

应用技术

高效液相色谱法测定木姜叶柯中 根皮苷、三叶苷和根皮素的含量

王 钰, 王 磊, 张东星, 李赫宇, 晏仁义

(天津益倍生物科技集团有限公司 天津 300457)

摘要: 建立高效液相色谱法同时测定木姜叶柯中三叶苷、根皮苷和根皮素的含量。采用 C18 色谱柱; 检测波长 285 nm, 流动相为乙腈-0.04%甲酸, 梯度洗脱; 流速 0.8 mL/min; 柱温 40 °C。三叶苷、根皮苷和根皮素的加标回收率分别为 102.54%、102.01%和 102.12%, RSD 分别为 1.66%、2.21%和 2.38%。该方法适用于木姜叶柯中根皮苷、三叶苷和根皮素的含量分析, 为其药材质量的判定提供数据参考。

关键词: 高效液相色谱 木姜叶柯 三叶苷 根皮苷 根皮素

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1006-8945(2019)07-0066-03

Determination of Phlorizin, Trilobatin and Phloretin in *Lithocarpus litseifolius* by HPLC

WANG Yu, WANG Lei, ZHANG Dongxing, LI Heyu, YAN Renyi

(Tianjin Ubasio Biotechnology Group Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine phlorizin, trilobatin and phloretin in *Lithocarpus litseifolius*. The separation of target components was performed on a C18 column. The detection wavelength was 285 nm, the mobile phase was acetonitrile-water (0.04% formic acid), with gradient elution. The flow rate was 0.8 mL/min. Column temperature was 40 °C. The standard recoveries of phlorizin, trilobatin and phloretin were 102.54% (RSD 1.66%), 102.01% (RSD 2.21%) and 102.12% (RSD 2.38%), respectively. This method can be used to analyze the content of phlorizin, trilobatin and phloretin simultaneously, and can provide reference for quality control of the *L. litseifolius*.

Key words: HPLC; *Lithocarpus litseifolius*; trilobatin; phloridzin; phloretin

木姜叶柯 (*Lithocarpus ploystachyus* Rehd), 别名多穗柯、湖南甜茶、野金柴等, 是我国传统民间草药和保健饮料植物, 以叶入药, 对高血压及冠心病有疗效^[1]。据《中华中药志》记载: 多穗柯茶能防治高血压, 治疗湿热痢疾、皮肤瘙痒、痈疽恶疮等症, 并具有滋养肝肾、和胃降逆、润肺止咳、解困醒酒等作用。

2017 年 6 月, 木姜叶柯被批准为我国的新食品原料, 化学成分主要是黄酮类物质, 其中根皮苷常被作为木姜叶柯质量评价的成分指标。杨大坚等^[2]从木姜叶柯的乙醇提取物中分离得到除根皮苷外, 还有含量较高的成分三叶苷。文献报道木姜叶柯三叶苷对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶有明显抑制作用, 且具有较强的抗氧化能力, 是一种有应用潜力的抗糖尿病活性物质^[3]。因此三叶苷也是木姜叶柯的有效成分之一,

经测定木姜叶柯中三叶苷的含量比根皮苷高出很多。本文为了更好地评价木姜叶柯药材质量, 以 11 批木姜叶柯样品为研究对象, 以三叶苷、根皮苷和根皮素 3 个成分的含量作为评价指标。

1 检测仪器与样品

岛津 LC-2030C 3D 高效液相色谱系统, 包括洗脱泵、自动进样器、柱温箱和 PDA 检测器(日本岛津公司), KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), MS105DU 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司), TDZ4-WS 台式低速离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司)。

根皮苷、根皮素(纯度大于 98%)对照品购自中

收稿日期: 2019-06-18

国食品药品检定研究院。三叶苷(纯度大于 98%)对照品为成都曼思特生物科技有限公司与中国科学院成都生物研究所联合制得。乙腈、甲酸均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。共从产地采集木姜叶柯叶样品 11 份。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Inertail ODS-3 C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.04% 甲酸(B) 梯度洗脱(表 1); 流速 0.8 mL/min; 柱温 40 °C; 检测波长 285 nm。在上述色谱条件下,样品中三叶苷、根皮苷和根皮素的色谱峰能达到较好的分离,且纯度检查符合要求,样品其他成分的测定无干扰,如图 1。

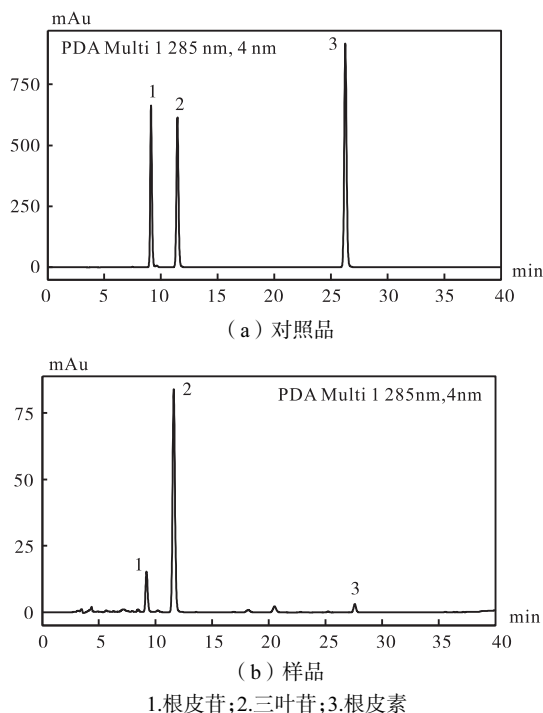


图 1 对照品和木姜叶柯样品的高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatography of references and sample

表 2 标准品的线性关系和范围

Tab.2 Linear relationship and range of references

成分	回归方程	R ²	线性范围(μg)	检测限(mg/L)	定量限(mg/L)
三叶苷	$Y = 2.770 \times 10^6 X + 5.158 \times 10^3$	0.999 8	0.01 ~ 2.5	0.057 00	0.273 60
根皮苷	$Y = 3.465 \times 10^6 X - 6.795 \times 10^3$	1.000 0	0.01 ~ 2.5	0.068 60	0.110 59
根皮素	$Y = 7.254 \times 10^6 X - 6.613 \times 10^4$	1.000 0	0.01 ~ 2.5	0.024 71	0.079 08

2.6 稳定性试验

取供试品溶液,分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h 进样,记录根皮苷、三叶苷和根皮素的峰面积值,计算峰面积 RSD。结果显示,根皮苷、三叶苷和根皮素

表 1 流动相梯度洗脱数据(%)

Tab.1 Gradient elution of mobile phase(%)

时间(min)	A	B
0	28	72
14	28	72
30	40	60
35	28	72
40	28	72

2.2 对照品溶液制备

精密称取真空至恒质量的根皮苷、三叶苷、根皮素 5.00 mg 置于 10 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇溶解并定容,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取滤液供测试。

2.3 供试品溶液制备

将多穗柯叶干燥、粉碎、研磨,过 4 号筛备用。精确称取多穗柯样品 0.25 g,置于 25 mL 容量瓶中,加入适量 70% 乙醇,超声处理(100 W, 40 kHz) 30 min,取出、放冷、定容、摇匀、离心,取上清液 1 mL 定容于 10 mL 70% 乙醇中,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取滤液供测试。

2.4 线性关系考察

精确称取根皮苷、三叶苷、根皮素对照品各 5 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得标准品母液。精密吸取标准品母液按照 1、2.5、5、10、20、40、50 倍数进行稀释,得系列质量浓度溶液,取各个浓度的对照品溶液各 5 μL 注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积。以进样量 X(μg) 为横坐标,峰面积值 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程和相关系数。同法逐级稀释,分别以信噪比 S/N = 3 和 S/N = 10 的进样浓度确定检测限和定量限,结果见表 2。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品混合溶液 5 μL,按上述色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积值。记录峰面积,计算峰面积的 RSD。结果显示根皮苷、三叶苷、根皮素峰面积的 RSD 分别为 0.30%、0.37%、0.29%,表明仪器精密度良好。

峰面积的 RSD 分别为 0.94%、0.56%、1.49%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一份样品约 250 mg,共 6 份,按照

2.3 项下方法制备供试品溶液并进样、测定峰面积、计算含量。结果 6 份样品中,根皮苷、三叶苷和根皮素的 RSD 分别为 1.86%、1.1% 和 1.05%,表明此方法的重复性良好。

2.8 加样回收试验

精密称取已知含量的样品 0.125 g,共 6 份,分别加入一定量对照品,按 2.1 项下色谱条件进行测定,计算回收率,结果见表 3。

2.9 样品的含量测定

取各药材粉末,按 2.3 项下的方法操作制备供试品溶液,每个样品平行 2 份,并按 2.1 项下的色谱条件进行测定,计算各供试品中 3 种成分的含量,结果见表 4。

表 3 根皮苷、三叶苷和根皮素的加样回收率

Tab.3 Results on recovery rate of phlorizin, trilobatin and phloretin

成分	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测定值 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
根皮苷	0.998 9	0.857 5	1.887 6	103.64	102.54	2.21
	0.998 6		1.897 2	104.79		
	1.000 8		1.876 4	102.11		
	1.005 9		1.905 0	104.85		
	1.004 5		1.860 0	99.77		
	1.001 3		1.859 4	100.07		
三叶苷	26.33	26.00	53.00	102.58	102.01	1.66
	26.32		53.30	103.77		
	26.38		52.40	100.08		
	26.51		53.24	102.81		
	26.48		52.40	99.69		
	26.39		53.20	103.12		
根皮素	0.493 2	0.337 5	0.832 0	100.39	102.12	2.38
	0.493 0		0.842 0	103.41		
	0.494 1		0.829 0	99.23		
	0.496 7		0.849 9	104.65		
	0.495 9		0.834 4	100.30		
	0.494 4		0.847 9	104.74		

表 4 根皮苷、三叶苷和根皮素的含量 (%)

Tab.4 Contents of phlorizin, trilobatin and phloretin in samples (%)

样品	根皮苷	三叶苷	根皮素
M-1	0.80	21.04	0.39
M-2	0.41	25.53	0.47
M-3	0.36	23.41	0.44
M-4	3.92	0.62	无
M-5	0.74	17.14	0.42
M-6	3.41	10.07	0.33
M-7	4.00	0.66	0.22
M-8	5.50	0.20	无
M-9	6.26	0.67	无
M-10	1.62	14.94	0.43
M-11	0.55	23.99	0.50

3 讨论和结论

本研究建立了通过 HPLC 测定木姜叶柯中三叶苷、根皮苷和根皮素 3 种成分含量的方法,能将 3 种成分很好分离,经过方法学验证,证实该方法简便、准确、重复性好。克服了一些文献报道方法的缺点,比如张毅等^[3]用高效液相法检测从多穗柯中分离纯化出的三叶苷,色谱条件 C18(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),洗脱条件甲醇:水 = 60:40,检测结果发现:三叶苷色谱峰的保留时间与根皮苷一致,经核磁共振波谱分析后证实三叶苷与根皮苷互为同分异构体。陈文等^[4]用高效液相法测试木姜叶柯水提取物中根皮苷的含量,色谱条件 C18(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),洗脱条件甲醇:水 = 47:53,检测结果根皮苷含量高达 92.8%,推测根皮苷与三叶苷的色谱峰未能分离。蒋珍藕等^[5]研究紫外分光光度计测定木姜叶柯总黄酮的方法,发现芦丁是黄酮醇类的化合物,而木姜叶柯中的总黄酮成分是二氢查尔酮,两者在结构上存在较大的差异,所以用经典方法以芦丁为对照品,通过络合比色法测定木姜叶柯总黄酮的结果并不理想。之后,采用以根皮苷为对照品,采用直接紫外测定法测定总黄酮,结果比较可靠。

采用本文建立的方法对 11 批样品进行了测定。本实验中,以 4~8 月份的木姜叶柯为材料,测定三叶苷、根皮苷和根皮素的含量,结果发现,根皮苷从 4~8 月份含量大幅度增加(0.74%~6.26%)。三叶苷从 4~6 月份的含量大幅度降低(17.14%~0.66%),之后含量变化不明显(0.20%~0.67%)。根皮素 4 月份到 6 月份的含量小幅度降低(0.42%~0.22%),7 月份和 8 月份样本检测不到根皮素。整体而言,木姜叶柯中根皮苷、三叶苷和根皮素含量变化具有一定规律性:随着月份增加根皮苷含量增加,三叶苷含量降低,根皮素含量逐渐降低至没有。说明木姜叶柯在整个生长周期中,有效成分会发生转变,其发生机理有待于进一步深入研究,为提高木姜叶柯有效活性成分的含量提供有力的依据。■

参考文献

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1987.
- [2] 杨大坚,钟焜昌. 甜茶化学成分研究 I. 甜味成分[J]. 中草药,1991(3):99-101.

下转第 70 页

消耗等特点。特别是低温固化的特点使得转向器涂装充分体现节能减排的特点,通过双组分喷涂设备的施工可以实现方便快捷的连续化生产,整体提升厂家的供货及时性和竞争力。

2.2 汽车转向器专用聚脲涂料的性能参数

从表 1、2 中可以看到,聚脲汽车转向器专用涂料具有高施工固体含量、干燥性优异、耐盐雾性和耐老化性平衡的特点,适合连续化生产线涂装,可以节省能源消耗、改善环境,从而达到优化生产的目的。该产品具有良好的应用和推广价值。

表 1 原漆参数

Tab.1 Performance data of paint

项目	指标	实测	检验方法
原漆状态	均匀	均匀	目测
原漆细度/ μm	≤ 30	25	GB/T 1724—1979
原漆黏度(涂-4)/s	≥ 40	54	GB/T 1723—1993
原漆固含/%	≥ 70	73	GB/T 1725—1979
原漆比重/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.45 ± 0.05	1.48	GB/T 6750—1986
施工固体含量/%	≥ 65	69.6	GB/T 1725—1979

表 2 涂膜参数

Tab.2 Performance data of coating

项目	指标	实测	检验方法
表面状态	平整光亮	平整光亮	目测
涂膜厚度/ μm	70-90	82	GB/T 1764—1979
光泽(60°角)/%	30-50	41.5	GB/T 9754—1988
干燥性(70 °C)/min	20-30	25	—
涂膜硬度(铅笔)	$\geq \text{HB}$	H	GB/T 6739—1996
附着力(划格)/2 mm	≤ 1	1	GB/T 9286—1998
涂膜耐冲击性/cm	≥ 30	40	GB/T 1732—1993
耐盐雾性/h	≥ 240	240	GB/T 1771—1991
耐老化性/h	≥ 480	504	GB/T 1765—1979

3 试验结果与讨论

3.1 汽车转向器专用聚脲涂料的节能降耗性

在汽车及相关部件的涂装施工过程中,能源消耗的占比是非常大的,特别是很多部件是厚质钢板或者铸件,提升温度的能源消耗就更大。目前主要的汽车转向器配套涂装采用底漆配套面漆的方式,底漆和面

漆分别进行烘烤消耗了大量的能量和时间。本项目产品具有高施工固体含量的特点,同时保持了良好的耐盐雾和耐候性,使得产品可以进行一次涂装和烘烤,从而节约大量的时间成本和能源。

原有的涂料产品需要 80 ~ 100 °C 烘烤 30 ~ 40 min,本产品工艺要求 60 ~ 70 °C 烘烤 20 ~ 30 min,凸显了节能降耗优势。本项目产品施工可以一次成膜,节省了人力和空间,综合节能降耗能力得到客户的认可。

3.2 汽车转向器专用聚脲涂料的双重保障

一般涂料不具有耐老化性和耐盐雾性的综合性能。从表 2 中可以看到,汽车转向器专用聚脲涂料的耐老化性达到 504 h、耐盐雾性达到 240 h,这就保证了工件的耐候性和耐腐蚀性,涂膜对工件具有更长效的防护效果,更能凸显出汽车整体的优异性能,无疑具有很好的应用前景和推广价值。

4 结 语

聚脲涂料是近年发展起来的一个新型产品,该类产品具有固体含量高、干燥迅速、耐候性优异等特点,本项目针对汽车转向器的具体应用研发聚脲涂料,拓宽了聚脲类产品的应用领域。汽车转向器专用聚脲涂料具有对工件的长效防护作用,能够为厂家节省大量的能源消耗和空间占用,整体降低生产成本,增强竞争力,产品具有很好的市场推广前景和应用价值。■

参考文献

- [1] 沈春林. 喷涂聚脲防水涂料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [2] 李华宁, 孟昭辉, 高成勇, 等. 聚脲汽车涂料的研究[J]. 中国涂料, 2017(32): 29-32.
- [3] 朱骥良, 吴申年. 颜料工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.

上接第 68 页

- [3] 张毅, 宁正祥, 董华强. 多穗柯三叶苷的抑制糖尿病关键酶活性和抗氧化性[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 32-35.
- [4] 陈文, 杜明月, 刘浩然. 高效液相色谱法测定木姜叶

柯水提取物中根皮苷的含量[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2017, 14(2): 190-192.

- [5] 蒋珍藕, 邱宏聪, 韦宝伟, 等. 木姜叶柯总黄酮的质量控制方法研究[J]. 中成药, 2011, 33(5): 838-840.