

刘存芳. 反相高效液相色谱法测定厚朴树叶中的厚朴酚[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 311–313.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.103

反相高效液相色谱法测定厚朴树叶中的厚朴酚

刘存芳

(陕西理工学院化学与环境科学学院, 陕西汉中 723000)

摘要: 超声辅助法提取秦巴山区野生厚朴树叶中的厚朴酚, 用显色法和薄层色谱法对厚朴酚进行定性鉴定, 反相高效液相色谱法测定厚朴树叶中厚朴酚的含量。采用高效液相色谱仪测定, 以 C_{18} 为固定相, 选择不同的流动相, 检测波长为 294 nm, 流速为 1 mL/min, 进样量 20 μ L。试验结果表明, 厚朴树叶中含有厚朴酚, 且厚朴酚的含量为 0.75%, 以体积比 78:22 的甲醇:水为流动相, 测得厚朴酚的保留时间为 4.528 min, 分离效果好、简单、灵敏、重现性好, 结果满意, 适合于厚朴树叶中厚朴酚含量的测定。

关键词: 厚朴树叶; 厚朴酚; 含量; 高效液相色谱法; 测定

中图分类号: O657.7⁺2; R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)08-0311-03

厚朴 (*Magnolia officinalis*) 是木兰科木兰属的一种高大落叶植物^[1], 别名川朴、紫油厚朴, 树高 15~20 m, 广泛地分布于湖北西部、四川西南部、陕西南部、甘肃南部、江西、安徽、浙江、福建、湖南等地^[2], 厚朴树皮是我国传统中药材, 称为中药厚朴, 始载于《神农本草经》, 列为中品, 其后历代本草均有记载, 厚朴的树皮、根皮、花、籽及嫩芽均能入药^[3], 有燥湿消痰、化湿导滞、消除腹胀便秘、治疗痰饮喘咳、驱风镇痛等功效, 还具有抗菌、抗病毒、抗过敏、影响胃肠活动、松弛肌肉和中枢抑制等作用, 以厚朴树皮为主, 将其作为中药材或深加工的原料使用。厚朴酚是厚朴中的活性物质之一^[4], 有抗菌、镇静中枢神经、松弛肌肉、抗溃疡、抗氧化、预防龋齿等药理作用^[5], 最近研究表明厚朴酚还有抑制癌细胞的作用^[6], 厚朴酚应用广泛, 是一些中成药如保和丸、藿香正气水等的主要成分。目前, 厚朴酚主要是从厚朴树皮提取, 厚朴树皮资源有限, 厚朴树一般要生长 15 年才能符合药用需要, 挖根剥皮, 一次性使用, 而厚朴树叶资源却非常丰富^[7]。人们对厚朴树叶

的开发利用研究报道较多^[8], 不同产地和不同季节厚朴叶中厚朴酚以及和厚朴酚含量存在差异^[9-11], 用高效液相色谱法检测厚朴树叶中厚朴酚的含量, 不同提取方法测得厚朴树叶中厚朴酚含量不同^[12-13], 厚朴树叶提取物对植物病原真菌有抑菌活性^[14], 厚朴树叶中含有和厚朴树皮中相同的成分, 可用厚朴树叶提取厚朴酚, 厚朴树叶的利用前景广阔。陕西南部秦巴山区有丰富的厚朴资源, 本研究采用超声辅助提取法和索氏回流提取法从厚朴树叶中提取厚朴酚, 进行定性鉴定, 用反相高效液相色谱法测定厚朴树叶中厚朴酚的含量^[15], 可为开发利用厚朴树叶资源提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 试验材料 厚朴树叶于 2012 年 11 月上旬收集于陕西南部秦巴山区, 经陕西理工学院植物学专家赵桦教授分析和辨认, 为木兰科木兰属植物厚朴的叶子。置于烘箱 50 $^{\circ}$ C 烘干至恒质量, 用中草药粉碎机粉碎过 60 目筛, 密封保存备用。

1.1.2 试剂 厚朴酚标准品(中国药品生物制品检验所), 色谱甲醇(色谱纯, 进口分装), 乙腈(色谱纯 TEDIA, 进口分装)。乙醇、甲醇、三氯化铁、间苯三酚、苯、香草醛、硫酸、盐酸、羧甲基纤维素钠均为国产分析纯, 由天津市天力化学试剂有限公司生产。薄层层析硅胶 GF254(分析纯, 青岛海洋化工厂)。1% 香草醛硫酸显色剂配制: 100 mL 无水乙醇、1 g 香草

收稿日期: 2014-08-06

基金项目: 陕西省社会发展科技攻关项目(编号: 2012K19-03-03)。

作者简介: 刘存芳(1971—), 女, 陕西合阳人, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为天然产物开发和活性物质的结构修饰研究。

E-mail: 987253106@qq.com。

[8] 陈莉华, 李三艳, 张 烨, 等. 麦冬叶中总黄酮的抗油脂氧化研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(3): 70-73, 86.

[9] 张俊生, 陈莉华, 段琛圭, 等. 车前子中黄酮提取物对油脂的抗氧化活性研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(2): 62-67.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 333-334.

[11] 张兰杰, 辛 广, 张维华. 双波长分光光度法测定黑玉米花粉中总黄酮的含量[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 230-232.

[12] 张春兰, 叶 林, 吴晓军, 等. 蔷薇果黄酮类物质对油脂的抗氧化作用[J]. 中国油脂, 2010, 35(1): 44-46.

[13] 李文清, 李忠海, 付湘晋, 等. 樟树叶多酚复合抗氧化剂配方的

筛选及优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 206-208, 211.

[14] 薛畅敏, 申艳艳, 赵 越. 槐角黄酮抗油脂氧化作用[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(13): 117-120.

[15] 杨泉生, 聂基兰. 双波长分光光度法的原理与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1992.

[16] 孙崇鲁, 黄克瀛, 陈丛瑾, 等. 香樟叶中黄酮类化合物的提取[J]. 应用化工, 2006, 35(2): 142-143.

[17] 李慕春, 王 飞. 双波长分光光度法测定奶花芸豆总黄酮含量[J]. 广东农业科学, 2010, 37(12): 110-111.

[18] 李姣娟, 戴 瑜, 周尽花, 等. 川桂叶总黄酮对油脂抗氧化作用的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(10): 134-137.

醛和 10 mL 浓硫酸,混合均匀。5% 的三氯化铁甲醇水溶液配制:甲醇和水体积比 1:1 混合,按质量百分数称取三氯化铁,混合均匀。间苯三酚盐酸溶液:称取间苯三酚 0.1 g,加无水乙醇 1 mL,再加盐酸 9 mL,混匀,用时新配。水为二次蒸馏水。

1.1.3 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),SL 二极管阵列检测器(美国安捷伦公司),Kromasil C₁₈ 色谱柱(15 cm × 0.46 cm, 5 μm, 重庆中谱科技有限公司)。超声清洗机(浙江省宁波新芝生物股份有限公司),中草药粉碎机(F117 型,天津市泰斯特仪器有限公司),电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司),循环式真空泵(SHZ-Ⅲ型,河南省巩义市予华仪器有限责任公司),电子分析天平(GR-200,日本),薄层色谱扫描仪(北京化学科技有限公司),旋转蒸发仪(河南巩义仪器厂),Soxhelt 提取器。

1.2 试验方法

1.2.1 从厚朴树叶中提取厚朴酚 (1) 超声辅助提取法:准确称取 0.200 0 g 粉碎好的厚朴树叶粉末置于带塞锥形瓶中,加入 25 mL 甲醇,超声 30 min,浸渍 24 h。提取液呈深棕色浑浊液体,用真空泵减压抽滤,滤液呈透亮棕色,用活性炭脱色,减压回收甲醇,真空干燥提取物。用色谱甲醇溶解,定容到 25 mL 的容量瓶中,供定性鉴定和含量测试。精确吸取定容液 2.5 mL 于 10 mL 容量瓶中,加色谱甲醇稀释到刻度,摇匀,为超声提取待测样品溶液。(2) 索氏回流提取法:准确称取厚朴树叶细粉 2.000 0 g,用滤纸包好放置于 Soxhelt 提取器的提取管中,加入 250 mL 甲醇回流提取 48 h,至回流液澄清。提取液呈棕黑色,用活性炭脱色,减压回收甲醇,真空干燥提取物。用色谱甲醇溶解,定容到 250 mL 的容量瓶中,供定性鉴定和含量测试。精确吸取定容液 2.5 mL 于 10 mL 容量瓶中,加色谱甲醇稀释到刻度,摇匀,为索氏提取待测样品溶液。

1.2.2 厚朴酚定性鉴定 (1) 厚朴酚定性检测:分别取超声提取物和索氏提取物脱色之后的定容液体 2 mL 各 2 份于小试管中,再分别加入三氯化铁甲醇水溶液 3 滴和间苯三酚盐酸溶液 3 滴,摇匀,进行显色反应。(2) 厚朴酚的薄层色谱法检测:取超声提取物和索氏提取物脱色之后的定容液体,另取厚朴酚标准品储备液,按照《中国药典》2010 年版一部附录中薄层色谱法,用毛细管吸取 3 种溶液,分别点于同一个硅胶薄层板上,以苯:甲醇 = 27:1 为展开剂,展距 8 cm,取出,晾干,喷 1% 香草醛硫酸溶液后,在 100 ℃ 下烘烤 2~3 min,取出冷却,在日光下和薄层色谱扫描仪下分别观察。

1.2.3 厚朴树叶中厚朴酚含量的测定 标准品溶液的制备:准确称取厚朴酚标准品 1.500 mg,以色谱甲醇为溶剂,定容于 10 mL 棕色容量瓶中,配制成含厚朴酚 0.150 mg/mL 的标准品储备液。用厚朴酚标准品储备液精确配 5 个浓度梯度的标准品待测溶液,厚朴酚含量分别是 0.012 5、0.025 0、0.037 5、0.050 0、0.062 5 mg/mL,在色谱条件下进样检测,确定线性标准工作曲线。色谱条件:用 Kromasil C₁₈ 色谱柱,分别以乙腈:水体积比 65:35 和甲醇:水体积比 78:22 为流动相进行分析测试,流速为 1 mL/min,检测波长 294 nm,进样量 20 μL,保留时间 8 min,柱温 30 ℃。将超声提取待测样品溶液和索氏提取待测样品溶液与测试标准品待测溶液在同样色谱条件下测试。

2 结果与分析

2.1 提取方法选择

用超声辅助提取法和索氏回流提取法从厚朴树叶中提取厚朴酚,索氏回流提取法需要 48 h 才能提取完全,提取时间长,且长时间加热回流容易引起有效成分的氧化变质,使得提取液呈棕黑色,对实际操作中的提纯和含量测定都会带来很大的影响。超声辅助提取法温度低,一般控制在 50 ℃ 以下,所需时间短,约 30 min,操作简单,由于提取温度低,有效成分不易损失,能耗低,一般可选用超声辅助提取法。

2.2 厚朴酚的定性分析

超声提取物和索氏提取物分别加三氯化铁甲醇水溶液,均呈现蓝黑色,是厚朴酚的酚羟基反应,发生了显色反应;超声提取物和索氏提取物分别加间苯三酚盐酸溶液,出现红色沉淀,是厚朴酚的丙烯基反应,说明有厚朴酚被提取出来。厚朴酚的薄层色谱板在日光下和薄层色谱扫描仪下,超声提取物和索氏提取物的色谱图和标准品相应的位置上,均显棕红色斑点,如图 1 所示的薄层板分析图谱,说明厚朴树叶提取液中含有厚朴酚,还有其他有机物被提取出来。

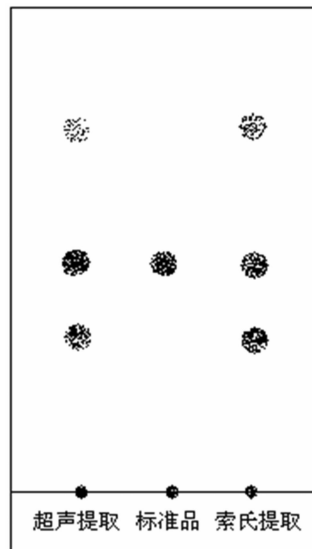


图1 薄层层析结果

2.3 工作曲线的制作

检测浓度梯度的不同标准品待测溶液,以含量(mg/mL)为纵坐标、色谱峰面积为横坐标来绘制工作曲线图(图2)。当厚朴酚浓度为 0.012 5 mg/mL 时,峰面积为 421.489 90;浓度为 0.025 0 mg/mL 时,峰面积为 822.312 62;浓度为 0.037 5 mg/mL 时,峰面积为 1 264.469 70;浓度为 0.050 0 mg/mL 时,峰面积为 1 665.953 74;浓度为 0.062 5 mg/mL 时,峰面积为 2 055.781 55。由此可见,峰面积与厚朴酚含量建立了良好的线性关系。厚朴酚含量(y)与峰面积(x)的回归方程为: $y = 3.006 \times 10^{-5}x + 1.4491 \times 10^{-5}$ ($r = 0.9999$),线性范围在 0.012 5 ~ 0.062 50 mg/mL。

2.4 厚朴树叶中厚朴酚的含量

在高效液相色谱(HPLC)测定过程中,流动相分别用乙腈:水体积比 65:35 和甲醇:水体积比 78:22 进行比较,测定结果如图3所示是以乙腈:水体积比为 65:35 作流动

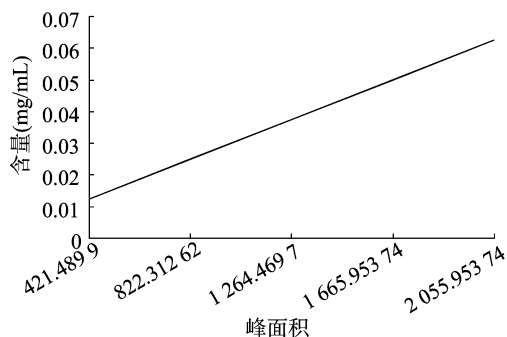


图2 工作曲线

相得到的图谱,图4是以甲醇:水体积比为78:22作为流动相得到的图谱。从图3中可以看到,以乙腈和水为流动相时出峰时间较早,厚朴酚的保留时间为3.935 min,各组分不能有效分离,分离度差,干扰严重,峰形不规则。从图4中可以看到以甲醇和水为流动相时出峰时间合理,厚朴酚的保留时间为4.528 min,各组分分离度好,干扰小,峰形规则,含量检测时误差会减小,在测定厚朴树叶中厚朴酚的含量时使用甲醇和水(体积比78:22)为流动相比较好。利用HPLC测定超声提取待测样品溶液和索氏提取待测样品溶液,归一化法得到峰面积,经过转化,表明超声提取法进行提取厚朴树叶中厚朴酚的含量为0.768%,索氏提取法进行提取厚朴树叶中厚朴酚的含量为0.725%,可见,不同的提取方法测得厚朴树叶中厚朴酚的含量是存在差异的。和按照《中国药典》2010年版中的方法测定厚朴树叶中厚朴酚的最高含量为0.32%相比较,高出了1.4倍,超声辅助提取法和索氏回流提取法能显著提高厚朴酚的得率,超声提取法相对更好一些。

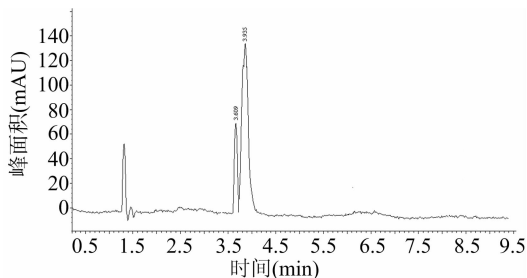


图3 乙腈和水为流动相色谱

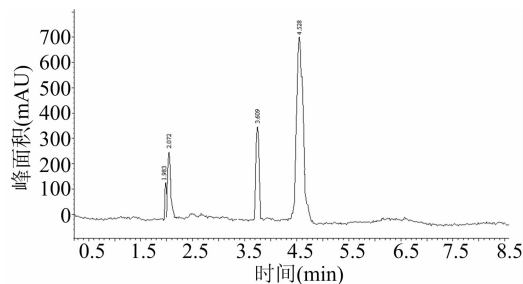


图4 甲醇和水为流动相色谱

3 结论

用超声辅助提取法和索氏回流提取法提取秦巴山区野生厚朴树叶中的厚朴酚,能显著提高得率,比按照《中国药典》2010年版中的方法提取和检测厚朴酚的含量高出1.4倍,超

声辅助提取法和索氏回流提取法均能提高厚朴酚的得率,前者比后者会更适合工业化生产,超声法提取天然产物中的有效成分已得到广泛应用,可加快浸取速度,提取率高,操作简单方便。用显色法和薄层色谱法对提取的厚朴酚进行定性鉴定,厚朴树叶中含有厚朴酚,可从厚朴树叶中提取厚朴酚。反相高效液相色谱法测定厚朴树叶中厚朴酚的含量,以Kromasil C₁₈色谱柱(15 cm × 0.46 cm, 5 μm)为固定相,以甲醇和水体积比78:22为流动相,检测波长294 nm,流速为1 mL/min,进样量20 μL,测得厚朴酚的保留时间为4.528 min,厚朴树叶中厚朴酚的含量为0.768%,分离效果好,干扰小,峰形规则,含量检测时误差小,结果满意,适合于厚朴树叶中厚朴酚含量的测定。本试验仅是对厚朴树叶中的厚朴酚进行定性和定量检测,厚朴树叶中的其他酚性物质检测和分析还需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 邓 芬,张芳芹,王 焯,等. 厚朴叶子中多糖的超声法提取及抗氧化活性研究[J]. 食品科技,2011,36(8):173-175,178.
- [2] Tong Z K, Zong Y R, Si J P. Variation, heredity and selection of effective ingredients in *Magnolia officinalis* of different provenances[J]. Journal of Forestry Research, 2002, 13(1): 7-11.
- [3] 李阳春,高家鉴,张伟敏,等. 厚朴姜制前后所含厚朴酚及和厚朴酚总量的变化[J]. 中成药,2001,23(6):415-417.
- [4] Tian Y L, Chen G H. Determination of magnolol and honokiol by non-aqueous capillary electrophoresis[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2006, 22(3): 335-338.
- [5] 赵纯森,黄俊斌,周茂繁. 厚朴叶中抑菌活性成分鉴别及其防病效果[J]. 华中农业大学学报,1994,13(4):373-377.
- [6] Lee Y K, Yuk D Y, Kim T I, et al. Protective effect of the ethanol extract of *Magnolia officinalis* and 4-O-methylhonokiol on scopolamine-induced memory impairment and the inhibition of acetylcholinesterase activity[J]. Journal of Natural Medicines, 2009, 63(3): 274-282.
- [7] 权婧婧,房艺丹,雷 迎,等. 厚朴叶的开发利用研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,39(33):20396-20397,20423.
- [8] 龙 飞,卫莹芳,刘 永,等. 厚朴叶化学成分的初步研究[J]. 华西药学杂志,2010,25(4):387-388.
- [9] 李弘强,黄念桃,王 蓉. 薄层扫描法考察不同产地厚朴叶中厚朴酚及和厚朴酚的含量[J]. 时珍国医国药,2004,15(3):141-142.
- [10] 何慧娟,王 焯,蒋 翔,等. 秦巴山区不同季节厚朴叶中厚朴酚含量的测定[J]. 安徽农业科学,2010,38(32):18148-18149.
- [11] 黄晓燕,卫莹芳,张盈娇,等. 高效液相色谱法测定厚朴叶不同采收期中厚朴酚、和厚朴酚的含量[J]. 中国中药杂志,2005,30(9):717-718.
- [12] 刘晓鹏,姜 宁,向东山,等. 厚朴叶中厚朴酚及和厚朴酚的提取与测定[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(5):694-696.
- [13] 叶锦霞,林 珊,曾建伟,等. 闽产厚朴叶中厚朴酚、和厚朴酚提取工艺研究[J]. 福建中医学院学报,2010,20(4):23-26.
- [14] 姜 宁,刘晓鹏,滕建勋,等. 紫油厚朴叶提取物对马铃薯青枯病菌的抑制作用及防病效果[J]. 植物保护,2008,34(2):58-60.
- [15] 田光辉,刘存芳,王 晓. 反相高效液相色谱法测定香茶菜籽中游离的亚麻酸含量[J]. 陕西理工学院学报:自然科学版,2007,23(3):87-90.