

# 陈皮水提物指纹图谱的化学计量学分析及与糖尿病认知功能障碍的谱效关系

李莉<sup>1,2</sup>, 孙宜春<sup>3</sup>, 庞媛媛<sup>3</sup>, 王娇<sup>4</sup>, 伍庆<sup>4\*</sup>, 潘卫<sup>1,5,6\*</sup>

- (1. 贵州医科大学 医学检验学院, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 基础医学院, 贵阳 550025;  
3. 国药集团同济堂(贵州)制药有限公司, 贵阳 550018;  
4. 贵州师范大学 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001;  
5. 贵州医科大学 附属医院 贵州省产前诊断中心, 贵阳 550004;  
6. 贵州医科大学 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵阳 550000)

**[摘要]** 目的:建立陈皮水提物的 HPLC 指纹图谱,并研究其与糖尿病大鼠认知功能的谱效关系。方法:采用 HPLC 建立 21 批陈皮水提物的指纹图谱,流动相乙腈(A)-0.1%的磷酸(B)梯度洗脱,检测波长 270 nm;采用指纹图谱软件中的相似度评价,SPSS 24.0 二维聚类分析和 SIMCA 14.1 主成分分析对结果进行分析;采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ, 50 mg·kg<sup>-1</sup>)复制糖尿病大鼠模型,模型复制成功后给予陈皮水提物灌胃,定期检测空腹血糖值,诱导第 12 周 Morris 水迷宫检测实验大鼠的空间学习记忆能力,灰色关联度分析和偏最小二乘回归分析研究谱效关系。结果:确定了陈皮水提物中 25 个共有峰,鉴定出 5 种物质,并且将 21 个不同品种、产地的陈皮分成了 2 类;与模型组比较,灌胃陈皮水提物的各组大鼠空腹血糖下降,认知能力得到改善;灰色关联分析及最小偏二乘回归分析谱效关系表明,19,15,4,17,6 号峰与糖尿病大鼠认知功能关联性较大。结论:不同品种、产地之间的陈皮水提物存在一定的差异,通过化学计量学可以方便、快捷的对不同产地的陈皮水提取物质进行全面的全面的质量评价,并且陈皮水提物可降低糖尿病大鼠的空腹血糖值及改善认知能力,其发挥作用是多种有效成分共同起效的结果,其中 19,15,4,17,6 号峰是与糖尿病大鼠认知功能密切相关的成分。

**[关键词]** 陈皮水提物; 指纹图谱; 化学计量学; 糖尿病; 认知功能障碍; 灰色关联度分析; 偏最小二乘回归分析; 谱效关系

**[中图分类号]** R289;R285;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0147-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191919

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190619.1644.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-06-20 09:17

## Stoichiometric Analysis in Fingerprint of Aqueous Extract of Citri Reticulatae Pericarpium and Spectrum-effect Relationship with Diabetic Cognitive Dysfunction

LI Li<sup>1,2</sup>, SUN Yi-chun<sup>3</sup>, PAN Yuan-yuan<sup>3</sup>, WANG Jiao<sup>4</sup>, WU Qing<sup>4\*</sup>, PAN Wei<sup>1,5,6\*</sup>

- (1. School of Clinical Laboratory Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;  
2. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;  
3. Sinopharm Tongjitang (Guizhou) Pharmaceical Co. Ltd., Guiyang 550018, China;  
4. Guizhou Provincial Key Laboratory for Mountainous Environment Information System and Environment Protection, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;  
5. Guizhou Prenatal Diagnostic Center, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University,

**[收稿日期]** 20190324(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81560720,81560138);贵州省域内一流学科建设项目(黔教科研发 2017[85]号);喀斯特地区生物与信息技术协同创新中心项目(黔教合协同创新字[2014]04)

**[第一作者]** 李莉,在读硕士,从事生物化学与分子生物学研究,E-mail:595555460@qq.com

**[通信作者]** \*潘卫,博士,教授,从事临床检验诊断学生物化学研究,E-mail:pw6602@sina.com;

\*伍庆,教授,从事分析化学研究,E-mail:wq0851@126.com

Guiyang 550004, China;

6. Key Laboratory of Education Department for Environmental Pollution and Disease Surveillance,  
Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of aqueous extract of Citri Reticulatae Pericarpium, and research the spectrum-effect relationship in diabetic cognitive dysfunction rats. **Method:** The HPLC fingerprints of 21 batches of Citri Reticulatae Pericarpium were established, with acetonitrile (A) -0.1% of phosphoric acid (B) as the flow phase for gradient elution. The detection wavelength was 270 nm. A comparative analysis was performed for the results based on similarity evaluation, SPSS 24.0 two-dimension clustering analysis and SIMCA 14.1 principal component analysis of fingerprint software. The diabetic rat model was duplicated by one-time intraperitoneal injection with streptozotocin (STZ) at the dose of  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . After successful replication of the model, the diabetic rats were given aqueous extract of Citri Reticulatae Pericarpium by gavage. The blood glucose value was determined at regular intervals. The cognitive function was analyzed with Morris water maze experiment at the 12 week. Grey relational analysis (GRA) and partial least squares regression analysis were used to study the spectrum-effect relationship. **Result:** Totally 16 common peaks of water extract of Citri Reticulatae Pericarpium were confirmed, five substances were identified, and 21 species of Citri Reticulatae Pericarpium of different varieties and origins were divided into 2 categories. Compared with the model group, the blood glucose of rats in each group treated with water extract of Citri Reticulatae Pericarpium were reduced, and their cognitive function was improved. According to the grey correlation analysis and the least partial square regression analysis, the peaks No. 19, 15, 4, 17 and 6 were significantly correlated with the cognitive function of diabetic rats. **Conclusion:** There were some differences in aqueous extract of Citri Reticulatae Pericarpium between different varieties and origins. It is convenient and fast to make a comprehensive quality evaluation of aqueous extract of Citri Reticulatae Pericarpium of different varieties and producing areas by stoichiometry, and aqueous extract of Citri Reticulatae Pericarpium can reduce the blood glucose level and improve the cognitive function of diabetic cognitive dysfunction rats, its mechanisms of action are resulted from the joint effects of multiple effective components, and peaks No. 19, 15, 4, 17 and 6 are components closely related to the cognitive function of diabetic rats.

**[Key words]** aqueous extract of Citri Reticulatae Pericarpium; fingerprints; chemometrics; diabetes; cognitive dysfunction; grey relational analysis; partial least squares regression analysis; spectrum-effect relationship

陈皮是芸香科植物橘 (*Citrus reticulata*) 及其栽培变种的干燥成熟果皮<sup>[1]</sup>。药材分为“陈皮”和“广陈皮”。经由采摘成熟果实、剥取果皮、晒干或低温干燥后得到。陈皮主要含有黄酮和挥发油两大类成分<sup>[2]</sup>,具有抗炎、抗氧化及营养神经的作用<sup>[3-5]</sup>。Ho 等<sup>[6]</sup>用 LC-MS 分析了陈皮乙醇提取物的成分,证明了陈皮中的黄酮类化合物具有较强的抗神经炎症作用。而陈皮更多的是以水提取液入药,如陈皮配方颗粒、二陈汤等。陈皮水溶性成分有橙皮苷、芸香柚皮苷、川陈皮素、橘皮素等<sup>[7]</sup>,且陈皮水提液有较强的体内外抗氧化效果,具有显著的抗缺氧、抗疲劳、降血糖作用<sup>[8-10]</sup>。目前对陈皮水提物的药物机制研究较多<sup>[11-14]</sup>,而其化学成分的报道较少。糖尿病性脑病是中枢神经系统 (CNS) 中较为严重的糖尿病相关并发症<sup>[15]</sup>,以认知功能受损、

神经化学和结构异常为特征<sup>[16]</sup>,糖尿病所引发的认知功能障碍的患病率为 25% ~ 36%<sup>[17]</sup>。目前糖尿病脑病的病理生理机制尚不明确<sup>[18]</sup>,其药物治疗仍处于摸索阶段<sup>[19]</sup>,药物治疗的主要原则为控制血糖和改善学习记忆能力,但这些药对糖尿病认知功能障碍的临床疗效还有待研究。张红蕊等<sup>[20]</sup>研究发现,陈皮提取物川陈皮素具有抗氧化应激和抑制凋亡的作用,进而改善糖尿病大鼠的学习和记忆能力。但陈皮水提物对糖尿病大鼠认知能力的影响鲜有报道,也尚未有陈皮水提物指纹图谱与药效相结合的研究,因此本研究采用 HPLC 建立陈皮水提物中香草酸、原儿茶酸、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素的指纹图谱,结合化学计量学对 21 批陈皮提取物进行分析,并研究陈皮水提物对糖尿病认知功能大鼠的改善作用,进而结合

灰色关联度分析及最小偏二乘回归分析研究其指纹图谱与认知能力的谱效关系。

### 1 材料

1100 型高效液相色谱仪(包括色谱工作站), Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(美国安捷伦科技有限公司);AL-104 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),移液枪(德国 Eppendorf 公司),恒温水浴锅(上海赫田科学仪器有限公司),水浴恒温振荡器(常州中诚仪器制造有限公司),链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司),血糖仪及血糖试纸[强生(中国)医疗器械有限公司],Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所)。

香草酸、原儿茶酸、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 Y26M7C15276, Z30M6L1, M03J8S39169, H22M8K32109, H09M7K14409, 纯度均 > 98%);乙腈(色谱纯),磷酸(分析纯)均购自天津科密欧试剂有限公司;水(超纯水,自制)。

动物选用 SD 雄性大鼠,清洁级,体质量 180 ~ 220 g,由贵州医科大学动物实验中心提供,贵州医科大学实验动物伦理委员会批准,合格证号为 SCXK(黔)2012-0001,批准编号 1702093。

21 批陈皮来源见表 1,以上药材均购于全国各药店,均由贵州中医药大学魏升华教授做药材鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》规定。

表 1 陈皮药材来源

Table 1 Sources of Pericarpium Citri Reticulatae

样品编号	产地	品种	样品编号	产地	品种
S1	广东新会	茶枝柑	S12	广西桂林	蜜柑
S2	广东新会	茶枝柑	S13	广西桂林	蜜柑
S3	广东惠州	茶枝柑	S14	广东新会	茶枝柑
S4	广东惠州	茶枝柑	S15	江西抚州	蜜柑
S5	江西南昌	蜜柑	S16	浙江温州	蜜柑
S6	江西南昌	蜜柑	S17	江西南昌	蜜柑
S7	浙江金华	蜜柑	S18	江西莲塘	蜜柑
S8	广西桂林	蜜柑	S19	广西桂林	蜜柑
S9	广东惠州	茶枝柑	S20	广东惠州	茶枝柑
S10	江西抚州	蜜柑	S21	江西莲塘	蜜柑
S11	广东惠州	茶枝柑			

### 2 方法

2.1 色谱条件 Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)梯

度洗脱(0 ~ 30 min, 5% ~ 19% A; 30 ~ 40 min, 19% ~ 20% A; 40 ~ 50 min, 20% ~ 29% A; 50 ~ 85 min, 29% ~ 54% A);流速 1 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长 270 nm;柱温 30 ℃;进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称定川陈皮素、橘皮素、橙皮苷对照品适量,加入甲醇溶解后得到质量浓度为 0.722, 0.840, 1.262 g·L<sup>-1</sup> 的对照品贮备液;分别精密称定原儿茶酸、香草酸对照品适量,加入无水乙醇溶解后得到质量浓度分别为 2.440, 2.260 g·L<sup>-1</sup> 的对照品贮备液。精密量取上述各对照品贮备液适量,用甲醇稀释,得到质量浓度分别为川陈皮素 0.101 1 g·L<sup>-1</sup>, 橘皮素 0.084 g·L<sup>-1</sup>, 橙皮苷 0.706 7 g·L<sup>-1</sup>, 原儿茶酸 0.040 g·L<sup>-1</sup>, 香草酸 0.027 1 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

2.3 供试品的制备 称取陈皮药材粗粉 2 g,过 60 目筛,混合均匀,精密称定于 250 mL 蒸馏瓶中,加入蒸馏水 100 mL,并加热回流 2 h,重复提取 3 次,过滤,合并过滤液,浓缩,加水定容至 100 mL 量瓶中,摇匀即得。取 1 mL 溶液过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

#### 2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取同一批号的供试品溶液 0.5 mL 于进样瓶中,按照 2.1 项下色谱条件连续进样 5 次,得到 25 个共有峰的保留时间和峰面积,计算得到各色谱峰保留时间的 RSD 在 0.2% ~ 0.6%,峰面积的 RSD 在 1.3% ~ 3.5%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取同一批号的供试品溶液 0.5 mL 于进样瓶中,按照 2.1 项下色谱条件,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进行进样,得到 25 个共有峰的保留时间和峰面积,计算得到各色谱峰保留时间的 RSD 在 0.07% ~ 0.6%,峰面积的 RSD 在 0.5% ~ 1.5%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批号样品根据 2.3 项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份进行测定,按照 2.1 项下色谱条件进样测定,记录 25 个共有峰的保留时间和峰面积,计算得到各色谱峰保留时间的 RSD 在 0.1% ~ 0.6%,峰面积的 RSD 在 0.1% ~ 3.1%,表明该方法重复性良好。

2.5 动物灌胃液的制备 取陈皮药材粗粉约 1 g,过 60 目筛,混合均匀,精密称定于 125 mL 蒸馏瓶中,加入蒸馏水 50 mL,并加热回流 2 h,重复提取 3 次,过滤,合并过滤液,浓缩,作为动物实验灌胃液。

**2.6 动物分组和给药** 将 96 只雄性清洁级 SD 大鼠适应性喂养 1 周,随机分出 8 只为正常组,其余 88 只采用一次性腹腔注射 STZ ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 诱导动物模型。4 周后,将造模成功的大鼠随机分为 11 组,每组 8 只,分别为模型组和试验组(陈皮水提取物灌胃),模型组灌胃等体积的纯净水,其余各组给予相应的陈皮水提取物,剂量按  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,每日 1 次,定时灌胃给药,连续灌胃 8 周。

**2.7 血糖的检测** 定期尾静脉采血,测定大鼠空腹血糖值。先用 75% 乙醇对大鼠尾部进行消毒,再以无菌采血针刺入大鼠尾部,见滴血后,用无菌棉签擦拭掉第 1 滴血,取第 2 滴血进行血糖仪测血糖,完毕后迅速用无菌棉签按压出血处。

**2.8 Morris 水迷宫试验** 连续灌胃 8 周后,对大鼠进行 Morris 水迷宫试验,于每天的相同时间段对每只大鼠进行测试,测试时需避免室内灯光、噪声等对大鼠的干扰。试验共历时 5 d,内容包括①定位航行实验,每只大鼠每天进行 4 次训练,每次训练时间为 60 s,连续两次训练时间应间隔 15 min 以上,每次训练时需将大鼠从不同象限的中点处投入水中,投入时将大鼠面朝池壁轻轻投入,以免扰动水面形成水波纹,影响实验结果。大鼠从入水至找到目标平台所需的时间记为逃避潜伏期,如大鼠在规定时间内未能找到目标平台,则逃避潜伏期记为 60 s,并将大鼠引导至目标平台停留 10 s。②空间探索实验,实验进行至第 5 天,撤除平台,按上述方法将大鼠投入水中,观察大鼠的游泳轨迹并记录大鼠穿越目标平台所在象限的次数,用来判别大鼠的空间学习记忆能力。

**2.9 灰色关联度分析** 对获得的 10 批陈皮药材水提取物 HPLC 指纹图谱共有峰峰面积数据与糖尿病大鼠的血糖值、逃避潜伏期、跨越平台次数进行灰色关联度分析,研究其相关性,参照文献[21-22]的方法和步骤对数据进行处理和分析。

**2.10 偏最小二乘回归分析** 以陈皮水提取物 HPLC 谱指纹图谱 25 个共有峰的峰面积作为自变量,不同批次陈皮水提取物对糖尿病大鼠的逃避潜伏期、跨越平台次数作为因变量,利用 SIMCA 14.1 软件通过偏最小二乘回归法进行谱效相关性分析。

### 3 结果

#### 3.1 21 批不同来源陈皮水提取物指纹图谱的建立

分别取 21 批不同来源的陈皮药材,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液  $10 \mu\text{L}$ ,按 2.1 项下色谱条件进样检测,记录色谱图,分别将 21

批陈皮水提取物的 HPLC 数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 版 A),得到 21 批陈皮水提取物样品的指纹图谱,确定 25 个共有峰,见图 1,2。

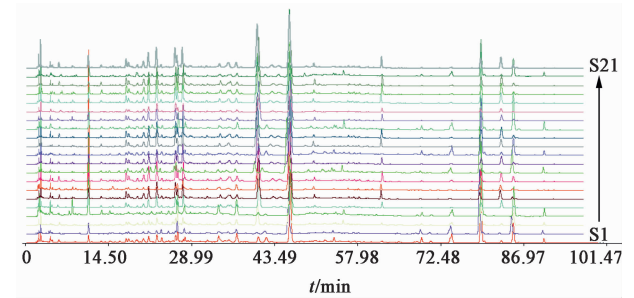
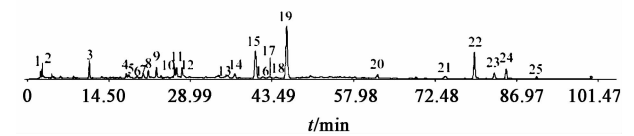


图 1 陈皮水提取物 HPLC 指纹谱叠加

Fig. 1 HPLC fingerprints overlay of aqueous extract of *Pericarpium Citri Reticulatae*



9. 原儿茶酸;12. 香草酸;19. 橙皮苷;22. 川陈皮素;25. 橘皮素

图 2 陈皮水提取物共有模式指纹谱

Fig. 2 Common pattern fingerprints of aqueous extract of *Pericarpium Citri Reticulatae*

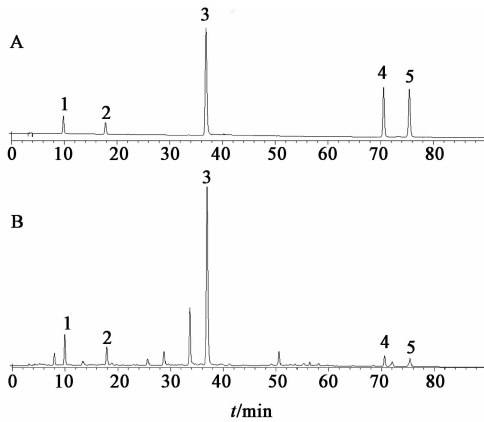
**3.2 21 批不同来源陈皮水提取物的相似度评价** 分别将 21 批陈皮水提取物的 HPLC 数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 版 A),结果 21 批陈皮水提取物的指纹图谱相似度均  $> 0.93$ ,各批次陈皮之间的相似性良好,见表 2。

表 2 陈皮提取物 HPLC 指纹图谱相似度分析

Table 2 Similarity analysis of aqueous extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* HPLC fingerprints

样品批号	相似度	样品批号	相似度
S1	0.991	S12	0.943
S2	0.993	S13	0.936
S3	0.984	S14	0.989
S4	0.988	S15	0.941
S5	0.936	S16	0.953
S6	0.931	S17	0.942
S7	0.955	S18	0.945
S8	0.938	S19	0.939
S9	0.983	S20	0.982
S10	0.940	S21	0.944
S11	0.985		

**3.3 共有峰的确证** 采用对照品比对的方法,经鉴定 1 号峰为原儿茶酸,2 号峰为香草酸,3 号峰为橙皮苷,4 号峰为川陈皮素,5 号峰为橘皮素,见图 3。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 原儿茶酸; 2. 香草酸; 3. 橙皮苷; 4. 川陈皮素; 5. 橘皮素

图 3 陈皮水提取物 HPLC 指纹谱共有峰识别

Fig. 3 Common peak identification of aqueous extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* HPLC fingerprints

**3.4 聚类分析** 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 版 A)处理指纹图谱得到 25 个共有峰的峰面积,以峰面积作为变量,运用 IBM SPSS Statistics version 24,分别采用组间联接、组内联接、中位数聚类和瓦尔德法进行分析,结果表明,瓦尔德法以欧式平方距离作为度量标准距离对陈皮水提取物进行聚类分析,通过 21 批陈皮水提取物聚类分析树状图发现,距离度量为 10 时,样品被分 2 类,距离度量为 5 时被分为 3 类。根据聚类分类情况,品种茶枝柑和蜜柑明显分为两类,且两类的相似度有所差异,茶枝柑相似度在 0.982 ~ 0.993,蜜柑的相似度在 0.931 ~ 0.955,产地之间的差异较小,对比指纹图谱软件得出的相似度结果,与相似度结果相符,见图 4。

**3.5 主成分分析** 采用 SPSS 统计软件(IBM SPSS Statistics version 24)和 SIMCA-P 14.1 统计软件对 21 批不同来源的陈皮水提取物指纹图谱数据进行主成分分析(PCA),SPSS 主成分分析组件图,见图 5。

**3.5.1 特征值、方差贡献率** 通过 SPSS 统计软件(IBM SPSS Statistics version 24)对指纹图谱数据进行 PCA,得出初始值特征值和方差贡献率,见表 3。提取主成分以变量重要性投影(VIP)值(特征值) > 1 为提取标准,最终提取到 5 个主成分且方差贡献率为 90.294% > 85%。

**3.5.2 多元统计分析** 运用 SIMCA-P 14.1 软件对 25 个共有峰的峰面积数据进行中心化处理,进行自

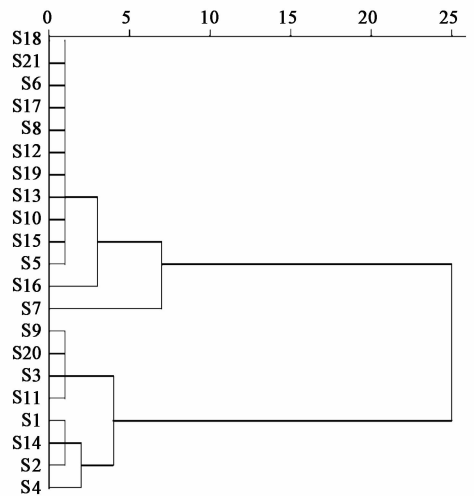


图 4 21 批陈皮水提取物指纹图谱的聚类分析树状关系

Fig. 4 Hierarchical cluster analysis for 21 batches of aqueous extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* HPLC fingerprints

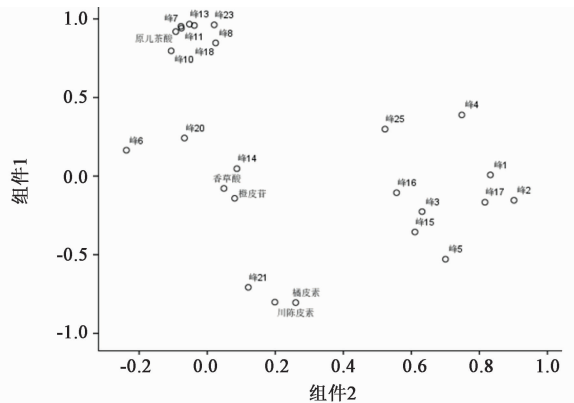


图 5 SPSS 主成分分析

Fig. 5 Principal component analysis component diagram from SPSS

表 3 初始特征值和方差贡献率

Table 3 Initial Eigenvalues and variance contribution rate

成分	初始特征值			提取平方和载入		
	总计	方差百分比 /%	累积 /%	总计	方差百分比 /%	累积 /%
1	10.531	42.123	42.123	9.431	37.725	37.725
2	5.590	22.360	64.483	4.812	19.248	56.972
3	3.626	14.504	78.987	3.250	12.999	69.972
4	1.675	6.699	85.686	2.916	11.662	81.634
5	1.152	4.608	90.294	2.165	8.660	90.294

动拟合对比不同主成分下的  $R^2X$  值和  $Q^2$  值,21 批采自不同产地、不同品种的陈皮水提取物进行主成分分析,经软件分析得到得分(Score)图和负载图>Loading),见图 6。由 Score 图可见,新生成的变量  $t1$  和  $t2$ ,包含了原始数据 84.52% 的变化,21 批不同

来源的陈皮水提取物被分成了 2 类,但是根据相似度和聚类分析,S16,S7 与茶枝柑品种较近,在 Score 图上表现的一致,从陈皮品种分类以及品种之间产地分析,所得结果与相似度评价结果和聚类分析大概一致。为了需求品种、产地之间的差异,由 Loading 图看出色谱峰 8,7,11,原儿茶酸,16,17,橘皮素是造成差异性的关键指标,色谱峰的确还待进

一步研究。

**3.6 陈皮水提取物对糖尿病大鼠血糖值的影响** 诱导第 12 周时各组大鼠的空腹血糖值,见表 4,结果说明,与正常组比较,模型组大鼠的空腹血糖值明显增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,陈皮水提取物灌胃后各组大鼠的空腹血糖均明显降低( $P < 0.01$ ),且陈皮水提取物灌胃各组组间差异无统计学意义。

表 4 各组大鼠空腹血糖值( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Fasting blood glucose of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	血糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	组别	血糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	4.66 ± 0.35	S8	11.92 ± 2.07 <sup>2)</sup>
模型	24.7 ± 2.54 <sup>1)</sup>	S9	12.29 ± 1.91 <sup>2)</sup>
S1	12.61 ± 1.90 <sup>2)</sup>	S10	11.91 ± 1.82 <sup>2)</sup>
S3	11.20 ± 1.24 <sup>2)</sup>	S14	11.59 ± 1.58 <sup>2)</sup>
S5	11.79 ± 1.54 <sup>2)</sup>	S16	12.31 ± 1.77 <sup>2)</sup>
S7	12.14 ± 1.66 <sup>2)</sup>	S18	11.89 ± 1.46 <sup>2)</sup>

注:给药剂量均为  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;<sup>1)</sup>与对照组比较  $P < 0.01$ ,<sup>2)</sup>与模型组比较  $P < 0.01$ 。

**3.7 陈皮水提取物对糖尿病大鼠学习记忆能力的影响** 大鼠诱导第 12 周时,采用 Morris 水迷宫试验检测认知功能,见表 5。结果表明,与正常组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期明显延长( $P < 0.01$ ),穿越次数明显减少( $P < 0.01$ );与模型组比较,陈皮水提取物各组大鼠的逃避潜伏期均明显缩短( $P < 0.01$ ),穿越次数均明显增加( $P < 0.01$ ),且陈皮水提取物灌胃各组组间差异无统计学意义。

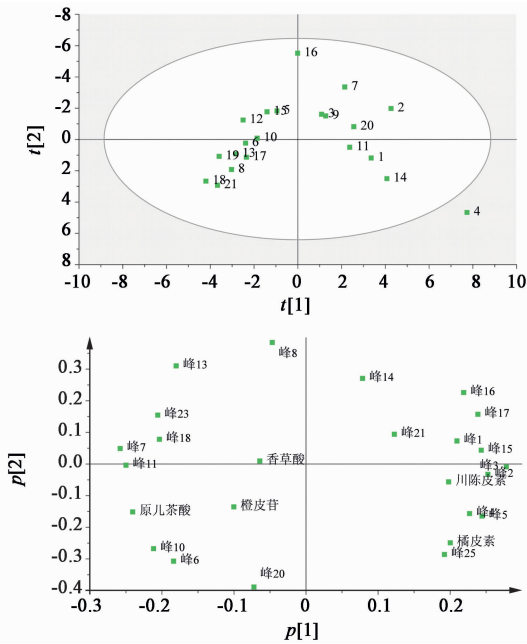


图 6 21 批陈皮提取物的 PCA 的 Score 及 Loading  
Fig. 6 PCA Score and Loading plots of 21 batches of aqueous extract of Pericarpium Citri Reticulatae

表 5 各组大鼠 Morris 水迷宫学习记忆能力测试( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 5 Test results of Morris water maze learning and memory ability in each group of rat ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	逃避潜伏期/s	跨越平台次数/次	组别	逃避潜伏期/s	跨越平台次数/次
正常	10.74 ± 3.68	8.37 ± 1.84	S8	18.45 ± 5.72 <sup>2)</sup>	5.87 ± 1.45 <sup>2)</sup>
模型	36.37 ± 9.92 <sup>1)</sup>	2.25 ± 1.03 <sup>1)</sup>	S9	18.66 ± 8.21 <sup>2)</sup>	5.75 ± 1.66 <sup>2)</sup>
S1	19.32 ± 4.39 <sup>2)</sup>	6.37 ± 1.59 <sup>2)</sup>	S10	19.41 ± 5.54 <sup>2)</sup>	6.75 ± 1.28 <sup>2)</sup>
S3	18.74 ± 8.36 <sup>2)</sup>	5.37 ± 1.50 <sup>2)</sup>	S14	20.50 ± 6.94 <sup>2)</sup>	6.25 ± 1.48 <sup>2)</sup>
S5	20.65 ± 6.17 <sup>2)</sup>	5.50 ± 1.92 <sup>2)</sup>	S16	19.59 ± 8.16 <sup>2)</sup>	6.37 ± 2.26 <sup>2)</sup>
S7	19.55 ± 5.28 <sup>2)</sup>	6.25 ± 1.48 <sup>2)</sup>	S18	19.72 ± 5.52 <sup>2)</sup>	5.62 ± 2.26 <sup>2)</sup>

注:<sup>1)</sup>与对照组比较  $P < 0.01$ ;<sup>2)</sup>与模型组比较  $P < 0.01$ 。

**3.8 陈皮水提取物指纹图谱特征与药效作用的灰色关联度分析** 结果表明,陈皮水提取物的 25 个共有峰所代表的化学成分与糖尿病大鼠逃避潜伏期、跨越平台次数均有一定的关联性(关联度  $> 0.759$ ),见表 6,说明陈皮水提取物改善糖尿病大鼠认知能力的作用是多种有效成分共同作用的结果,其中 19(橙

皮苷),9(香草酸),15,4,10,17,5,6,20 号峰对作用效果贡献较大,关联度均  $> 0.873$ 。

**3.9 陈皮水提取物指纹图谱特征与药效作用的偏最小二乘回归分析** 偏最小二乘回归分析的 PLSR 回归系数及 VIP 贡献值见图 7,8,结果表明,陈皮提取物的色谱峰中有 12 个峰与逃避潜伏期呈正相关,其

表 6 不同来源陈皮水提取物指纹图谱与糖尿病大鼠逃避潜伏期、跨越平台次数的灰色关联度分析

Table 6 Grey correlation analysis between fingerprints of aqueous extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* from different sources with escape latency, crossing platform times

关联序号	逃避潜伏期		跨越平台次数	
	峰号	关联度	峰号	关联度
1	19	0.934	19	0.932
2	9	0.912	9	0.909
3	15	0.907	15	0.909
4	4	0.898	10	0.902
5	10	0.894	4	0.892
6	17	0.884	17	0.883
7	5	0.878	5	0.879
8	6	0.878	6	0.874
9	20	0.876	20	0.873
10	16	0.873	1	0.870
11	1	0.869	16	0.870
12	8	0.868	14	0.867
13	14	0.863	8	0.861
14	12	0.861	12	0.858
15	7	0.858	7	0.856
16	2	0.857	2	0.855
17	18	0.854	18	0.848
18	11	0.850	11	0.847
19	13	0.842	13	0.839
20	25	0.833	25	0.838
21	23	0.821	23	0.818
22	21	0.797	21	0.801
23	3	0.776	3	0.779
24	22	0.766	22	0.764
25	24	0.759	24	0.759

余 13 个峰与其呈负相关, 一般而言, VIP 值 > 1, 说明其对模型有显著贡献, 峰 3, 19, 1, 10, 4, 17, 2, 15, 25, 6, 12, 16 的 VIP 值 > 1; 陈皮提取物的色谱峰中有 12 个峰与跨越平台次数呈正相关, 其余 13 个峰与其呈负相关, 峰 15, 1, 25, 17, 3, 14, 4, 8, 6, 19, 2 的 VIP 值 > 1, 说明在陈皮水提物的 HPLC 指纹图谱中, 其相对应的成分对药效指标血糖水平发挥着重要影响。结合灰色关联度分析结果, 19, 15, 4, 17, 6 号峰为 5 个与糖尿病大鼠认知能力密切相关的成分。

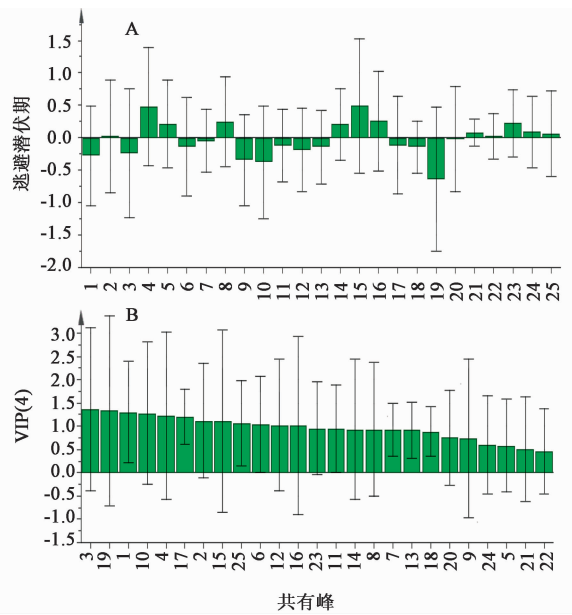


图 7 共有峰与逃避潜伏期的偏回归系数 (A) 及 VIP (B)  
Fig. 7 Partial regression coefficient (A) and VIP plot (B) of common peak and escape latency

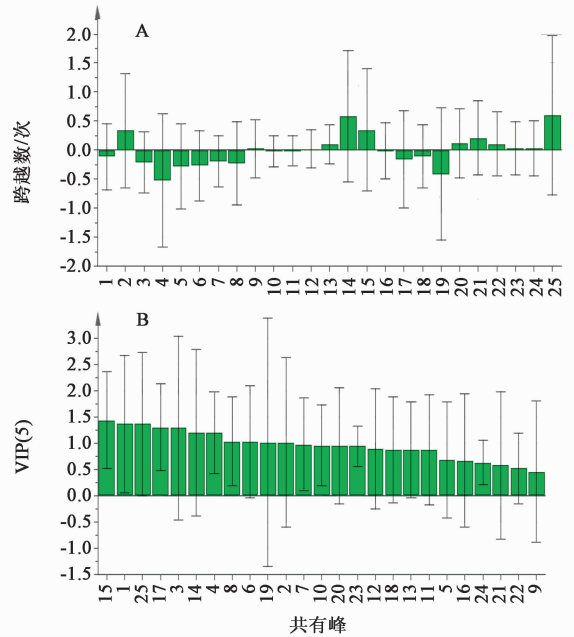


图 8 共有峰与跨越平台次数的偏回归系数 (A) 及 VIP (B)  
Fig. 8 Partial regression coefficient (A) and VIP plot (B) of common peak and crossing platform times

#### 4 讨论

对陈皮水提取的次数 (1, 2, 3 次), 提取溶剂体积 (50, 80, 100 mL), 提取时间 (30, 60, 120 min) 进行了考察, 最终确定了制备陈皮水提取物供试品的方法为加入蒸馏水 100 mL, 并加热回流 2 h, 重复提取 3 次。

在流动相选择方面,通过对乙腈-水,甲醇-水及乙腈-0.1%磷酸体系的考察,参照梯度洗脱所得各峰分离效果及配比简单性,最终确定为乙腈(A)-0.1%磷酸(B)体系。在检测波长的选择上,采用270 nm同时测定陈皮水提物指纹图中的色谱峰时均能得到较好的响应值,且峰型良好,因此选择270 nm作为检测波长。

通过化学计量学对其进行主成分分析,中药色谱指纹图谱相似度评价系统、系统聚类3种方法对21批不同品种、产地的陈皮水提物进行数据分析,可将其分为两类,表明陈皮水提物的质量较稳定,为陈皮水提物的质量控制及溯源研究提供物质基础。

本研究根据预实验选择药效较好的 $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,作为给药剂量,实验结果显示,陈皮水提物可以降低糖尿病大鼠的血糖值和改善其认知能力,且不同品种、产地的陈皮水提物对糖尿病大鼠认知功能障碍的保护作用无明显差异。本实验结果显示陈皮水提物可改善糖尿病认知功能障碍,但陈皮水提物的药效成分及作用机制尚不清楚,因此,探讨陈皮中防治糖尿病认知功能障碍的药效成分及作用机制将是下一步研究的重点。

本研究采用了灰色关联度分析和偏最小二乘回归分析的方法<sup>[21-22]</sup>,研究了陈皮水提物HPLC指纹图谱共有峰与糖尿病大鼠学习记忆之间的关系,表明了陈皮水提物中19,15,4,17,6号峰为5个与糖尿病大鼠认知功能密切相关的成分,初步阐述了陈皮水提物与糖尿病大鼠认知功能的谱效关系,为陈皮水提物改善糖尿病大鼠认知功能的药效物质研究奠定了基础。

[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,2015:191.  
[2] 童红梅. 陈皮中黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 山西中医学院学报,2010,11(3):75-76.  
[3] Akachi T, Shiina Y, Ohishi Y, et al. Hepatoprotective effects of flavonoids from shekwasha (*Citrus depressa*) against D-galactosamine-induced liver injury in rats[J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2010, 56(1): 60-67.  
[4] 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.  
[5] Erukainure L O, Ebuehi A T O, Choudhary I M, et al. Orange peel extracts: chemical characterization, antioxidant, antioxidative burst, and phytotoxic activities [J]. J Diet Suppl, 2016, 13(5): 585-594.

[6] Ho S C, KUO C T. Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae pericarpium*) [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 71: 176-182.  
[7] XU G H, CHEN J C, LIU D H, et al. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water [J]. J Food Sci, 2008, 73(1): C11-8.  
[8] 马森. 瓯柑橘皮的体内抗氧化作用研究[J]. 武夷学院学报, 2010, 29(5): 27-29.  
[9] 马森. 瓯柑橘皮和陈皮降血糖作用研究[J]. 武夷学院学报, 2010, 29(2): 18-20.  
[10] 马森. 瓯柑橘皮和陈皮类黄酮体外抗氧化作用[J]. 畜牧兽医杂志, 2010, 29(3): 9-10 + 13.  
[11] 傅曼琴, 肖更生, 吴继军, 等. 广陈皮促消化功能物质基础的研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(1): 56-64.  
[12] 罗璇捷, 罗美霞, 杨宜婷, 等. 不同产地广陈皮水提物的祛痰、理气功效比较研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20(5): 48-50.  
[13] 贺燕林, 杨中林. 陈皮不同提取物及橙皮苷部位的抗炎活性比较研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(13): 23-25.  
[14] 陈琼, 付远飞, 刘惠婷, 等. 陈皮总黄酮干预血管平滑肌细胞糖胺聚糖代谢的机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(2): 179-183.  
[15] Bhusal A, Rahman M H, Lee I K, et al. Role of hippocampal lipocalin-2 in experimental diabetic encephalopathy [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 25.  
[16] Kuhad A, Chopra K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 576(1/3): 34-42.  
[17] Alagiakrishnan K, Sankaralingam S, Ghosh M, et al. Antidiabetic drugs and their potential role in treating mild cognitive impairment and Alzheimer's disease [J]. Discov Med, 2013, 16(90): 277-286.  
[18] 杜宇, 付剑亮. 糖尿病脑病危险因素及发病机制研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2016, 43(4): 358-362.  
[19] 张梅. 中西医药物治疗糖尿病脑病的研究进展[J]. 中医药导报, 2014, 20(1): 109-111.  
[20] 张红蕊, 王耕根, 崔昌萌, 等. 川陈皮素对糖尿病大鼠认知功能障碍的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(18): 4516-4519.  
[21] 于萍, 李克. 使用 Microsoft Excel 进行数据的灰关联分析[J]. 微型电脑应用, 2011, 27(3): 29-30.  
[22] 白关亚, 何盼, 李媛媛, 等. 青翘不同极性部位抗炎作用的谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 1-6.

[责任编辑 顾雪竹]