.164	0.255	-0.639	-0.002	-0.548
橙皮苷 Hesperidin	0.390	-0.232	0.009	-0.337	0.510	0.576	0.297	-0.017
槲皮素 Quercetin	0.416	0.089	-0.040	0.172	-0.681	0.231	0.426	-0.298
5,7-二甲氧基香豆素 5,7-Dimethoxy coumarin	0.278	0.663	-0.151	-0.034	0.046	0.320	-0.586	-0.108
木犀草素 Luteolin	-0.230	0.697	0.273	-0.118	0.199	-0.103	0.565	0.055
特征值 Eigenvalue	3.962	1.247	0.943	0.725	0.451	0.322	0.258	0.092
贡献率(%) Account	49.527	15.591	11.789	9.058	5.640	4.019	3.223	1.153
累计贡献率(%) Total account	49.527	65.118	76.907	85.965	91.605	95.624	98.847	100

2.11.2 不同产地川佛手品质的综合评价

以特征向量为权重构建 2 个主成分的表达函数式:

$$F_1 = 0.443X_1 + 0.180X_2 + 0.341X_3 + 0.447X_4 + 0.390X_5 + 0.416X_6 + 0.278X_7 - 0.230X_8$$

$$F_2 = 0.053X_1 - 0.082X_2 + 0.059X_3 + 0.001X_4 - 0.232X_5 + 0.089X_6 + 0.663X_7 + 0.697X_8$$

2 个表达式中, X_1 为 7-羟基香豆素、 X_2 为莨菪亭、 X_3 为阿魏酸、 X_4 为 6,7-二甲氧基香豆素、 X_5 为橙皮苷、 X_6 为槲皮素、 X_7 为 5,7-二甲氧基香豆素、 X_8 为木犀草素。

以各个主成分对应的方差贡献率作为权重,由

主成分得分和对应的权重线性加权求和得到综合评价函数。

$$F = 0.495Z_1 + 0.156Z_2$$

根据主成分综合得分模型,可计算出 48 个产地川佛手的综合得分值和排序结果(表 7)。综合排序的名次越前,表明就该 8 项指标而言,该样品的质量较好,反之,质量就较差。四川省宜宾市长宁县老翁镇(26 号)佛手样品综合得分最高,药材质量最优,其次为四川省乐山市犍为县新民镇(32 号)佛手样品,重庆市云阳县养鹿新合村(44 号)佛手样品综合得分最低,药材质量最差。

表 7 主成分得分、综合得分及排序

Table 7 Principal components scores and sort results of the samples

样品号 Sample No.	F ₁	F ₂	综合得分 F Comprehensive F	排序 Sorting
1	-1.8582	0.2015	-0.888	42
2	-1.6569	2.2766	-0.465	33
3	-1.8795	0.5286	-0.848	39
4	-0.6363	1.2967	-0.113	23
5	0.1728	-0.8386	-0.045	21
6	-2.5616	0.0704	-1.257	47
7	-0.5131	1.6724	0.007	19
8	-1.4939	0.4854	-0.664	35
9	-1.1623	0.2994	-0.529	34
10	-1.1824	1.6951	-0.321	27
11	-1.7181	-0.0315	-0.855	40
12	-2.0573	1.5377	-0.778	37
13	-1.8320	0.1213	-0.888	41
14	-2.1641	0.7239	-0.958	43
15	-0.9994	0.6204	-0.398	30
16	-0.5010	-0.0020	-0.248	25
17	-1.7585	0.1617	-0.845	38
18	0.9312	0.7705	0.581	10
19	-0.1707	0.2661	-0.043	20
20	0.9644	-1.5295	0.239	14
21	2.2747	0.9883	1.280	6
22	3.5532	-0.0197	1.756	3
23	-0.9620	0.3246	-0.426	32
24	1.8594	1.2883	1.121	8
25	1.9447	2.2702	1.317	5
26	6.1378	1.3149	3.243	1
27	1.5797	-1.4906	0.549	11
28	1.0275	-0.5742	0.419	13
29	0.9633	-2.5570	0.078	17
30	2.9970	-0.4792	1.409	4
31	1.1738	-0.5768	0.491	12
32	5.1097	1.5177	2.766	2
33	0.2709	-1.1499	-0.045	22
34	-0.4108	-1.1883	-0.389	29
35	2.7348	-1.9293	1.053	9
36	-0.5821	-0.7361	-0.403	31
37	-2.3906	-0.1131	-1.201	45
38	-0.2938	-1.3842	-0.361	28

续表 7 (Continued Tab. 7)

样品号 Sample No.	F ₁	F ₂	综合得分 F Comprehensive F	排序 Sorting
39	0.0364	0.4268	0.085	16
40	-2.0861	-1.3845	-1.249	46
41	-0.2245	-1.0456	-0.274	26
42	2.5872	-0.0962	1.266	7
43	-0.1942	-0.8756	-0.233	24
44	-2.4986	-1.1005	-1.408	48
45	0.5011	-1.1786	0.064	18
46	0.4887	-0.8708	0.106	15
47	-2.1775	0.6647	-0.974	44
48	-1.3431	-0.3714	-0.723	36

2.12 不同产地佛手化学成分的聚类分析

聚类分析是将样品按照品质特性相似程度逐渐聚合在一起,相似度最大的优先聚合在一起,最终按照类别的综合性质的多个品种聚合,从而完成聚类分析的过程^[19]。而系统聚类则是把相似的样品或变量归类的有效方法。因此,本实验使用 SPSS Statistics 20 对不同产地川佛手中 7-羟基香豆素、萜萜亭、阿魏酸、6,7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、槲皮素、5,7-二甲氧基香豆素、木犀草素的含量测定结果进行系统聚类,以 8 种有效成分含量为聚类的变量,采用平方欧氏距离(squared Euclidean distance)获得聚类分析树状图,结果见图 2。由图 2 可知,当阈值为 10 时,48 个不同产地川佛手样品被聚为 3 类,其中 1、47、3、48、6、33、34、38、41、36、17、40、44、13、37、16、43、27、20、30、45、46、5、19、8、15、9、11、14、18、23、31、39、28 聚为一类,该类样品主要产自四川大部分地区及重庆市云阳县,样品特征为各化学成分含量较平均;29(四川省乐山市沐川县新凡乡)、35(四川省石棉县田湾乡)聚为一类,该类特征为橙皮苷含量较高;25、26、7、24、32、22、42、21、4、10、2、12 聚为一类,该类样品主要产自四川省宜宾市及重庆少部分地区,样品特征为 5,7-二甲氧基香豆素和木犀草素含量较高。

3 讨论

佛手为 2015 年版中国药典收载品种,其含量测定项下以橙皮苷含量为考察指标。本研究采集了 48 个川佛手产区的药材样品,采用 HPLC 技术同时测定了 7-羟基香豆素、萜萜亭、5,7-二甲氧基香豆素、6,7-二甲氧基香豆素、槲皮素、橙皮苷、阿魏酸和

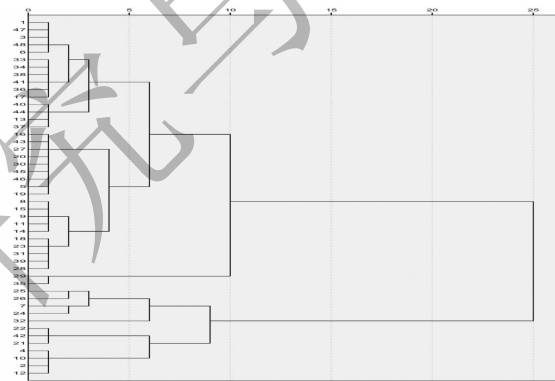


图 2 48 批川佛手样品的聚类树状图

Fig. 2 Results of dendrogram from 48 batches *Fructus Citris Sarcodactylis*

木犀草素共 8 个化学成分指标,该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于川佛手药材中 8 种成分含量的同时测定,可以为全面评价川佛手药材的质量提供一种切实可行的参考根据。在实验中,通过全波长扫描(190~400 nm)确定了 8 种待测成分在 322 nm 处均有最大吸收。在最大波长下测定,提高了检测的灵敏度,另外,在同一波长条件下完成川佛手中 8 种成分的含量测定,方法快捷。

相关性分析旨在研究 2 个变量之间的变化趋势,本研究对川佛手药材中的 8 个成分进行了相关性分析,由相关性分析结果可知,7-羟基香豆素、6,7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、槲皮素、5,7-二甲氧基香豆素和阿魏酸之间显著正相关,表明此类化学成分可能在川佛手生长过程中存在内在的相关关系。

主成分分析是一种多指标的综合评价方法,旨在利用降维的思想把多指标转化为少数几个综合指

标,现已广泛用于中药研究领域^[20]。本研究以 48 份川佛手药材的 8 种化学成分检测结果为基础,采用主成分分析法得到 2 个主成分因子。决定第一主成分大小的主要是 6,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、槲皮素和橙皮苷 4 个性状分量,其中 6,7-二甲氧基香豆素是佛手药材质量分级的最主要指标。决定第二主成分大小的主要是木犀草素和 5,7-二甲氧基香豆素。因此,建议使用 6,7-二甲氧基香豆素、7-羟基香豆素、槲皮素、橙皮苷、木犀草素和 5,7-二甲氧基香豆素 6 个指标作为川佛手质量标准的评价指标,从而进一步弥补其药典中单一橙皮苷成分进行质量检测的不足。

本研究结果显示,48 份药材样品的橙皮苷含量都达到 0.003% 的《中国药典》标准。不同产地川佛手药材具有一定的差异性,其中 5,7-二甲氧基香豆素和橙皮苷在样品中含量较高,6,7-二甲氧基香豆素在样品中含量较低。7-羟基香豆素含量最高的为四川省宜宾市长宁县老翁镇(26 号样品);萹苣亭含量最高为四川省乐山市沐川县高笋乡(27 号样品);阿魏酸含量最高为四川省乐山市犍为县新民镇(32 号样品);6,7-二甲氧基香豆素含量最高为四川省宜宾市长宁县老翁镇(26 号样品);橙皮苷含量最高为四川省石棉县田湾乡(35 号样品);槲皮素含量最高为四川省宜宾市宜宾县蕨溪镇石坪村(21 号样品);5,7-二甲氧基香豆素含量最高为四川省乐山市犍为县新民镇(32 号样品);木犀草素含量最高为重庆市万州区甘宁镇(2 号样品)。

聚类分析是一种可将一组数据按照本身内在的规律较合理地分为几类的探索性的分类方法,此方法可以大大缩小了以往全凭主观判断所造成的误差,使数据分析结果客观性更强^[21]。本文以 8 种化学成分的含量为指标对 48 个不同产地的川佛手样品进行聚类分析,聚类分析结果将不同产地分为 3 类:29(四川省乐山市沐川县新凡乡)、35(四川省石棉县田湾乡)归为一类,该类特征为橙皮苷含量较高;25、26、7、24、32、22、42、21、4、10、2、12 归为一类,该类样品主要产自四川省宜宾市及重庆部分地区,样品特征为 5,7-二甲氧基香豆素和木犀草素含量较高;其余产地归为第三类,该类样品主要产自四川大部分地区及重庆市云阳县,样品特征为各化学成分含量较平均。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the

- People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:178.
- Zhang GF, Xu HH. Survey of research on germplasm resources of *Citrus medica* var. *Sarcodactylis* [J]. J Guangzhou Univ TCM (广州中医药大学学报), 2007, 24:69-72.
 - Zhao XL. Research progress of physiologically active compounds of bergamot [J]. Sci Tech Food Ind (食品工业科技), 2012, 33:393-399.
 - Yin F, Lou FC. Studies on the constituents of *Citrus medica* L. var. *Sarcodactylis* [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2004, 39:20-21.
 - Zeng JW, Wu JZ, Lin ZN, et al. Determination of hesperidin in *Fructus Citris Sarcodactylis* from different provenances by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2012, 18(19):97-99.
 - Zhang ZQ, Zhu SX. Research progress on pharmacological activities and clinical application of quercetin [J]. J Pharm Res (药学研究), 2013, 32:400-403.
 - Wang JS, He Y, Zhang WJ, et al. Advances in studies on pharmacological effects of luteolin [J]. Life Sci (生命科学), 2013, 25:560-565.
 - Zou QF, Ma K, Lu R. Research progress in pharmacokinetic study on ferulic acid [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2013, 36:297-301.
 - Yin F, Cheng L, Lou FC. Studies on the constituents of *Citrus medica* L. var. *Sarcodactylis* (Noot.) Swingle [J]. Chin J Nat Med (中国天然产物), 2004, 2:149-151.
 - Gao YH, Huang HB, Xu HH, et al. Studies on the chemical constituents of *Citrus medica* var. *Sarcodactylis* [J]. Chin Med Mat (中药材), 2002, 25:639-640.
 - Cui HH, Gao YH, Liang SL, et al. Chemical constituents of *Citrus medica* var. *Sarcodactylis* from Sichuan province (I) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2007, 38:1304-1306.
 - Cui HH, Gao YH, Cai HF, et al. Study on chemical constituents of *Citrus medica* var. *Sarcodactylis* from Sichuan provenance (II) [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharm (中药新药与临床药理), 2009, 20:344-347.
 - Zhao L, Ji BP, Zhou F, et al. Study on chemical compositions of 12 volatile oils from Bergamots [J]. Food Sci (食品科学), 2006, 27:179-184.
 - Zhang RFGao YH, Cui HH, et al. Fingerprints of *Fructus citri Sarcodactylis* from guangdong by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2007, 38:1075-1077.
 - Lin LW, Jiang L, Hao DQ, et al. Determination of 5,7-dimethoxycoumarin in *Fructus citri Sarcodactylis* from Guangdong at different collecting times [J]. Res Pract Chin Med (现代中药研究与实践), 2009, 22(6):15-17.

(下转第 324 页)