

HPLC-荧光法测定酒女贞子中羟基酪醇、红景天苷和酪醇

廖晓燕, 洪圆, 姜雯文, 梁淑彩* (武汉大学药学院, 武汉 430071)

摘要:目的 建立一种简单、高灵敏度,可同时测定酒女贞子中羟基酪醇、红景天苷和酪醇含量的 HPLC-荧光法。方法 采用 Amethyst C₁₈-P 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以水-乙腈(92:8)为流动相等度洗脱, 激发波长为 280 nm, 发射波长为 310 nm, 柱温 35 °C。结果 羟基酪醇、红景天苷和酪醇在一定浓度范围内线性关系良好, 检测限分别可达 23.0, 10.5, 9.82 ng·mL⁻¹。酒女贞子中羟基酪醇、红景天苷和酪醇的含量范围分别为 642.9~867.2 μg·g⁻¹, 1 932.3~15 357.5 μg·g⁻¹, 239.1~638.1 μg·g⁻¹。结论 所建立的 HPLC-荧光法灵敏度高, 选择性好、准确度高, 可用于酒女贞子中羟基酪醇、红景天苷和酪醇的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 荧光; 羟基酪醇; 红景天苷; 酪醇; 酒女贞子

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)24-3064-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.24.012

引用本文: 廖晓燕, 洪圆, 姜雯文, 等. HPLC-荧光法测定酒女贞子中羟基酪醇、红景天苷和酪醇[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(24): 3064-3067.

Determination of Hydroxytyrosol, Salidroside and Tyrosol in Wine-fried Ligustri Lucidi Fructus by HPLC with Fluorescence Detection

LIAO Xiaoyan, HONG Yuan, JIANG Wenwen, LIANG Shucui* (Wuhan University School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan 430071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a simple and sensitive HPLC with fluorescence detection method for simultaneous determination of hydroxytyrosol, salidroside and tyrosol in wine-fried Ligustri Lucidi Fructus. **METHODS** The analysis was performed on a Amethyst C₁₈-P column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with isometric elution using water and acetonitrile(92:8). The detection wavelengths were at 280 nm and 310 nm for excitation and emission. The column temperature was 35 °C. **RESULTS** The good linearity was in the certain concentration range, and the limit of quantitation of hydroxytyrosol, salidroside and tyrosol were 23.0, 10.5, 9.82 ng·mL⁻¹, respectively. The range of content of hydroxytyrosol, salidroside and tyrosol in wine-fried Ligustri Lucidi Fructus were 642.9~867.2 μg·g⁻¹, 1 932.3~15 357.5 μg·g⁻¹, 239.1~638.1 μg·g⁻¹, respectively. **CONCLUSION** The developed HPLC-Fluorescence detection method is sensitive, selective and accurate for simultaneous determination of hydroxytyrosol, salidroside and tyrosol in wine-fried Ligustri Lucidi Fructus.

KEYWORDS: HPLC; Fluorescence detection; hydroxytyrosol; salidroside; tyrosol; wine-fried Ligustri Lucidi Fructus

女贞子系木犀科植物女贞(*Ligustrum lucidum* Ait.)的干燥成熟果实, 酒制后可缓和其凉滑之性, 补肝肾作用更强^[1], 临床上多用于肝肾阴虚、眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明等症^[2]。酒女贞子中的苯乙醇类成分(如羟基酪醇、红景天苷和酪醇)均具有较强的生理活性。研究表明红景天苷可保护心脑血管系统、调节免疫系统、防辐射、抗疲劳、抗肿瘤等^[3]; 羟基酪醇在糖脂代谢调节、防治肿瘤、抗血栓、缓解动脉硬化、抑制病原微生物、防治视网膜黄斑变性、保护软骨和防治骨质疏松等方面都具有良好的生物活性^[4-5]。酪醇作为红景天苷代谢产物之一^[6], 在延长寿命, 治疗和

预防氧化应激、神经系统疾病、炎症和糖尿病, 抑制耐药金黄色葡萄球菌和真菌等方面显示出良好的药理作用^[7-8]。因此羟基酪醇、红景天苷和酪醇均是酒女贞子的重要活性成分。研究发现女贞子酒蒸后红景天苷、酪醇、羟基酪醇等苯乙醇类化合物含量均有不同程度的增加^[9]。而中国药典 2015 年版中酒女贞子的质量控制仅为采用 HPLC 进行特女贞苷的检测, 难以全面反映酒女贞子的炮制工艺与质量的差异, 因此有必要建立一种同时检测这 3 种苯乙醇类活性成分的 HPLC 检测方法。现有研究多采用 HPLC-UV 进行检测^[9-10], 而荧光检测器具有灵敏度高、选择性好等特点。该 3 种活性

基金项目: 武汉大学教学改革研究项目(JG201670, 2018JG031)

作者简介: 廖晓燕, 女, 博士, 高级实验师 Tel: (027)68759253
Tel: (027)68759139 E-mail: chirolab@whu.edu.cn

E-mail:liao.xy@whu.edu.cn *通信作者: 梁淑彩, 女, 博士, 副教授

成分均可不需要衍生化而产生荧光,具有一定的特异性,因此本研究拟建立选择性好、灵敏度高、准确度高的HPLC-荧光法(HPLC-FC)同时检测酒女贞子中羟基酪醇、红景天苷和酪醇的含量,为酒女贞子质量控制提供一种更加灵敏的检测手段。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪(配 RF-20A 检测器、LC solution 工作站); F-4600 荧光分光光度计(日立); ME55 电子天平(梅特勒); SB-3200DTN 超声波清洗器(宁波新芝)。

甲醇、乙腈(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水; 羟基酪醇(批号: H1629156; 纯度 $\geq 98\%$)、红景天苷(批号: B1619137; 纯度 $\geq 97.5\%$)和酪醇(批号: H1208031; 纯度 $\geq 99.5\%$)对照品均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 酒女贞子(四川御鼎堂中药饮片有限公司, 批号: 160401; 四川利民中药饮片有限公司, 批号: 161001; 河北安国振宇药业有限公司, 批号: 160609)均为市售品, 经武汉大学药学院汤俊副教授鉴定 3 个批号均为酒女贞子。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Amethyst C₁₈-P 色谱柱(Sepax Technologies, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 以乙腈-水(8:92)为流动相进行等度洗脱; 激发波长: 280 nm; 发射波长: 310 nm; 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 柱温为 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定适量羟基酪醇、红景天苷和酪醇对照品, 分别用甲醇溶解配制成羟基酪醇贮备液 575 μ g \cdot mL⁻¹, 红景天苷贮备液 525 μ g \cdot mL⁻¹和酪醇贮备液 491 μ g \cdot mL⁻¹, 低温避光贮藏备用。使用前用流动相稀释成适宜浓度。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取酒女贞子粉末(过四号筛)0.1 g, 加入 80%的甲醇 10 mL, 超声(250 W、40 kHz)处理 30 min, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 取 100 μ L, 用流动相稀释至 1 mL, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.4 专属性试验

分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 结果样品中羟基酪醇、红景天苷和酪醇色谱峰的保留时间分别为 9.16, 11.87, 15.86 min。目标峰与其相邻色谱峰的分离度 >1.5 , 色谱图见图 1。

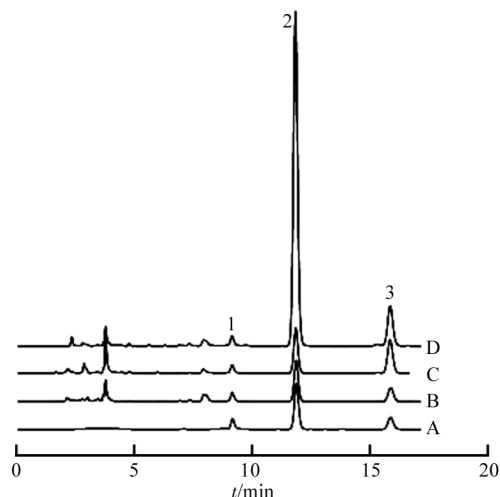


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-利民样品; C-御鼎堂样品; D-安国振宇样品; 1-羟基酪醇; 2-红景天苷; 3-酪醇。

Fig. 1 HPLC chromatogram

A-standard solution; B-sample solution of Limin; C-sample solution of Yudingtang; D-sample solution of Anguozenyu; 1-hydroxytyrosol; 2-salidroside; 3-tyrosol.

2.5 线性关系及定量限考察

精密量取各对照品贮备液适量, 用流动相稀释配制不同浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别取 10 μ L 进样分析。以峰面积为纵坐标、浓度为横坐标作图, 进行线性回归分析, 结果见表 1, 表明羟基酪醇在 23.0~11 500 ng \cdot mL⁻¹, 红景天苷在 10.5~10 500 ng \cdot mL⁻¹, 酪醇在 9.82~9 820 ng \cdot mL⁻¹的线性关系良好, 定量限(S/N=10)可以分别达到 23.0, 10.5, 9.82 ng \cdot mL⁻¹, 与现有的其他检测方法相比^[9-15], 灵敏度远远高于紫外法, 并且与质谱检测法相当。

表 1 方法的线性和定量限

Tab. 1 Linear range and LOQ of the method

待测物	线性范围/ ng \cdot mL ⁻¹	标准曲线	R	LOQ/ ng \cdot mL ⁻¹
羟基酪醇	23.0~11 500	y=1 146 453x-85 096	0.999 6	23.0
红景天苷	10.5~10 500	y=2 206 913x+3 842	0.999 9	10.5
酪醇	9.82~9 820	y=6 555 875x+229 368	0.999 7	9.82

2.6 仪器精密度试验

取高、中、低浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别连续手动进样 3 次, 记录色谱图, 羟基酪醇、红景天苷和酪醇的峰面积 RSD 在 1.0%~2.6%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

精密称取四川利民中药饮片有限公司(批号:

161001)的6份酒女贞子粉末0.1 g,按“2.3”项下供试品溶液制备方法配制。上述各待测物含量的RSD值分别为1.7%,2.4%,3.5%,表明方法重复性好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:161001)于常温下放置,分别于0,2,4,8,10 h进样分析,羟基酪醇、红景天苷和酪醇的色谱峰面积RSD分别为4.2%,2.3%和4.7%,表明样品在10 h内稳定。

2.9 回收率试验

精密称取5份利民中药饮片有限公司(批号:161001)的酒女贞子粉末0.05 g,置于10 mL量瓶中,分别精密加入含混合对照品的80%甲醇溶液(含羟基酪醇 $4.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,红景天苷 $10.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和酪醇 $0.982 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)10 mL,按“2.3”项下供试品溶液制备方法配制,按“2.1”项下色谱条件测定其含量,分别计算加样回收率。羟基酪醇、红景天苷和酪醇的加样回收率分别为100.87%,98.15%,99.25%,RSD分别为4.0%,2.9%,4.0%。结果表明该方法准确度良好。结果见表2。

表2 加样回收率试验

Tab. 2 Recovery experiment

待测物	称样量/ mg	原有量/ μg	加入量/ μg	测定量/ μg	回收率/ %	平均回收 率/%
羟基酪醇	49.38	40.00	46	87.33	102.88	100.87
	49.40	40.02	46	83.78	95.15	
	49.32	39.95	46	87.39	103.12	
	52.68	42.67	46	87.89	98.29	
	49.60	40.18	46	88.44	104.91	
红景天苷	49.38	95.42	105	197.18	96.91	98.15
	49.40	95.46	105	198.74	98.36	
	49.32	95.31	105	195.60	95.51	
	52.68	101.80	105	203.71	97.06	
	49.60	95.85	105	203.90	102.90	
酪醇	49.38	11.81	9.82	21.57	99.43	99.25
	49.40	11.81	9.82	21.59	99.64	
	49.32	11.79	9.82	21.18	95.63	
	52.68	12.60	9.82	22.04	96.11	
	49.60	11.86	9.82	22.22	105.45	

2.10 样品测定

取3个厂家的酒女贞子,每个厂家2份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析。分别计算供试品中羟基酪醇、红景天苷和酪醇的含量,结果见表3。

表3 酒女贞子中羟基酪醇、红景天苷和酪醇含量测定结果($n=3$)

Tab. 3 Determination result of salidroside, tyrosol and hydroxytyrosol in wine-fried Ligustri Lucidi Fructus($n=3$)

生产厂家	检测方法	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		
		羟基酪醇	红景天苷	酪醇
利民(161001)	LC-FL	810.1	1 932.4	239.1
	LC-UV	789.8	1 944.7	246.1
安国振宇(160609)	LC-FL	867.2	15 357.5	638.1
	LC-UV	833.7	15 431.1	631.6
御鼎堂(160401)	LC-FL	642.9	2 015.6	518.8
	LC-UV	612.2	1 944.7	516.3

3 讨论

3.1 检测波长的选择

3个化合物的激发光谱和发射光谱见图2,结果表明当激发波长为280 nm,发射波长为310 nm时,3种物质均有较高的荧光强度,因此选择280 nm为激发波长,310 nm为发射波长进行检测。

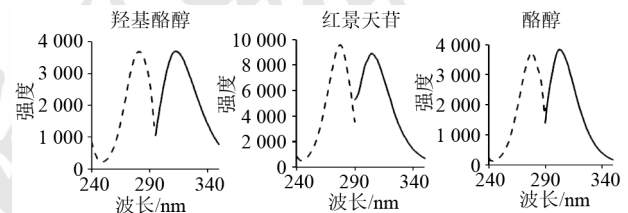


图2 羟基酪醇、红景天苷和酪醇的荧光光谱
虚线-激发光谱;实线-发射光谱。

Fig. 2 Fluorescence spectra of hydroxytyrosol, salidroside and tyrosol

Dashed line—excitation spectra; solid line—emission spectra.

3.2 流动相的选择

分别比较了以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸等不同体系的流动相及其比例,结果表明乙腈-水体系比甲醇-水体系能更好地改善其他成分与待测峰的分离。流动相体系中加入甲酸后保留增强,但使检测灵敏度降低^[11],故采用乙腈-水体系,各成分峰形较好,分离度高。

3.3 样品提取条件的选择

分别进行提取溶剂-甲醇水溶液的浓度(70%,80%,90%和100%)、提取溶剂体积(6,8,10,12 mL)和提取时间(15,30,45,60 min)的优化,当提取溶剂为80%的甲醇,提取溶剂体积为10 mL,提取时间为30 min时,3种苯乙醇类化合物含量较高。

3.4 样品含量

HPLC-FL测定不同厂家的酒女贞子中羟基酪醇、红景天苷和酪醇的含量范围分别为642.9~

867.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 1 932.3~15 357.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 239.1~638.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。3 个厂家批次间红景天苷含量的差异最大, 可达到近 8 倍, 这可能与酒制前女贞子中红景天苷的固有含量有关, 也可能与酒女贞子的酒制工艺直接相关。因此, 同时测定酒女贞子羟基酪醇、红景天苷和酪醇的含量可以进一步体现酒女贞子的质量差异。对文献报道的 HPLC-UV^[9]进行适当调整, 测定的含量结果基本与 HPLC-FL 的结果相当。但在紫外检测波长下, 待测物附近的干扰峰也有较高响应, 更容易影响其专属性。因此, 本实验建立的 HPLC-FL 可以同时检测羟基酪醇、红景天苷和酪醇的含量, 该方法选择性好、灵敏度高、简便、准确, 可为酒女贞子的质量控制提供实验依据和参考。同时该方法可进一步应用于生物样品中羟基酪醇、红景天苷和酪醇的高灵敏度检测。

REFERENCES

- [1] WANG J M, YAO C, LU C C, et al. Spectrum-effect relationship of antioxidant activity of wine fried *Ligustrum Lucidum Fructus* [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2016, 51(22): 1907-1912.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2015: 附录 45-46.
- [3] HAN X J, GUO N, ZHU M T, et al. Research progress in pharmacological activities and related mechanism of salidroside [J]. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志), 2015, 35(1): 171-175.
- [4] YANG Z Q, LONG J G, LIU J K. The biological effect and metabolic characteristics of hydroxytyrosol [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2016, 32(9): 1189-1193.
- [5] GAO J, ZOU X, YANG L, et al. Hydroxytyrosol protects against acrolein induced preosteoblast cell toxicity: Involvement of Nrf2 /Keap1 pathway [J]. *J Functional Foods*, 2015(19): 28-38.
- [6] HU Z, WANG Z, LIU Y, et al. Metabolite profile of salidroside in rats by ultraperformance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-linear ion trap mass spectrometry [J]. *J Agricult Food Chem*, 2015, 63(41): 8999-9005.
- [7] ZANG H, XU Q, ZHANG L Y, et al. New progress of the study on pharmacological effects of tyrosol [J]. *J Tonghua Normal Univ*(通化师范学院学报), 2017, 38(12): 48-53.
- [8] DEWAPRIYA P, HIMAYA S W, LI Y X, et al. Tyrosol exerts a protective effect against dopaminergic neuronal cell death in *in vitro* model of Parkinson's disease [J]. *Food Chem*, 2013, 141(2): 1147-1157.
- [9] HUO Y J, YUE L, LIU Y, et al. Effect of processing with wine on content of main chemical components in *Ligustri Lucidi Fructus* decoction pieces [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(1): 26-30.
- [10] WU X H, SUN Z, YANG E L, et al. HPLC fingerprint of wine-fried *Ligustri Lucidi Fructus* and content determination of multi-components [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2016, 36(2): 273-277.
- [11] HU F, LIAO X, CHEN Z. Determination of three phenylethanoid glycosides in *Osmanthus fragrans* fruits by HPLC with fluorescence detection [J]. *J Separation Sci*, 2018, 41(21): 3995-4000.
- [12] PIÑEIRO Z, CANTOSVILLAR E, PALMA M, et al. Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines [J]. *J Agricult Food Chem*, 2011, 59(21): 11683-11689.
- [13] WANG Q, WANG K, HUANG M G, et al. Determination of the contents of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil by liquid-liquid extraction and UPLC-FLD [J]. *Sci Technol Food Industry*(食品工业科技), 2018, 39(9), 233-238.
- [14] MAZZOTTI F, BENABDELKAMEL H, DONNA L D, et al. Assay of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil by tandem mass spectrometry and isotope dilution method [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1006-1010.
- [15] ROMERO C, BRENES M. Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils [J]. *J Agricult Food Chem*, 2012, 60(36): 9017-9022.

收稿日期: 2018-12-30
(本文责编: 蔡珊珊)