

运用 RP-HPLC 测定油茶枯饼中皂苷类、黄酮类有效指标性成分的含量

申立峰 王亚利 李倩 刘璐 谭立 孔静 杨元 彭平 王梦林 石任兵

【摘要】 目的 基于药物体系导向建立油茶枯饼中皂苷类和黄酮类有效指标性成分的含量测定方法。**方法** 采用反相高效液相色谱方法,在酸性系统下同时测定油茶枯饼中皂苷类和黄酮类有效指标性成分,采用 Waters×bridge C₁₈(4.6×250 mm,5 μm)色谱柱;流动相为乙腈-0.05%磷酸水,梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,柱温 30℃,黄酮类检测波长为 265 nm,皂苷类检测波长为 203 nm,进样 20 μL。**结果** 山奈酚 3-O-[2-O-β-D-木糖-6-O-α-L-鼠李糖]-β-D-葡萄糖苷、山奈酚 3-O-[2-O-β-D-半乳糖-6-O-α-L-鼠李糖]-β-D-葡萄糖苷、camelliasaponin B₁ 分别在 0.0876 ~ 8.76 μg、0.0885 ~ 8.85 μg、0.0872 ~ 8.72 μg 范围内与色谱峰面积呈现良好的线性关系,相关系数均为 0.9999。精密性、稳定性、重复性良好,平均加样回收率分别为 99.22%、101.50%、100.44%,RSD 值分别为 1.66%、1.72%、1.58%。**结论** 所建方法快速、简便、准确度高、重现性好、适用于油茶枯饼的含量测定与质量控制。

【关键词】 油茶枯饼; 黄酮; 皂苷; 反相高效液相色谱法; 含量测定

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.05.001

Simultaneous determination of saponins, flavonoids in oil-tea camellia defatted cake by reversed phase high performance liquid chromatography SHEN Lifeng, WANG Yali, LI Qian, et al. School of Traditional Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China
Corresponding author: SHI Renbing, E-mail: Shirb@126.com

【Abstract】 Objective To establish a HPLC method for the determination of index components of flavonoids and saponins in oil-tea camellia defatted cake based on drug system. **Methods** Reversed phase high performance liquid chromatography was used for determination of index components of flavonoids and saponins in acid system at the same time, Waters×bridge C₁₈(4.6×250mm, 5μm) chromatographic column was used; moving phase was acetonitrile and 0.05% phosphoric acid water, gradient elution, flow rate was 1 mL/min, column temperature was 30℃. The detection wavelength of flavonoids was 265 nm. The detection wavelength of saponins was 203nm, the injection volume was 20μL. **Results** The kaempferol 3-O-[2-O-β-D-xylose-6-O-α-L-rhamnopyranosyl]-β-D-glucopyranoside, kaempferol 3-O-[2-O-β-D-galactose-6-O-α-L-rhamnopyranosyl]-β-D-glucopyranoside and camelliasaponin B₁ showed a good linear relationship with peak area respectively in 0.0876 ~ 8.76 mg/mL, 0.0885 ~ 8.85 mg/mL, 0.0872 ~ 8.72 mg/mL, and the correlation coefficient was 0.9999. Precision, stability and repeatability were

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2012BAI29B06);北京中医药大学创新团队资助项目(2011-CXTD-12)

作者单位: 100069 北京,首都医科大学中医药学院[申立峰(硕士研究生)、李倩(硕士研究生)、王梦林(硕士研究生)];北京中医药大学中药学院国家中医药管理局中药经典名方有效物质发现重点实验室[王亚利(硕士研究生)、刘璐(硕士研究生)、谭立(硕士研究生)、孔静(硕士研究生)、石任兵];北京市教委中药质量控制技术工程中心(石任兵);河南省食品药品检验所中药室(杨元);北京同仁堂研究院(彭平)

作者简介: 申立峰(1991-),2014 级在读硕士研究生。研究方向: 中药(复方)有效物质基础研究与药物创新。E-mail:13366927181@163.com

通信作者: 石任兵(1957-),博士,教授,博士生导师。研究方向: 中药(复方)有效物质基础研究与药物创新。E-mail:shirb@126.com

reached the requirements. The average recoveries were 99.22%, 101.50%, 100.44%, and RSD were 1.66%, 1.72%, 1.58%, respectively. **Conclusion** The method is quick, simple, accurate and reproducible, and can be used for the quality control and content determination of oil-tea camellia defatted cake.

【Key words】 Oil-tea camellia defatted cake; Flavonoids; Saponins; Reversed phase high performance liquid chromatography; Content determination

油茶 *camellia oleifera* abel. 是中国特有的树种, 具有清热解毒、活血散瘀、止痛的药用价值^[1]。油茶枯饼作为油茶籽炼油后的剩余物, 含有多种活性成分^[2], 具有抗氧化、抗菌、杀虫等活性^[3-5]。笔者前期研究发现油茶枯饼制备物具有显著的抗血栓、抗心肌缺血的药效作用, 并有抗痴呆的疗效趋势。笔者在研究过程中, 通过药学—药效质量表征关联分析, 发现油茶枯饼中的皂苷类、黄酮类成分为其抗血栓、抗心肌缺血和抗痴呆药物体系构架的主要有效物质基础。然而, 目前油茶枯饼侧重单类指标性成分的分析, 如对油茶枯饼中山奈酚 3-O-[2-O-β-D-木糖-6-O-α-L-鼠李糖]-β-D-葡萄糖苷、山奈酚 3-O-[2-O-β-D-半乳糖-6-O-α-L-鼠李糖]-β-D-葡萄糖苷的含量进行测定^[6-8], 对油茶皂苷中 camelliasaponin B₁ 成分分离确定等^[9-10], 而未见有关油茶枯饼中皂苷类成分含量测定的报道, 更缺乏油茶枯饼药物质量整体评价的方法。因此, 笔者基于课题组所建立的药物体系的中药质量评价模式^[11-15], 建立了同时测定油茶枯饼皂苷类和黄酮类有效指标性成分含量的方法, 并应用于油茶枯饼及其系列制备物药物质量表征。本文以药物体系为导向, 关注油茶枯饼主要有效物质基础, 建立其药物质量评价方法, 为油茶枯饼作为自然健康产品与药物资源的质量控制及开发应用奠定基础。

1 材料

1.1 药物与试剂

山奈酚 3-O-[2-O-β-D-木糖-6-O-α-L-鼠李糖]-β-D-葡萄糖苷(下文以黄酮 a 代替, 自制, 批号: 20160110)、山奈酚 3-O-[2-O-β-D-半乳糖-6-O-α-L-鼠李糖]-β-D-葡萄糖苷(下文以黄酮 b 代替, 自制, 批号: 20160111)、camelliasaponin B₁(自制, 批号: 20160316), 对照品纯度均≥98%, 色谱级乙腈购自 Fisher Scientific 公司; 分析纯甲醇购自北京化工厂; 分析纯磷酸购自北京化学试剂公司; 娃哈哈纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司; 其余试剂也均为分析纯。

3 批油茶(江西: 20150721、河南: 20150726、湖北: 20150716) 枯饼均由湖南润农生态茶油有限公司提供, 现存放于北京中医药大学中药学院中药化学系。

1.2 仪器

Waters e2695 自动进样高效液相色谱仪, 2996PDA 检测器, Empower 工作站; Sartorius-BT25S 型 1/100000 电子分析天平; Sartorius BT 124S 型 1/10000 电子分析天平; KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 油茶枯饼有效指标性成分含量测定方法的建立

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别取黄酮 a 对照品、黄酮 b 对照品、camelliasaponin B₁ 对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇分别制成每 1 mL 含黄酮 a 87.6 μg、黄酮 b 88.5 μg、camelliasaponin B₁ 87.2 μg 的溶液, 即得混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的配制 取本品粉末(过四号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 125 倍量 50% 甲醇, 加热回流两次, 每次 1 小时, 滤过, 用 50% 甲醇多次洗涤滤纸和残渣, 合并滤液与洗涤液置蒸发皿中蒸干, 残渣加 50% 甲醇溶解并转移至 100 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。

2.1.3 色谱条件与系统适应性 酸性系统; Waters xbridge C₁₈(4.6×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水(B), 洗脱梯度(0~8 分钟, 10%~15.5% A; 8~16 分钟, 15.5% A; 16~35 分钟, 15.5%~37.4% A; 35~61 分钟, 37.4% A, 61~70 分钟, 37.4%~45% A, 70~85 分钟, 45% A, 85~90 分钟, 45%~60% A), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30℃^[16-17], 黄酮类成分检测波长为 265 nm, 皂苷类成分检测波长为 203 nm, 进样 20 μL。在上述酸性系统下, 3 种有效指标性成分在对应检测波长下分离度良好, 样品和对照品有效指标性成分保留时

间一致。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取黄酮 a、黄酮 b、camelliasaponin B₁ 的混合对照品溶液 1、20、40、60、80、100 μL 注入液相色谱仪,测定色谱峰峰面积;以峰面积积分值为纵坐标,对照品进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,并进行线性回归,得到回归方程,黄酮 a: $Y = 1368862.44X - 20520.36$ ($r = 0.9999$, $n = 6$); 黄酮 b: $Y = 1454138.15X - 42323.95$ ($r = 0.9999$, $n = 6$); camelliasaponin B₁: $Y = 412609.80X + 30214.56$, ($r = 0.9999$, $n = 6$)。结果表明黄酮 a、黄酮 b、camelliasaponin B₁ 分别在 0.0876 ~ 8.76 μg、0.0885 ~ 8.85 μg、0.0872 ~ 8.72 μg 范围内与色谱峰面积呈现良好的线性关系。

2.1.5 精密度考察 分别精密吸取同一供试品溶液 20 μL,连续进样 6 次,按“2.1.3 色谱条件与系统适应性”项下方法进行测定,测定黄酮 a、黄酮 b、camelliasaponin B₁ 面积,计算 RSD 值分别为 0.24%、0.29%、1.32%,表明该方法精密度良好。

2.1.6 稳定性考察 分别精密吸取同一供试品溶液 20 μL,分别于制备后 0 小时、2 小时、4 小时、8 小时、12 小时、24 小时,按“2.1.3 色谱条件与系统适应性”项下方法进行测定,测定黄酮 a、黄酮 b、camelliasaponin B₁ 峰面积,计算 RSD 值分别为 0.24%、0.26%、1.15%、0.85%、1.52%,得出供试品溶液在 24 小时内稳定性良好。

2.1.7 重复性考察 取本品粉末(过四号筛)约 0.5 g,6 份,精密称定,按“2.1.2 供试品溶液的配制”项下方法,制备供试品溶液,精密吸取同一供试品溶液 20 μL,按“2.1.3 色谱条件与系统适应性”项下方法进行测定,测定黄酮 a、黄酮 b、camelliasaponin B₁ 面积,计算得到平均含量分别为 1.22%、1.40%、1.17%、0.0016%、0.0019%,RSD 值分别为 2.63%、2.84%、2.24%、1.64%、2.02%,说明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率考察 取本品粉末(过四号筛)约 0.25 g,6 份,精密称定,分别加入对照品,按“2.1.2 供试品溶液的配制”项下方法,制备供试品溶液,精密吸取试品溶液 20 μL,按“2.1.3 色谱条件与系统适应性”项下方法进行测定,测定黄酮 a、黄酮 b、camelliasaponin B₁ 峰面积,计算回收率和 RSD 值,结果见表 1,说明该方法加样回收率合格,符合定量分析要求。

2.2 不同批次油茶枯饼有效指标性成分含量测定结果

取不同产地油茶枯饼粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,按“2.1.2 供试品溶液的配制”项下方法,制备供试品溶液,精密吸取试品溶液 20 μL,按“2.1.3 色谱条件与系统适应性”项下方法进行测定,测定黄酮 a、黄酮 b、camelliasaponin B₁ 峰面积,计算各自含量,结果见表 2。

表 1 3 种成分加样回收率(n=6)

对照品	取样量(g)	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	均值(%)	RSD(%)
黄酮 a	0.2506	3.06	3.00	6.11	101.65	99.22	1.66
	0.2518	3.07	3.00	6.04	99.00		
	0.2521	3.08	3.00	6.10	100.77		
	0.2573	3.14	3.00	6.08	97.87		
	0.2596	3.17	3.00	6.09	97.57		
	0.2505	3.06	3.00	6.01	98.43		
黄酮 b	0.2506	3.48	3.13	6.74	103.89	101.50	1.72
	0.2518	3.50	3.13	6.66	100.80		
	0.2521	3.50	3.13	6.74	103.37		
	0.2573	3.58	3.13	6.71	99.99		
	0.2596	3.61	3.13	6.73	99.70		
	0.2505	3.48	3.13	6.65	101.25		
camelliasaponin B ₁	0.2506	2.91	3.10	6.09	102.84	100.44	1.58
	0.2518	2.92	3.10	6.08	101.78		
	0.2521	2.92	3.10	5.98	98.64		
	0.2573	2.98	3.10	6.06	99.26		
	0.2596	3.01	3.10	6.11	99.82		
	0.2505	2.91	3.10	6.02	100.31		

表 2 3 批油茶枯饼有效指标性成分的平均含量($n=3$, %)

批次	产地	黄酮 a 含量	黄酮 b 含量	camelliasaponin B ₁
S1	江西	1.2569	1.2691	1.0401
S2	河南	1.0651	1.1239	0.9713
S3	湖北	1.1430	1.2021	0.9797

3 讨论

本文基于自然药学观药物体系导向^[18-21],发现油茶枯饼抗血栓、抗心肌缺血和抗痴呆药物体系构架的主要有效物质基础为皂苷类和黄酮类,并首次建立同时测定其有效指标性成分含量的方法。在选择流动相时,考察了乙腈-水、乙腈-甲酸、乙腈-磷酸溶剂系统,结果表明:以乙腈-磷酸(0.05%)为流动相时色谱峰峰形和分离效果较好,分离度大于1.5,因此选用乙腈-磷酸(0.05%)为测定方法的流动相,同时在不同波长下检测黄酮类(265 nm)和皂苷类(203 nm)成分。本文建立了同时测定皂苷和黄酮类成分的方法,缩短了检测时限,有助于油茶枯饼的整体性、系统性研究,能直观地反映油茶枯饼化学成分的特征^[22],且本方法已成功应用于油茶枯饼及其系列制备物的药物质量表征之中,从而为油茶枯饼的质量控制与开发应用奠定了药学质量评价方法学基础。

参 考 文 献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:339-340.
- [2] 干丽,李嘉滢,蔡映艳,等. 茶枯饼主要化学成分的研究及综合利用[J]. 中南药学,2013,(11):823-826.
- [3] 李丽丽,廖金铃,文艳华. 茶枯饼乙醇提取物对爪哇根结线虫的毒杀活性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(1):73-77.
- [4] 肖燕,林海敏,吴秋平,等. 油茶枯饼中黄酮类化合物的提取及抗氧化活性研究[J]. 林业实用技术,2011,(9):52-53.
- [5] 唐祥怡,芦金清. 茶籽饼抗浅部真菌活性成分的研究(一)[J]. 中国医院药学杂志,1986,(9):8-9.
- [6] 俞斌,颜流水,罗旭彪,等. HPLC 法测定油茶枯饼中两种主要黄酮苷[J]. 分析试验室,2008,27(10):52-54.
- [7] 陈虹霞,王成章,叶建中,等. 油茶饼粕中黄酮苷类化合物的分离与结构鉴定[J]. 林产化学与工业,2011,31(1):13-16.
- [8] 陈虹霞,王成章,叶建中,等. 油茶饼粕中黄酮苷类化合物的分离与结构鉴定[C]//中国林学会. 第九届中国林业青年学术年会论文摘要集,2010:1.
- [9] 王睿龙. 油茶籽皂苷的分离纯化及其生物活性研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2013.
- [10] 张新富. 油茶皂苷分离纯化及生物活性研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2013.
- [11] 温静,唐雪阳,李焕娟,等. 基于药物体系质量评价模式的丹参质量表征关联分析研究[J]. 中华中医药学刊,2015,(4):843-846.
- [12] 张璐,李焕娟,朱乃亮,等. 基于药物体系质量评价模式的石菖蒲质量表征关联分析研究[J]. 环球中医药,2015,7(3):274-280.
- [13] 冯朵,谭立,彭平,等. 基于药物体系的金花葵特征图谱质量表征关联分析研究[J]. 北京中医药大学学报,2016,39(4):308-315.
- [14] 杨元,陈唯,张芳,等. 三七酚类成分特征图谱质量表征关联评价研究[J]. 世界中医药,2016,11(5):894-899.
- [15] 陈唯,杨元,张芳,等. 基于酚类特征图谱的人参质量表征关联分析研究[J]. 环球中医药,2016,8(4):419-427.
- [16] 苏晓楠,季德,周亚萍,等. HPLC-DAD-ELSD 同时测定知母中黄酮和皂苷类成分的含量[J]. 中国中药杂志,2015,40(1):108-111.
- [17] 韦英杰,王莱,宁青,等. HPLC 法同时测定柴胡与春柴胡中皂苷类及黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2011,(5):879-883.
- [18] 石任兵,王永炎. 自然药学观的相关性思考[J]. 北京中医药大学学报,2012,35(4):221-225.
- [19] 石任兵,王永炎,吕松涛. 基于自然药学观药物体系的中药药物本质相关性思考[J]. 北京中医药大学学报,2015,38(3):149-152.
- [20] 石任兵,王永炎,吕松涛. 基于自然药学观药物体系的中药药物创新相关性思考[J]. 环球中医药,2015,7(3):257-260.
- [21] 石任兵,王永炎,吕松涛. 中药药物质量精准预期的相关性思考[J]. 中国中药杂志,2015,40(17):3343-3346.
- [22] 刘芳,张浩,青琳森. 黄连 HPLC 数字化指纹图谱研究及 7 种生物碱含量测定[J]. 中国中药杂志,2013,38(21):3713-3719.

(收稿日期:2017-01-06)

(本文编辑:韩虹娟)

本刊声明

近期有代理单位或个人利用虚假网站,或通过电子邮件、QQ、电话、信函,以“环球中医药杂志”的名义,征稿并收取版面费。这些行为,严重侵犯了我社的合法权益。为此,我社郑重声明:我社从未委托他人或组稿代理单位为《环球中医药》杂志征稿,我社将保留依法起诉的权利。

《环球中医药》杂志官方网站 www.hqzyy.com 为本刊唯一投稿方式,不接受邮箱投稿,未开设 QQ 咨询,未开展电话征稿。希望作者投稿时注意甄别,谨防受骗。联系电话:010-65133322 转 5203, 010-65269860。编辑部邮箱:hqzhyy@163.com, hqzyy@126.com。微信公众号:hqzyy2008。

· 启事 ·