

HPLC-DAD 法测定通贤柚叶中 两种活性黄酮的含量

黄友秋¹, 赵雪荔¹, 陈 席¹, 游元元^{1,2,*}

(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 HPLC-DAD 测定通贤柚叶中柚皮苷与野漆树苷的方法。方法:色谱柱为 Sepax Amethyst C₁₈-H(250 × 4.60mm, 5μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸梯度洗脱, 流速 1.0mL/min, 检测波长为 283nm(柚皮苷), 337nm(野漆树苷), 柱温 25℃, 进样量 20μL。结果:柚皮苷与野漆树苷色谱峰分离良好。二者分别在 0.0653~0.6526mg/mL 与 0.0350~0.3505mg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系。平均加样回收率分别为 98.68% 与 98.47%。结论:所建立的含量测定方法可用于通贤柚叶的质量控制。采收季节与叶龄对柚叶中两种黄酮类物质的含量有较明显的影响。

关键词:通贤柚叶, 高效液相色谱-二级管阵列检测器, 柚皮苷, 野漆树苷, 含量测定

Determination of two flavonoids in Tongxian grapefruit leaves by HPLC-DAD

HUANG You-qiu¹, ZHAO Xue-li¹, CHEN Xi¹, YOU Yuan-yuan^{1,2,*}

(1. Pharmaceutical College, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China;

2. Key Laboratory of Structure-specific Small Molecule Drug Research of Sichuan Province, Chengdu 610083, China)

Abstract: Objective: To develop a HPLC-DAD method to determine the content of naringin and rhoifolin in Tongxian grapefruit leaves. Methods: HPLC was performed on a Sepax Amethyst C₁₈-H analytical column(250mm × 4.60mm, 5μm) with gradient elution using acetonitrile and 0.1% aqueous formic acid as the mobile phase at a flow rate of 1.0mL/min. The detection wavelength was 283nm for naringin, 337nm for rhoifolin. The column temperature was 25℃ and the injection volume was 20μL. Results: The chromatographic peaks of naringin and rhoifolin could be separated well in the above cases. The linear ranges for the two flavonoids were 0.0653~0.6526mg/mL and 0.0350~0.3505mg/mL, respectively. The average recoveries were 98.68% and 98.47%, respectively. Conclusion: The established method could be used for the quality control of Tongxian grapefruit leaves. Harvest season and leaves age affect the content of two flavonoids significantly.

Key words: Tongxian grapefruit leaves; HPLC-DAD; naringin; rhoifolin; content assay

中图分类号: TS209

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)07-0286-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.07.052

通贤柚为川产地方良种柚。自 1929 年从福建漳州引种至四川省安岳县通贤镇后, 经过多年的培育, 逐渐成为当地的特有品种, 并多次获得全国柚类质量评比金杯奖。2011 年, 通贤柚被批准为国家地理标志保护产品。目前安岳县已形成百里通贤柚产业带, 2013 年全县通贤柚栽种面积为 3.4 万亩。

为了培养合理的丰产树形、平衡生长与结果的关系并培育优良母枝, 通贤柚树每年都需修枝剪叶, 由此产生了大量废弃柚叶。《本草纲目》记载柚叶具有行气止痛、解毒消肿之效, 主治头风痛、寒湿痹痛、

食滞腹痛、乳痈等症。柚叶中含有柚皮苷(naringin)与野漆树苷(rhoifolin)等黄酮类物质。柚皮苷具有抗肿瘤^[1-2]、抗炎^[3]、抗氧化^[4]、降血脂^[5-6]、调节血糖^[7-8]等活性, 而野漆树苷对肝损伤有保护作用, 也能调节血糖^[9-10]。为了充分利用通贤柚叶的药用价值, 本实验对通贤柚叶中柚皮苷与野漆树苷两种活性黄酮类物质进行了含量测定, 为通贤柚资源的综合利用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期: 2014-06-27

作者简介: 黄友秋(1990-), 男, 本科, 研究方向: 药学。

* 通讯作者: 游元元(1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药品种、品质、药效和资源开发。

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(13ZC074); 四川省“高等教育质量工程”建设项目。

DionexU3000 型高效液相色谱仪 美国戴安公司;BP1215 电子天平 Sartorius 公司;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。

柚皮苷对照品 成都曼思特生物科技有限公司;野漆树苷对照品 成都曼思特生物科技有限公司。色谱纯乙腈 美国 Sigma-Aldrich;分析纯甲醇、分析纯甲酸 成都市科龙化工试剂厂;水为自制超纯水。

通贤柚叶采集自安岳县通贤柚地理标志产品保护产地范围。洗去表面杂质与灰尘,自然阴干后粉碎,过 60 目筛备用。样品来源见表 1。

表 1 样品来源
Table 1 Source of samples

样品编号	采集时间	采集地点
1	2013.10.02	安岳通贤镇高文村(1)
2	2013.10.02	安岳通贤镇高文村(2)
3	2013.10.02	安岳通贤镇四方村(1)
4	2013.10.02	安岳通贤镇四方村(2)
5	2013.10.02	安岳通贤镇四方村(3)
6	2013.10.02	安岳通贤镇五陵村(1)
7	2013.10.02	安岳通贤镇五陵村(2)
8	2013.10.02	安岳天马乡土桥村(1)
9	2013.10.02	安岳天马乡土桥村(2)
10	2013.10.02	安岳通贤镇板桥村(1)
11	2013.10.02	安岳天马乡堰坝村
12	2013.10.02	安岳天马乡油井村
13	2014.02.02	安岳长河乡青石村(1)
14	2014.02.02	安岳长河乡青石村(2)
15	2014.02.02	安岳长河乡石盆村(1)
16	2014.02.02	安岳长河乡石盆村(2)
17	2014.02.02	安岳通贤镇板桥村(2)
18	2014.02.02	安岳通贤镇板桥村(3)
19	2014.02.02	安岳天马乡土桥村(3)
20	2014.02.02	安岳天马乡土桥村(4)
21	2014.02.02	安岳天马乡土桥村(5)
22	2014.02.02	安岳通贤镇四方村(4)
23	2014.02.02	安岳通贤镇五陵村(3)

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的配制 精密称取柚皮苷、野漆树苷对照品适量,分别置 10mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成浓度分别为 1.004mg/mL 与 1.001mg/mL 的对照品贮备液。

分别精确移取柚皮苷、野漆树苷对照品贮备液 3.25mL 与 1.75mL,同置 5mL 容量瓶中,得到浓度分别为 0.6526mg/mL 与 0.3504mg/mL 的混合对照品溶液 A。分别精确移取柚皮苷、野漆树苷对照品贮备液 2.6mL 与 1.4mL,同置 5mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得到浓度分别为 0.5221mg/mL 与 0.2803mg/mL 的混合对照品溶液 B。精确移取混合对照品溶液 B 2.5mL,置 5mL 容量瓶中,用甲醇稀

释至刻度,得混合对照品溶液 C。精确移取混合对照品溶液 C 2.5mL,置 5mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得混合对照品溶液 D。精确移取混合对照品溶液 D 2.5mL,置 5mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得混合对照品溶液 E。

1.2.2 供试品溶液的配制 取各通贤柚叶样品细粉约 3.0g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇 40mL,浸泡过夜,超声提取 30min,补足减失质量。提取液离心 (2500r/min) 10min,取上清液以 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

1.2.3 色谱条件 色谱柱:Sepax Amethyst C₁₈-H 柱 (250mm × 4.6mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.1% 甲酸(B)梯度洗脱,乙腈的体积分数配比:0~15min 为 14% → 16%, 15~35min 为 16% → 17%, 35~45min 为 17% → 19.5%, 45~70min 为 19.5% → 23%;流速为 1.0mL/min;柚皮苷检测波长为 283nm,野漆树苷检测波长为 337nm;柱温:25℃;进样量为 20 μ L;采样时间 70min。混合对照品和通贤柚叶样品分离的色谱图见图 1。

1.2.4 标准曲线及线性范围 分别取混合对照品溶液 A、B、C、D、E 各 20 μ L 进样,记录峰面积。以峰面积(A)对样品浓度(C)进行线性回归,得到 2 种黄酮化合物的回归方程、相关系数与线性范围。

1.2.5 方法学考察 精密度实验:取 14 号样品,按 1.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 1.2.3 项下色谱条件重复进样 6 次,记录峰面积。

重复性实验:取 14 号样品共 6 份,按 1.2.2 项下方法平行制备供试品溶液,按 1.2.3 项下色谱条件进样,记录峰面积并计算含量。

稳定性实验:取 14 号样品供试品溶液,在 0、1.5、3、4.5、6、7.5、12、36h 分别进样测定,记录峰面积。

回收率实验:精密称取已知含量的 14 号样品约 1.5g,共 6 份,精密加入含有柚皮苷 2.487mg/mL 与野漆树苷 1.847mg/mL 的混合对照品溶液 1.45mL,混匀,挥干甲醇液后按 1.2.2 项下方法平行制备供试品溶液,按 1.2.3 项下色谱条件进样,记录峰面积。

1.2.6 含量测定 取各通贤柚叶粉末样品,按 1.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 1.2.3 项下色谱条件进样分析,测定各分析物的峰面积。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

实验采用 100% 甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、30% 甲醇作为提取溶剂,结果表明以 50% 甲醇溶液提取时柚皮苷及野漆树苷峰面积最大,故选用 50% 甲醇作为提取溶剂。此外,考察了超声提取 20、30、40、50min 的提取效果,结果表明 30min 超声提取能使化学组分被充分提出。

2.2 检测波长的选择

用二极管阵列检测器(DAD)在实验条件下分析了柚皮苷与野漆树苷对照品色谱峰的紫外光谱,其 λ_{\max} 分别为 283、337nm,故选择这两个波长分别作为两个待测成分的检测波长。

2.3 两种待测组分的分离情况

柚皮苷与野漆树苷混合对照品及通贤柚叶样品分离的色谱图见图1,在本实验条件下两种黄酮类物质的色谱峰分离良好。

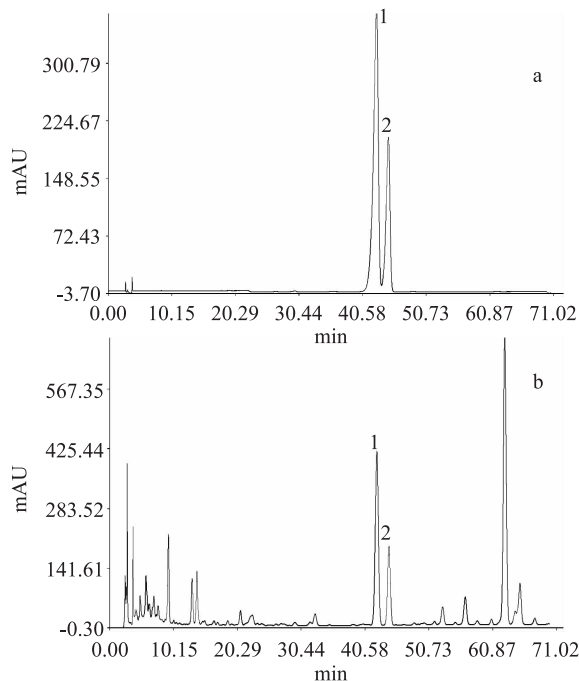


图1 对照品与1号通贤柚叶样品色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of reference substances and No.1 sample

注:1.柚皮苷 2.野漆树苷;a.对照品,b.样品。

2.4 线性关系考察结果

柚皮苷与野漆树苷含量测定的回归方程、相关系数与线性范围见表2。

表2 2种黄酮类化合物的回归方程、相关系数与线性范围
Table 2 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of 2 flavonoids

化合物	回归方程	相关系数 r	线性范围 (mg/mL)
柚皮苷	$A = 512.85C + 5.1743$	0.9999	0.0653~0.6526
野漆树苷	$A = 824.02C + 4.1352$	0.9999	0.0350~0.3504

2.5 方法学考察结果

精密度实验结果见表3。柚皮苷与野漆树苷峰面积的RSD分别为0.31%与1.34%,表明精密度良好。

表3 精密度实验结果
Table 3 Results of precision

进样次数	柚皮苷峰面积	野漆树苷峰面积
1	92.17	107.29
2	92.15	109.14
3	92.19	108.72
4	92.04	108.22
5	92.36	105.97
6	92.82	105.70
RSD(%)	0.31	1.34

重复性实验结果见表4。柚皮苷与野漆树苷含量的RSD分别为0.84%与1.70%,表明重复性良好。

表4 重复性实验结果
Table 4 Results of repeatability

实验号	称样量 (g)	柚皮苷含量 (%)	野漆树苷含量 (%)
1	3.0001	0.237	0.175
2	3.0011	0.237	0.178
3	3.0003	0.240	0.178
4	3.0019	0.240	0.178
5	3.0005	0.242	0.184
6	3.0009	0.241	0.176
平均含量		0.240	0.178
RSD(%)		0.84	1.70

稳定性实验结果见表5。柚皮苷与野漆树苷峰面积的RSD分别为1.28%与1.90%,表明供试品溶液在36h内稳定。

表5 稳定性实验结果
Table 5 Results of stability

进样时间(h)	柚皮苷峰面积	野漆树苷峰面积
0	92.17	107.29
1.5	92.15	109.14
3	92.19	108.72
4.5	92.04	108.22
6	92.36	105.97
7.5	92.82	105.70
12	94.24	104.33
36	95.25	103.71
RSD(%)	1.28	1.90

回收率计算结果见表6。柚皮苷与野漆树苷的平均回收率分别为98.68%与98.47%,RSD分别为2.54%与1.48%。

2.6 样品含量测定结果

以外标法计算23个样品中柚皮苷与野漆树苷的含量,结果见表7。

3 结论与讨论

23个通贤柚叶所含柚皮苷含量为1.56%~5.63%,野漆树苷含量为0.66%~2.65%。夏末秋初采摘的叶片中所含的2种活性黄酮物质含量普遍高于冬季采摘样品。此外,叶龄对2种成分的含量也有影响,修枝所得柚叶多为新长出的嫩叶,其含量高于长期无人管理、修剪的老叶。通贤镇四方村为通贤柚科技园区,栽培技术更为规范,其叶片所含两种活性物质的含量较高。

文献报道柚叶中含有柚皮苷元(柚皮素)^[11-12],但本实验并未在通贤柚叶中发现柚皮素。推测是由于通贤柚与文献报道的柚树品种不同,且生长环境特征相异,导致柚叶中累积的次生代谢产物有别。

表6 加样回收实验结果

Table 6 Results of recovery

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
柚皮苷 (naringin)	3.605	3.606	7.335	103.43	98.68	2.54
	3.598	3.606	7.171	99.06		
	3.604	3.606	7.131	97.80		
	3.603	3.606	7.137	97.98		
	3.603	3.606	7.127	97.74		
	3.602	3.606	7.067	96.10		
野漆树苷 (rhoifolin)	2.682	2.678	5.290	97.38	98.47	1.48
	2.677	2.678	5.346	99.66		
	2.681	2.678	5.374	100.54		
	2.681	2.678	5.327	98.82		
	2.680	2.678	5.271	96.73		
	2.680	2.678	5.296	97.69		

表7 样品含量测定结果

Table 7 Results of content determination of various samples

样品编号	柚皮苷含量 (mg/g)	野漆树苷含量 (mg/g)
1	4.73	2.41
2	2.78	1.30
3	4.60	2.35
4	3.47	1.35
5	5.63	1.78
6	2.44	1.35
7	3.35	2.65
8	2.11	0.66
9	4.97	1.74
10	3.15	1.79
11	5.47	2.24
12	3.91	1.52
13	2.58	1.44
14	2.44	1.61
15	2.89	1.82
16	1.56	1.06
17	2.16	1.17
18	3.82	2.25
19	2.48	1.20
20	2.12	1.09
21	2.52	1.84
22	2.64	1.84
23	3.57	1.66

参考文献

[1] Hsiao YC, Kuo WH, Chen PN, et al. Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway[J]. Chem Biol Interact, 2007, 167(3): 193-206.

[2] Ekambaram G, Rajendran P, Magesh V, et al. Naringenin reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats[J]. Nutr Res, 2008, 28(2): 106-112.

[3] 谢仁峰, 文双娥, 李洋, 等. 柚皮苷抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2011, 8(4): 5-12.

[4] Jeon SM, Bok SH, Jang MK, et al. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits[J]. Clin Chim Acta, 2002, 317(1-2): 181-190.

[5] Jeon SM, Park YB, Choi MS. Antihypercholesterolemic property of naringin alters plasma and tissue lipids, cholesterol-regulating enzymes, fecal sterol and tissue morphology in rabbits[J]. Clin Nutr, 2004, 23(5): 1025-1034.

[6] 刘新迎, 周联, 梁瑞燕, 等. 柚皮苷对前脂肪细胞 3T3-L1 增殖和诱导分化的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3): 176-179.

[7] 吴铿, 游琼, 黄瑞娜, 等. 柚皮苷对实验性 2 型糖尿病心脏病大鼠模型糖脂代谢的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(13): 1863-1866.

[8] 周燕文, 时雪峰. 柚皮苷对四氧嘧啶致糖尿病小鼠的降糖与抗氧化作用[J]. 中国药师, 2012, 15(3): 293-295.

[9] 高书亮, 卢元元, 安利娟, 等. 野漆树苷对雷公藤甲素诱导肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(6): 18-20.

[10] Rao YK, Lee MJ, Chen K, et al. Insulin-mimetic action of rhoifolin and cosmosiin isolated from Citrus grandis (L.) Osbeck Leaves; enhanced adiponectin secretion and insulin receptor phosphorylation in 3T3-L1 cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011, 2011: 624375.

[11] 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.

[12] 周梦春, 苏智先, 胡进耀, 等. 三种柚叶悬浮培养愈伤组织黄酮类有效成分的比较研究[J]. 绵阳师范学院学报, 2009, 28(2): 51-55.