

陈皮挥发油质量标志物预测及 GC-MS 定量分析

朱丽云¹, 柳小莉², 郑琴^{1*}, 康勇杰¹, 李文静¹, 肖帅¹, 熊艳芬¹,
蔡可珍¹, 吴梦琪¹, 杨明^{1,2*}

(1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室 创新药物与高效节能降耗制药设备
国家重点实验室, 江西 南昌 330004; 2. 成都中医药大学 药学院, 四川 成都 611137)

[摘要] 陈皮挥发油质量标志物预测及 GC-MS 定量分析。GC-MS 检测陈皮挥发油获得共有成分, 运用网络药理学方法构建成分-靶点网络、蛋白与蛋白互作 (PPI) 网络、GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析, 阐明共有成分药理作用, 分子对接考察共有成分生物活性, 以确定陈皮挥发油质量标志物, GC-MS 定量分析质量标志物。19 批次陈皮挥发油 GC-MS 分析获得了 3 个共有成分为 D-柠檬烯、 γ -蒎品烯和月桂烯, 对共有成分进行网络药理学分析, 筛选出陈皮挥发油主要通过 D-柠檬烯与 γ -蒎品烯作用于核心靶点 GABRA1、GABRA6、GABRA5、GABRA3、GABRA2, 通过 5 条重要通路尼古丁成瘾、 γ -氨基丁酸能突触等, 主要分布于嗅觉、大脑皮层、小脑、基底神经节、海马、杏仁核等组织中发挥药理作用, 分子对接结果分析 D-柠檬烯和 γ -蒎品烯具有较好的生物活性。确定陈皮挥发油的质量标志物为 D-柠檬烯和 γ -蒎品烯。定量分析结果表明各产地陈皮挥发油中 D-柠檬烯的体积分数为 0.77~1.03 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -蒎品烯的体积分数 0.04~0.13 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。预测的 D-柠檬烯和 γ -蒎品烯确定为陈皮挥发油的质量标志物, 为陈皮挥发油质量标准建立质量评价奠定实验基础。

[关键词] 陈皮挥发油; GC-MS; 质量标志物; 网络药理学; 分子对接; D-柠檬烯; γ -蒎品烯

Prediction of Q-markers of Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil and GC-MS based quantitative analysis

ZHU Li-yun¹, LIU Xiao-li², ZHENG Qin^{1*}, KANG Yong-jie¹, LI Wen-jing¹, XIAO Shuai¹, XIONG Yan-fen¹,
CAI Ke-zhen¹, WU Meng-qi¹, YANG Ming^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Innovative Drugs and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] This study was designed to predict the Q-markers of Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil and conduct quantitative analysis by GC-MS. The common components of Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil were detected by GC-MS. The network pharmacology approaches were utilized for constructing the component-target network and protein-protein interaction (PPI) network, followed by the GO and KEGG pathway enrichment analysis to clarify the pharmacological effects of common components. Molecular docking was conducted to observe the biological activities of common components, thus identifying the Q-markers of Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil. The obtained Q-markers were subjected to quantitative analysis by GC-MS. The GC-MS analysis of 19 batches of Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil revealed three common components, namely, D-limonene, γ -terpinene, and myrcene. The

[收稿日期] 2021-05-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82074026); 江西省重大科技研发专项 (20194ABC28009); 江西省大学生创新创业训练计划项目 (S202010412052); 江西省大学生创新创业训练计划项目 (202010412213)

[通信作者] * 杨明, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型与新技术, E-mail: yangming26@126.com; * 郑琴, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型与新技术, E-mail: zhengqin912006@163.com

[作者简介] 朱丽云, 硕士研究生, E-mail: 577979083@qq.com

common components were analyzed based on network pharmacology, and the results showed that Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil mainly acted on the core targets GABRA1, GABRA6, GABRA5, GABRA3, and GABRA2 through D-limonene and γ -terpinene, with five important pathways such as nicotine addiction and GABAergic synapse involved. The core targets were mainly distributed in olfactory region, cerebral cortex, cerebellum, basal ganglia, hippocampus, and amygdala to exert the pharmacological effects. As revealed by molecular docking, D-limonene and γ -terpinene exhibited good biological activities, so they were identified as the Q-markers of Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil. The results of quantitative analysis showed that the volume fraction of D-limonene was within the range of $0.77\text{--}1.03\ \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, and that of γ -terpinene within the range of $0.04\text{--}0.13\ \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. The prediction of D-limonene and γ -terpinene as the Q-markers of Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil has laid an experimental foundation for the establishment of the quality evaluation standard for Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil.

[Key words] Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil; GC-MS; Q-markers; network pharmacology; molecular docking; D-limonene; γ -terpinene

DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20210924.302

陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮,具有理气健脾,燥湿化痰的功效^[1]。湖北、湖南、四川、浙江、广东、山东为陈皮的主产地。除药用外,陈皮在药膳、保健食品、调味品、茶饮等均具有开发前景。挥发油是陈皮主要成分之一,占药材总量的 2%^[2],对心血管系统、消化系统、中枢神经系统疾病^[2-3]均具有明显的药理作用,通过吸嗅、口服、经皮等途径发挥作用达到预防与治疗疾病的目的^[4]。失眠是最常见的中枢神经系统疾病之一^[5-6],研究发现,陈皮挥发油及其主要成分柠檬烯对中枢神经系统有镇痛作用和促进神经中枢维持觉醒的作用^[7]。柠檬烯可能通过调节多巴胺水平和 5-HT 受体功能达到镇静作用^[8]。

陈皮挥发油药效保证与安全应用以质量评价为基础。橘类栽培种类繁多,饮片生产过程中受多种因素影响,导致各产地陈皮药材挥发油含量存在一定的差异。现阶段陈皮挥发油质量相关研究缺乏,筛选质量标志物^[9]对陈皮挥发油质量评价及标准建立具有推进意义。本文提取挥发油后通过 GC-MS 检测并分析不同产地陈皮挥发油的化学成分,找出共有成分,运用网络药理学方法查找共有成分的作用靶点,通过构建共同成分靶点-靶点网络、蛋白-蛋白互作(PPI)网络、靶点-组织网络、GO 分析与 KEGG 富集通路分析以及成分-靶点-通路图,阐明共有成分药理作用,并运用分子对接技术,验证共有成分生物活性,并确定陈皮挥发油质量标志物,再将预测的陈皮挥发油质量标志物进行 GC-MS 定量分析,通过测定 19 批不同产地的陈皮确定质量标志物的含量范围,为陈皮挥发油的质量评价及标准建立提供依据。

1 材料

1.1 仪器

DZTW 控温电热套(北京市光明医疗仪器有限公司);HLD-30002 型电子天平(杭州友恒称重设备有限公司);Agilent 7890A/5975C 型 GC-MS 仪器(美国安捷伦公司);800 Y 高速多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司)。

1.2 药材与试剂

无水乙醇(西陇科学股份有限公司,批号 2011039),无水硫酸钠(西陇科学股份有限公司,批号 2009032)均为分析纯;柠檬烯对照品(成都埃法生物科技有限公司,批号 AF20051051), γ -萜品烯对照品(北京索莱宝科技有限公司,批号 1206A023)。19 批陈皮药材购自成都慧锄科技有限公司,分别为广东 4 批次(C_1 新会、 C_2 江门、 C_3 肇庆、 C_4 高要),广西 2 批次(C_5 南宁、 C_6 桂林),山东 2 批次(C_7 济南、 C_8 德州),湖南 3 批次(C_9 长沙、 C_{10} 衡阳、 C_{11} 益阳),湖北 3 批次(C_{12} 宜昌、 C_{13} 枝江、 C_{14} 荆州),四川 3 批次(C_{15} 成都、 C_{16} 泸州、 C_{17} 广元),浙江 2 批次(C_{18} 衢州、 C_{19} 台州),经江西中医药大学葛菲教授鉴定为芸香科植物橘 *C. reticulata* 的干燥成熟果皮。

2 方法与结果

2.1 陈皮挥发油提取

将 19 批陈皮药材粉碎为粗粉,分别称取 100 g 陈皮粗粉,加入 800 mL 水,浸泡时间 1 h,提取时间 5 h^[10],收集陈皮挥发油,加入适量的无水硫酸钠静置脱水,依次按产地标记 $C_1\sim C_{19}$,密封于棕色玻璃瓶中,2~8℃ 环境下保存。

2.2 陈皮挥发油 GC-MS 检测方法

2.2.1 制样方法 分别移取 19 批陈皮挥发油各

50 μL , 加入无水乙醇溶解, 定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀后加入适量无水硫酸钠, 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤, 取续滤液加入进样瓶中, 即得样品溶液。

2.2.2 GC-MS 检测条件 安捷伦 Agilent HP-5 MS (0.25 mm $\times$ 30 m, 0.25 μm) 毛细管色谱柱, 载气为高纯 He (99.999%), 进样量 1 μL , 分流比 40:1, 流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 。升温程序: 初始温度 60 $^{\circ}\text{C}$, 以 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 80 $^{\circ}\text{C}$, 保留 10 min, 再以 25 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 220 $^{\circ}\text{C}$ 。EI 离子源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$, MS 四极杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$; 接口温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 溶剂延迟 3.0 min, 质量扫描模式全扫描, 扫描范围 m/z 30~650。标准谱库 NIST 17. L 检索, 峰面积归一法计算各组分相对百分含量。

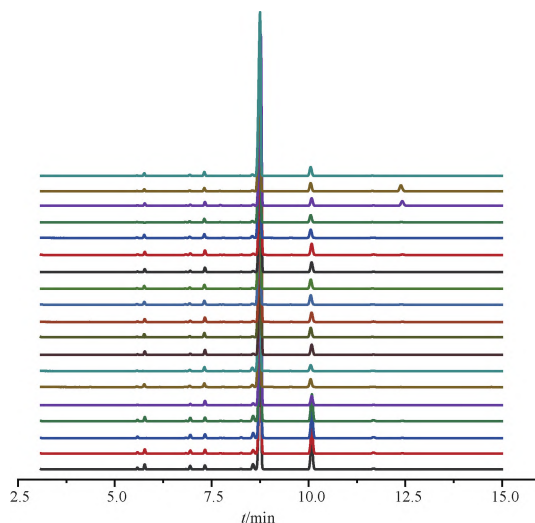
2.2.3 方法学考察 精密度考察: 取陈皮挥发油样品 C_1 , 按 2.2.1 项下方法制备样品溶液, 按 2.2.2 项下 GC-MS 检测条件, 连续进样 6 次, 记录柠檬烯的相对峰面积和相对保留时间及 γ -萜品烯的相对峰面积和相对保留时间, 计算 RSD。结果柠檬烯的相对峰面积 RSD 为 0.13%, 柠檬烯的相对保留时间 RSD 为 0.12%, γ -萜品烯的相对峰面积 RSD 为 0.85%, γ -萜品烯的相对保留时间 RSD 为 0.10%, 表明仪器精密度较好。

稳定性考察: 取陈皮挥发油样品 C_1 , 按 2.2.1 项下方法制备样品溶液, 按 2.2.2 项下 GC-MS 检测条件分别于 0、4、8、12、24、48 h 进行检测, 记录柠檬烯的相对峰面积和相对保留时间及 γ -萜品烯的相对峰面积和相对保留时间, 计算 RSD。结果柠檬烯的相对峰面积 RSD 为 0.69%, 柠檬烯的相对保留时间 RSD 为 0.11%, γ -萜品烯的相对峰面积 RSD 为 2.1%, γ -萜品烯的相对保留时间 RSD 为 0.12%, 表明样品在 48 h 内稳定性好。

重复性考察: 取陈皮挥发油样品 C_1 , 按 2.2.1 项下方法平行制备 6 份样品溶液按 2.2.2 项下 GC-MS 检测条件进行检测, 记录柠檬烯的相对峰面积和相对保留时间及 γ -萜品烯的相对峰面积和相对保留时间, 计算 RSD。结果柠檬烯的相对峰面积 RSD 为 1.4%, 柠檬烯的相对保留时间 RSD 为 0.09%, γ -萜品烯的相对峰面积 RSD 为 2.0%, γ -萜品烯的相对保留时间 RSD 为 0.10%, 表明制样方法重复性好。

2.3 陈皮挥发油成分分析

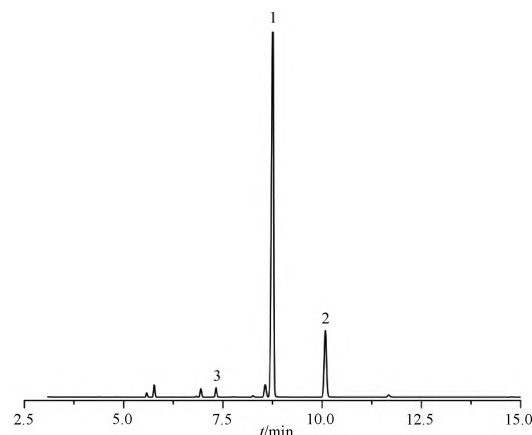
陈皮挥发油 $C_1 \sim C_{19}$ 分别按照 2.2.1 项下方法制备样品溶液, 按 2.2.2 项下 GC-MS 检测条件进行检测, 共获得 19 批次的陈皮挥发油总离子流图, 见图 1。根据 Agilent 7890A/5975C 型 GC-MS 仪器数据库 NIST 17. L 检索, 分别获得 19 批次的陈皮挥发油的化学成分信息, 得到 19 批次陈皮挥发油中有 3 个共有成分, 见图 2, 分别为 D-柠檬烯 (D-limonene)、 γ -萜品烯 (gamma-terpinene)、月桂烯 (beta-myrcene), 相对百分含量见表 1。



从下至上依次为 $C_1 \sim C_{19}$ 。

图1 陈皮挥发油 GC-MS 总离子流图

Fig.1 Total ion current chromatogram of Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil by GC-MS



1. D-柠檬烯; 2. γ -萜品烯; 3. 月桂烯。

图2 陈皮挥发油共有成分

Fig.2 Common components of Citri Reticulatae Pericarpium volatile oil

表 1 共有成分相对百分含量

Table 1 Relative percentages of common components

批次	GC-MS 测得 成分个数	共有成分相对含量/%		
		D-柠檬烯	γ -萜品烯	月桂烯
C ₁	16	75.62	14.01	1.37
C ₂	11	76.66	13.59	1.33
C ₃	7	77.46	14.40	1.35
C ₄	12	74.88	14.51	1.26
C ₅	6	91.10	4.84	1.54
C ₆	5	91.54	4.66	1.51
C ₇	6	90.59	5.72	1.54
C ₈	7	90.48	5.00	1.56
C ₉	6	91.05	5.30	1.60
C ₁₀	4	91.66	5.68	1.62
C ₁₁	6	90.63	5.64	1.67
C ₁₂	6	90.55	5.94	1.60
C ₁₃	4	92.05	5.28	1.64
C ₁₄	4	91.14	5.79	1.81
C ₁₅	10	88.05	4.20	1.43
C ₁₆	6	88.02	4.97	1.34
C ₁₇	5	91.38	5.16	1.60
C ₁₈	8	90.06	5.41	1.48
C ₁₉	6	88.56	5.09	1.34

19 批次 D-柠檬烯、 γ -萜品烯和月桂烯占陈皮挥发油总量 90.65%~98.97%，具有充分代表性，将 D-柠檬烯、 γ -萜品烯和月桂烯作为质量标志物的候选化合物进一步分析。

2.4 网络药理学分析

2.4.1 共有成分靶点预测 通过中药系统药理学数据库^[11] (TCMSP, <https://tcmspw.com/tcmsp.php>)、SwissTargetPrediction 数据库^[12] (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 检索 D-柠檬烯 (CAS:5989-27-5)、 γ -萜品烯 (CAS:99-85-4) 和月桂烯 (CAS:123-35-3) 的作用靶点, UniProt 数据库^[13] (<https://www.uniprot.org/>) 规范检索的靶点名称, 靶点整合, 除去重复值, 得到共有成分相关的 17 个靶点。将化合物与靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 运用 Network Analyzer 插件对靶点进行运算分析, 以拓扑参数度值 (degree) 大于各节点度值平均数的靶点为关键靶点, 构建成分-靶点网络图, 见图 3 (绿色三角形节点代表化合物, 黄色圆形节点代表靶点, 节点大小代表度值大小, 度值越大, 节点越大)。

2.4.2 蛋白与蛋白互作 (PPI) 网络分析 将获得的 17 个靶点蛋白导入 STRING 11.0^[14] 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input>) 物种选择为人 (homo sapiens), 最高置信度蛋白交互参数评分值 > 6406

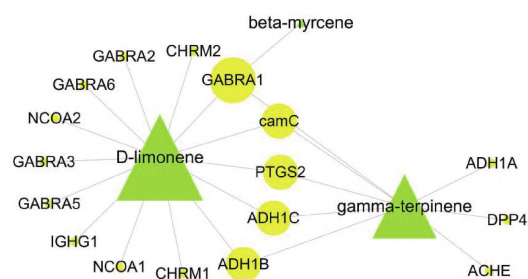


图 3 成分-靶点网络图

Fig. 3 Component-target network

0.7, 其他参数设置不变, 去掉网络中的单一节点, 获得 PPI 网络图。对 PPI 进行拓扑特征分析, 选取在“度中心性” (degree) 大于平均数 (= 2.7) 的点作为核心靶点, 经筛选后共得到 5 个核心靶点, 具体包括 GABRA1 (degree 4)、GABRA6 (degree 4)、GABRA5 (degree 4)、GABRA3 (degree 4)、GABRA2 (degree 4)。

2.4.3 功能富集分析与通路分析 运用生物学信息注释数据库^[15] (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>), Select Identifier 选择 “official gene symbol”, List Type 设置为 “gene list”, 物种选择为 “homo sapiens”, 设定阈值 $P < 0.01$ 。对 5 个关键靶点进行 Gene Ontology 选项下 (GO, 功能富集分析) 生物过程 (biology process) 和 pathways 选项下 (KEGG, 基因组百科全书) 信号通路富集分析。

GO 分析结果共获得 20 个条目, 见图 4, 其中生物过程 (BP) 6 个条目, 细胞组成 (CC) 9 个条目以及分子功能 (MF) 5 个条目, 以 $P < 0.05$ 对 GO 条目进行筛选, 生物过程包含 γ -氨基丁酸信号通路、氯离子跨膜运输、离子跨膜运输等; 细胞组成为 GABA-A 受体复合物、氯离子通道复合体、突触后膜等; 分子功能有 GABA-A 受体活性、细胞外配体门控离子通道活性、苯二氮草受体活性、氯离子通道的活动、GABA 门控氯离子通道活性。

KEGG 通路分析得到 5 条信号通路 ($P < 0.01$), 见表 2, 分别为尼古丁成瘾、 γ -氨基丁酸能突触、吗啡成瘾、逆行内源性大麻素信号以及神经活性配体-受体相互作用, 共有成分可能通过核心靶点作用于这些通路发挥作用。

2.4.4 核心蛋白组织分布 通过 The Human Protein Atlas 数据库^[16] (<https://www.proteinatlas.org/>) 查找 5 个关键靶点 GABRA1、GABRA6、GABRA5、

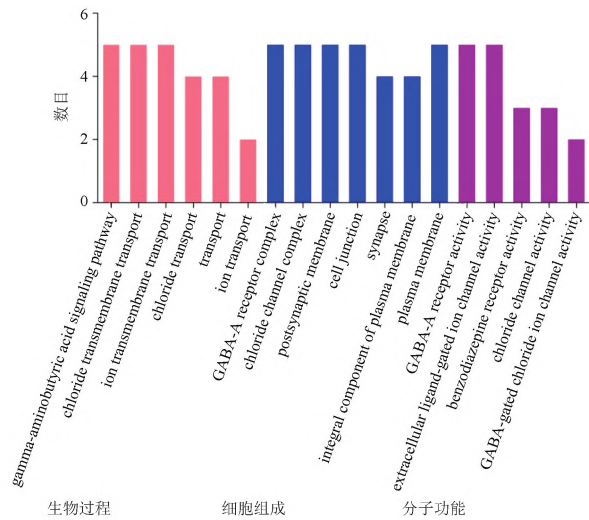


图 4 GO 富集分析
Fig. 4 GO enrichment analysis

表 2 KEGG 信号通路分析

Table 2 KEGG signaling pathway analysis

ID 编号	KEGG 信号通路
hsa05033	尼古丁成瘾 (nicotine addiction)
hsa04727	γ -氨基丁酸能突触 (GABAergic synapse)
hsa05032	吗啡成瘾 (morphine addiction)
hsa04723	逆行神经信号通路 (retrograde endocannabinoid signaling)
hsa04080	神经活动配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)

注:基因数均为 5。

表 3 核心靶点组织分布表达量

Table 3 Tissue distribution expression of core targets

靶点	组织/器官	NX	平均值 NX	靶点	组织/器官	NX	平均值 NX
GABRA1	嗅觉区域	22.0	19.7	GABRA1	大脑皮层	58.6	48.5
GABRA2	嗅觉区域	31.0		GABRA2	大脑皮层	52.6	
GABRA3	嗅觉区域	10.5		GABRA3	大脑皮层	30.1	
GABRA5	嗅觉区域	15.2		GABRA5	大脑皮层	52.6	
GABRA1	海马	10.5	20.3	GABRA1	基底神经节	21.9	29.9
GABRA2	海马	38.9		GABRA2	基底神经节	34.4	
GABRA3	海马	10.9		GABRA3	基底神经节	15.2	
GABRA5	海马	20.9		GABRA5	基底神经节	48.2	
GABRA1	小脑	35.2	47.3	GABRA2	杏仁核	38.5	25.2
GABRA2	小脑	10.4		GABRA5	杏仁核	12.0	
GABRA6	小脑	96.4		GABRA3	下丘脑	15.9	15.9
GABRA2	脑桥和髓质	10.5	10.5	GABRA2	附睾	11.7	11.7

GABRA3、GABRA2 的组织分布数据,下载 tsv 格式的文件,共获得 305 条组织 (tissue) 数据,对数据中表达量 (NX) 大于 10 的组织或器官进行分析,筛选出 23 条数据。应用 Cytoscape 3.7.1 软件构建关键靶点-组织或器官分布网络图,见图 5 (黄色圆形节点代表核心靶点,橙色菱形节点代表组织/器官,度值越大,节点越大)。

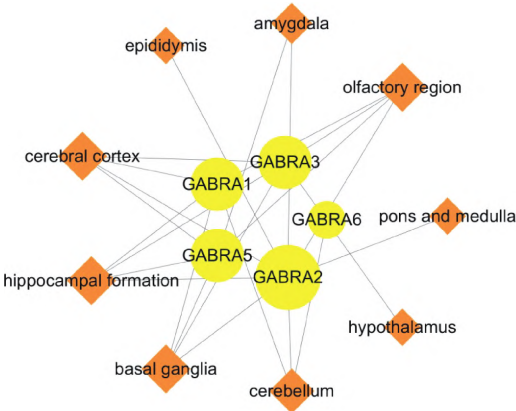


图 5 靶点-组织网络图
Fig. 5 Target-tissue network

选取 degree 最大的组织或器官,分别为 hypothalamus (下丘脑)、amygdala (杏仁核)、cerebellum (小脑)、pons and medulla (脑桥和髓质),结合 NX,计算核心靶点在各组织或器官中的 NX。5 个核心靶点主要分布在嗅觉区域、大脑皮层、小脑、基底神经节等组织或器官中,其中 GABRA6 主要在小脑中表达,见表 3。

2.4.5 分子对接^[15] 共有成分 D-柠檬烯和 γ -萜品烯为配体,在 PubChem 数据库下载 3D 结构.sdf 格式文件,核心靶点 GABRA1、GABRA6、GABRA5、GABRA3、GABRA2 为受体,在 RSCB PDB 数据库中,选择“homo sapiens”,选择分辨率高的 3D 结构 pdb 文件,获得 GABRA1 与 GABRA5 结构;openbabel 转换格式;AutoDockTools 1.5.6 软件进行去水、加氢、加电荷处理,AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接计算,见表 4。

表 4 D-柠檬烯、 γ -萜品烯与靶点分子对接计算结果Table 4 Docking calculation of D-limonene and γ -terpinene with target molecules

受体	D-柠檬烯	γ -萜品烯
GABRA1	-5.1	-5.4
GABRA5	-5.1	-5.1

affinity 越小,表明结合能力越高,结合力小于 0 kcal·mol⁻¹时,说明配体与受体分子之间可自发的进行结合,结合力小于-4 kcal·mol⁻¹时,表明配体与受体之间有较强的生物活性^[17-18]。共有成分 D-柠檬烯、 γ -萜品烯与 GABRA1、GABRA5 结合的 affinity 值都小于-5 kcal·mol⁻¹,表明质量标志物与核心蛋白具有较强结合能力。因此,确定共有成分 D-柠檬烯和 γ -萜品烯为陈皮挥发油 Q-marker。

2.5 质量标志物定量分析

2.5.1 线性关系考察 精密配制柠檬烯对照品和 γ -萜品烯对照品溶液 0.041 0、0.103、0.256、0.640、1.60、4.00 mL,无水乙醇定容至 10 mL 量瓶,混匀后,0.22 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液于进样瓶中,按 2.2.2 项下 GC-MS 检测条件进行检测,以峰面积(y)与体积浓度(x)进行线性关系的考察,见表 5。

表 5 D-柠檬烯和 γ -萜品烯线性范围Table 5 Linear ranges of D-limonene and γ -terpinene

物质名称	线性回归方程	R^2	线性范围 / μ L·mL ⁻¹
D-柠檬烯	$y=2\times 10^8x+4\times 10^6$	0.999 8	0.041 0~4
γ -萜品烯	$y=2\times 10^8x+239\ 852$	0.999 8	0.041 0~4

2.5.2 质量标志物含量测定结果 将 19 批陈皮挥发油样品,分别按照 2.2.1 项下制样方法制备样品,按照 2.2.2 项下色谱条件进行检测,D-柠檬烯和

γ -萜品烯按外标法计算样品中的含量,见表 6。

表 6 D-柠檬烯和 γ -萜品烯含量Table 6 D-limonene and γ -terpinene content

No.	D-柠檬烯	γ -萜品烯
1	0.77	0.12
2	0.79	0.12
3	0.77	0.12
4	0.78	0.13
5	0.90	0.04
6	0.91	0.04
7	0.92	0.05
8	1.00	0.05
9	0.93	0.05
10	0.94	0.05
11	1.03	0.06
12	0.92	0.05
13	0.92	0.05
14	0.94	0.05
15	0.95	0.04
16	0.89	0.04
17	0.92	0.04
18	0.94	0.05
19	0.88	0.04

在 19 批次陈皮挥发油样品中,D-柠檬烯的体积分数为 0.77~1.03 μ L·mL⁻¹, γ -萜品烯的体积分数为 0.04~0.13 μ L·mL⁻¹。其中,广东产地陈皮挥发油(C₁~C₄),D-柠檬烯的含量少于其他产地含量, γ -萜品烯的含量高于其他产地含量。各产地陈皮挥发油质量标志物含量不同,质量也会存在差异。

3 讨论

本研究首先对 19 批次陈皮药材进行水蒸气蒸馏法提取挥发油,通过 GC-MS 分析 19 批次陈皮挥发油化学成分,获得 3 个共有成分为 D-柠檬烯、 γ -萜品烯和月桂烯。通过网络药理学对 D-柠檬烯、 γ -萜品烯和月桂烯分析,获得 5 个核心靶点 GABRA1、GABRA6、GABRA5、GABRA3、GABRA2,核心靶点生物过程包含 γ -氨基丁酸信号通路、氯离子跨膜运输、离子跨膜运输等;细胞组成为 GABA-A 受体复合物、氯离子通道复合体、突触后膜等;分子功能有 GABA-A 受体活性、细胞外配体门控离子通道活性、苯二氮䓬受体活性、氯离子通道的活动、GABA 门控氯离子通道活性。KEGG 分析表明通路主要为尼古丁成瘾、 γ -氨基丁酸能突触、吗啡成瘾、逆行内源性大麻素信号以及神经活性配体-受体相

互作用通路发挥作用。核心靶点主要分布于嗅觉、大脑皮层、小脑、基底神经节等,且在嗅觉区域的表达量最大,其次是大脑皮层和海马。研究表明,嗅觉是人类最本能的感官之一。《医林改错》和《辨证录》有“鼻窍通脑”之说,与脑的功能之间存在密切联系,如通过嗅觉系统调节情志活动、学习记忆、睡眠等活动^[19-21]。应用分子对接技术,分析配体与受体的结合能力,表明 D-柠檬烯和 γ -萜品烯有较好的生物活性。从共有成分含量及生物活性考虑,确定陈皮挥发油质量标志物为 D-柠檬烯和 γ -萜品烯。通过 GC-MS 定量分析确定陈皮挥发油质量标志物为 D-柠檬烯和 γ -萜品烯的含量范围。广东产地的陈皮挥发油质量标志物含量与其他产地有所区别。

中药挥发油质量稳定、可控是保证临床疗效与安全的重要基础。中药挥发油质量与产地、提取方式等密切相关^[22]。当前中药挥发油质量参差不齐,质量标志物概念的提出与应用可以为陈皮挥发油的质量奠定评价基础。本文通过 GC-MS 检测方法,结合网络药理学与分子对接技术,预测的 D-柠檬烯和 γ -萜品烯作为陈皮挥发油的 Q-marker,为后续陈皮挥发油质量标准的建立和质量评价奠定实验基础。

[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, 2020.
- [2] 李皓翔, 梅全喜, 赵志敏, 等. 陈皮广陈皮及新会陈皮的化学成分药理作用和综合利用研究概况[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1460.
- [3] 严绥平, 于蕾, 申静伟, 等. 陈皮挥发油成分的气-质联用分析及药理作用研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2007, 26(3): 57.
- [4] 王雅琪, 杨园珍, 伍振峰, 等. 中药挥发油传统功效与现代研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(2): 455.
- [5] ROTH T. Insomnia: definition, prevalence, etiology, and consequences[J]. J Clin Sleep Med, 2007, 3(5): S7.
- [6] ZHONG Y, ZHENG Q, HU P, et al. Sedative and hypnotic effects of compound Anshen essential oil inhalation for insomnia[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 306.
- [7] 王梅兰, 林建交, 陈雅容. 柠檬烯对小白鼠中枢神经系统的影响[J]. 海峡药学, 2005, 17(4): 30.
- [8] JAESUK Y. Limonene inhibits methamphetamine-induced locomotor activity via regulation of 5-HT neuronal function and dopamine release[J]. Phytomedicine, 2014, 21(6): 883.
- [9] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443.
- [10] 李瑞明, 岑帼英, 邝翠仪, 等. 正交法优选陈皮挥发油提取工艺[J]. 中国药业, 2006, 15(1): 47.
- [11] 赵苗青, 李丰, 石彬彬, 等. 系统药理学(VI)——TCMSP 数据库及其应用[J]. 中医药信息, 2020, 37(3): 22.
- [12] GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42 (Web Server issue): W32.
- [13] THE U C, BATEMAN A, MARTIN M, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D480.
- [14] VON MERING C, JENSEN L J, SNEL B, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33 (Database issue): D433.
- [15] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. [J]. Nature Protoc, 2009, 4(1): 44.
- [16] DIGRE A, LINDSKOG C. The human protein atlas-spatial localization of the human proteome in health and disease [J]. Protein Sci, 2021, 30(1): 218.
- [17] MEEKRATHOK P, THONGSOM S, AUNKHAM A, et al. Novel GH-20 beta-N-acetylglucosaminidase inhibitors: virtual screening, molecular docking, binding affinity, and anti-tumor activity [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 142(1): 503.
- [18] 赵哲, 胡仕祥. 基于网络药理学和分子对接技术的海藻玉壶汤调控甲状腺乳头状癌机制研究[J]. 中医临床研究, 2020, 12(29): 1.
- [19] 李鹏跃, 杜守颖, 杨冰. 中药经鼻递药的研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3456.
- [20] 贺利敏, 李光武, 王敏, 等. 辛夷挥发油经嗅觉通路改善自闭症模型昆明鼠学习记忆能力及其神经递质含量[J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(4): 507.
- [21] 钟钰, 郑琴, 胡鹏翼, 等. 复方安神精油吸入给药的镇静催眠作用及化学成分的 GC-MS 分析[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(9): 1528.
- [22] 刘媛, 臧振中, 伍振峰, 等. 中药挥发油质量控制的现状、问题与对策[J]. 中草药, 2018, 49(24): 5946.

[责任编辑 孔晶晶]