

·指纹图谱研究·

通贤柚叶 HPLC 指纹图谱研究

游元元^{1,2}, 范媛媛¹, 陈 席¹, 谢仁宗¹ (1. 成都医学院药学院, 四川 成都 610083; 2. 四川省高校结构特异性小分子药物研究重点实验室, 四川 成都 610083)

摘要: **目的** 建立通贤柚叶的 HPLC 指纹图谱。**方法** 色谱柱为 Sepax Amethyst C₁₈-H (250 mm × 4.6 0mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1 % 甲酸, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 303 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。分析 12 批通贤柚叶样品, 并进行主成分分析。**结果** 建立了通贤柚叶的 HPLC 指纹图谱, 确定了 16 个共有色谱峰, 采用对照品指认了其中 2 个峰。主成分分析结果表明, 11 个色谱峰对其质量控制较为重要。**结论** 所建立的指纹图谱分析方法特征性强, 为通贤柚叶的质量控制提供了科学依据。

关键词: 通贤柚叶; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 主成分分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)05-0632-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.028

Study on HPLC Fingerprint of Folium Citri Grandis of Tongxian

YOU Yuanyuan^{1,2}, FAN Yuanyuan¹, CHEN Xi¹, XIE Renzong¹ (1. Pharmaceutical Department, Chengdu Medical College, Chengdu 610083 Sichuan, China; 2. Key Laboratory of Structure-specific Small Molecule Drug Research, Sichuan Higher Education Institutions, Chengdu 610083 Sichuan, China)

Abstract: **Objective** To establish the HPLC fingerprint of Folium Citri Grandis of *Tongxian*. **Methods** HPLC was performed on a Sepax Amethyst C₁₈-H analytical column (250 mm × 4.60 mm, 5 μm) with gradient elution using acetonitrile and 0.1 % aqueous formic acid as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 303 nm, the column temperature was set at 25 °C and the injection volume was 20 μL. Twelve batches of pomelo leaves from Tongxian were analyzed, and principal component analysis (PCA) was used for data analysis. **Results** The HPLC fingerprint of Folium Citri Grandis of Tongxian was established. Sixteen peaks were confirmed as the characteristic common peaks, 2 of them were identified according to the reference standards. The results of principal component analysis showed that 11 peaks had an obvious effect on the quality of pomelo leaves. **Conclusion** The established method is specific for fingerprint analysis, and could provide a basis for quality control of Folium Citri Grandis of *Tongxian*.

Keywords: Folium Citri Grandis of *Tongxian*; HPLC; Fingerprint; Principal component analysis

柚叶为芸香科植物柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的叶, 始载于《本草纲目》, 能行气止痛、解毒消肿。中国是全球最大的柚类生产国^[1], 栽培的柚品种、品系和类型有 200 余种^[2]。柚树每年均需修枝, 废弃的

枝叶或就地焚烧, 或直接丢弃, 造成资源浪费与环境污染, 若能充分利用柚叶的药用价值, 将有效提高柚类资源的综合利用率。通贤柚是四川省安岳县具有近百年栽培历史的地方良种柚, 曾 4 次获得全国柚类质

收稿日期: 2014-04-24

作者简介: 游元元, 女, 副教授, 研究方向: 生药品种、品质、药效与资源开发。Email: yyy@cmc.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201946); 四川省教育厅科研项目(14ZA0221)。

量评比金杯奖, 2011 年被批准为国家地理标志产品, 是当地的支柱产业之一。通贤柚以鲜果消费为主, 其柚叶的开发利用至今未见报道。本研究首次采用 HPLC 法对通贤柚叶的指纹图谱进行研究, 并对其进行主成分分析, 以期为全面控制通贤柚叶质量提供依据。

1 仪器与试剂

DionexU3000 型高效液相色谱仪, 由 ultimate 3000 泵、DAD3000 紫外检测器、ultimate3000 柱温箱、ultimate3000 自动进样器及 Chromeleon 色谱工作站组成, 美国戴安公司; BP1215 电子天平 (Sartorius, $d=0.1\text{ mg}$)、Rios 纯水器, 密理博上海贸易有限公司; AS5150BD-I 超声波清洗器, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; Anke TGL-16G 离心机, 上海安亭科学仪器厂。乙腈, 色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇、甲酸, 分析纯, 成都市科龙化工试剂厂; 水为自制超纯水。柚皮苷对照品 (批号: 12030612)、野漆树苷对照品 (批号: 13022208), 成都曼思特生物科技有限公司。

2013 年 10 月 2 日, 在安岳县通贤柚地理标志产品保护产地, 选取即将被修剪的徒长枝采集叶片, 共采集 12 批通贤柚叶。所有样品原植物均被当地农技站鉴定为芸香科通贤柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck。采样品种编号及产地见表 1。

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

样品编号	产地来源	样品编号	产地来源
S1	通贤镇板桥村	S7	天马乡土桥村(1)
S2	通贤镇四方村(1)	S8	天马乡土桥村(2)
S3	通贤镇四方村(2)	S9	通贤镇高文村(1)
S4	通贤镇四方村(3)	S10	通贤镇高文村(2)
S5	天马乡油井村	S11	通贤镇五陵村(1)
S6	天马乡堰坝村	S12	通贤镇五陵村(2)

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Sepax Amethyst C_{18} -H 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.1 % 甲酸水溶液; 梯度洗脱, 乙腈的体积分数配比: 0 ~ 10 min 为 3 % $\rightarrow$ 12 %, 10 ~ 25 min 为 12 % $\rightarrow$ 13 %, 25 ~ 35 min 为 13 % $\rightarrow$ 14 %, 35 ~ 50 min 为 14 % $\rightarrow$ 15.5 %, 50 ~ 70 min 为 15.5 % $\rightarrow$ 17 %, 70 ~ 90 min 为 17 % $\rightarrow$ 21 %, 90 ~ 105 min 为 21 % $\rightarrow$ 24 %, 105 ~ 130 min 为 24 % $\rightarrow$ 35 %, 130 ~ 170 min 为 35 % $\rightarrow$ 87 %; 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长:

303 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL ; 采样时间: 170 min。

2.2 对照品溶液的制备 取柚皮苷、野漆树苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释, 配成质量浓度分别为 0.510, 0.201 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的混合贮备液。

2.3 供试品溶液的制备 取各通贤柚叶样品细粉 (过 40 目筛) 约 2.50 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 40 mL, 浸泡过夜, 超声提取 30 min, 补足减失质量。提取液离心 (2500 r $\cdot$ min⁻¹) 10 min, 取上清液以 0.22 μm 滤膜过滤, 取滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 1 号样品的供试品溶液, 重复进样 6 次, 以野漆树苷为参照峰, 考察主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性, 其 RSD 均小于 3 %, 表明进样精密度良好。

2.4.2 重现性试验 取 1 号样品, 平行制备供试品溶液 6 份, 以野漆树苷为参照峰, 考察主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性, 其 RSD 均小于 3 %, 表明重现性较好。

2.4.3 稳定性试验 取 1 号样品的供试品溶液, 分别在 0, 6, 12, 24, 36, 48 h 等不同时间点进样分析, 以野漆树苷为参照峰, 考察主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性, 其 RSD 均小于 3 %, 表明样品在 48 h 内稳定。

2.5 通贤柚叶指纹图谱的建立 将 12 批通贤柚叶样品的供试品溶液按照所建立的方法进行分析, 所得图谱见图 1。将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》, 经多点校正后进行自动匹配, 采用中位数法生成对照图谱。确定了 16 个主要的共有色谱峰作为特征构成通贤柚叶的指纹图谱。考察对照品的保留时间与 DAD 紫外光谱后, 确定 5 号峰为柚皮苷, 6 号峰为野漆树苷, 结果见图 2。12 批样品图谱相对于对照指纹图谱的相似度分别为 0.603, 0.945, 0.739, 0.925, 0.955, 0.947, 0.954, 0.600, 0.939, 0.848, 0.587, 0.942。

2.6 主成分分析 将 12 批通贤柚叶 HPLC 指纹图谱各共有峰进行单位质量药材峰面积量化, 得到 12 $\times$ 16 阶的数据矩阵, 采用 SPSS17.0 统计分析软件对其进行主成分分析, 以特征值大于 1 为提取标准, 得到 3 个主成分, 特征值之和对方差的累积贡献率达到 89.86 %。其中, 第一主成分 $\lambda=10.353$, 方差贡献率为 64.71 %; 第二主成分 $\lambda=2.533$, 方差贡献率为 15.83 %; 第三主成分 $\lambda=1.492$, 方差贡献率为 9.32 %。

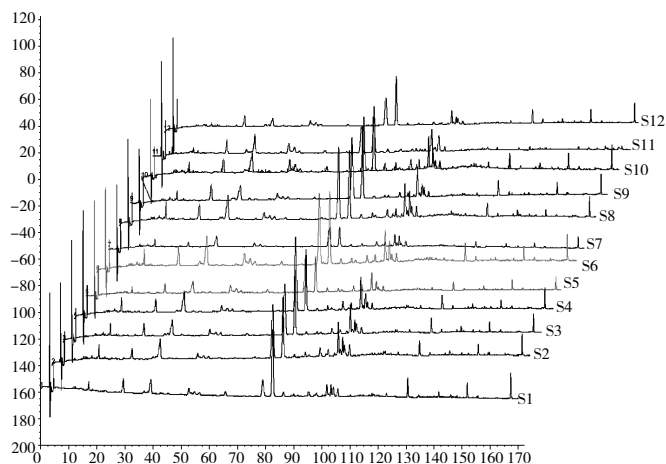


图 1 12 批通贤柚叶 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of 12 batches of Folium Citri Grandis of Tongxian

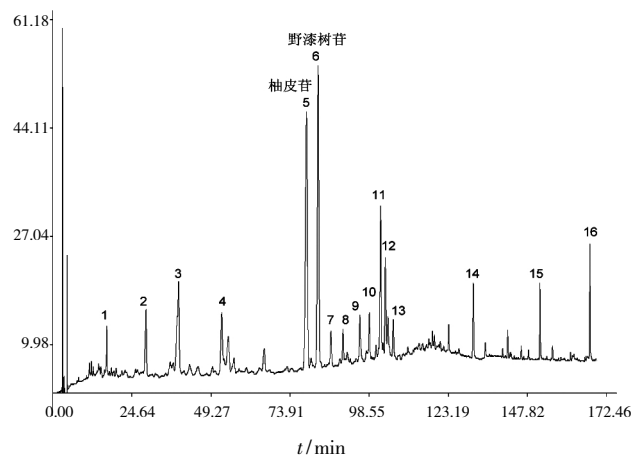


图 2 9 号样品 HPLC 指纹图谱

Figure 2 HPLC fingerprint of No.9 sample

将“成分矩阵”中的因子载荷除以“解释的总方差”中 λ 的初始特征值的平方根，得到主成分的特征向量矩阵，由此可知 3 个主成分的表达式分别为：

$$\text{Prin1} = 0.276X_1 + 0.258X_2 + 0.298X_3 + 0.189X_4 + 0.273X_5 + 0.249X_6 + 0.198X_7 + 0.291X_8 + 0.267X_9 + 0.278X_{10} + 0.276X_{11} + 0.281X_{12} + 0.249X_{13} + 0.224X_{14} + 0.112X_{15} + 0.209X_{16}$$

$$\text{Prin2} = -0.207X_1 + 0.186X_2 - 0.077X_3 + 0.405X_4 - 0.104X_5 + 0.105X_6 + 0.204X_7 - 0.068X_8 - 0.241X_9 - 0.014X_{10} - 0.204X_{11} - 0.221X_{12} - 0.248X_{13} + 0.303X_{14} + 0.558X_{15} + 0.266X_{16}$$

$$\text{Prin3} = -0.110X_1 - 0.288X_2 + 0.075X_3 + 0.255X_4 - 0.286X_5 - 0.452X_6 + 0.385X_7 + 0.220X_8 + 0.147X_9 + 0.339X_{10} - 0.247X_{11} + 0.139X_{12} + 0.087X_{13} - 0.319X_{14} - 0.027X_{15} + 0.156X_{16}$$

3 个主成分中，第一主成分贡献最大，而其中除 X_4 、 X_7 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 的载荷系数较小外，其余 11

个变量的系数都很接近，说明这 11 个集中于 105 min 之前的色谱峰的峰面积对通贤柚叶指纹图谱的质量控制起着较为重要的作用。

3 讨论

比较了甲醇—水、乙腈—水、乙腈—磷酸水、乙腈—甲酸水等系统对分离的影响，本研究表明乙腈—甲酸水系统较其他体系更适合对通贤柚叶成分的分析。依据 DAD 检测的三维图谱，在 303 nm 下的峰数多，信息量丰富，主要色谱峰的表现丰度较强且各峰相对比例较适宜，故选择 303 nm 作为检测波长。

各样品中柚叶的树龄、叶龄、光照等存在差异，导致叶中次生代谢产物的累积有所不同，所以尽管各样品的特征指纹峰的相对保留时间一致，但总峰面积与各共有峰的相对峰面积并不相同，使 12 批样品相似度变化幅度为 0.587 ~ 0.955。

柚叶除行气止痛、解毒消肿的功效外，目前还发现柚叶中的某些组分有拟胰岛素的作用^[9]。但有关柚叶质量评价的文献较少，且多集中于岭南地区的特色柚类——化州柚^[4-6]。通贤柚是四川安岳的优势特色作物，其资源的利用率不高，积极开发其药用价值不但能提高其综合利用率，还能减少处置废弃叶造成的环境污染。本实验建立的指纹图谱分析方法特征性强，为通贤柚叶的鉴定、质量控制及进一步开发利用提供了依据。

参考文献：

- [1] 贺雪皎，张放. 2011 年全球柑桔生产与贸易统计分析[J]. 中国果业信息, 2013, 20(2): 16-25.
- [2] 郑淑娟，罗金辉. 中国柚类产业现状与发展分析[J]. 广东农业科学, 2010, (1): 192-194.
- [3] Rao YK, Lee MJ, Chen K, et al. Insulin-Mimetic Action of Rhoifolin and Cosmoisin Isolated from *Citrus grandis* (L.) Osbeck Leaves: Enhanced Adiponectin Secretion and Insulin Receptor Phosphorylation in 3T3-L1 Cells[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, Article ID 624375, 1-9.
- [4] 杨燕军，梁北梅. 广东蛇药有效成分柚叶总黄酮提取及含量测定方法研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(1): 16-17.
- [5] 杨燕军，林洁红. RP-HPLC 法测定广东蛇药有效成分柚皮苷的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(4): 49-50.
- [6] 林励，黄兰珍，欧剑锋，等. 化橘红原植物化州柚生长过程中黄酮类成分的变化规律研究[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(3): 256-261.

(编辑：邓响潮)