

橘叶 UPLC 指纹图谱和化学模式识别研究

周桂荣^{1,2}, 李响^{1,2}, 赵桂铃^{1,2,3}, 白雪^{1,2}, 何毅^{1,2*}

1. 天士力控股集团有限公司研究院, 现代中药开发中心, 天津 300410

2. 天士力医药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410

3. 中国药科大学, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 建立橘叶 UPLC 指纹图谱, 对不同产地药材进行质量评价, 为科学评价各批次橘叶质量提供依据。方法 采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以 0.2% 甲酸水溶液-甲醇为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 0.3 mL/min, 柱温为 26 ℃, 检测波长为 330 nm。结合聚类分析和主成分分析对 20 批不同产地橘叶药材的整体质量进行评价。结果 建立 20 批橘叶的 UPLC 对照指纹图谱, 标定 27 个共有峰, 聚类分析分成 4 类, 利用主成分分析进行验证且确定 6 个决定峰。结论 结合化学计量学和 UPLC 指纹图谱为建立全面有效的橘叶药材质量控制模式提供参考。

关键词: 橘叶; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 12-2237-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.12.019

UPLC characteristic chromatographic profile of *Folium Citri Reticulatae*

ZHOU Guirong^{1,2}, LI Xiang^{1,2}, ZHAO Guiling^{1,2,3}, BAI Xue^{1,2}, HE Yi^{1,2}

1. TCM Research Center, Tasly Academy, Tasly Holding Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To establish fingerprint of *Folium Citri Reticulatae* by UPLC, and assess the quality of different habitats, provide reasonable reference for its quality evaluation and control. **Methods** The ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) was used with a mobile phase of methanol-0.2% phosphoric acid in gradient elution. The flow rate was 0.3 mL/min. The column temperature was 26 ℃, and detection wavelength was 330 nm. Principal component analysis and cluster analysis were used to evaluate 20 batches quality of *Folium Citri Reticulatae* from different habitats. **Results** Fingerprints of 20 batches of samples were established and 27 common peaks were obtained. All of samples could be classified into four clusters by cluster analysis, and PCA was used to verify and identify 6 determination peaks. **Conclusion** The combination of Chemometrics (CMM) and fingerprint can provide a reference for the comprehensive and effective quality control of herbs.

Key words: *Folium Citri Reticulatae*; UPLC; principal component analysis; cluster analysis

橘叶为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥叶^[1]。其性平, 味苦、辛, 具有疏肝行气, 化痰消肿散结的功效^[2-3], 《本草汇》中记载“橘叶, 疏肝、散逆气、定胁痛之药也。”^[4]橘叶临床应用广泛, 在乳块消片、乳癖康胶囊、乳块消颗粒等现代中成药中均有应用^[5-7]。橘叶中含有多种化学成分, 包括挥发油、碳水化合物、黄酮类成分^[3,8]。

目前, 市场上的橘叶商品主要来源于栽培品, 主要分布于华东、华中、华南及西南地区, 主产于广东、四川、浙江、江西等地, 以广东新会、江门一带所产为地道^[9]。

目前 2015 年版《中国药典》中未收录橘叶, 虽然橘叶收录于湖南、湖北、甘肃、北京、江苏等地方标准中, 但也仅限于性状鉴定和显微鉴别^[1], 难以评价

收稿日期: 2018-06-08

基金项目: 国家重大科技专项重大新药创制——中医药优势领域的创新中药关键技术开发研究(2017ZX09301005)

第一作者: 周桂荣(1977—), 女, 高级工程师, 研究方向为新药研究与质量控制。E-mail: zhougr@tasly.com

*通信作者: 何毅, 博士, 研究方向为中药新药研发、中药现代化及国际法规与注册。E-mail: heyi@tasly.com

药材质量。文献报道有以橙皮苷含量作为橘叶单一质控指标^[9-10],仍难以全面反应橘叶药材的整体质量。本实验采用具有效率高和高灵敏度的UPLC法,建立橘叶UPLC特征图谱,结合相似度分析、聚类分析和主成分分析(PCA)的方法,为橘叶质量控制及标准的制定提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC(美国 Waters 公司,包括二元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、Empower 3 色谱工作站);Mettler Toledo Xs205 分析天平(瑞士, Mettler Toledo 公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水系统(Millipore 公司)。

1.2 试剂和药材

甲醇(色谱纯,美国 Merck 公司);乙腈(质谱纯,美国 Merck 公司);甲酸(色谱纯,阿拉丁公司)。对照品橙皮苷(纯度:95.3%,批号:110749-201316,中国食品药品检定研究院,供含量测定用)。

本实验收集 20 批市售不同产地橘叶药材,详见表 1。

表 1 不同产地橘叶药材

Table 1 *Folium Citri Reticulatae* of different regions

样品编号	产地	样品编号	产地
S1	江西 1	S11	四川 1
S2	江西 2	S12	四川 2
S3	浙江 1	S13	湖北 1
S4	浙江 2	S14	湖北 2
S5	浙江 3	S15	广东
S6	浙江 4	S16	云南
S7	河南 1	S17	河北
S8	河南 2	S18	湖南
S9	安徽 1	S19	广西
S10	安徽 2	S20	福州

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相 A 为 0.2% 甲酸水, B 为甲醇;梯度洗脱(0~2 min, 10% B; 2~10 min, 10%~25% B; 10~12 min, 25% B; 12~18 min, 25%~33% B; 18~19 min, 33% B; 19~38 min, 33%~70% B; 38~41 min, 70%~100% B);体积流量 0.3 mL/min;检测波

长 330 nm;柱温 26 ℃;进样量 2 μL;洗脱 41 min。

2.2 对照品溶液制备

精密称取橙皮苷对照品适量,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜备用。

2.3 供试品溶液制备

取各批次橘叶粉末 0.5 g,置具塞三角瓶中,加入 70% 甲醇 20 mL,密塞,超声(500 W, 40 kHz)提取 40 min,取出,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,静止,取上清液,14 000 r/min 离心 10 min。用 0.22 μm 滤膜过滤,备用。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份橘叶药材供试品溶液,按“2.1”色谱条件,连续进样 6 针采集分析。以橙皮苷为参照峰,各共有峰相对保留时间的 RSD<1.0%,相对峰面积的 RSD<5.0%。结果表明,仪器精密度较好。

2.4.2 重复性试验 取橘叶药材(S14),分别按“2.3”方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”色谱条件进样分析。以橙皮苷为参照峰,各共有峰相对保留时间的 RSD<1.0%,相对峰面积的 RSD<5.0%。结果表明,方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取橘叶药材粉末(S14),按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”色谱条件,分别于 0、2、4、6、12、24 h 进样采集色谱图。以橙皮苷为参照峰,各共有峰相对保留时间 RSD<1.0%,相对峰面积的 RSD<5.0%。结果表明,样品在室温下 24 小时内保持稳定。

2.5 对照指纹图谱的建立

将 20 批橘叶药材供试品溶液分别进样检测,记录 330 nm 波长下色谱图,以橙皮苷为参照峰,按峰出现率 100% 计,确定该 27 个共有峰。将所得的各批次药材图谱以 AIA 格式导入国家药典委员会研制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A)软件,并按中位数法生成 330 nm 波长下对照指纹图谱(RFP)见图 1,相似度见表 2。

2.6 化学计量学分析

单一的相似度评价难以全面地反映不同产地橘叶药材的差异性,指纹图谱和化学计量学的结合可以整体地评价各个产地橘叶的质量。目前,化学计量学在中药质量控制与评价中应用广泛,主要利用其信息化技术将指纹图谱丰富的信息量进行降维,以低维变量代替原始高维变量,建立分类模型,从而有效评价指纹图谱中各信息的贡献影响力^[11]。

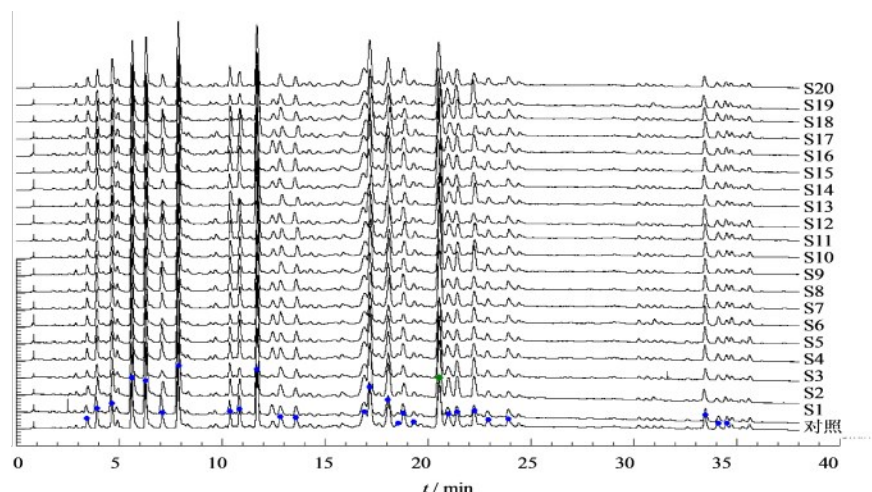


图1 330 nm 波长下20批橘叶药材UPLC 指纹图谱和对照指纹图谱

Fig.1 UPLC fingerprints of 20 batches of samples and RFP under 330 nm wavelengths

表2 20批橘叶相似度分析结果

Table 2 Similarity of 20 batches of samples

样品 编号	相似 度	样品 编号	相似 度	样品 编号	相似 度	样品 编号	相似 度
S1	0.990	S6	0.993	S11	0.995	S16	0.995
S2	0.977	S7	0.995	S12	0.991	S17	0.974
S3	0.993	S8	0.997	S13	0.988	S18	0.995
S4	0.995	S9	0.991	S14	0.983	S19	0.994
S5	0.989	S10	0.982	S15	0.993	S20	0.990

本研究采用 IBM SPSS 22.0 软件和 SIMCA 13.0 软件对不同批次橘叶药材的指纹图谱进行聚类分析和主成分分析。

2.6.1 聚类分析 采用 SPSS 22.0 统计软件对 20 批橘叶样品进行聚类分析,采用组间联接法,利用欧氏距离(Eucildean Distance)作为样品的测度对其进行系统聚类分析,得到聚类树状图^[12],见图2。

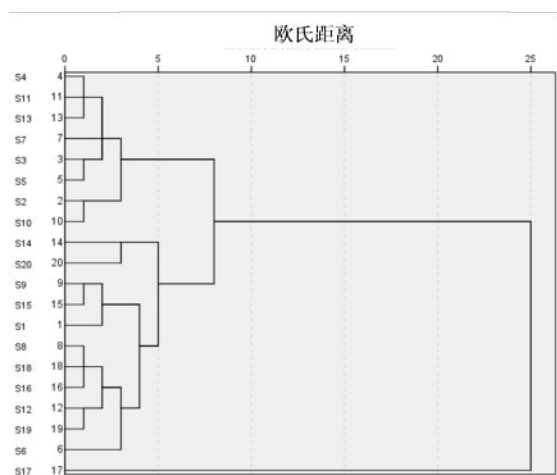


图2 20批橘叶药材聚类分析树状图

Fig.2 Cluster analysis tree of 20 batches of samples

结果显示,当判别条件距离为5时,20批橘叶药材被分为4大类,一类包括S17;二类包括S14、S20;三类包括S2、S3、S4、S5、S7、S10、S11、S13;四类包括S1、S6、S8、S9、S12、S15、S16、S18、S19。直观分析第一类和第二三四类药材的指纹图谱色谱峰的相对峰面积可以发现,S17药材指纹图谱中的橙皮苷(19号峰)的峰面积明显小于其他类药材中橙皮苷峰面积,推测此为S17药材单独分类的主要原因。且其他类别的组成存在产地交叉情况,因此,产地不能作为橘叶质量优劣的标准,需要综合药材各化学成分含量进行整体质量评价。

2.6.2 主成分分析 采用 SPSS 22.0 统计软件对 20 批橘叶药材的指纹图谱数据进行主成分分析,由于S17药材与其他批次药材的差异性较大,因此剔除S17相关数据,求出相关矩阵的特征值及其方差,见表3。以特征值>1 为提取标准,得到前2个主成分的累计方差贡献率为82.224%(>80%),故选取前2个主成分即可进行评价,它代表了橘叶药材中27个成分量的82.224%的信息量,具有很好的代表性,足以评价橘叶药材的品质。

根据因子荷载矩阵,推测影响橘叶药材质量差异的并不是单一成分,而是多成分的作用的结果。从表4看出,第2主成分主要来自色谱峰21,22;其余均为第1主成分。

用 SIMCA 13.0 分析软件,以第1、2主成分得到 PCA 得分图(图3),图中20批橘叶药材分布情况与聚类分析结果一致。为了确定样本组间差异,本研究对A、B、C三组样品进行 PLS-DA 分析,通过VIP图(Variable importance)(图4)筛选出差异较大成

表3 特征值和方差贡献率

Table 3 Characteristic value and variance contribution rate

峰号	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差的贡献率/%	累积贡献率/%	合计	方差的贡献率/%	累积贡献率/%
1	17.520	67.386	67.386	11.768	45.260	45.260
2	3.858	14.838	82.224	9.611	36.964	82.224
3	1.696	6.521	88.746			
...	...	...	...			
26	-5.967E-16	-2.295E-15	100.000			

表4 初始因子载荷矩阵

Table 4 Component matrix

	Component			Component	
	1	2		1	2
G1	0.940	0.087	G14	0.903	0.275
G2	0.893	-0.087	G15	0.917	0.044
G3	0.931	-0.199	G16	0.922	0.302
G4	0.925	-0.018	G17	0.813	-0.466
G5	0.741	-0.178	G18	0.781	-0.424
G6	0.649	-0.645	G20	0.736	0.515
G7	0.882	0.085	G21	0.446	0.881
G8	0.837	-0.428	G22	0.168	0.865
G9	0.713	-0.600	G23	0.910	-0.102
G10	0.965	0.143	G24	0.838	-0.061
G11	0.859	0.445	G25	0.851	-0.098
G12	0.874	-0.192	G26	0.693	0.263
G13	0.913	0.276	G27	0.783	0.163

分。且文献说明^[13],VIP>1的变量对分类起着关键作用。由图4可知10个成分VIP均大于1,其中21、17、22、8、26、6号峰对橘叶药材分类的影响较大。

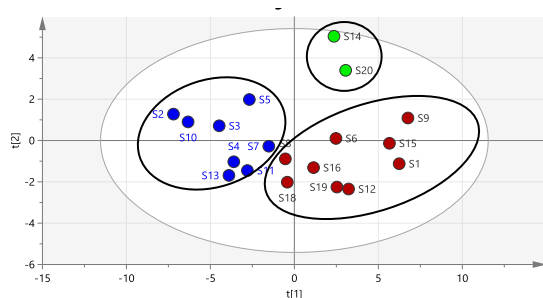


图3 橘叶药材主成分分析结果

Fig.3 PCA diagram of 19 batches of samples

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本研究考察了不同检测波长、不同柱温、不同流速以及不同流动相的样品色谱图,根据谱图分离情况确定色谱条件,具体条件见“2.1”项下。

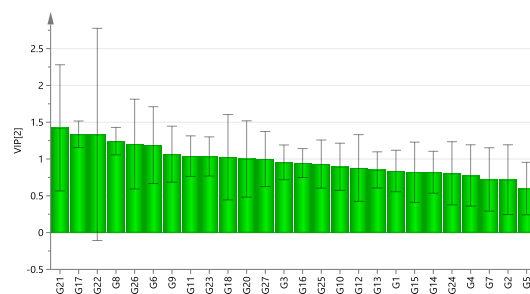


图4 橘叶药材PLS-DA分析结果

Fig.4 PLS-DA results of samples

采用PDA检测器对样品进行190~400 nm全波长扫描,结果在330 nm处有最多的吸收峰,因此选择330 nm作为橘叶指纹图谱的检测波长。分别考察不同柱温26、27、28、29℃对色谱峰分离情况的影响,结果表明26℃分离效果较好,因此确定柱温为26℃。在流速的考察中,26℃、0.4 mL/min流速条件下,柱压较高,且无法进行较好分离,因此确定流速为0.3 mL/min。对于流动相的考察,通过对乙腈-0.1%甲酸水、甲醇-0.1%甲酸水、甲醇-0.2%甲酸水、甲醇-0.1%磷酸水作为流动相系统进样,对比不同流动相条件下的图谱,甲醇-0.2%甲酸水条件下色谱峰个数较多,峰形较好,因此选择甲醇-0.2%甲酸水作为流动相。

3.2 提取方式的优化

本试验考察了不同提取方式、不同提取时间以及不同提取溶剂下的样品色谱图,对比各条件下的谱图的分离情况确定供试品溶液制备条件,具体条件见“2.3”项下。

结果表明,超声提取与加热回流提取的效果相当,但超声操作简单便利,因此选择超声提取。超声时间选择了20、40、60 min进行考察,提取时间对提取效果无较大影响,且希望保证每批药材提取完全,因此超声时间确定为40min。通过比较不同提取溶剂的图谱,70%甲醇测定的图谱中峰的高度强度展现的较为均一,更适合对各批次的药材进行共

有峰的指认,因此提取溶剂定为70%甲醇。

4 小结

本研究首次采用UPLC技术建立橘叶指纹图谱,全面地反映橘叶化学成分信息,从而建立橘叶整体质量控制体系。利用化学计量学方法对橘叶指纹图谱所包含的大量信息进行降维分析,结果表明,相同产地的橘叶药材质量具有差异性,因此,产地不能作为评价橘叶药材质量的唯一依据,需要综合整体化学成分的含量特征进行质量评价。本研究在主成分投影空间上,获得得分图,还通过PLS-DA分析找出影响橘叶分类的6个主要差异性成分,全面有效地反应样品与样品、样品与变量之间的相对关系。为进一步结合质谱和药效等手段进行物质基础研究奠定基础。

参考文献

- [1] 湖南省中药饮片炮制规范[S]. 2010.
- [2] 崔国静,刘芳,贺蕾.橘叶、橘络、橘核的性状与药用价值[J].首都医药,2013,20(05): 44.
- [3] 申屠乐.正交试验优选橘叶挥发油提取工艺[J].海峡药学,2013,25(03): 29-30.
- [4] 朱丽玲.复方香夏胶囊的制备工艺及质量标准研究[D].武汉:湖北中医药大学,2014.
- [5] 吴良发,吴燕红,杨明,等.乳块消片中丹参、橘叶与地龙的同板薄层色谱鉴别[J].赣南医学院学报,2015,35(03): 350-351.
- [6] 黄蒙蒙.乳癖康胶囊的制备工艺及质量标准研究[D].济南:山东中医药大学,2014.
- [7] 陈伟康,马双成,罗跃华,等.超高效液相串联质谱法同时测定乳块消颗粒中6种成分的含量[J].中国药杂志,2015,50(07): 629-633.
- [8] 曹规划,付庆荣,张藏曼,等.HPLC-DAD-ESI-MSⁿ技术对橘叶(福橘叶)中96个化学成分的快速分离和鉴定(英文)[J].中国药杂志英文版,2016,25(02): 91-110.
- [9] 刘传夫.橘叶药材质量评价体系研究[D].济南:山东中医药大学,2014.
- [10] 史锐,张晓丽,龙沛霞.HPLC法测定橘叶中橙皮苷的含量[J].辽宁中医药大学学报,2008(06): 184-185.
- [11] 孙立丽,王萌,任晓亮.化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J].中草药,2017,48(20): 4339-4345.
- [12] 曾慧婷,沙秀秀,宿树兰,等.不同产地丹参茎叶UPLC指纹图谱与化学模式识别研究[J].中草药,2017,48(04): 767-772.
- [13] 黄涵,曾令杰,冯鸿耀,等.基于HPLC指纹图谱与PLS-DA法评价新疆、云南产雪菊的质量[J].中成药,2015,37(12): 2710-2714.