

多成分含量测定结合网络药理学识别湘枳壳种质资源品质评价的质量标志物

杨莉^{1,2}, 唐其^{1,2}, 范明慧^{1,3},
王燕^{1,2}, 张睿胤^{1,2}, 周铁³, 陈鹏^{3*}, 郑亚杰^{1,2*}

¹湖南农业大学园艺学院; ²国家植物功能成分利用工程技术研究中心; ³湖南省农业科学院园艺研究所, 长沙 410128

摘要: 建立多指标成分的色谱定量分析方法, 结合网络药理学、分子对接技术和多变量统计分析从“谱-效”关系找出用于湘枳壳种质资源品质评价的质量标志物 (quality marker, Q-Marker)。采用高效液相色谱法、顶空固相微萃取-气相色谱法对湖南省多个县市枳壳种质资源样本进行含量测定; 对多指标成分进行靶点搜集和网络药理学分析, 构建“成分-靶点-通路”网络, 并预测候选 Q-Marker 和核心作用靶点; 通过分子对接技术对配体与受体结合活性进行理论模拟找出关键 Q-Marker, 借助主成分荷载因子分子和聚类分析挖掘出区分枳壳种质资源样本的 Q-Marker。结果表明种质资源样本以柚皮苷、新橙皮苷和 D-柠檬烯含量最高, 各目标化合物的含量差异波动较大; 橘皮素等 7 个候选 Q-Marker 通过 PI3K/AKT 和 RAS/MAPK 通路的 PIK3CD 等 7 个核心靶点发挥抗氧化、抗炎等作用, 它们之间的分子对接活性良好; 多变量统计分析表明柠檬苦素等 5 个 Q-Marker 可用于区分种质资源样本, 它们有类群特异性, 但样本间差异与地域无关。该方法可对湘枳壳种质资源进行品质评价, 为品种选育提供参考。

关键词: 湘枳壳种质资源; 质量标志物; 色谱法; 网络药理学; 分子对接技术; 多变量统计方法

中图分类号: R282.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)12-2102-15

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.12.011

Screening of quality markers for the quality evaluation of Hunan Aurantii Fructus germplasm resources based on multicomponent quantitative analysis combined with network pharmacology

YANG Li^{1,2}, TANG Qi^{1,2}, FAN Ming-hui^{1,3},
WANG Yan^{1,2}, ZHANG Rui-yin^{1,2}, ZHOU Tie³, CHEN Peng^{3*}, ZHENG Ya-jie^{1,2*}

¹College of Horticulture, Hunan Agricultural University; ²National Research Center of Engineering and Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients; ³Hunan Horticultural Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences Changsha 410128, China

Abstract: The study aims to identify quality markers (Q-Markers) for the evaluation of Hunan Aurantii Fructus (HAF) germplasm resources based on the "spectrum-efficacy" correlation by the establishment of chromatographic quantitative analysis of multiple components, combining network pharmacology, molecular docking technology, and multivariate statistical analysis. High performance liquid chromatography and headspace solid-phase microextraction-gas chromatography were used to perform content determination of germplasm resource samples from counties and cities in Hunan. Target collection and network pharmacology analysis were carried out on multi-components to construct a "component-target-pathway" network and predict candidate Q-Markers and core targets. Molecular docking technology was used to theoretically simulate the binding activity of ligands and receptors to identify key Q-Markers. Principal component loading factor analysis and cluster analysis were utilized to excavate Q-Markers that distinguish HAF germplasm resource samples. The results showed that the germplasm resource samples had the highest contents of naringin, neohesperidin, and D-limonene, with significant fluctuations in the content differ-

收稿日期: 2024-04-26

接受日期: 2024-09-10

基金项目: 湖南省农业科技创新资金 (2023CX71, 2023CX23); 湖南省自然科学基金面上项目 (2020JJ4357)

* 通信作者 E-mail: chenpeng@hunaas.cn; zhengyj4@126.com

ences of each target compound. Seven candidate Q-Markers, including tangeretin, exerted antioxidant and anti-inflammatory effects through seven core targets such as PIK3CD in the PI3K/AKT and RAS/MAPK pathways, demonstrating good molecular docking activity among them. Multivariate statistical analysis indicated that five Q-Markers, including limonin, could be used to differentiate germplasm resource samples. These markers were group-specific, while the differences between samples were unrelated to geography. This method can evaluate the quality of HAF germplasm resources and furnishing a valuable tool for variety selection and breeding initiatives.

Key words: Hunan *Aurantii Fructus* germplasm resources; quality markers; chromatography; network pharmacology; molecular docking; multivariate statistical analysis

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],富含黄酮、生物碱和挥发油等化合物,具有抗抑郁^[2]、抗炎^[3]、降血脂^[4]、调节胃肠功能^[5]、抗肿瘤^[6]等作用。在湖南、江西、四川等长江流域及以南地区广泛分布,湖南枳壳销往全国各地和大量出口,产量占全国总产量的40%~60%以上,习称湘枳壳 (*Hunan Aurantii Fructus*, HAF)^[7]。湘枳壳不同产地、不同批次药材的化学成分含量存在差异,且目标成分的色谱峰强度变化与产地有关联^[8-10],而指纹图谱技术或多指标定量分析多是从化学角度出发,所选枳壳药材的检测指标未能兼顾“谱-效”之间的关联性。

中药质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 指与中草药安全性和有效性密切相关的化合物^[11],可通过文献预测、成分特有性结合网络药理学、多组分多组学等进行梳理^[12-14]。网络药理学在生物信息学、系统生物学和药理学基础上兴起,具有系统性和整体性特点,通过构建药材化学成分与其潜在靶点的相互作用网络,系统地预测靶点的作用通路和作用机制,实现 Q-Marker 的理论筛选^[5,15]。枳壳种质资源样本未规模化种植,通常样品偏少无法利用动物试验开展“谱-效”关系研究。本研究通过高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 和气相色谱法 (gas chromatography, GC) 多指标定量分析方法,结合网络药理学和分子对接技术从“谱-效”关系维度筛选出湘枳壳药材的候选 Q-Marker,借助多变量统计分析挖掘可用于湘枳壳种质资源区分的关键 Q-Marker,以期为湘枳壳品种选育及品质评价供技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

研究用湘枳壳样本药材收集自湖南省郴州市永兴县等多个县市 (见表1),作为种质资源栽种在湖南省农业科学院园艺研究所资源圃,经陈鹏副研究

员鉴定为黄皮酸橙 (*Citrus aurantium* 'Huangpi'),属于《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2020年版一部枳壳药材的法定来源酸橙 (*Citrus aurantium* L.) 的栽培变种。

1.2 仪器与试剂

UltiMate 3000 高效液相色谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); GC-2010 气相色谱仪 (日本岛津公司); 固相微萃取装置,包括固相微萃取手动进样手柄、50/30 μm -DVB/CAR-PDMS 萃取纤维针头 (上海安普实验科技股份有限公司); 顶空样品瓶 (上海安普实验科技股份有限公司); SB-3200DT 超声波仪 (上海巴玖实业有限公司); XS205 分析天平 (德国 METTLER TOLEDO 公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水制备系统 (美国 MILLIPORE 公司)。

芸香柚皮苷 (纯度为 98.0%)、柚皮苷 (纯度为 98.1%)、橘皮素 (纯度为 99.3%)、枸橼苷 (纯度为 99.4%)、柚皮素 (纯度为 99.0%)、橙皮素 (纯度为 98.0%)、川陈皮素 (纯度为 98.0%)、柠檬苦素 (纯度为 97.9%)、橙皮油素 (纯度为 99.9%)、橙皮苷 (纯度为 95.3%)、新橙皮苷 (纯度为 98.0%)、芦丁 (纯度为 98.0%)、圣草次苷 (纯度为 99.7%) (上海诗丹德科技有限公司); β -月桂烯 (纯度为 99.4%)、*D*-柠檬烯 (纯度为 99.1%)、 β -蒎烯 (纯度为 98.3%)、 α -石竹烯 (纯度为 91.7%)、 α -松油醇 (纯度为 97.2%)、香叶醇 (纯度为 92.7%)、4-萜品醇 (纯度为 96.2%)、芳樟醇 (纯度为 99.9%) (上海诗丹德科技有限公司); 乙腈、甲醇 (色谱纯,安徽天地高纯溶剂有限公司); 水 (超纯水,实验室自制)。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

将采摘的鲜果进行切半,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风干燥,粉碎,过 10 目筛,密闭保存,备用。

1.3.2 供试品和对照品溶液的制备

1.3.2.1 HPLC 分析用溶液

供试品溶液:精密称取上述粉碎后的枳壳样品各约 10 mg,精密加入 60% 乙醇 4 mL,称定,70 $^{\circ}\text{C}$ 水

浴超声处理 20 min,冷却至室温后用 60% 乙醇补足 损失重量,取上清液过 0.22 μm 有机膜,备用。

表 1 湘枳壳种质资源的产地信息

Table 1 Information on the origin of Hunan Aurantii Fructus germplasm resources

编号 No.	产地 Origin	编号 No.	产地 Origin
S1	湖南省郴州市永兴县	S15	湖南省郴州市嘉禾县
S2	湖南省益阳市沅江市	S16	湖南省衡阳市衡东县
S3	湖南省湘潭市湘乡市	S17	湖南省怀化市洪江市
S4	湖南省邵阳市新邵县	S18	湖南省岳阳市华容县
S5	湖南省张家界市桑植县	S19	湖南省常德市汉寿县
S6	湖南省永州市祁阳县	S20	湖南省怀化市会同县
S7	湖南省长沙市宁乡市	S21	湖南省衡阳市衡阳县
S8	湖南省益阳市南县	S22	湖南省郴州市桂阳县
S9	湖南省怀化市麻阳县	S23	湖南省邵阳市洞口县
S10	湖南省湘西州泸溪县	S24	湖南省永州市道县
S11	湖南省涟源市	S25	湖南省湘西土家族苗族自治州凤凰县
S12	湖南省常德市澧县	S26	湖南省张家界市慈利县
S13	湖南省邵阳市隆回县	S27	湖南省衡阳市常宁市
S14	湖南省常德市临澧县	S28	湖南省邵阳市城步县

对照品溶液:精密称取芸香柚皮苷等对照品各适量,分别用甲醇溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,作为储备溶液;再分别取上述对照品储备液各 1 mL 混匀后定容,制成混合对照品溶液。

1.3.2.2 GC 分析用溶液的制备

供试品溶液:取上述粉碎后的枳壳样品各约 0.20 g,置于预先加入 20% 氯化钠溶液 4 mL 的顶空进样瓶中,边加热(70 $^{\circ}\text{C}$)边搅拌(200 r/min)进行预平衡和吸附。

对照品溶液:精密称取 *D*-柠檬烯等对照品各适量,分别用正己烷溶解并定容到 500 μL ,制成储备溶液;再分别取上述对照品储备液各 20 μL 混匀后定容,制成混合对照品溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光存放备用。

1.3.3 色谱分析条件

1.3.3.1 HPLC 条件

Agilent-Poroshell 120 EC- C_{18} 色谱柱(150 mm \times 2.1 mm,2.7 μm);流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)为流动相,梯度洗脱程序为 0 ~ 2 min,10% \rightarrow 15% A;2 ~ 3 min,15% \rightarrow 18% A;3 ~ 4 min,18% \rightarrow 20% A;4 ~ 6 min,20% \rightarrow 22% A;6 ~ 7 min,22% \rightarrow 23% A;7 ~ 9 min,23% \rightarrow 25% A;9 ~ 11 min,25% \rightarrow

35% A;11 ~ 17 min,35% \rightarrow 55% A;17 ~ 20 min,55% \rightarrow 90% A;20 ~ 25 min,90% A;25 ~ 26 min,90% \rightarrow 10% A;26 ~ 35 min,10% A;检测波长为 210 nm;柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$;流速为 0.3 mL/min;进样体积为 1 μL 。

1.3.3.2 GC 条件

Agilent AE-FFAP 柱(30 m \times 0.32 mm,0.50 μm),FID 检测器;进样口温度为 240 $^{\circ}\text{C}$,载气为高纯氮气;载气总流量 25 mL/min,空气流量为 400 mL/min,氢气流量为 40 mL/min,尾气吹扫流速为 30 mL/min,分流比为 5:1;升温程序为起始温度 60 $^{\circ}\text{C}$,以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 96 $^{\circ}\text{C}$,保持 1.5 min;以 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 100 $^{\circ}\text{C}$,保持 3 min;以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 140 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min;以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 210 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至温 240 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min。

1.3.4 方法学考察

参照《中国药典》2020 年版四部收录的分析方法验证指导原则(9101)对 HPLC 分析和 GC 分析方法进行方法学考察。

1.3.4.1 HPLC 分析

专属性试验:取“1.3.2.1”项下混合对照品溶

液、供试品溶液和空白溶液,分别按“1.3.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。

检测限和定量限:分别精密量取“1.3.2.1”项下单一对照品储备溶液适量,倍比稀释,并按“1.3.3.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比(signal-to-noise, S/N)为3:1和10:1时的浓度分别作为检测限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantity, LOQ)。

精密度试验:取枳壳样品 S1,按“1.3.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“1.3.3.1”项下色谱条件连续进样6次,计算各目标峰的保留时间及峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

重复性试验:取枳壳样品 S1,平行6份,按“1.3.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“1.3.3.1”项下色谱条件进行测定,计算各目标峰的保留时间及峰面积的 RSD。

稳定性试验:取枳壳样品 S1,按“1.3.2.1”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、2、4、6、12、20、24 h按“1.3.3.1”项下色谱条件进行测定,计算各目标峰的保留时间及峰面积的 RSD。

准确度试验:取枳壳样品 S1,平行9份,分别添加样品含量80%、100%和120%的对照品,按“1.3.2.1”项下方法制备供试品溶液和“1.3.3.1”项下色谱条件进行测定,计算各目标峰的加样回收率。

线性关系与范围:将“1.3.2.1”项下配制得到的混合对照品溶液,用甲醇逐次稀释成系列不同浓度,按“1.3.3.1”项下的条件进行测定,以目标峰峰面积为纵坐标(Y),对照品溶液浓度(mg/mL)为横坐标(X),将各目标色谱峰峰面积值分别与其系列浓度值进行线性回归,得到标准曲线方程和范围,并计算回归系数(r)。

1.3.4.2 GC分析

专属性试验:取“1.3.2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和空白溶液,分别按“1.3.3.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。

检测限和定量限:分别精密量取“1.3.2.2”项下单一对照品储备溶液适量,倍比稀释,并按“1.3.3.2”项下色谱条件进样测定,以S/N为3:1和10:1时的浓度分别作为LOD和LOQ。

重复性试验:取枳壳样品 S1,平行6份,按“1.3.2.2”项下方法制备供试品溶液。按“1.3.3.2”项下色谱条件进行测定,计算各目标峰的保留时间及

峰面积的 RSD。

稳定性试验:取枳壳样品 S1,按“1.3.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、2、4、6、8、10 h按“1.3.3.2”项下色谱条件进行测定,计算各目标峰的保留时间及峰面积的 RSD。

线性关系与范围:将“1.3.2.2”项下配制得到的混合对照品溶液,用正己烷逐次稀释成系列不同浓度,按“1.3.3.2”项下的条件进行测定,以目标峰峰面积为纵坐标(Y),对照品溶液浓度(mg/g)为横坐标(X),将各目标色谱峰峰面积值分别与其系列浓度值进行线性回归,得到标准曲线方程和范围,并计算回归系数(r)。

1.3.5 样品测定

取“1.2”项下湘枳壳样本,分别按“1.3.2.1”和“1.3.2.2”项下方法制备供试品溶液,照“1.3.3.1”和“1.3.3.2”项下色谱条件进行测定,将各目标峰的峰面积值代入相应的线性方程和计算它们的含量。

1.3.6 网络药理学对湘枳壳的 Q-Marker 预测分析

1.3.6.1 成分靶点信息搜集

将色谱法检测得到的21个指标成分作为Q-Marker 候选化合物,基于Swiss ADME 在线平台预测活性成分,将化合物成分(*.sdf格式)上传至Swiss ADME,设定化合物胃肠道吸收(gastrointestinal absorption, GI absorption)为“high”与类药性分析中有 ≥ 2 个为“Yes”的条件,可筛选出具有较好口服生物利用度,与已知药物的相似性较高的化合物作为活性成分。将活性成分(*.sdf格式)导入SwissTarget Prediction 数据库,以“homo sapiens”和“probability > 0”为筛选条件,查找候选化合物的作用靶点。

将这些候选化合物与它们对应的作用靶点导入Cytoscape 3.8.2 软件中构建“化学成分-作用靶点”网络图。

1.3.6.2 蛋白互作网络分析

将“1.3.6.1”项下筛选出的作用靶点导入STRING 数据库进行蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络分析。设置物种为“Homo sapiens”,蛋白期待交互分数为“interaction score > 0.9”,去除离散节点,其他参数保持不变;将分析结果保存为“*.tsv”格式,利用Cytoscape 3.8.2 软件对网络中的节点进行拓扑特征分析。根据拓扑参数度值(degree 值)的大小,设定节点的颜色和大小,

degree 值越大,颜色越深,节点越大。以 degree 值大于二倍中位数为标准,进一步筛选出关键靶点。

1.3.6.3 GO 与 KEGG 富集分析

通过 DAVID 在线数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对“1.3.6.2”项下获得的关键靶点进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析,物种限定为“Homo sapiens”,将所得数据按 *P*-Value 值由小到大排列,并利用 KEGG 在线数据库及查阅相关文献,对得到的靶点蛋白及通路进行分析。

1.3.6.4 “成分-靶点-通路”网络构建

将“成分-靶点-通路”的相互对应关系导入 Cytoscape 3.8.2 中进行可视化分析,用不同形状 of 节点分别表示成分、靶点、通路,以成分、靶点、通路的连接度 (degree 值) 为参考值,获得核心作用靶点。

1.3.6.5 成分-靶点分子对接分析

将筛选获得的候选 Q-Marker 成分作为配体,在 PubChem 在线数据库下载其 3D 结构的“*.sdf”格式文件;以“1.3.6.4”项下筛选得到的核心作用靶点为受体,在 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中物种选择“Homo sapiens”,选择分辨率高的 3D 结构,下载保存为“*.pdb”格式文件。利用 Pymol 2.6.0 软件对受体和配体进行加氢和去水处理,再通过 AutoDock Vina 1.1.2 中输入命令符对其进行分子对接计算,得到配体与受体的结合能,最佳构象选用自由结合能数值最低的结合构象,最后通过 Pymol 2.6.0 软件进行分子对接可视化分析,依据参考文献对它们的结合活性进行判定^[16]。

1.3.7 多变量统计分析

1.3.7.1 主成分荷载因子分析

将湘积壳样本中通过网络药理学和分子对接筛选出的 Q-Marker 的含量进行标准化处理后导入 SPSS 26.0 软件进行主成分分析,将得到的主成分依据特征值和方差贡献率进行排序和计算累计贡献率。将贡献率靠前的主成分利用主轴因子提取法进行荷载因子分析,经过平均正交旋转和迭代 6 次后得到主成分矩阵模型,按照从大到小依次排列出各 Q-Marker 指标成分对主成分的贡献系数,据此可挖掘出对各主成分影响较大的 Q-Marker。

1.3.7.2 聚类分析

选取主成分分析筛选出的对样本差异贡献大的 Q-Marker,同时兼顾《中国药典》2020 年版积壳项下含量测定的指标成分,利用 MetaboAnalyst 6.0 进行聚类分析。

2 结果

2.1 HPLC 分析

2.1.1 专属性、精密度、重复性和稳定性

在专属性、精密度、重复性和稳定性等考察中记录芸香柚皮苷、枸橼苷、川陈皮素、橙皮油素、柚皮苷、橙皮苷、橘皮素、柠檬苦素、柚皮素、圣草次苷、橙皮素、新橙皮苷和芦丁所对应的色谱峰峰面积和保留时间,计算它们的峰面积 RSD 和保留时间 RSD。专属性试验结果表明与目标化合物保留时间一致的出峰时间,空白样品无干扰。精密度试验中各目标化合物色谱峰峰面积 RSD 依次为 0.18%、0.20%、0.24%、6.3%、0.19%、0.16%、0.90%、4.7%、7.8%、3.8%、5.3%、0.15%、7.6%;重复性试验中各目标化合物色谱峰峰面积 RSD 依次为 0.21%、1.25%、0.45%、0.20%、0.30%、0.39%、2.2%、0.31%、7.0%、7.2%、1.5%、0.51%、7.2%;稳定性试验中各目标化合物色谱峰在不同时间的峰面积 RSD 依次为 0.55%、3.1%、0.48%、3.6%、1.4%、0.63%、5.0%、1.7%、4.5%、7.7%、6.8%、0.32%、5.7%;并且在上述考察项目中各目标化合物保留时间的 RSD 均小于 1.0%。结果表明,该分析方法的精密度、重复性和稳定性均良好。

2.1.2 线性关系考察

对上述目标化合物的线性关系进行考察,记录芸香柚皮苷等目标化合物的色谱峰峰面积,绘制标准曲线和计算相关系数(见表 2)。结果表明,各目标化合物在各自浓度范围内线性关系良好,可用于样品的定量测定。

2.1.3 检测限、定量限和加样回收率

对上述目标化合物的 LOD、LOQ 和加样回收率考察,记录各项目中芸香柚皮苷、枸橼苷、川陈皮素、橙皮油素、柚皮苷、橙皮苷、橘皮素、柠檬苦素、柚皮素、圣草次苷、橙皮素、新橙皮苷和芦丁所对应的色谱峰峰面积,计算它们的 S/N 和回收率。各目标化合物 LOD 值依次为 0.22、0.23、0.23、0.08、0.31、0.78、0.12、2.67、0.26、0.48、0.21、0.54、0.18 mg/mL;LOQ 值依次为 0.88、0.81、0.81、0.32、1.24、3.12、0.42、9.35、0.91、1.94、0.82、1.62、0.72 mg/mL,表明此方法灵敏度较高。各目标化合物的平均回收率依次为 100.4%、110.1%、104.6%、103.4%、120.5%、106.9%、95.22%、76.00%、75.00%、105.5%、110.14%、101.6%、77.17%,表明该方法准确可靠。

表 2 各目标化合物的 HPLC 线性关系和范围结果
Table 2 The HPLC linear relationship and ranges of target compounds

化合物 Compound	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient(<i>r</i>)	线性范围 Linear range(mg/mL)
芸香柚皮苷 Narirutin	$Y = 155.78 X + 0.001 2$	0.999 2	0.80 ~ 16.90
枸橼苷 Poncitin	$Y = 164.43 X + 0.067 0$	0.998 4	0.80 ~ 16.30
川陈皮素 Nobiletin	$Y = 296.24 X - 0.041 0$	0.999 4	0.78 ~ 15.75
橙皮油素 Auraptene	$Y = 200.90 X + 0.001 8$	0.998 2	0.30 ~ 6.60
柚皮苷 Naringin	$Y = 162.99 X + 0.437 3$	0.990 7	0.94 ~ 18.90
橙皮苷 Hesperidin	$Y = 113.31 X - 0.055 0$	0.993 3	3.10 ~ 25.60
橘皮素 Tangeretin	$Y = 237.32 X - 0.010 9$	0.998 7	0.30 ~ 6.80
柠檬苦素 Limonin	$Y = 28.82 X + 0.049 8$	0.986 3	9.20 ~ 46.10
柚皮素 Naringenin	$Y = 285.58 X + 0.088 7$	0.999 4	0.87 ~ 17.56
圣草次苷 Eriocitrin	$Y = 123.60 X - 0.026 6$	0.999 2	1.00 ~ 20.60
橙皮素 Hesperetin	$Y = 284.80 X - 0.026 0$	0.999 5	0.34 ~ 6.82
新橙皮苷 Neohesperidin	$Y = 65.99 X - 0.026 7$	0.993 4	1.60 ~ 31.80
芦丁 Rutin	$Y = 128.65 X - 0.035 7$	0.998 8	0.70 ~ 14.30

2.2 GC 分析方法学考察

2.2.1 专属性、重复性和稳定性

对专属性、重复性和稳定性等进行考察,记录上述各考察项目中 β -蒎烯、 β -月桂烯、*D*-柠檬烯、芳樟醇、4-萜品醇、 α -石竹烯、 α -松油醇、香叶醇所对应的色谱峰峰面积和保留时间,计算它们的峰面积 RSD 和保留时间 RSD。专属性试验结果表明与目标化合物保留时间一致的出峰时间,空白样品无干扰。重复性试验中各目标化合物色谱峰峰面积 RSD 依次为 6.3%、2.6%、3.2%、2.2%、1.1%、6.0%、2.6%、3.2%;稳定性试验中各目标化合物色谱峰在不同时间的峰面积 RSD 依次为 9.6%、4.5%、4.4%、6.7%、1.8%、7.0%、4.8%、9.1%;并且在上述考察项目中各目标化合物保留时间的 RSD 均小于 1.0%。结果表明,该分析方法的精密度、重复性和稳定性均良好。

2.2.2 线性关系考察

对上述目标化合物的线性关系进行分析,记录 β -蒎烯等目标化合物的色谱峰峰面积和计算 S/N,绘制标准曲线和计算相关系数(见表 3)。各目标化合物 LOD 值依次为 0.090、0.007、0.006、0.008、0.009、0.007、0.013、0.017 mg/g; LOQ 值依次为 0.342、0.028、0.025、0.041、0.028、0.022、0.042、0.063 mg/g,表明此方法灵敏度较高。由表 3 可知各目标化合物在适宜浓度范围内,对照品浓度与峰

面积呈良好线性关系。

2.3 样品测定

对上述湘枳壳样本中非挥发性成分和挥发性成分进行测定(见表 4 和表 5),结果表明湘产枳壳种质资源的各目标成分及总和存在较大差异。

由表 4 可知,枳壳药材中以柚皮苷和新橙皮苷含量最高,分别在 46.43 ~ 100.58 mg/g 和 35.8 ~ 86.2 mg/g,其次为芸香柚皮苷、橙皮苷、枸橼苷和柠檬苦素,但各目标成分在样本中的含量具有较大的波动。样本 S5 的多个指标成分含量低,样本 S1 的多个指标成分含量高;特别值得注意的是,样本 S6 中橙皮素含量最高,超过该指标成分平均含量的 13 倍。

由表 5 可知,湘枳壳药材的挥发性指标成分以 *D*-柠檬烯含量最高,为 38 ~ 40.81 mg/g,其次为芳樟醇,但样本间含量存在较大差异。其中以样本 S9 的 *D*-柠檬烯含量最高,S5、S15、S17、S18 和 S21 等样本中的含量均超过 5 mg/g;S2、S15、S22 和 S26 等样本中均未检出 β -蒎烯、 β -月桂烯和 α -石竹烯。

由上述结果可知,研究用湘枳壳种质资源的品种、生长环境、采收时间和果实外观等基本一致,且含量测定结果都符合《中国药典》2020 年版要求,但多指标测定结果提示来自不同产地的湘枳壳种质的品质具有较大差异。因此构建多成分的品质评价方法将有助于湘枳壳药材种质资源筛选,对市售枳壳药材品质评价等质量控制也具有参考意义。

表3 各目标化合物的 GC 线性关系和范围结果
Table 3 The GC linear relationship and ranges of target compounds

化合物 Compound	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient(<i>r</i>)	线性范围 Linear range(mg/g)
β -蒎烯 β -Pinene	$Y = 0.782 X + 13.358$	0.992 8	0.024 ~ 2.29
β -月桂烯 β -Myrcene	$Y = 0.649 X + 14.101$	0.988 8	0.022 ~ 2.12
D-柠檬烯 D-Limonene	$Y = 0.690 X + 14.140$	0.992 9	0.023 ~ 2.24
芳樟醇 Linalool	$Y = 0.700 X + 14.104$	0.994 7	0.024 ~ 2.29
4-萜品醇 4-Terpineol	$Y = 0.719 X + 14.583$	0.997 3	0.026 ~ 2.49
α -石竹烯 α -Caryophyllene	$Y = 1.018 X + 16.838$	0.995 3	0.025 ~ 2.39
α -松油醇 α -Terpineol	$Y = 0.753 X + 14.951$	0.996 6	0.026 ~ 2.49
香叶醇 Geraniol	$Y = 0.963 X + 15.512$	0.995 7	0.025 ~ 2.37

表4 湘积壳中目标化合物的 HPLC 含量测定结果
Table 4 HPLC quantitative determination results of target components of Hunan Aurantii Fructus samples

编号 No.	含量 Content(mg/g)													总含量 Total content
	芸香 柚皮苷 Narirutin	枸橼苷 Ponitin	川陈 皮素 Nobiletin	橙皮 油素 Auraptene	柚皮苷 Naringin	橙皮苷 Hespe- ridin	橘皮素 Tangeretin	柠檬 苦素 Limonin	柚皮素 Naring- enin	圣草 次苷 Ericitrin	橙皮素 Hespe- retin	新橙 皮苷 Neohesperidin	芦丁 Rutin	
S1	23.12	8.29	1.50	2.66	100.58	9.42	1.21	3.99	0.14	0.32	0.34	81.96	0.25	233.78
S2	19.02	5.89	1.53	1.75	61.26	4.86	1.13	4.76	-	0.26	0.26	44.59	0.19	145.50
S3	22.86	4.41	1.30	2.83	60.42	7.46	1.19	4.08	0.01	0.23	0.17	45.83	0.29	151.08
S4	19.60	4.11	0.89	0.86	70.80	4.37	1.08	4.01	0.05	0.35	0.67	57.82	0.19	164.80
S5	24.31	1.54	0.48	2.66	46.43	5.86	0.89	3.04	-	0.44	0.09	35.80	0.22	121.76
S6	23.31	3.11	1.38	1.62	69.35	5.72	0.42	3.38	0.03	0.25	7.78	44.16	0.24	160.75
S7	20.29	2.45	0.96	2.37	54.25	4.84	0.78	3.35	0.05	0.27	0.13	86.20	0.19	176.13
S8	22.33	6.18	1.25	2.47	72.14	5.01	0.26	2.32	0.04	0.33	0.24	55.80	0.22	168.59
S9	23.08	5.09	1.42	0.17	67.12	6.45	1.11	3.72	0.02	0.37	0.30	46.49	0.18	155.52
S10	19.84	5.55	1.46	0.69	58.50	7.47	1.22	3.01	0.15	0.55	0.24	53.25	0.22	152.15
S11	19.35	6.76	1.58	2.23	88.03	8.30	1.38	5.56	0.21	0.56	0.32	57.81	0.21	192.30
S12	21.08	4.20	1.13	2.24	48.20	5.54	0.85	2.29	0.01	0.21	0.21	36.54	0.18	122.68
S13	21.77	6.61	1.30	2.11	83.26	7.64	0.81	2.84	0.08	0.46	0.19	64.54	0.22	191.83
S14	18.73	6.05	1.23	1.92	72.12	6.57	0.93	3.95	0.21	0.6	0.25	53.89	0.21	166.66
S15	22.44	5.24	1.46	2.99	71.73	6.99	1.16	3.31	0.05	0.92	0.19	57.99	0.29	174.76
S16	20.52	4.36	1.12	1.36	62.29	6.15	0.74	5.04	0.09	0.71	0.25	38.25	0.23	141.11
S17	22.46	3.34	1.37	1.53	70.90	7.43	0.89	4.47	0.03	0.34	0.24	65.69	0.19	178.88
S18	20.46	7.40	1.38	1.09	65.91	7.05	1.08	2.87	0.01	0.21	0.25	62.31	0.18	170.20
S19	19.53	8.67	0.90	2.27	74.70	7.25	0.81	2.85	0.01	0.28	0.21	67.69	0.19	185.36
S20	22.35	4.11	0.90	0.93	58.40	5.08	0.91	2.46	-	0.41	0.18	41.56	0.25	137.54
S21	19.95	6.29	1.75	0.97	76.93	7.42	1.28	4.67	0.10	0.35	0.32	57.08	0.55	177.66
S22	20.89	5.05	1.17	2.14	73.55	7.33	1.07	3.76	0.02	0.29	0.26	47.23	0.29	163.05
S23	21.67	2.28	0.61	1.32	48.72	6.12	0.72	2.97	0.01	0.18	0.19	40.80	0.22	125.81
S24	22.19	5.39	1.77	1.48	83.05	9.17	1.43	5.97	0.1	0.75	0.32	66.08	0.26	197.96

续表 4(Continued Tab. 4)

编号 No.	含量 Content(mg/g)													总含量 Total content
	芸香 柚皮苷 Narirutin	枸橼苷 Ponitin	川陈 皮素 Nobiletin	橙皮 油素 Auraptene	柚皮苷 Naringin	橙皮苷 Hespe- ridin	橘皮素 Tangeretin	柠檬 苦素 Limonin	柚皮素 Naring- enin	圣草 次苷 Eriocitrin	橙皮素 Hespe- retin	新橙 皮苷 Neohesperidin	芦丁 Rutin	
S25	23.85	7.22	1.29	1.95	79.89	7.46	1.11	4.77	0.01	0.30	0.28	62.70	0.21	191.04
S26	19.93	5.19	1.33	0.91	95.34	8.29	1.21	3.81	0.25	0.30	0.86	66.76	0.17	204.35
S27	21.70	5.59	1.28	1.72	85.69	6.17	1.14	3.54	-	0.47	0.24	49.33	0.26	177.13
S28	21.65	6.91	1.57	1.92	72.02	7.63	0.72	2.79	0.11	0.29	0.28	73.18	0.17	189.24
平均值 Mean	21.37	5.26	1.26	1.76	70.41	6.75	0.98	3.70	0.06	0.39	0.55	55.76	0.23	-
RSD(%)	7.1	32.8	24.0	39.8	18.9	18.9	26.9	25.5	109.8	45.0	256.9	23.1	30.6	-

注:“-”表示该样本中目标化合物的含量低于定量限。

Note:“-” indicates that the target compound was lower than LOQ in the sample.

表 5 湘枳壳中目标化合物的 GC 含量测定结果

Table 5 GC quantitative determination results of target components of Hunan Aurantii Fructus samples

编号 No.	含量 Content(mg/g)								总含量 Total content
	β -蒎烯 β -Pinene	β -月桂烯 β -Myrcene	<i>D</i> -柠檬烯 <i>D</i> -Limonene	芳樟醇 Linalool	4-萜品醇 4-Terpineol	α -石竹烯 α -Caryophyllene	α -松油醇 α -Terpineol	香叶醇 Geraniol	
S1	0.01	0.01	0.74	0.35	0.03	0.01	0.04	0.02	1.21
S2	-	-	3.77	0.10	0.01	-	0.01	0.01	3.90
S3	0.01	-	1.39	0.17	0.01	-	0.02	0.02	1.62
S4	0.01	0.01	0.72	0.29	0.02	-	0.04	0.03	1.12
S5	0.01	0.01	5.56	0.26	0.02	0.01	0.03	-	5.90
S6	0.04	0.01	3.32	0.39	0.02	0.01	0.05	0.04	3.88
S7	0.02	0.01	0.59	0.16	0.06	0.01	0.04	0.02	0.91
S8	0.01	0.01	3.53	0.21	0.03	-	0.04	0.03	3.86
S9	-	-	40.81	0.12	0.01	0.01	0.03	0.02	41.00
S10	0.01	0.01	0.71	0.26	0.03	0.01	0.05	0.04	1.12
S11	0.01	0.01	0.92	0.24	0.02	0.01	0.05	0.05	1.31
S12	0.01	0.01	1.92	0.81	0.04	0.02	0.15	0.10	3.06
S13	0.04	0.02	3.03	0.95	0.03	0.01	0.09	0.05	4.22
S14	0.01	0.01	0.65	0.33	0.03	0.01	0.05	0.04	1.13
S15	-	-	12.23	0.11	0.01	-	0.01	0.01	12.37
S16	0.02	0.01	1.17	0.24	0.02	0.01	0.05	0.04	1.56
S17	0.01	0.01	8.30	0.27	0.04	-	0.04	0.01	8.68
S18	-	-	7.07	0.18	0.01	0.01	0.02	0.01	7.30
S19	-	-	0.38	0.23	0.02	0.01	0.04	0.03	0.71
S20	0.01	-	2.07	0.43	0.03	-	0.03	0.01	2.58
S21	0.02	0.01	6.45	0.15	0.02	-	0.03	0.01	6.69
S22	-	-	0.92	0.15	0.03	-	0.03	0.02	1.15
S23	0.01	-	1.80	0.13	0.01	-	0.01	-	1.96
S24	0.01	-	0.47	0.20	0.03	-	0.04	0.04	0.79
S25	-	-	2.99	0.14	0.01	0.01	0.01	0.01	3.17
S26	-	-	2.50	0.24	0.02	-	0.03	0.02	2.81

续表5 (Continued Tab. 5)

编号 No.	含量 Content (mg/g)									总含量 Total content
	β -蒎烯 β -Pinene	β -月桂烯 β -Myrcene	<i>D</i> -柠檬烯 <i>D</i> -Limonene	芳樟醇 Linalool	4-萜品醇 4-Terpeneol	α -石竹烯 α -Caryophyllene	α -松油醇 α -Terpeneol	香叶醇 Geraniol		
S27	0.02	0.01	0.73	0.27	0.03	0.01	0.04	0.03	1.14	
S28	0.01	0.01	4.94	0.24	0.02	-	0.04	0.01	5.27	
平均值 Mean	0.01	0.01	4.27	0.27	0.02	0.01	0.04	0.03	-	
RSD (%)	88.3	41.2	180.1	70.4	49.3	45.2	68.8	77.2	-	

注：“-”表示该样本中目标化合物的含量低于定量限。

Note:“-” indicates that the target compound was lower than LOQ value in the sample.

2.4 网络药理学分析

2.4.1 成分靶点信息搜集

将芸香柚皮苷(HAF1)、枸橼苷(HAF2)、川陈皮素(HAF3)、橙皮油素(HAF4)、柚皮苷(HAF5)、橙皮苷(HAF6)、橘皮素(HAF7)、柠檬苦素(HAF8)、柚皮素(HAF9)、圣草次苷(HAF10)、橙皮素(HAF11)、新橙皮苷(HAF12)、芦丁(HAF13)、 β -蒎烯(HAF14)、 β -月桂烯(HAF15)、*D*-柠檬烯(HAF16)、芳樟醇(HAF17)、4-萜品醇(HAF18)、 α -石竹烯(HAF19)、 α -松油醇(HAF20)、香叶醇

(HAF21)等指标成分作为 Q-Marker 候选化合物,利用 Swiss Target Prediction 数据库,查找这些候选化合物的作用靶点;合并去除重复项后得到与 18 个化合物相关的 391 个作用靶点。构建的“化学成分-作用靶点”网络图(见图 1),化合物橙皮油素、橘皮素、柚皮素、橙皮素、柠檬苦素、香叶醇、新橙皮苷和芳樟醇等 8 个成分的度值从大到小依次为 71、58、54、38、36、27、25 和 21,表明它们对应的作用靶点多且影响大,与枳壳生物功效的发挥具有密切关联。

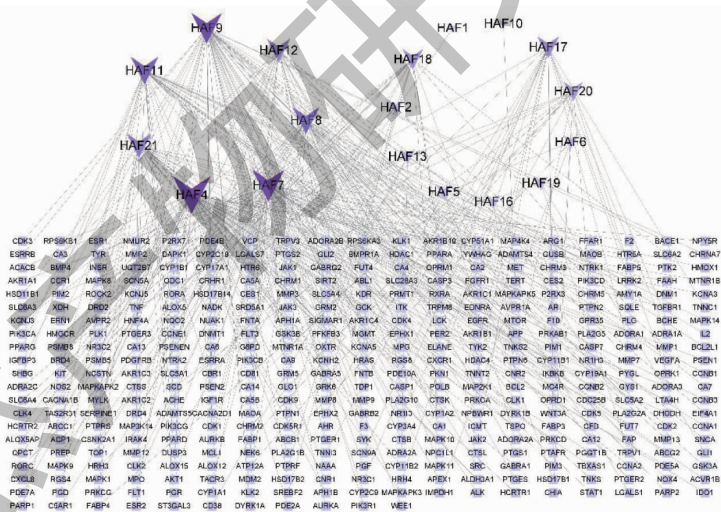


图 1 化学成分-作用靶点网络图

Fig. 1 Chemical component-target network diagram

注:V形节点代表目标化合物;方形节点代表作用靶点;节点大小代表度值大小。Note:V-shaped nodes represent target compounds;

Square-shaped nodes represent targets; Node size indicates degree values.

2.4.2 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析

将上述得到的 391 个作用靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 分析(见图 2),并利用 Cytoscape 软件对网络中的节点进行拓扑特征分析,运用 Analyze Network 插件对作用靶点进行运算分析,进一步筛选出 75 个关键靶点蛋白。

2.4.3 GO 与 KEGG 富集分析

将上述获得的 75 个关键靶点蛋白进行 GO 功能富集分析,共得到 657 条结果,其包括生物过程(biological process, BP)477 个条目、细胞组分(cellular component, CC)58 个条目和分子功能(molecular function, MF)122 个条目;功能分析以 FDR (false

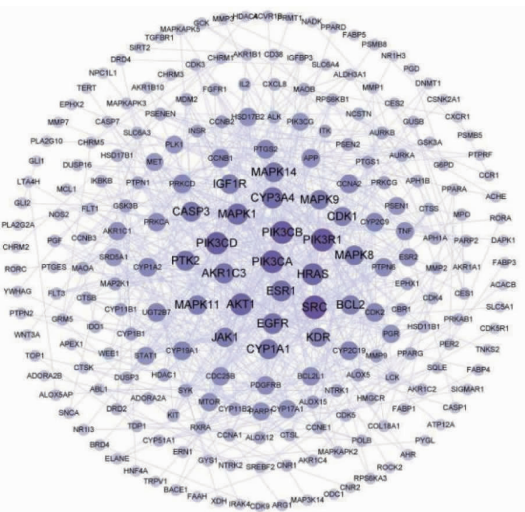


图2 蛋白质-蛋白质互作网络图

Fig. 2 Protein-protein interaction network diagram

discovery rate) <0.05 为标准对各 GO 条目进一步筛选,并按照 *P*-value 值从小到大排列,分别选择前 10 条结果进行可视化分析(见图 3A),发现这些关键靶点蛋白在细胞组分方面涉及到细胞质 (cytoplasm)、内质网膜 (endoplasmic reticulum membrane)、大分子复合物 (macromolecular complex) 等;在分子功能上可与蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性 (protein serine/threonine/tyrosine kinase activity)、酶结合 (enzyme binding)、ATP 结合 (ATP binding) 等多种功能活性相关;在生物过程中参与了蛋白质磷酸化 (protein phosphorylation)、细胞凋亡过程的负调节 (negative regulation of apoptotic process)、肽基丝氨酸磷酸化 (peptide serine phosphorylation) 等。

使用 DAVID 数据库对 75 个关键靶点蛋白进行 KEGG 分析,共得到 161 条结果,以 *FDR* <0.05 为标准,筛选得到 157 条结果,根据 *P* <0.05、*FDR* <0.05 选出前 20 条通路进行可视化分析(见图 3B)。这些关键靶点主要作用于 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药 (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、内分泌抵抗 (endocrine resistance)、乙型肝炎 (hepatitis B)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in complications of diabetes)、黄体酮介导的卵母细胞成熟 (progesterone-mediated oocyte maturation)、催乳素信号通路 (prolactin signaling pathway)、癌症中的蛋白聚糖 (proteoglycans in cancer)、癌症的通路 (pathways in cancer) 和

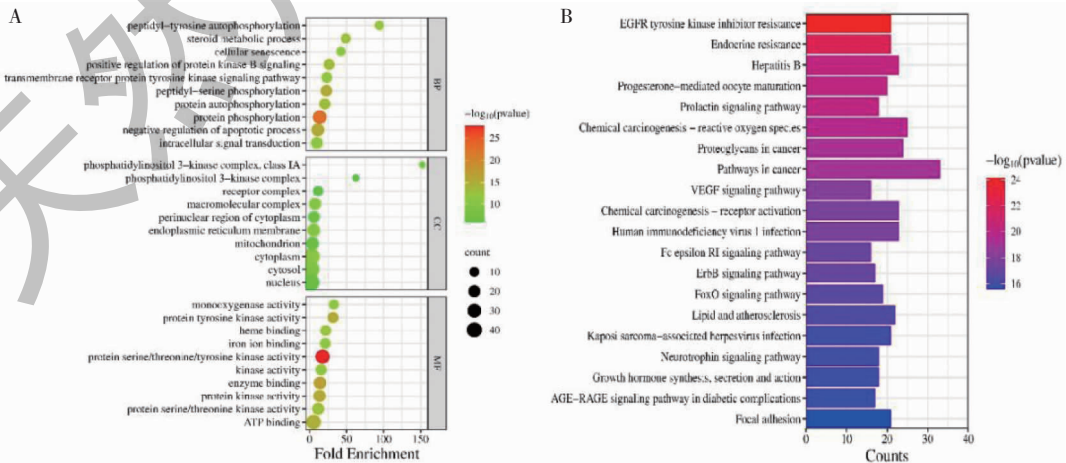


图3 GO 功能分析(A)与 KEGG 富集分析(B)结果

Fig. 3 GO functional analysis (A) and KEGG enrichment analysis (B) results

VEGF 信号通路 (VEGF signaling pathway)、化学致癌-活性氧 (chemical carcinogenesis-reactive oxygen species) 等信号通路发挥药效作用。

2.4.4 成分-靶点-通路网络构建

由上述挖掘的 8 个重要成分、75 个关键靶点蛋白和 20 条通路的“成分-靶点-通路”网络图 (见图 4), 发现橘皮素、柚皮素、柠檬苦素、香叶醇、橙皮素、橙皮油素和新橙皮苷等 7 个化合物有较高的连接度, 它们通过 PIK3R1、MMP9、PDGFRB、PTGS2、PARP1、AKR1C3 和 HRAS 等 69 个靶点, 在 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药 (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)-癌症的通路 (pathways in cancer)、乙

型肝炎 (hepatitis B)、内分泌抵抗 (endocrine resistance) 等多种途径发挥药效作用, 据此将这 7 个化合物选作湘积壳种质资源的候选 Q-Marker 进行后续的理论活性研究。

在 75 个关键靶点蛋白中 PIK3CD (degree 20)、PIK3CB (degree 20)、PIK3R1 (degree 20)、PIK3CA (degree 20)、AKT1 (degree 20)、MAPK1 (degree 20)、HRAS (degree 19) 等 7 个靶点蛋白的连接度最高, 提示它们具有在上述多条信号通路中发挥的作用尤为重要。因此将这 7 个靶点蛋白作为核心靶点, 进一步研究湘积壳基于中药治疗作用“多成分、多靶点、多途径”整体观的“谱-效”关联性。

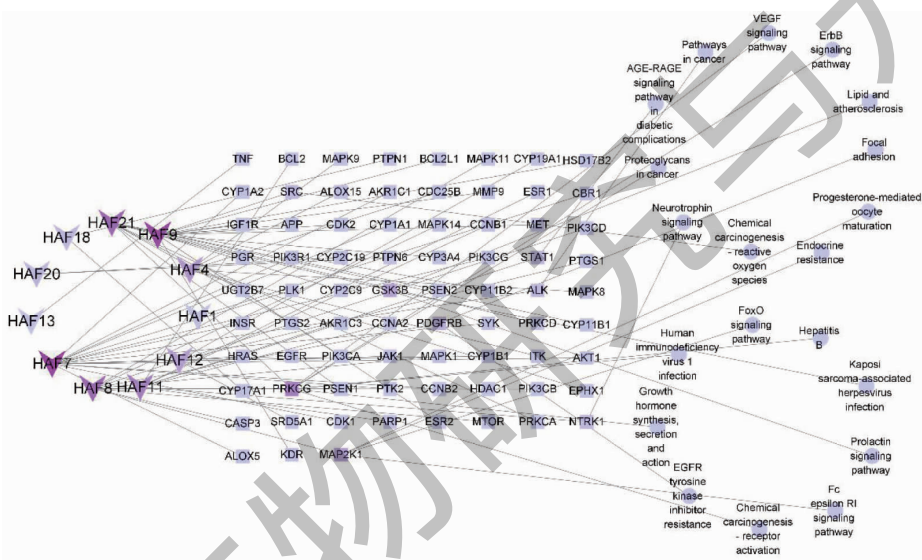


图 4 湘积壳的“成分-靶点-通路”网络图

Fig. 4 "Compound-target-pathway" network diagram of Hunan Aurantii Fructus

注: V 形节点代表目标化学成分; 方形节点代表关键靶点; 圆形节点代表通路; 节点颜色深浅代表度值大小。Note: V-shaped nodes represent target compounds; Square-shaped nodes represent key targets; Circular shaped nodes represent pathway; Node size indicates degree values.

2.5 分子对接分析

以筛选出的候选 Q-Marker (橘皮素、柚皮素、柠檬苦素、香叶醇、橙皮素、橙皮油素和新橙皮苷) 为配体, 以核心靶点 (PIK3CD、PIK3CB、PIK3R1、PIK3CA、AKT1、MAPK1、HRAS) 为受体进行分子对接的计算得到配体与受体的结合能 (见表 6) 和可视化。

由表 9 可知, 新橙皮苷等 7 个成分与 7 个靶点的结合能普遍较高, 提示目标化合物可与目标蛋白的氨基酸残基形成稳定的空间结构, 表明它们之间良好的对接活性, 目标化合物可用作湘积壳种质资源品质评价的 Q-Marker。选取结合能小于 -9.0 kcal/mol 的 5 个对接模式进行可视化展示 (见图

5)。

2.6 多变量统计分析

2.6.1 主成分荷载因子分析挖掘 Q-Marker

通过主成分分析共提取到五个主成分; 它们的特征值依次为 2.077、1.287、1.200、0.945 和 0.794, 方差贡献率依次为 29.673、18.379、17.136、13.498 和 11.336, 累积贡献率达到 90%, 能基本代表成分的全部信息。

经荷载因子分析, 按照从大到小依次排列出 7 个 Q-Marker 指标成分对五个主成分的贡献系数, 其中柠檬苦素 (0.940)、橘皮素 (0.740) 和柚皮素 (0.312) 对主成分 1 的贡献系数都大于 0.3; 新橙皮苷 (0.877) 和柚皮素 (0.749) 对主成分 2 的贡献最

表6 化合物与核心靶点的结合能

Table 6 Binding energy of compounds and core targets

化合物 Compound	结合能 Binding energy(kcal/mol)						
	PIK3CD	PIK3CB	PIK3R1	PIK3CA	AKT1	MAPK1	HRAS
橘皮素 Tangeretin	-5.6	-7.1	-7.6	-6.6	-7	-7.8	-5.2
柚皮素 Naringenin	-6.3	-7.5	-8.5	-6.7	-7.1	-8.7	-6.3
柠檬苦素 Limonin	-6.6	-9.8	-10.1	-7.8	-7.7	-8.3	-7.2
香叶醇 Geraniol	-4.4	-5.2	-5.3	-4.7	-4.6	-5	-4.4
橙皮素 Hesperetin	-5.9	-7.7	-8.2	-6.9	-7.1	-8.8	-6.4
橙皮油素 Auraptene	-5.3	-8.6	-7.6	-6.1	-6.9	-5.2	-6.2
新橙皮苷 Neohesperidin	-7	-8.9	-10	-10.4	-7.8	-10.4	-7.3

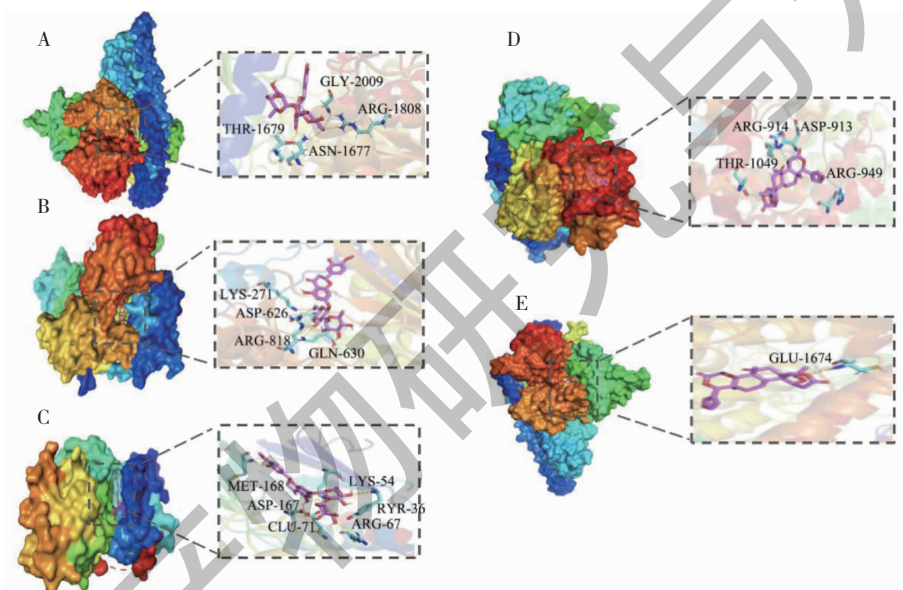


图5 代表性化合物与目标靶点的分子对接图

Fig. 5 Molecular docking plots of representative compounds and targets

注:A. 新橙皮苷与PIK3R1;B. 新橙皮苷与PIK3CA;C. 新橙皮苷与MAPK1;D. 柠檬苦素与PIK3CB;E. 柠檬苦素与PIK3R1。

Note:A. Neohesperidin and PIK3R1;B. Neohesperidin and PIK3CA;C. Neohesperidin and MAPK1;D. Limonin and PIK3CB;E. Limonin and PIK3R1.

大;橙皮素(0.965)对主成分3的贡献大;柚皮素(0.364)和香叶醇(0.957)对主成分4的贡献大;橙皮油素(0.980)主成分5的贡献大。由上述分析可知柠檬苦素、新橙皮苷、橙皮素、橘皮素和柚皮素等对湘枳壳种质资源样本间差异的贡献值较大,可选作进行湘枳壳种质资源评价的Q-Marker。

2.6.2 湘枳壳种质资源样本的聚类分析

以上述柠檬苦素等5个Q-Marker、《中国药典》2020年版枳壳项下含量测定的指标成分(柚皮苷和新橙皮苷)和高含量的挥发性成分D-柠檬烯和芳樟醇为指标成分,如图6所示,通过聚类分析可将湘枳

壳种质样本分为三个类群;第I类包括S5、S6等7个样本,第II类包括S9等9个样本,第III类包括S10等12个样本。

在第I类群中挥发性成分D-柠檬烯、芳樟醇和橙皮素等整体含量偏高,而非挥发性成分整体偏低;柚皮苷和新橙皮苷在第II类群中含量整体较高,其次是第I类群;第III类群样本所含柠檬苦素和橘皮素较高。部分种质资源样本中Q-Marker含量值得特别关注,如S1和S13样本中柚皮苷和新橙皮苷含量相对较高;D-柠檬烯在各样本中含量差异较大,特别是在S9样本中含量最高且超过40mg/g。上述

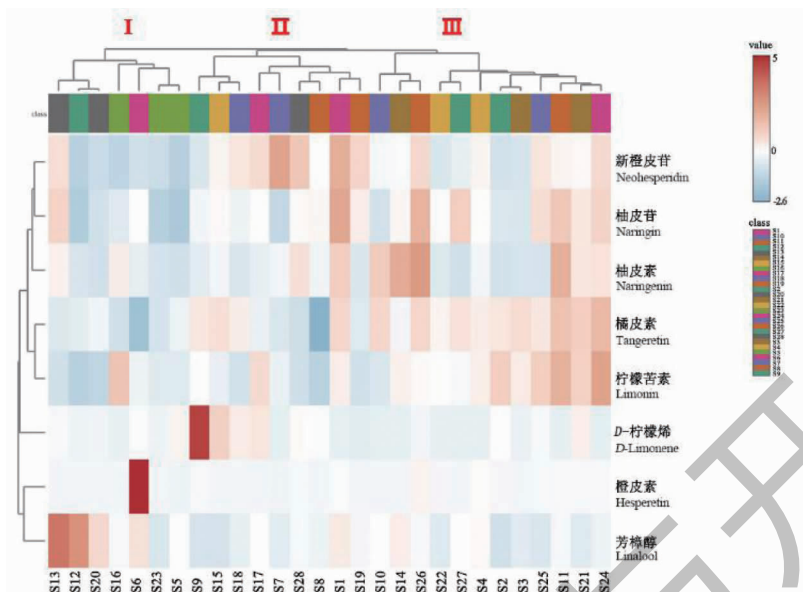


图6 湘枳壳种质资源样本的聚类分析

Fig. 6 Cluster analysis of Hunan *Aurantii Fructus* germplasm resources

样本聚类结果体现出的差异,与采集地域之间未发现明确的关联性。

3 讨论与结论

枳壳等柑橘属植物挥发油多采用气相色谱-质谱联用技术定性分析,结合面积归一化法对 *D*-柠檬烯等进行相对定量分析^[9]。本研究通过顶空固相微萃取-气相色谱法对湘枳壳种质资源样本挥发性成分进行定量测定,发现挥发性成分以 *D*-柠檬烯和芳樟醇为主,柠檬烯平均含量占总值比例约 90%; 湘枳壳样本间挥发性成分的含量差异较大,在湘枳壳药材品种选育时应应对挥发性成分予以高度重视。

作为传统大宗理气药材,枳壳所含的芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、橘皮素、柠檬苦素、橙皮油素、芦丁、圣草次苷、 β -月桂烯、*D*-柠檬烯、 β -蒎烯、 α -石竹烯、 α -松油醇、香叶醇、4-萜品醇和芳樟醇等 21 个化合物,因具有潜在的理气功效可作为候选 Q-Marker^[14]。结果表明,柚皮苷和新橙皮苷的含量符合《中国药典》2020 年版规定,研究样本均可作药材入药;而多指标测定结果显示湘枳壳种质资源样本间存在较大差异,在湘枳壳种质资源的选育和品质评价中应慎重选择。

借助网络药理学和分子对接技术在理论层面上通过“谱-效”关系筛选湘枳壳药材的潜在 Q-Marker。本研究从上述 21 个化合物中进一步筛选出橘皮素、柚皮素、柠檬苦素、香叶醇、橙皮素、橙皮油素

和新橙皮苷等 7 个化合物可作为湘枳壳药材的关键 Q-Marker,它们可能通过作用 PI3K/AKT 和 RAS/MAPK 信号通路上的 PIK3CD、PIK3CB、PIK3R1、PIK3CA、AKT1、MAPK1、HRAS 等关键靶点发挥作用。新橙皮苷可作用于 HRAS 靶点调控鞘脂代谢通路发挥治疗精神系统疾病及心血管系统疾病的作用^[17];橘皮素可通过 AKT、HRAS 等靶点介导炎症介质调节、神经信号传导及代谢等通路^[18];柚皮素、橙皮素可通过提高 PI3K/AKT 信号通路上 AKT1 蛋白磷酸化活性,调节氧化炎症性损伤等改善小鼠抑郁样行为^[19],同时,橙皮素在多项研究中显示出对血脂调节的潜在效果,通过抑制 TGF- β 1/ILK/Akt 信号通路上的蛋白水平来实现这一作用^[20];柠檬苦素可以抑制 TNF- α 和 IL-6 等炎症因子的表达,具有抗炎的药理作用;香叶醇可通过对 MAPK 信号通路的调节发挥其抗氧化和抗炎作用,诱导癌细胞凋亡^[21]。这些 Q-Marker 的抗氧化、抗炎、降血脂等功效表现为“多组分、多靶点、多通路”的特点。

本研究通过主成分荷载因子从上述 Q-Marker 中发现柠檬苦素、新橙皮苷、橙皮素、橘皮素和柚皮素等对湘枳壳种质资源样本差异具有较大的功效,但柚皮素和橙皮素含量偏低对分析方法构建形成了较大挑战。进一步的聚类分析发现以柠檬苦素、新橙皮苷、橙皮素、橘皮素、柚皮素 *D*-柠檬烯、芳樟醇和柚皮苷作为指标成分可实现湘枳壳种质资源的有效区分,部分种质资源呈现出 Q-Marker 的特异性富

集。本研究用的果实样本均为同一时期嫁接保存在同一地方的盆栽苗,挂果后在同一时期采集的幼果样品,生境和采收时间对样品的影响基本相同。造成标志物特异性富集的可能原因是品种和资源本身品质特性差异;枳壳为酸橙植物的果实,是由橘和柚杂交而来^[22],由于在栽种过程中不是同品种的橘和柚杂交导致的酸橙资源种性差异,从而造成湘枳壳化学谱的差异。

基于这些指标成分建立的高效液相色谱法和顶空固相微萃取-气相色谱法可实现湘枳壳种质资源的筛选及其品质评价,可为湘枳壳质量评价标准的提升及后期深入研究枳壳的药理作用机制及其品种选育提供参考依据。

参考文献

- 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 and Technology Press, 2020: 257.
- Wu M, Zhang HW, Zhou C, et al. Identification of the chemical constituents in aqueous extract of Zhi-Qiao and evaluation of its antidepressant effect [J]. *Molecules*, 2015, 20: 6925-6940.
- Zhao SY. Investigation on the pharmacodynamic material basis of *Citrus* plants and different anti-inflammatory effects of *Aurantii Fructus Immaturus* and *Aurantii Fructus* based on Chemotaxonomy [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine (北京中医药大学), 2018.
- Ye AQ, Jiang JP, Li R, et al. Study on hypolipidemic effect of pure total flavonoids from *Qu Aurantii Fructus* on golden hamsters of hyperlipidemia and its potential mechanism [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2020, 37: 1938-1946.
- Qiao RF, Zhong MY, Zhang M, et al. Dryness comparison of different fractions of *Aurantii Fructus* extract on normal mice and gastrointestinal motility disorder rats and spectrum-dryness study [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2021, 46: 5291-5303.
- Qiu YF, Zhang XX, Xiao GS, et al. Study on inhibitory activity of *Aurantii Fructus* flavonoids extract against colorectal cancer cell proliferation [J]. *Food Ind* (食品工业), 2023, 44: 199-204.
- Zhao WL, Guo ZX, Zhang WT, et al. Study on original plant species and geographical distribution of *Fructus Aurantii* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2018, 43: 4361-4364.
- Li C, Zeng J, Long YQ, et al. Evaluation of the quality of *Aurantii Fructus* by HPLC fingerprint combined with multi-mode chemometrics [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34: 665-676.
- Liu QR, Tan WM, Wen SY, et al. Study on GC-MS fingerprint of volatile oil from *Citrus aurantium* [J]. *J China Pharm* (中国药房), 2018, 29: 461-465.
- He YJ. Construction of fingerprint and analysis of bioactive ingredients from *Hunan Aurantii Fructus* [D]. Changsha: Hunan Agricultural University (湖南农业大学), 2018.
- Zhang TJ, Bai G, Liu CX. The concept, core theory and research methods of Chinese medicine quality markers [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2019, 54: 187-196.
- Xu SS, Xu J, Zhang XM, et al. Research progress on *Citri Reticulatae Pericarpium*, *Aurantii Fructus Immaturus*, and *Aurantii Fructus* and Q-Marker predictive analysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2018, 49: 35-44.
- Zhu J, Huang Y, Yuan E, et al. Predictive analysis of Q-Marker composition library of *Zhangbang Aurantii Fructus* pieces with honeyed bran associated with efficacy of "regulating vital energy and eliminating flatulence" [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50: 4713-4728.
- Liu SC, Qing XP, Qi B, et al. Structure-activity omics on anti-inflammatory and analgesic effect of *Aurantii Fructus* in *Qizhi Weitong Granules* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2024, 30: 154-161.
- Wu JJ, Liu D, Zhang L, et al. Predictive analysis of quality markers of *Atractylodis Macrocephalae Rizaoma* volatile oil based on GC-MS fingerprint and network pharmacology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35: 1305-1313.
- Hsin KY, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e83922.
- Li N, Wang Y, Wang CF, et al. Q-Markers prediction of *Wendan Decoction* based on fingerprint and network pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2023, 54: 6241-6252.
- Lv S. Anti-inflammatory activity of citrus citrillin: network pharmacological analysis and empirical study [D]. Chongqing: Southwest University (西南大学), 2021.
- Olugbemide AS, Ben-Azu B, Bakre AG, et al. Naringenin improves depressive and anxiety-like behaviors in mice exposed to repeated hypoxic stress through modulation of oxidative-inflammatory mediators and NF- κ B/BDNF expressions [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 169: 214-227.