doi:10.11751/ISSN.1002 – 1280.2019.08.07

UPLC 法同时测定桃金娘果中 4 种酚类成分

银慧慧,刘 伟,赵 武,孟 菲,姜源明,覃振华,孙建华

(广西壮族自治区兽医研究所,广西兽医生物技术重点实验室,南宁 530001)

[收稿日期] 2019 – 05 – 09　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 – 1280 (2019) 08 – 0044 – 07　[中图分类号] S853.7

[摘　要]　建立了 UPLC 同时测定桃金娘果中没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇和白藜芦醇 4 种酚类物质的方法。桃金娘果样品经甲醇超声提取后采用 Waters CORTECS Ⓡ UPLC Ⓡ T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.6 μm);流动相为乙腈 – 0.2% 磷酸溶液进行梯度洗脱程序;流速 0.2 mL/min;柱温 35℃;检测波长为 280 nm。结果显示桃金娘果中的 4 种成分 10 min 内能够完全分离,在测定的质量浓度范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.9990;平均加样回收率在 95.1% ~ 102% 之间,*RSD* 1.5% ~ 2.8%;检出限分别为 7.55、2.32、63.7、4.59 ng/mL。该法简便快速,具有较高准确性和重复性,可用于桃金娘果药材的质量控制。

[关键词]　超高效液相色谱;桃金娘果;没食子酸;鞣花酸;白皮杉醇;白藜芦醇

Simultaneous Determination of Four Main Phenolics in *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. Fruit by UPLC

YIN Hui – hui, LIU Wei, ZHAO Wu, MENG Fei, JIANG Yuan – ming, Qin Zhen – hua, SUN Jian – hua

(*Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology*, *Guangxi Veterinary Research Institute*, *Nanning* 530001, *China*)

Abstract: An ultra performance liquid chromatography method for the determination of four phenolics in *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. Fruits imultaneously (gallic acid, ellagic acid, piceatannol and resveratrol) was obtained. The samples were extracted by methanol and detected through a Waters CORTECS Ⓡ UPLC Ⓡ T3 column (2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm) with the mobile phase of acetonitrile – 0.2% phosphoric acid, following a flow rate of 0.20 mL/min. The detection wave – length was set at 280 nm and the column temperature was 30 ℃. The results showed that four compounds can be completely separated within 10 min. The calibration curves for the four compounds were linear within a specific range respectively with a related coefficient more than 0.9990. Their respective average recovery were in the range of 95.1% ~ 101.9% and the *RSD* in the range of 1.5% ~ 2.8%. The limit detection of gallic acid, ellagic acid, piceatannol and resveratrol were 7.55, 2.32,

---

基金项目:广西创新驱动发展专项 – 畜禽重大病害生态综合防控技术创新示范(桂科 AA17204057);广西基本科研业务费专项(桂科专项 18 – 5)

作者简介:银慧慧,硕士,从事兽药及天然药物研究。E – mail: huihui981@foxmail.com

63.7, 4.59 ng/mL, respectively. This simple and rapid method can be used for the quality control of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. fruitwith high accuracy and repeatability.

Key words: ultra performance liquid chromatography; *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. fruit; gallic acid; ellagic acid; piceatannol; resveratrol

桃金娘[*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk.],又名稔子树、豆稔等,是一种优良的野生药用植物资源[1-3],我国台湾、福建、广西、广东以及云南等南方地区较为常见,在日本、菲律宾、印度以及马来西亚等国家也有分布。桃金娘全株可入药,具有除湿祛风、去瘀止血、止痛等功效,在《兽药国家标准(化学药品、中药卷)第一册》(中国兽药委员会,2013)中已收录了桃金娘根,而其他部位尚未有统一标准。桃金娘果实中富含黄酮、多酚以及多糖等多种活性成分,在饮料、酿酒以及保健品等方面都逐渐得到了开发应用[4-6]。桃金娘果中已知的酚类物质有没食子酸(Gallic acid, GA)、鞣花酸(Ellagic acid, EA)、白皮杉醇(Piceatannol, PICE)和白藜芦醇(Resveratrol, RES)等[7-8]。目前,对于这 4 种酚类物质的检测方法主要有紫外分光光度法(UV)[9]、高效液相色谱法(HPLC)[10]和高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS)[11-12]等。UV 法较为繁琐,灵敏度低,重现性差;而 HPLC 法同时测定多种酚类物质耗时较长,试剂消耗大;HPLC-MS 法虽然灵敏度和准确度高,但检测费用较高、普及率低。基于前期基础,研究建立了一种快速、简便分离测定桃金娘果中没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇的超高效液相色谱法(UPLC),为桃金娘果药材质量标准的制定提供科学依据,促进野生桃金娘资源得到更有效的开发和利用。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　Waters Acquity UPLC 带二级管阵列检测器(PDA),Empower™3 色谱工作站,配 Waters CORTECS ® UPLC ® T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.6 μm)(美国 waters 公司);SK7200HP 型超声波清洗器(上海科导);Milli-Q 超纯水仪(Millipore 公司)。

没食子酸对照品(中国食品药品检定研究所,110831-201204,含量 89.9%);鞣花酸对照品(中国食品药品检定研究所,111959-201602,含量 89.3%);白皮杉醇对照品(北京索莱宝科技有限公司,10083-24-6,HPLC≥98%);白藜芦醇对照品(中国食品药品检定研究所,110877-201703,含量 99.4%);0.2 μm 混合滤膜(美国 waters 公司);桃金娘干果(产地广东梅州、广西桂林和广西柳州,经广西植物研究所温放副研究员鉴定为桃金娘的干燥果实);实验用试剂均为色谱纯,实验用水均为超纯水。

1.2　方法

1.2.1　UPLC 检测条件　色谱柱:Waters CORTECS ® UPLC ® T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.6 μm);流动相:乙腈-0.2% 磷酸;梯度洗脱条件:0~2 min, 6% 乙腈;2~4 min,6%~20% 乙腈;4~10 min,20%~60% 乙腈;10~12 min,6% 乙腈;检测波长:280 nm;流速:0.2 mL/min;柱温:35 ℃;进样体积 5 μL。

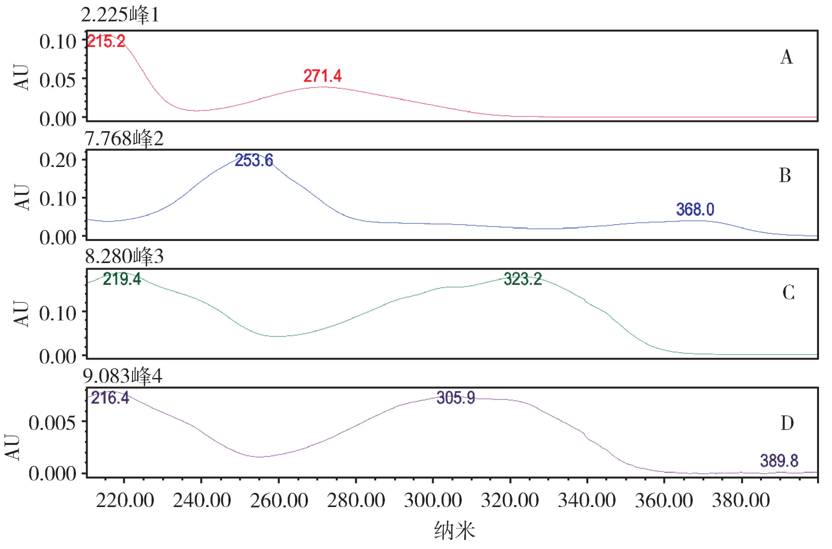
1.2.2　标准溶液的配置　准确称取没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇对照品置于不同棕色容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别制成没食子酸浓度为 98.7 μg/mL、鞣花酸浓度 148 μg/mL、白皮杉醇浓度 121 μg/mL、白藜芦醇浓度 90.2 μg/mL 的对照品溶液;实验时,分别用甲醇依次稀释配制成不同浓度的标准工作液,过 0.2 μm 滤膜后使用。

1.2.3　供试品溶液配置　将桃金娘干果打粉,过筛,得到的样品粉末置烘箱中烘干至恒重,置干燥器中储存;准确称取 1.0 g 桃金娘果粉末置于具塞锥形瓶中,准确加入 30 mL 甲醇,称定重量,超声(350 W,53 kHz,40 ℃)提取 40 min,放冷,补重,过滤,置于棕色容量瓶中保存,过滤膜。

2　结果与分析

2.1　色谱行为　吸取一定量含没食子酸浓度为 49.4 μg/mL、鞣花酸浓度 74.0 μg/mL、白皮杉醇浓

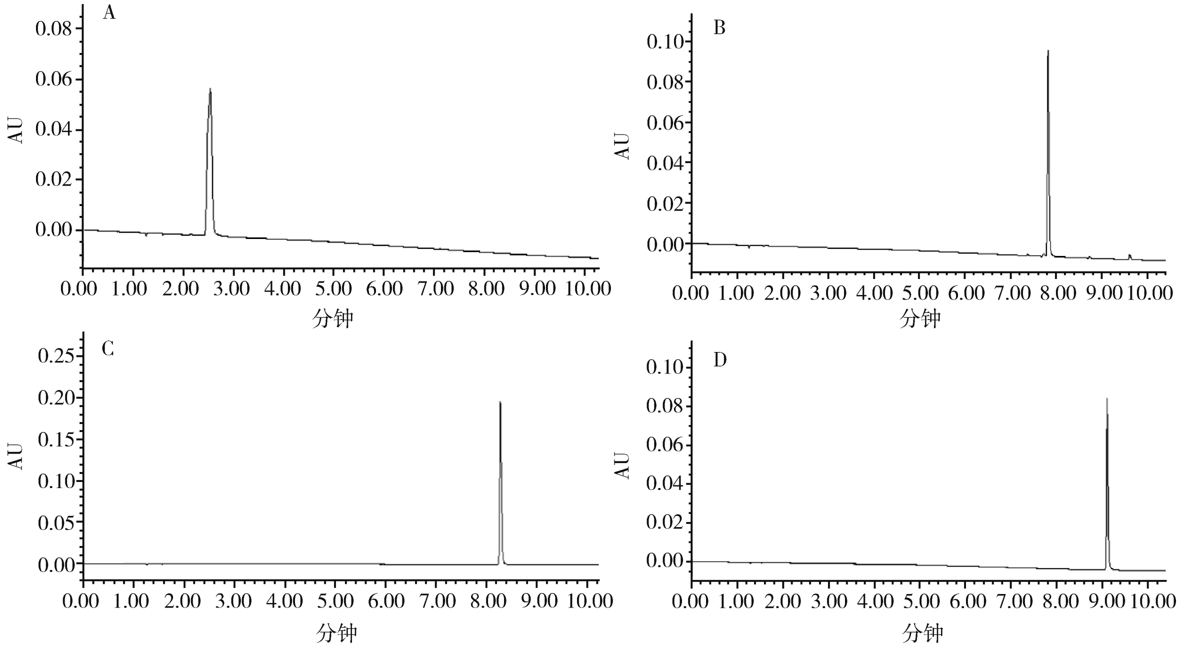
度 60.6 μg/mL、白藜芦醇浓度 45.1 μg/mL 的混合对照品溶液，按 1.2.1 节色谱条件，在 190 ~ 400 nm 进行紫外波长扫描，得到的紫外光谱图如图 1 所示。没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇对照品溶液和桃金娘干果（广西桂林）供试品溶液的色谱图分别见图 2、图 3，在 1.2.1 节的梯度洗脱条件下，没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇能够与样品基质较好分离。



A. 没食子酸；B. 鞣花酸；C. 白皮杉醇；D. 白藜芦醇

图 1　对照品紫外光谱图

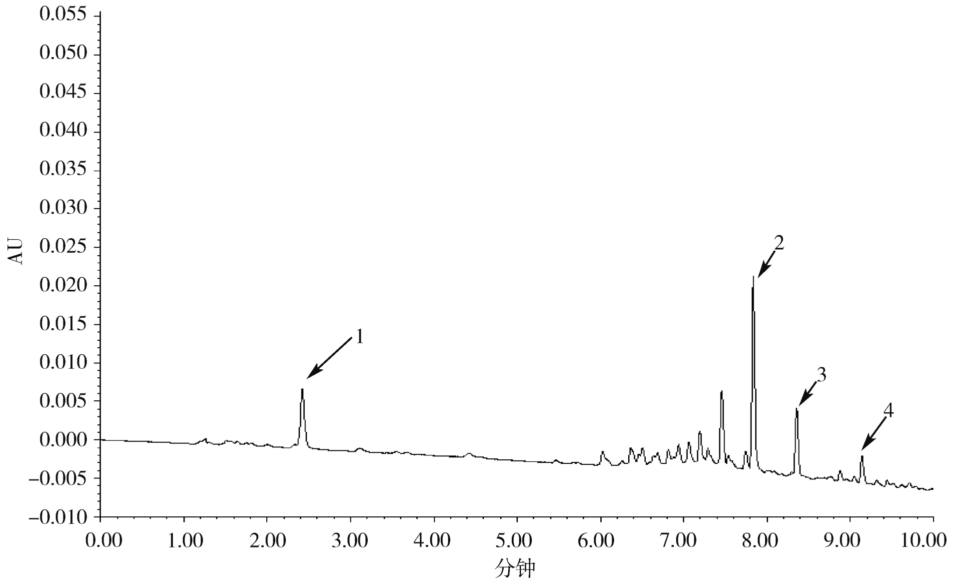
Fig 1　The ultraviolet spectrogram of reference substance



A. 没食子酸；B. 鞣花酸；C. 白皮杉醇；D. 白藜芦醇

图 2　对照品色谱图

Fig 2　Chromatograms of reference substance



1. 没食子酸; 2. 鞣花酸; 3. 白皮杉醇; 4. 白藜芦醇

图 3　桃金娘果样品色谱图

Fig 3　Chromatogram of *Rhodomyrtus tomentosa*(Ait.) Hassk. fruit sample

2.2　方法学考察

2.2.1　方法线性范围　分别精密吸取不同浓度的没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇对照品溶液进行 UPLC 测定,以得到的色谱峰峰面积(y)为纵坐标,相应的浓度(x)为横坐标,绘制 4 种酚类物质的标准曲线。当没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇浓度在一定范围时,具有良好的线性关系($r > 0.9996$,如表 1 所示)。

表 1　线性方程、相关系数和线性范围

Tab 1　Linear range, related coefficient and calibration curves

名称	线性方程	相关系数 r	线性范围 /($\mu g \cdot mL^{-1}$)
没食子酸	$y = 3577.9x + 1605.1$	0.9996	0.624 ~ 49.4
鞣花酸	$y = 3873.1x + 1267.5$	0.9997	4.63 ~ 74.0
白皮杉醇	$y = 4568.9x + 1730.9$	0.9997	5.05 ~ 121
白藜芦醇	$y = 9797x + 117.11$	0.9996	0.224 ~ 45.1

2.2.2　精密度试验　分别对没食子酸浓度为 49.4 μg/mL、鞣花酸浓度 74.0 μg/mL、白皮杉醇浓度 60.6 μg/mL、白藜芦醇浓度 45.1 μg/mL 的对照品溶液进行 11 次平行测定,没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇峰面积的 RSD 分别为 1.6%、2.7%、3.0%、2.5%,迁移时间 RSD 分别为 0.8%、0.2%、0.1%、0.5%。

2.2.3　稳定性试验　精密称取产地为广西桂林的桃金娘干果样品粉末 1.0 g,按 1.2.3 节方法制备供试品溶液,在室温下保存,分别在制备后的 0、4、8、12、24、48 h 注入 UPLC 中进行测定,记录各个时间样品的峰面积。计算没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇峰面积的相对标准偏差,分别为1.8%、1.6%、2.3%、2.7%,说明样品在 48 h 内稳定。

2.2.4　重复性试验　准确称取产地为广西桂林的桃金娘干果样品粉末 5 份,按 1.2.3 节方法制备样品溶液,在 1.2.1 节色谱条件下对样品进行测定,根据 UPLC 测定得到的各个物质的峰面积,计算 *RSD*,得到样品中没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇峰面积的 *RSD* 分别为 2.0%、2.3%、2.7%,3.0%,结果显示该方法具有良好的重现性。

2.2.5　检出限　根据 IUPAC 规定,得到本法测定没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇的检出限(3σ, $n = 11$)分别为 7.55、2.32、63.7、4.59 ng/mL。

2.3.6　回收率试验　精密称取广西桂林的桃金娘

果粉末样品,按 1.2.3 节处理方法制备供试品,将一定浓度的没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇标准溶液分别添加至样品中,混匀后过滤进行 UPLC 分析,每个浓度的样品制备 3 份溶液,根据 UPLC 分析得到的结果计算回收率和 RSD 值,结果见表2。4 种酚类物质的加标回收率在 95.1% ~102%之间,*RSD* 为 1.5% ~2.8%,该法具有较好的回收率和重现性。

表 2　没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇测定的回收率(n = 3)

Tab 2　Detection recoveries of GA、EA、PICE and RES (n = 3)

化合物	加入量/(μg·mL^{-1})	平均加入量/(μg·mL^{-1})	平均回收率/%	*RSD*/%
没食子酸	12.16	12.24	100.7	1.5
	24.32	23.16	95.2	1.8
	36.48	36.17	99.2	1.8
鞣花酸	5.94	5.65	95.1	2.4
	11.88	11.38	95.8	2.3
	17.82	17.19	96.5	2.4
白皮杉醇	10.27	10.02	97.6	2.2
	20.54	20.93	101.9	2.1
	30.81	30.10	97.7	2.8
白藜芦醇	2.01	1.95	97.0	2.8
	4.02	4.06	101.0	2.7
	6.03	6.07	100.7	2.7

2.4　样品分析　对不同地区的桃金娘干果样品进行分析,考察各地 4 种酚类物质的含量差异。精密称取桃金娘干果粉末 1.0 g,每个各称取 3 份平行样,按 1.2.3 节制备供试品溶液,各进样 5 μL,对样品中的没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇、白藜芦醇的含量进行分析测定,结果如表 3 所示,不同地区的桃金娘果 4 种酚类物质的含量存在一定的差异。

表 3　桃金娘果中没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇和白藜芦醇的含量测定(n = 3)

Tab 3　Detection results of GA, EA, PICE and RES in *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. fruit (n = 3)

化合物	广东梅州		广西桂林		广西柳州	
	含量/(μg·g^{-1})	*RSD*/%	含量/(μg·g^{-1})	*RSD*/%	含量/(μg·g^{-1})	*RSD*/%
没食子酸	820.6	2.6	711.2	2.3	862.3	2.1
鞣花酸	662.7	2.0	1026	1.7	781.6	2.3
白皮杉醇	861.3	1.9	1092	2.4	956.0	2.3
白藜芦醇	16.31	2.7	44.02	2.1	15.82	2.9

3　讨论与结论

3.1　UPLC 检测条件的优化　同一物质在不同检测波长下具有不同的吸收值。利用 PDA 检测器对混合对照品溶液进行全波长(190 ~400 nm)扫描,结果显示没食子酸、白皮杉醇和白藜芦醇在 220 nm 附近具有较强的紫外吸收,而在该波长下溶剂峰对目标检测物没食子酸的影响较大;此外,鞣花酸在 271 nm、白皮杉醇和白藜芦醇在 300 nm 波长附近也

有较强吸收峰,而采用多波长同时检测多种物质时会降低灵敏度低,因此综合考虑,选取中间值 280 nm 为检测波长。不同色谱柱由于其构型及填充材料的不同对物质的分离效果也不同。分别采用 Waters BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm)、Waters BEH C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm)、Waters CORTECS Ⓡ UPLC Ⓡ T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.6 μm)对对照品以及样品溶液进行分离测定,发现样品经 Waters CORTECS Ⓡ UPLC Ⓡ T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.6 μm)分离得到的色谱图峰形更好,基线更平稳,分析时间更短。此外,流动相也是色谱分析的一个重要影响因素,不同浓度比例的溶剂以及流动相的酸碱度对待测物质的分离程度和色谱峰的峰形有着一定影响。分别比较了乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.2%磷酸、乙腈-0.1%甲酸和乙腈-0.2%甲酸等流动相体系进行梯度洗脱的分离检测效果。结果显示,流动相为乙腈-0.2%磷酸时,4 种酚类物质在色谱柱上的保留效果最佳、灵敏度更高和分离度更好。这是由于没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇以及白藜芦醇均为弱酸性物质,磷酸能更好地增加保留利于分离,因此,本研究选择的流动相体系为乙腈-0.2%磷酸,整个分析时间不超过 10 min,显著优于现有检测技术方法[13-14]。

3.2　样品预处理的优化　由于酚类物质的结构带有-OH,根据相似相溶原理酚类物质在醇类溶剂中的溶解度较纯水好,因此选择不同浓度的甲醇和乙醇溶剂(甲醇、80%甲醇、60%甲醇、95%乙醇、80%乙醇、60%乙醇)进行提取实验,结果显示,4 种酚类物质在甲醇中都具有较好的溶解效果,而且提取液中的杂质对目标成分的干扰较小,因此综合考虑选择甲醇作为提取溶剂。此外,还考察了料液比对提取量的影响,研究结果表明,当料液比大于 1∶30时,酚类物质的提取率呈现下降趋势,这可能是由于随着提取溶剂甲醇量的增加稀释了提取样品,或是高浓度甲醇易挥发间接降低了料液比,因此综合考虑,选择1∶30料液比适宜。提取时间对提取率也存在着重要影响,提取时间太短则提取不充分,而提取时间过长又容易产生热效应降低提取率。考察不同超声提取时间对 4 种酚类物质的提取量的影响,当提取时间超过 40 min 时,提取量增加缓慢并有缓慢下降的趋势,可能是由于提取时间过长温度过高,降低了酚类物质的溶解度,故选择超声提取时间为 40 min。

相较于现有的没食子酸、鞣花酸、白皮杉醇以及白藜芦醇检测方法 UV、HPLC 和 HPLC-MS 法,本文建立的同时测定桃金娘果中 4 种酚类物质含量的 UPLC 法更为简便、快速、重现性好,检出限达到了 ng 级,可用于桃金娘果中药材的质量控制及含量测定,为制定桃金娘果药材标准提供参考依据。

参考文献:

[1] Tayeh M, Nilwarangoon S, Mahabusarakum W, *et al*. Anti-metastatic effect of rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* on human skin cancer cells [J]. International Journal of Oncology, 2017, 50(3):1035.

[2] 刘 伟, 赵 武, 孟 菲,等. 桃金娘化学成分及生物活性的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3):241-244.
Liu W, Zhao W, Meng F, *et al*. Research progress on chemical components and biological activity of *Rhodomyrtus tomentosa*. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine [J]. 2014, 41(3):241-244.

[3] Cui C, Zhang S, You L, *et al*. Antioxidant capacity of anthocyanins from *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) and identification of the major anthocyanins [J]. Food Chemistry, 2013, 139(1-4):1-8.

[4] Lai T N, André C, Rogez H, *et al*. Nutritional composition and antioxidant properties of the sim fruit (*Rhodomyrtus tomentosa*) [J]. Food Chemistry, 2015, 168:410-416.

[5] 薛娟萍, 熊 婷. 浸泡型桃金娘果酒的工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37(7):89-92.
Xue J P, Xiong T. Study on Process of Soaking Type of the Myrtle Wine [J]. Food Research And Development, 2016, 37(7):89-92.

[6] Liu G L, Guo H H, Sun Y M. Optimization of the Extraction of Anthocyanins from the Fruit Skin of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk and Identification of Anthocyanins in the Extract Using High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray

ionization – mass spectrometry (HPLC – ESI – MS) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13 (5): 6292 – 6302.

[7] 谷荣辉, 黎 平, 王艺舟, 等. HPLC – TOF – MS 分析桃金娘不同部位的化学成分 [J]. 中草药, 2018, 49 (3): 554 – 560.
Gu R H, Li P, Wang Y Z, *et al*. Analysis of constituents from different parts of *Rhodomyrtus tomentosa* by HPLC – TOF – MS [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(3): 554 – 560.

[8] 银慧慧, 刘 伟, 赵 武, 等. 双波长 UPLC 同时测定桃金娘根中没食子酸和鞣花酸 [J]. 分析试验室, 2015, 34(10): 1183 – 1186.
Yin H H, Liu W, Zhao W, *et al*. Simultaneous determination of gallic acid and ellagic acid in radix rhodomyrti by dual – wavelength UPLC [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2015, 34(10): 1183 – 1186.

[9] Leontowicz M. Fluorescence and ultraviolet spectroscopic evaluation of phenolic compounds, antioxidant and binding activities in some kiwi fruit cultivars [J]. Spectroscopy Letters, 2015, 48 (8): 586 – 592.

[10] Aramendía M A, Boráu V, García I, *et al*. Qualitative and quantitative analyses of phenolic compounds by high – performance liquid chromatography and detection with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2015, 10(13): 1585 – 1590.

[11] 石 芳, 廖 霞, 卢可可, 等. UPLC – DAD/ESI – TOF – MS 鉴定黑脉羊肚菌多酚化合物 [J]. 食品科学, 2017, 38(16): 121 – 127.
Shi F, Liao X, Lu K K, *et al*. Analysis of phenolic compounds in morchella angusticeps peck by ultra performance liquid chromatography – diode array detector/electrospray ionization – time of fight – mass spectrometry [J]. Food Science, 2017, 38(16): 121 – 127.

[12] Ferreres F, Magalhães S C, Gilizquierdo A, *et al*. HPLC – DAD – ESI/MS(n) profiling of phenolic compounds from *Lathyrus cicera* L. seeds [J]. Food Chemistry, 2017, 214: 678 – 685.

[13] 肖 婷, 崔炯谟, 郭正红, 等. 不同产地桃金娘果中 5 种酚类成分的测定及其抗氧化作用研究 [J]. 中草药, 2014, 45 (18): 2703 – 2706.
Xiao T, Cui J M, Guo Z H, *et al*. Determination of five phenolic compounds from fruits of *Rhodomyrtus tomentosa* in different regions and its antioxidant effect [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 45(18): 2703 – 2706.

[14] 徐维盛, 李 东, 刘 静, 等. 果酒中 11 种酚类化合物反相高效液相色谱检测方法的建立 [J]. 卫生研究, 2013, 42(3): 497 – 503.
Xu W S, Li D, Liu J, *et al*. Simultaneous determination of 11 polyphenols in ratafee by reversed – phase high performance liquid chromatography [J]. Journal of Hygiene Research, 2013, 42 (3): 497 – 503.

(编 辑:陈 希)