

川产橘核传统与新兴药用品种的等同性分析

鲜彬, 王瑞, 吴清华*, 王黎, 任超翔, 陈江, 陈翠平, 钟婉婷, 裴瑾*
(成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用重点实验室, 成都 611137)

[摘要] 目的:研究川产传统药用橘核与新兴药用橘核在亲缘关系、形状大小和黄酮类化合物含量上的差异,探讨二者的等同性。方法:收集6份川产传统药用橘核(大红袍)和23份川产新兴药用橘核,采用相关序列扩增多态性分子标记(SRAP)研究橘核样品间的亲缘关系;使用体视显微镜观测样品的形状大小;借助高效液相色谱法(HPLC)检测柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量,用SIMCA 14.1软件分别对形状、大小和黄酮类化合物含量进行聚类分析,研究传统药用橘核和新兴药用橘核在性状大小和化学成分上的相似度。结果:SRAP亲缘关系分析能有效区分不同品种的橘核样品,部分产地相同或相邻的不同品种的橘核亲缘关系较近,还发现亲缘关系较近的不同品种橘核在形状大小和黄酮类化合物含量上相似度也高,但总体看来传统药用品种橘核与大部分新兴药用品种区别较大。结论:通过分析传统药用品种和非传统药用品种在遗传物质、外观性状和有效成分含量的差异,发现部分地区的椪柑与传统药用品种大红袍等同性最大,有作为新兴药用品种的潜力。

[关键词] 橘核; 传统药用品种; 新兴药用品种; 相关序列扩增多态性(SRAP); 性状; 黄酮类化合物

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)14-0138-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210818

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210507.1758.002.html>

[网络出版日期] 2021-05-08 13:57

Analysis of Equivalence Between Traditional and Nontraditional Medicinal Varieties of Citri Reticulatae Semen from Sichuan Province

XIAN Bin, WANG Rui, WU Qing-hua*, WANG Li, REN Chao-xiang, CHEN Jiang, CHEN Cui-ping,
ZHONG Wan-ting, PEI Jin*

(School of Pharmacy, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research,
Development and Utilization of Chinese Medicine Resources,
Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To study the differences in genetic relationship, shape, size, and flavonoid content between traditional and nontraditional medicinal varieties of Citri Reticulatae Semen produced in Sichuan province as well as their equivalence. **Method:** Six batches of traditional medicinal Citri Reticulatae Semen (*Citrus reticulata* 'Dahongpao') and 23 batches of nontraditional medicinal varieties were collected, and their genetic relationship was explored using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. Following the observation of their shapes and sizes under a stereomicroscope, the contents of naringin, hesperidin, and neohesperidin were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). SIMCA 14.1 software was used for cluster analysis of their shapes, sizes, and flavonoid contents, thus figuring out the similarities between

[收稿日期] 20201108(006)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81703654);国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人函[2019]41号);四川省科技计划重点研发项目(2020YFN0152);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划项目(CXTD2018003)

[第一作者] 鲜彬,在读硕士,从事中药资源开发与利用研究,E-mail:1471941140@qq.com

[通信作者] *吴清华,博士,讲师,从事中药资源品种品质研究,E-mail:20122051@cdutcm.edu.cn;

*裴瑾,博士,教授,从事中药资源品种品质研究,E-mail:peixjin@163.com

the traditional and nontraditional medicinal varieties in character, size, and chemical components. **Result:** SRAP markers-based genetic relationship analysis effectively distinguished different *Citri Reticulatae Semen* varieties from each other. Some samples collected from the same or adjacent places exhibited a close genetic relationship and they shared high similarities in shape, size, and flavonoid content. However, the traditional medicinal *Citri Reticulatae Semen* was still quite different from most nontraditional medicinal varieties. **Conclusion:** The analysis of differences in genetic materials, appearance, character, and active ingredient content between the traditional and nontraditional medicinal varieties revealed that the equivalence of *C. reticulata* 'Ponkan' samples from some regions with the traditional medicinal variety was the largest, enabling them to be considered as the emerging medicinal variety.

[**Keywords**] *Citri Reticulatae Semen*; traditional medicinal variety; nontraditional medicinal varieties; sequence-related amplified polymorphism (SRAP); characters; flavonoids

橘核为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* 及其栽培变种的干燥成熟种子。橘核在中国具有悠久的药用历史,1 000多年前,《诸家本草》中就有关于应用橘核治疗睾丸疼痛和腹痛的记载,2020年版《中华人民共和国药典》记载,橘核具有理气、散结、止痛的功效,临床上常用于治疗睾丸肿痛、乳痈乳癖等病症^[1]。橘核的主要有效成分为柠檬苦素类和黄酮类化合物^[2-3],其中黄酮类化合物具有抗氧化^[4]、抗癌^[5]、抑菌^[6]等作用。橘核广泛应用于临床处方和中成药生产中,例如茴香橘核丸^[7]、橘核莪术颗粒^[8]、鹿角橘核汤^[9]等。近年来,橘核临床上治疗急性乳腺炎、乳腺增生等疾病,效果显著^[10-11],其药用价值逐渐受到人们重视。

橘核的基原植物——橘,是典型的药食两用品种之一,在公元2000多年前就有栽培记载。橘是世界第一大水果,中国是世界第二大橘生产国,近几年年均产量达3 705.2万吨(1吨=1 000 kg)^[12],在江西、四川、广西等19个省均有栽培^[13]。目前,以橘核入药的柑橘品种主要有红橘、福橘、椪柑、大红袍、茶枝柑、樟头红、南丰蜜橘等几十个品种。橘品种十分丰富,极易发生种属内杂交,加上人类有意的干预,近年来涌现了许多新品种。不同品种的橘在外观形态、化学成分和遗传物质等方面存在明显差异^[2],其种子橘核与橘密切联系。因此,不同品种的橘核其药用品质亦差别明显。然而随着新品种的不断更新,橘核药材受到极大的影响:①传统药用品种逐渐被淘汰,传统来源品种大红袍、红橘等因其不耐贮藏、经济效益低、无市场竞争力等缺点已逐渐被果农淘汰,大多已被改良成经济效益高、趋于无籽化发展的品种,仅有少数果农栽培红橘供自己食用。②以果用新品种橘核入药的质量问题突出,来源于新品种的橘核药材质量未经评价便流通

市场,导致质量问题突出,临床疗效难以保证。

目前关于柑橘的研究大多集中在果用新品种选育、陈皮的化学成分^[14]和药理药效研究^[15]等方面,关于橘核的研究仅限于某一类化学成分方面,如柠檬苦素^[16],而对于新品种橘核能否代替传统品种入药的研究鲜见报道。为保证橘核药材质量,寻找和扩大新药源,本研究拟从不同品种橘核主要有效成分群、亲缘关系和性状特征这几个方面展开评价。以柑橘大省四川的29份橘核样品为研究对象,运用相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记技术对不同品种和产地的橘核进行遗传多样性分析,采用体视显微镜对橘核的性状指标进行量化,运用高效液相色谱法(HPLC)对橘核的有效成分含量进行测定。通过“亲缘关系-性状-化学表征”的多维评价模式,根据植物亲缘关系探索不同品种橘核中活性成分的分布、变化规律,阐释不同品种在性状、代谢产物等方面的差异,筛选优良的橘核种质资源,为橘核药材的可持续利用奠定基础;为以橘核为代表的药食两用的多基原中药材品种的品质评价提供科学的理论依据。

1 材料

Mini-Subcell GT型电泳槽,Power Pac Basic型凝胶水平电泳仪,Gel Doc™ XR+SOP型凝胶成像系统 EB, T100™ Thermal Cycler型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司),900 series型超低温冰箱(美国Thermo Fisher公司),高压灭菌锅(日本Sanyo公司),JA1003型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),CTISRE型高速离心机(日本Hitachi公司),MX-20型X-射线成像系统(美国Faxitron公司),CL-600型体视显微镜(德国Zeiss公司),1200 infinity系列高效液相色谱系统(美国Agilent公司),BSA224S型电子天平(德国Sartorius公司)。

植物总DNA提取试剂盒(OMEGA生物公司,批号R6928), $2\times$ Taq PCR Master Mix(天根生化科技有限公司,批号726285AC),液氮(成都飞克生物科技有限公司),Ultra GelRed(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号GR501-AA), $6\times$ Loading buffer(天根生化科技有限公司,批号P4527),DL-2000 Maker(宝日生物技术有限公司,批号AJ50970A),Agarose LE(天根生化科技有限公司,批号111860),无水乙醇(成都市科龙化工试剂厂,批号2015092102),甲醇、乙腈(色谱级,美国Fisher公司,批号分别为140284,154450),柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为

MUST-16041912, MUST-16041806, MUST-16040707,纯度均 $>98\%$)。

实验样品于2015年10月至12月采自柑橘主产地四川邛崃、泸州、广元、宜宾、自贡等14个地区,经成都中医药大学裴瑾教授鉴定为橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其近缘物种(包括椪柑 *C. reticulata* ‘Ponkan’,甜橙 *C. sinensis* Osbeck,宜昌橙 *C. ichangensis* Swingle,金橘 *Fortunella margarita* Swingle,血橙 *C. sinensis* Osbeck Egyptian Blood 等)。果实摘取种子,剥去种皮,与用无水乙醇清洁后的橘叶置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。样本收集具体情况见表1,图1。

表1 29批橘核样品采集情况

Table 1 Collection information of 35 batches of Citri Reticulatae Semen samples

| 编号 | 品种 | 采集地 | 经纬度/ $^{\circ}$ | 编号 | 品种 | 采集地 | 经纬度/ $^{\circ}$ |
|----|-----|--------|------------------|----|-----|--------|------------------|
| 1 | 椪柑 | 邛崃市小堂村 | 东经103.61,北纬30.30 | 16 | 大红袍 | 雅安市姚桥镇 | 东经103.05,北纬30.02 |
| 2 | 血橙 | 邛崃市小堂村 | 东经103.58,北纬30.33 | 17 | 椪柑 | 雅安市姚桥镇 | 东经103.05,北纬30.02 |
| 3 | 椪柑 | 泸州市古蔺县 | 东经105.81,北纬28.03 | 18 | 大红袍 | 眉山市丹棱县 | 东经103.48,北纬30.02 |
| 4 | 橘橙 | 广元市苍溪县 | 东经105.93,北纬31.73 | 19 | 椪柑 | 眉山市丹棱县 | 东经103.51,北纬30.01 |
| 5 | 椪柑 | 广元市苍溪县 | 东经105.90,北纬31.72 | 20 | 血橙 | 眉山市丹棱县 | 东经103.50,北纬30.03 |
| 6 | 大红袍 | 广元市苍溪县 | 东经105.91,北纬31.73 | 21 | 金橘 | 成都市温江区 | 东经103.85,北纬30.68 |
| 7 | 大红袍 | 乐山市犍为县 | 东经103.92,北纬29.21 | 22 | 血橙 | 资阳市伍隍镇 | 东经104.78,北纬29.94 |
| 8 | 椪柑 | 乐山市犍为县 | 东经103.94,北纬29.20 | 23 | 椪柑 | 资阳市伍隍镇 | 东经104.78,北纬29.96 |
| 9 | 血橙 | 乐山市犍为县 | 东经103.93,北纬29.20 | 24 | 椪柑 | 内江市双才镇 | 东经105.06,北纬29.65 |
| 10 | 大红袍 | 宜宾市高县 | 东经104.51,北纬28.43 | 25 | 大红袍 | 内江市双才镇 | 东经105.08,北纬29.67 |
| 11 | 椪柑 | 宜宾市高县 | 东经104.51,北纬28.40 | 26 | 宜昌橙 | 南充市阆家镇 | 东经106.16,北纬30.69 |
| 12 | 椪柑 | 宜宾市长宁县 | 东经104.91,北纬28.59 | 27 | 血橙 | 南充市阆家镇 | 东经106.15,北纬30.66 |
| 13 | 甜橙 | 宜宾市长宁县 | 东经104.93,北纬28.56 | 28 | 椪柑 | 南充市阆家镇 | 东经106.15,北纬30.66 |
| 14 | 血橙 | 宜宾市长宁县 | 东经104.92,北纬28.58 | 29 | 椪柑 | 江油市义新乡 | 东经104.88,北纬31.74 |
| 15 | 椪柑 | 自贡市成佳镇 | 东经104.60,北纬29.37 | | | | |

2 方法与结果

2.1 遗传多样性分析

2.1.1 DNA的提取与检测 参照植物DNA提取试剂盒说明书中方法二(适用于新鲜/冷冻样品提取)分别提取29份叶片样品的总DNA,凝胶电泳后,凝胶成像系统检测DNA的浓度和完整性。29份样品DNA条带单一,清晰,明亮,无拖尾现象,样品DNA完整,浓度较高。见图2。

2.1.2 SRAP-PCR 采用了80对SRAP引物组合^[17](正向10个和反向8个)进行SRAP-PCR。PCR反应体系 $20\text{ }\mu\text{L}$, $2\times$ Taq PCR MasterMix $10\text{ }\mu\text{L}$,引物 $2\text{ }\mu\text{L}$,DNA模板 $2\text{ }\mu\text{L}$,dd H₂O加至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR扩增程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min , $35\text{ }^{\circ}\text{C}$

退火 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min ,5个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min , $51.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min ,35循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min ; $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增后,用2%的琼脂糖凝胶检测条带,从80对SRAP引物组合中筛选出22对扩增效果较好的引物。

本研究从80对SRAP引物组合中筛选出22对扩增效果较好的引物,用于遗传多态性分析,见表2。SRAP与引物F8-R8扩增后得到的琼脂糖凝胶,见图3。结果显示,不同品种橘核样品SRAP标记多态性较好,并具有明显的差异。本研究共统计清晰条带159条。

2.1.3 遗传多样性分析 应用NTsys 2.10e软件对29批橘核样品SRAP标记所获得的(1,0)矩阵数据

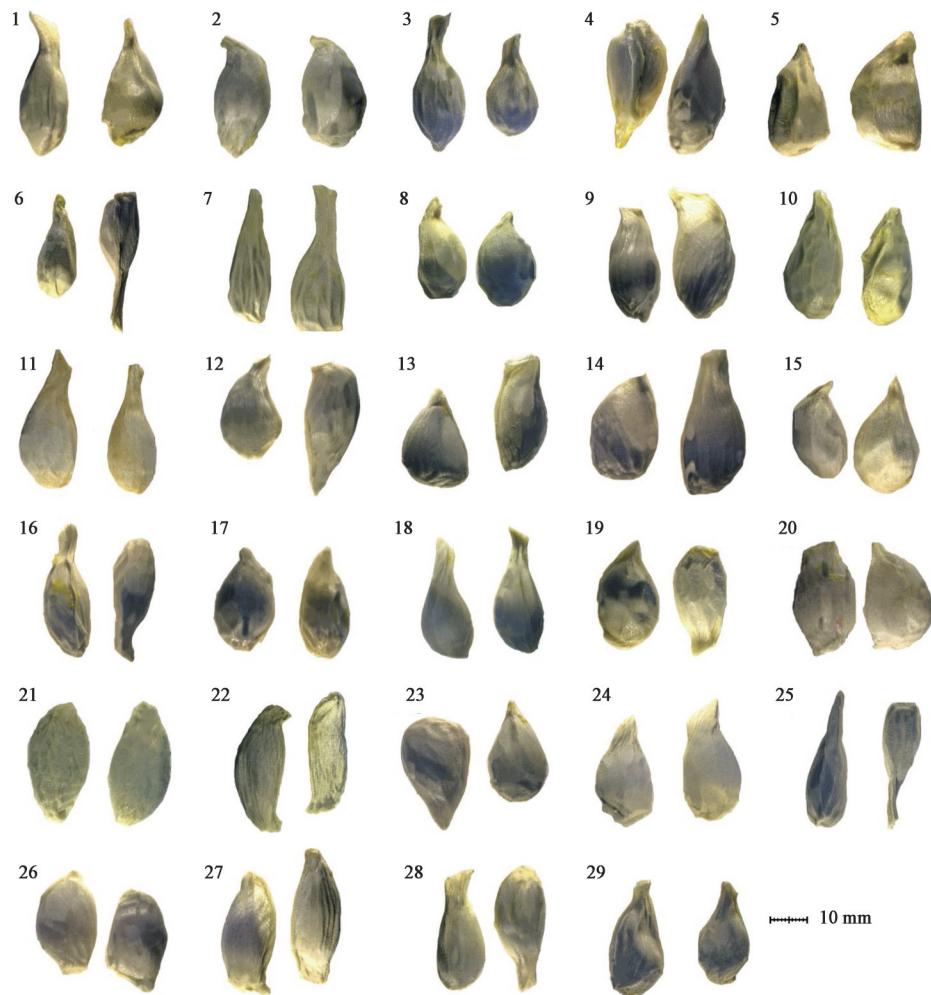


图1 29份橘核样品

Fig. 1 Seeds pictures of 29 batches of Citri Reticulatae Semen

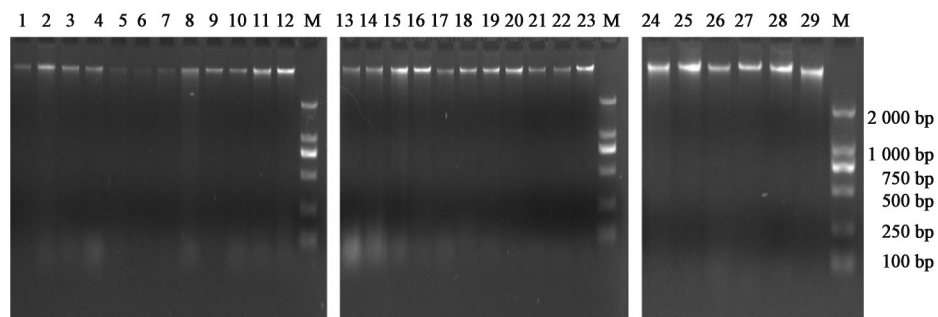


图2 29份橘核样品的DNA电泳

Fig. 2 DNA electrophoresis of 29 batches of Citri Reticulatae Semen

进行遗传多样性分析,获得的亲缘关系聚类图,见图4。结果表明29批柑橘种质资源间的遗传相似系数介于0.74~0.95。其中23号与其他28份样品亲缘关系最低,为0.73;在遗传相似系数0.816处,南充的3个样品聚为一类;剩余的25个样品相似系数在0.82~0.95;17号与18号亲缘关系最近,遗传相似系数为0.932。总体看来,椪柑与大红袍亲缘关系最近,金橘 *F. margarita* Swingle 与大红袍亲缘关系

最远。

2.2 橘核的形状、大小

2.2.1 橘核胚观察 在进行形状、大小观察前,先在X-射线成像系统下对29份川产橘样品透射成像,并在体视显微镜下观察,挑选种胚完好的橘核用于后续观测,见图5。

2.2.2 橘核大小、形状测量 每批橘核样品随机取30粒,以种脊棱线为长,与种脊棱线垂直的最长线

表2 SRAP引物中筛选出的22对引物

Table 2 22 pairs of primers selected from 80 pairs of SRAP primers

| 编号 | 引物序列 | 引物长度/bp | 编号 | 引物序列 | 引物长度/bp |
|----|-----------------------|---------|----|-----------------------|---------|
| 8 | 上游 TGAGTCCAAACCGGATA | 17 | 40 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAAG | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGAATTCAC | 18 | | 下游 GACTGCGTACGAATTCAC | 18 |
| 9 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAGC | 17 | 41 | 上游 TGAGTCCAAACCGGACA | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGATTAAT | 17 | | 下游 GACTGCGTACGATTAAT | 17 |
| 10 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAGC | 17 | 49 | 上游 TGAGTCCAAACCGGACG | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGAATTTGC | 18 | | 下游 GACTGCGTACGATTAAT | 17 |
| 13 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAGC | 17 | 56 | 上游 TGAGTCCAAACCGGACG | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGAATTAAC | 18 | | 下游 GACTGCGTACGAATTCAC | 18 |
| 24 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAAT | 17 | 58 | 上游 TGAGTCCAAACCGGACT | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGAATTCAC | 18 | | 下游 GACTGCGTACGAATTTGC | 18 |
| 25 | 上游 TGAGTCCAAACCGGACC | 17 | 60 | 上游 TGAGTCCAAACCGGACT | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGATTAAT | 17 | | 下游 GACTGCGTACGAATTTGA | 18 |
| 27 | 上游 TGAGTCCAAACCGGACC | 17 | 61 | 上游 TGAGTCCAAACCGGACT | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGAATTGAC | 18 | | 下游 GACTGCGTACGAATTAAC | 18 |
| 34 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAAG | 17 | 62 | 上游 TGAGTCCAAACCGGACT | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGAATTTGC | 18 | | 下游 GACTGCGTACGAATTGCA | 18 |
| 35 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAAG | 17 | 64 | 上游 TGAGTCCAAACCGGACT | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGAATTGAC | 18 | | 下游 GACTGCGTACGAATTCAC | 18 |
| 36 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAAG | 17 | 65 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAGG | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGAATTTGA | 18 | | 下游 GACTGCGTACGATTAAT | 17 |
| 37 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAAG | 17 | 66 | 上游 TGAGTCCAAACCGGAGG | 17 |
| | 下游 GACTGCGTACGAATTAAC | 18 | | 下游 GACTGCGTACGAATTTGC | 18 |

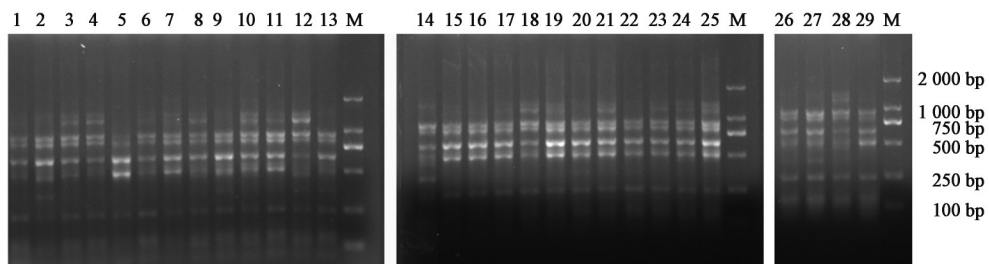


图3 29批橘核样品SRAP引物F8-R8的扩增结果电泳

Fig. 3 Amplification results electrophoresis of SRAP primer F8-R8 in 29 samples of Citri Reticulatae Semen

段为宽,宽到反种阜的垂线为高,用体视显微镜测量其长、宽、高,用种子长宽高之和来衡量种子的大小,见图6。用种子的总体方差来衡量种子的形状。总体方差越小、种子越接近球形;方差越大(总体方差 >0.05)^[18-19],种子越接近卵形。总体方差= $[3(x_{长}^2+x_{宽}^2+x_{高}^2)-(x_{长}+x_{宽}+x_{高})^2]/3^2$ 。

2.2.3 橘核形状、大小研究结果与分析 29批橘核样品的总体方差均 >0.05 ,三维之和基本一致,见表3。根据聚类图发现不同产地不同品种的橘核样品形状有较大差异,同一品种的橘核大部分较为相

似,见图7。与橘核样品的亲缘关系聚类图对比后发现,2,9和13号样品亲缘关系较近,15,16,17,19,23和24号样品的亲缘关系也较近,被分为同一支,说明橘核的形状大小与遗传物质相似性有关。与大红袍形状大小最相似的是部分椪柑、橘橙和血橙。宜昌橙、金橘与大红袍相差最大。

2.3 黄酮类化合物含量分析

2.3.1 色谱条件 采用Dikma C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.1%磷酸水(20:80);检测波长283 nm;柱温30℃;流速1.0 mL·min⁻¹;进

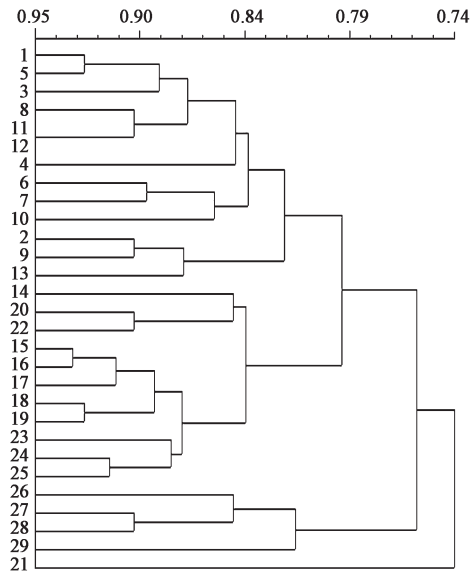


图4 29批橘核样品SRAP标记的亲缘关系聚类
Fig. 4 Dendrogram of genetic relationship 29 of Citri Reticulatae Semen samples using SRAP

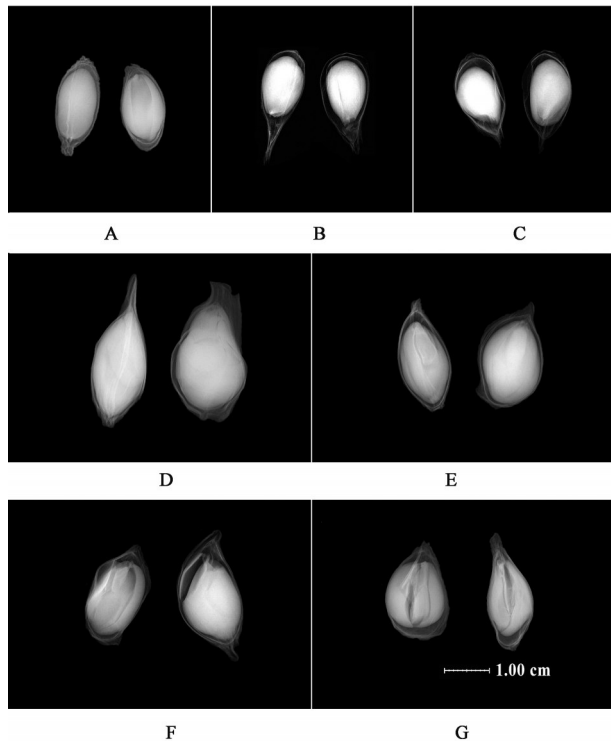


图5 橘核种胚X-射线
Fig. 5 X-ray diagrams of Citri Reticulatae Semen

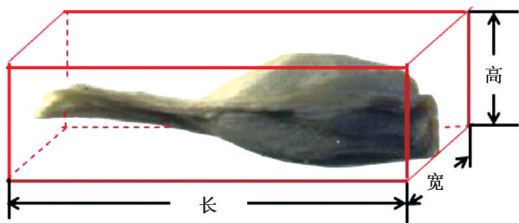


图6 橘核长、宽、高示意
Fig. 6 Length, width and height of Citri Reticulatae Semen

表3 橘核样品形状、大小数据

Table 3 Citri Reticulatae Semensamples' data of shape and size

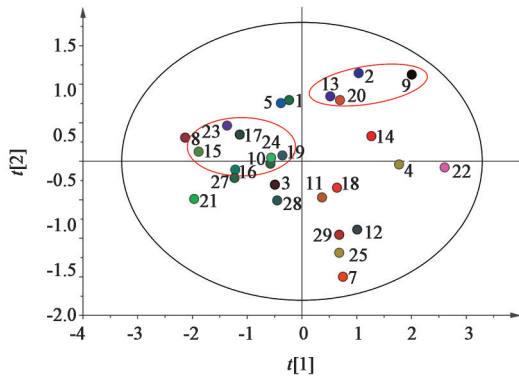
| 编号 | 长 | 宽 | 高 | 总体方差 | 三维之和($\bar{x}\pm s, n=3$) |
|----|-------|------|------|-------|-----------------------------|
| 1 | 11.39 | 6.39 | 5.23 | 7.82 | 23.02±0.31 |
| 2 | 12.45 | 6.53 | 5.61 | 9.51 | 24.60±0.35 |
| 3 | 11.39 | 5.60 | 4.72 | 9.37 | 21.70±0.31 |
| 4 | 13.95 | 8.37 | 6.28 | 13.06 | 24.16±0.32 |
| 5 | 11.33 | 6.35 | 5.17 | 7.60 | 22.84±0.33 |
| 6 | 12.92 | 6.17 | 5.07 | 10.96 | 28.60±0.27 |
| 7 | 12.18 | 5.31 | 4.25 | 13.87 | 21.75±0.39 |
| 8 | 9.93 | 5.97 | 4.78 | 5.20 | 20.69±0.31 |
| 9 | 13.09 | 6.70 | 5.74 | 11.33 | 25.52±0.34 |
| 10 | 11.32 | 5.80 | 4.76 | 8.71 | 21.89±0.23 |
| 11 | 11.84 | 6.03 | 4.50 | 11.26 | 22.38±0.41 |
| 12 | 12.46 | 5.52 | 4.62 | 13.2 | 22.60±0.31 |
| 13 | 11.90 | 7.02 | 4.89 | 9.11 | 23.81±0.18 |
| 14 | 12.53 | 6.36 | 5.13 | 11.43 | 24.03±0.37 |
| 15 | 10.21 | 5.68 | 4.85 | 5.99 | 20.75±0.38 |
| 16 | 10.83 | 5.69 | 4.65 | 7.66 | 21.19±0.24 |
| 17 | 10.77 | 6.08 | 4.84 | 6.97 | 21.70±0.25 |
| 18 | 12.18 | 5.78 | 4.79 | 11.51 | 22.76±0.32 |
| 19 | 11.45 | 5.93 | 4.82 | 8.89 | 22.20±0.30 |
| 20 | 12.13 | 6.65 | 5.15 | 9.54 | 23.93±0.37 |
| 21 | 10.25 | 5.49 | 4.34 | 6.98 | 20.08±0.23 |
| 22 | 13.47 | 6.48 | 4.98 | 14.66 | 24.94±0.44 |
| 23 | 10.57 | 6.16 | 4.86 | 6.32 | 21.59±0.25 |
| 24 | 11.31 | 5.82 | 4.84 | 8.59 | 21.97±0.20 |
| 25 | 12.33 | 5.30 | 4.34 | 13.14 | 21.98±0.25 |
| 26 | 12.96 | 7.10 | 5.37 | 20.35 | 26.01±0.39 |
| 27 | 14.72 | 6.45 | 4.84 | 7.83 | 21.06±0.30 |
| 28 | 10.81 | 5.57 | 7.83 | 9.81 | 21.55±0.29 |
| 29 | 10.84 | 5.44 | 4.68 | 12.73 | 22.21±0.32 |

样量 10 μL ^[20]。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别取柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷对照品适量,精密称定,加色谱甲醇制成质量浓度分别为 0.14, 0.10, 0.12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 取橘核粉末约 0.5 g,精密称定,置 150 mL 锥形瓶中,摇匀,称重,加入甲醇 25 mL,摇匀,置 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴回流提取 1.5 h,放置室温,称重,甲醇补足损失的质量,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液备用。

2.3.4 方法学考察 线性关系考察,以峰面积为



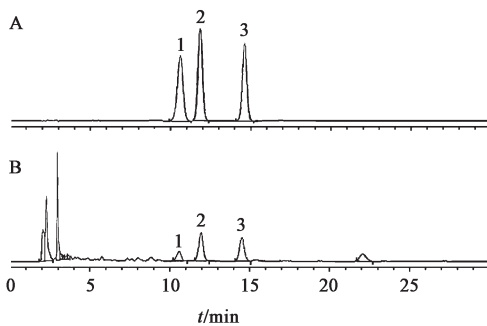
图种编号与表1一致

图7 橘核形状、大小聚类

Fig. 7 Cluster diagram of Citri Reticulatae Semen size and shape

Y轴,质量浓度为X轴,得柚皮苷线性回归方程为 $Y=11\ 129X+2.516\ 7$ ($R^2=0.999\ 7$),线性范围 $0.001\ 2\sim 0.008\ 8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;橙皮苷线性回归方程为 $Y=20\ 842X+9.343\ 1$ ($R^2=0.999\ 5$),线性范围 $0.002\ 0\sim 0.050\ 0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;新橙皮苷线性回归方程为 $Y=49\ 691X+15.857$ ($R^2=0.999\ 8$),线性范围 $0.000\ 1\sim 0.002\ 9\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。3个成分精密性、重复性、稳定性、加样回收率,RSD均 $<0.5\%$,符合实验要求。

2.3.5 黄酮类化合物测量结果分析 采用HPLC对29份橘核样品中的柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含量进行测定,色谱图见图8,测定结果见表4。结果表明,所有样品中柚皮苷和新橙皮苷的含量都比较低,其中仅不同产地的大红袍和金橘含有柚皮苷;橙皮苷的含量在血橙中最高,不同产地的大红袍次之,然后是不同产地的椪柑,成都金橘含量最低。大红袍样品在聚类分析图中聚在一起,与其他样品区别显著,与部分地区椪柑样品最接近,见图9;1,3,4,8,9,12和13号样品在亲缘关系聚类图中属于同一支,表明橘核黄酮类化合物含量与遗传物质关系密切。



1. 柚皮苷;2. 橙皮苷;3. 新橙皮苷

图8 混合对照品(A)和23号橘核样品(B)HPLC

Fig. 8 HPLC of mixed standard (A) and sample No. 23 (B)

表4 橘核样品中有效成分含量 (n=30)

Table 4 Assay results of active ingredient (n=30) %

| No. | 柚皮苷 | 橙皮苷 | 新橙皮苷 | No. | 柚皮苷 | 橙皮苷 | 新橙皮苷 |
|-----|---------|---------|---------|-----|---------|---------|---------|
| 1 | - | 0.014 3 | 0.002 8 | 16 | - | 0.040 3 | - |
| 2 | - | 0.013 1 | - | 17 | - | 0.034 0 | 0.003 1 |
| 3 | - | 0.030 5 | 0.005 2 | 18 | 0.009 3 | 0.031 0 | 0.015 1 |
| 4 | - | 0.029 9 | 0.003 7 | 19 | - | 0.033 7 | 0.003 1 |
| 5 | - | 0.080 5 | 0.002 5 | 20 | - | 0.018 9 | - |
| 6 | - | 0.066 2 | 0.009 5 | 21 | 0.039 2 | 0.012 3 | 0.002 9 |
| 7 | 0.013 9 | 0.067 8 | 0.013 8 | 22 | - | 0.179 2 | - |
| 8 | - | 0.037 2 | 0.003 9 | 23 | - | 0.053 9 | 0.002 3 |
| 9 | - | 0.032 9 | 0.003 7 | 24 | - | 0.054 3 | 0.004 7 |
| 10 | - | 0.065 3 | 0.011 9 | 25 | - | 0.056 8 | 0.010 5 |
| 11 | - | 0.025 2 | - | 26 | - | 0.033 1 | 0.003 1 |
| 12 | - | 0.030 5 | 0.004 6 | 27 | - | 0.250 9 | - |
| 13 | - | 0.015 6 | 0.002 4 | 28 | - | 0.065 9 | 0.002 8 |
| 14 | - | 0.023 9 | - | 29 | - | 0.015 0 | - |
| 15 | - | 0.031 6 | 0.003 9 | | | | |

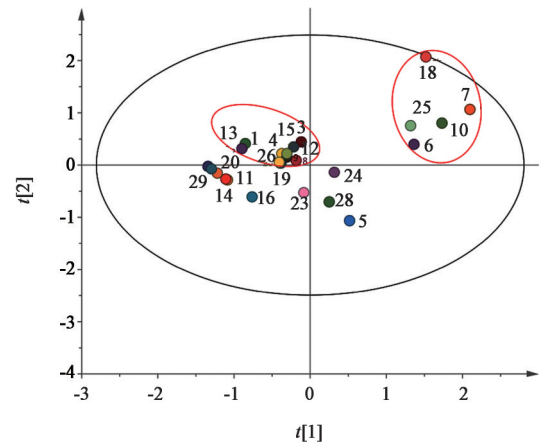


图9 橘核黄酮类成分含量聚类分析

Fig. 9 Cluster diagram of Citri Reticulatae Semen flavonoid content

3 讨论

本研究以29份川产橘核样品为研究对象,其中6份为传统药用品种大红袍样品,23份为新兴药用品种样品。结果表明29份川产橘核样品中,金橘、橘橙、血橙、甜橙、宜昌橙与传统药用品种大红袍的亲缘关系较远,橘核形状大小差异较大,黄酮类活性成分含量也有明显区别;部分椪柑与大红袍在这3个方面相似度高,可作为橘核来源的新兴品种进行进一步研究。

SRAP具有稳定、重复性好、周期短、多态性好等优点^[17],广泛应用于植物种质资源遗传多样性和

亲缘关系研究,因此本研究选用SRAP分子标记方法研究29份川产柑橘样品的亲缘关系。SRAP结果表明金橘与大红袍亲缘关系最远,因为金橘为金橘属植物,大红袍和其他品种的样品为柑橘属植物。橘橙是中国农科院柑橘研究所以伏令夏橙为母本、江南柑和朱砂柑为父本人工杂交而成的品种,与大红袍这个非杂交品种区别较大。血橙属于甜橙,甜橙原产于美国^[21],1965以后从摩洛哥等国家引进到中国^[22],而宜昌橙属宜昌橙类,可能起源于第四纪冰期,是较为原始的品种^[23-24],所以都与大红袍亲缘关系较远。椪柑和大红袍都属于宽皮柑桔的桔类,且椪柑嫁接在大红袍上,两者遗传背景相似,亲缘关系最近。环境饰变或自然选择的作用,加上种、属间杂交^[25],使得相同产地不同品种的柑橘其遗传相似度提高。例如南充不同品种的橘核样品与其余样品亲缘关系较远,被单独分为一支,可能因为南充的气候、土壤、海拔等自然环境尤其适合柑橘类植物的生长。地理隔离^[26]可能是不同产地的大红袍的被分为两支的原因之一。

传统性状检测具有较强的经验依赖性和主观性,无法客观评价药材质量,因此体视显微镜常用来观察种子形态结构并进行量化,能客观评价药材质量。如张杰等^[27]用体视显微镜鉴别白术和苍术的种子;李晓琳等^[28]使用体视显微镜研究丹参种子的形态结构。橘核是种子类中药,历版《中华人民共和国药典》都对橘核的大小、形状有规定,所以实验使用体视显微镜测量橘核的大小、形状,既能将橘核的外观特征以数字化方式呈现,又可避免主观性误差。研究发现部分品种相同的橘核其大小形状差异较大,这与橘生长地区的海拔、日照^[29]、年均温度、年均降雨量等自然因素^[30],栽培技术或生长发育时期有关。不同品种大小形状上的差异则可能是遗传物质不同引起的。

橘核的主要活性成分为柠檬苦素类化合物和黄酮类化合物,本课题组已经研究了新兴和传统药用品种中柠檬苦素类成分含量的差异,发现椪柑橘核中的柠檬苦素类化合物含量与大红袍最为接近^[16]。本实验对29批川产橘核样品黄酮类成分进行分析,发现柚皮苷仅存在于部分产地的大红袍和金橘样品中,大部分血橙样品不含新橙皮苷,这可能与橘核的遗传物质、种子成熟度^[31-32]等因素有关,如周浓等^[33]发现不同时间采收的川楝子中的3种黄酮类化合物含量随采收时间的不同有很大变化。部分大红袍样品中无柚皮苷和部分椪柑样品缺失

新橙皮苷的原因可能与其生长环境有关,已有研究表明光照^[34]、温度、灌溉^[35]、施肥^[36]等环境因素,会影响植物种子中黄酮类化合物的含量。聚类分析发现,部分品种不同的橘核样品,如1号椪柑,4号橘橙,9号血橙和13号甜橙被聚为一类,且在亲缘关系聚类图中也属于同一支,因此推测与遗传物质有关;还发现部分产地的椪柑样品与大红袍样品的黄酮类化合物含量相近,与前期研究相似^[16],进一步说明了椪柑与大红袍的等同性最大。本研究通过对29份川产橘核的遗传物质、外观性状和有效成分含量分析,发现大部分大红袍样品与椪柑样品的等同性最大,表明椪柑有潜力成为新兴的中药材橘核资源的潜力,为橘核药材资源的可持续利用奠定基础,并且对以橘核为代表的药食两用多基原中药材品种的品质评价提供科学的理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:376.
- [2] 罗静,何中燕,裴瑾,等. 橘核的HPLC指纹图谱研究及聚类分析[J]. 中国药房,2015,26(3):419-421.
- [3] 郁林娜,付洋,程盛勇,等. 橘核UPLC指纹图谱研究[J]. 中药材,2019,42(1):122-125.
- [4] MAJO D D, GIAMMANCO M, GUARDIA M L, et al. Flavonoids in citrus fruit structure antioxidant activity relationships[J]. Food Res Int, 2005, 38(10): 1161-1166.
- [5] MORLEY K L, FERGUSON P J, KOROPATNICK J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells[J]. Cancer Lett, 2007, 251(1):168-178.
- [6] KAWAGUCHI K, KIKUCHI S I, HASUNUMA R, et al. Suppression of infection-induced endotoxin shock in mice by a citrus flavanone naringin[J]. Planta Med, 2004, 70(1):17-22.
- [7] 张海红. 茴香橘核丸加减治疗功能性腹痛27例[J]. 河北中医, 2007, 29(4):312.
- [8] 蓝广和,王权胜,宾彬,等. 橘核莪术颗粒治疗慢性附睾炎30例临床观察[J]. 河北中医, 2013, 35(8):1201-1203.
- [9] 赵赛仙,杨丽清,杨昭娣. 鹿角橘核汤治疗乳腺增生68例[J]. 河北中医, 2001, 23(4):304.
- [10] 吴华. 橘核丸加减治疗乳腺增生病临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2016, 38(1):38-39.
- [11] LI X, XIN P, WANG C, et al. Mechanisms of traditional Chinese medicine in the treatment of

- mammary gland hyperplasia [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(3):443-458.
- [12] 赵丹, 杨肖华, 胡晶晶, 等. 大数据看我国柑橘市场[J]. *营销界*, 2019(31):30-33.
- [13] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985:2640-2641.
- [14] 杨放晴, 何丽英, 杨丹, 等. 不同陈化时间广陈皮中黄酮类成分的UPLC-Q-Orbitrap HRMS分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(12):125-132.
- [15] CHEN X M, TAIT A R, KITTS D D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities[J]. *Food Chem*, 2017, (218):15-21.
- [16] 胡静, 王黎, 裴瑾, 等. 橘核遗传多样性与柠檬苦素类化合物含量的相关性分析[J]. *中草药*, 2018, 49(3):678-684.
- [17] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2):455-461.
- [18] 徐宇. 大豆(*Glycine max* L. Merr.)籽粒大小和形状的QTL定位和驯化研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [19] 赵新风, 朱艳芬, 徐海量, 等. 塔里木河下游主要荒漠植物繁殖体的形状、大小与质量比较[J]. *生态学杂志*, 2009, 28(3):411-416.
- [20] 郭琦丽, 吕武清, 曾莉萍, 等. HPLC测定陈皮-枳壳药对提取物中柚皮苷, 橙皮苷和新橙皮苷的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(20):100-103.
- [21] 沈兆敏. 中国柑桔技术大全[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1992:1-90.
- [22] 沈兆敏, 柴寿昌. 中国现代柑橘技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2008:155-165.
- [23] 陈洪明, 江东, 胡忠荣, 等. 云南元江县首次发现原始宜昌橙群落[J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(6):929-935.
- [24] 苟剑英. 宜昌橙的生态地理分布和起源的初步探讨[J]. *四川农学院学报*, 1985, 3(1):23-27.
- [25] 李益, 马先锋, 唐浩, 等. 柑橘品种鉴定的SSR标记开发和指纹图谱库构建[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(15):149-159.
- [26] 史旦宾斯 G L. 植物的变异和进化[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1963:151-166.
- [27] 张杰, 周修腾, 杨光, 等. 白术和苍术种子的显微鉴别研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2019, 33(5):4-6.
- [28] 李晓琳, 展晓日, 李颖, 等. 丹参种子的生物学特性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(18):27-30.
- [29] 游晓庆, 陈慧, 李晓辉, 等. 不同种源掌叶覆盆子种子和果实表型性状及发芽率研究[J]. *南方林业科学*, 2019, 47(3):16-19, 34.
- [30] 葛玉珍, 梁惠凌, 蒋国秀, 等. 不同产地降香黄檀种子和幼苗性状的变异研究[J]. *广西植物*, 2020, 40(4):567-575.
- [31] FERRER-GALLEGO R, GARCÍA-MARINO M, HERNÁNDEZ-HIERRO M J, et al. Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 660(1/2):22-28.
- [32] 张小玲, 胡伟民. 种子学基础[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2016:30-54.
- [33] 周浓, 谢静, 陈璐. 不同采收时间川楝子中3种黄酮类化合物的含量变化[J]. *林产化学与工业*, 2013, 33(3):120-124.
- [34] LIU J, YANG C Q, ZHANG Q, et al. Partial improvements in the flavor quality of soybean seeds using intercropping systems with appropriate shading[J]. *Food Chem*, 2016(207):107-114.
- [35] XIA F B, LI C C, ZHAO N, et al. Rapid determination of active compounds and antioxidant activity of okra seeds using fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy[J]. *Molecules*, 2018, 23(3):550-559.
- [36] ZHANG B, HETTIARACHCHY N, CHEN P Y, et al. Influence of the application of three different elicitors on soybean plants on the concentrations of several isoflavones in soybean seeds[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(15):5548-5554.

[责任编辑 顾雪竹]