

梨花中熊果苷的高效液相色谱分析

李 媛, 乔进春, 张玉星, 何童森, 吕明霞, 张 飞, 崔 同*

河北农业大学食品科技学院, 保定 071000

摘要: 采用高效液相色谱法对不同时期、不同品种的梨花中熊果苷的含量进行了分析, 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇: 水 (6: 94), 加入甲酸 0.05%, 检测波长 280 nm。结果表明: 熊果苷在 0.01 ~ 5.00 μg 范围内线性关系良好 ($r = 0.9999$), 平均加标回收率为 97.7%。不同生长期的鸭梨梨花中熊果苷的含量一般在 10 mg/g 以上, 尤以花芽萌动期时含量最高, 达到 35.7 mg/g (鲜重计)。不同品种的 9 份梨花样品种中, 熊果苷含量在 3.5 ~ 10.5 mg/g 之间。

关键词: 梨花; 熊果苷; HPLC

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Quantification of Arbutin from Pear Blossoms by HPLC

LI Yuan, QIAO Jin-chun, ZHANG Yu-xing, HE Tong-sen, LV Ming-xia, ZHANG Fei, CUI Tong*

College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000

Abstract: The contents of arbutin in pear blossoms of different periods and different varieties were detected using the HPLC method with Hypersil BDS C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase methanol : water (6 : 94, with 0.05% formic acid), and the detection wavelength 280 nm. The results showed that the calibration curve was linear in the range of 0.01 ~ 5.00 μg ($r = 0.9999$) and the average recovery was 97.7%. The content of arbutin in Yali pear blossom during the florescence was above 10 mg/g (fresh weight) in most cases, especially in blossom bud germination period, reaching a maximum of 35.7 mg/g. In the nine pear blossom samples from different varieties, the contents of arbutin were range between 3.5 mg/g to 10.5 mg/g.

Key words: pear flower; arbutin; HPLC

梨是蔷薇科 (Rosaceae)、梨亚科 (Pomaceae)、梨属 (*Pyrus* L.) 植物^[1]。我国是梨属植物的原产地, 也是世界第一产梨大国, 种质资源十分丰富, 全国南北各地均有分布和栽培^[2], 河北省的栽培面积居全国首位^[3]。

在我国古代不仅有以梨果实入药的悠久历史, 而且还发现梨花也具有奇特的疗效, 据明朝《本草通玄》^[4] 记载, 梨花有润肺、化痰、止咳和解酒等功效, 民间还发现梨花有肌肤美白效果, 据李时珍的《本草纲目》^[5] 记载, “梨花可去面黑粉滓”。本研究组曾对东方梨植物的生理活性物质进行长期研究, 发现梨花中有高浓度的熊果苷 (arbutin), 是梨花美白肌肤作用的代表性活性因子^[6]。熊果苷, 化学名称为对羟基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷, 它可在体内释放氢醌, 一种强力酪氨酸氧化酶抑制剂, 可抑制皮肤黑色素合成, 而且还具有止咳、尿路消炎等作用^[7]。

自 90 年代以来, 它取代了曲酸和抗坏血酸成为市场最流行的化妆品美白剂, 在高档美白化妆品领域有广泛的应用^[8]。

与其他植物资源相比, 梨花生长期短, 受环境污染的机会少, 具有更好的安全性。然而, 目前为止除本研究组的报道^[6,9] 之外, 尚未发现梨花中熊果苷含量分析方法及存在分布方面的任何其他报道。为此, 本研究拟开发一种用于梨花中熊果苷进行定量分析的高效液相色谱 (HPLC) 分析方法, 并对生长期梨花中熊果苷的含量进行动态分析, 同时对梨属植物代表性物种的鲜花进行比较, 以便揭示梨花中熊果苷的存在规律, 为这种潜在生物资源的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

用于熊果苷含量动态变化分析的梨花样品种为属于白梨 (*P. bretschneideri*) 的鸭梨; 用于不同品种梨花

中熊果苷含量比较的样品包括:白梨的鸭梨、雪花梨,砂梨(*P. pyrifolia*)的黄金梨,西洋梨(*P. communis*)的红安久、红茄梨,野生种杜梨(*P. betulaefolia*),以及黄冠梨(雪花梨×新世纪梨)、绿宝石(早酥梨×新世纪梨)和八月红(早巴梨×早酥梨)。以上样品均采自河北农业大学(西校区)标本园。

熊果苷标准品购于美国 Sigma 公司;色谱流动相用甲醇为色谱纯,水为去离子重蒸馏水。其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

美国 Agilent 1200 型高效液相色谱仪;Agilent 1200 型可变波长检测器;Agilent Chemstation 色谱工作站。RE-5210 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),TB-215D 微量分析天平(德国赛多利斯股份有限公司),SK5200H 超声振动仪(上海波龙电子设备有限公司),SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 梨花样品的处理

准确称取鲜梨花样品 2.00 g,放入研钵中,加少量的石英砂和 7 mL 95% 的乙醇研磨,为防止氧化褐变加入磷酸 1 滴,研磨成匀浆状后用 80% 乙醇移至

25 mL 容量瓶中,在超声波振荡器中振荡提取 10 min 后用 80% 乙醇定容,于离心机上 4000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.2 mL 于试管中,50 ℃ 水浴真空抽干乙醇后用 2 mL 流动相回溶,经 0.45 μm 滤膜过滤,准备上样测定。

1.3.2 HPLC 分析条件^[9]

色谱柱:Hypersil BDS C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm);色谱柱温度:35 ℃;流动相:甲醇:水 = 6:94 (v/v),加入 0.05% 甲酸;流速:0.8 mL/min;检测波长:280 nm;进样量:10 μL。

2 结果与分析

2.1 HPLC 分析方法的评价

2.1.1 方法的回归方程、精密度及检出线

准确称取熊果苷标准品 50 mg 置于 10 mL 容量瓶中用甲醇定容,得到 5 mg/mL 的贮备液。分别吸取贮备液,用流动相稀释,配成系列浓度的标准溶液。按 1.3.2 中的色谱条件进样分析,以峰面积(Y, mv)和进样量(X, μg)求出线性回归方程、相关系数和线性范围;准确吸取 0.05 mg/mL 熊果苷标准液 10 μL 平行进样 5 次,统计色谱峰面积,计算相对标准偏差以评价方法的精密度;最低检出限以 3 倍信噪比所对应的进样量求得,结果列于表 1。

表 1 熊果苷的标准曲线、检出限和相对标准偏差

Table 1 The standard curve, detection limit and relative standard deviation of arbutin

回归方程 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient	线性范围(ng) Linear range	最低检出限(ng) Detection limit	相对标准偏差 RSD (%)
$Y = 503.89X - 0.93$	0.9999	10-5000	1	0.55

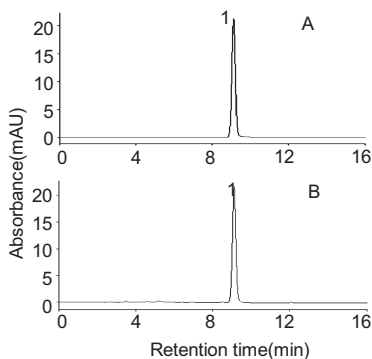


图 1 熊果苷标准品(A)和绿宝石梨花样品(B)(采于 2010 年 4 月 25 日)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard of arbutin (A) and tested sample (B)

2.1.2 加标回收率的测定

参照未加标样品中熊果苷的含量水平,精确称

取 7.00 mg 熊果苷标准品加入到 2.00 g 梨花样品中,按 1.3.1 所述样品处理方法进行操作,平行做 5 份,并对加标样品按 1.3.2 中的色谱条件进行分析。与未加标样品含量比较,计算每份样品的加标回收率,并统计结果。结果表明,熊果苷的平均回收率为 97.7%,相对标准偏差为 1.68%。

从图 1 可以看到,在选定的分析条件下,熊果苷在 10 min 内实现了良好分离。从方法评价的结果来看,此方法具有较好的灵敏度、精密度和准确度,可用于梨花样品中熊果苷的分析检测。

2.2 梨花中熊果苷含量分析

2.2.1 梨花生长期熊果苷的含量

从 2010 年 4 月 1 日开始采集鸭梨的花芽、花蕾和花朵等不同生长期的样品,采样间隔为 3 d。按照上述 1.3 的方法对样品中的熊果苷进行了动态含量

分析,结果见图2。

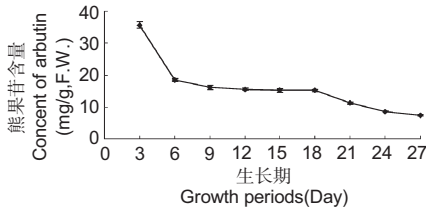


图2 梨花生长期熊果苷的含量变化 ($n=5$)

Fig. 2 Changes in content of pear blossom during the different growth periods ($n=5$)

由图2可以看出,不同生长期的梨花中熊果苷的含量均相当高,一般在10 mg/g以上,尤以花芽萌动期时(第3 d的样品)含量最高,达到35.7 mg/g(鲜重计),此后随着花芽的不断生长,鲜重增加,熊果苷含量逐渐降低。经过花芽开绽期(第6和9 d的样品)、花序露出期(第12 d的样品)和花序伸长期(第15、18和21 d的样品),熊果苷的含量从18.6 mg/g降到11.3 mg/g;进入花期(第24和27 d的样品)之后,含量降至10 mg/g以下。

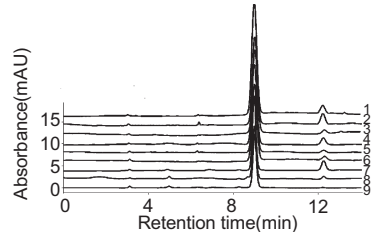
2.2.2 不同品种梨花中熊果苷含量的比较

由于梨的不同品种花期有所不同,我们分别在各品种的盛花期进行采样和分析。其中雪花梨、黄金梨和红安久,采样时间是2010年4月24日;鸭梨、黄冠梨和绿宝石,采样时间是2010年4月25日;杜梨、八月红,采样时间是2010年4月29日;红茄梨采样时间是2010年5月1日。按照上述1.3的方法,对以上9个品种的梨花中熊果苷含量进行分析比较,HPLC色谱图和含量测定结果分别见图3和图4。

由图4可以看出,这9个品种的梨花中熊果苷的含量存在较大差异。其中东方梨系的梨花中熊果苷含量较高,又以白梨的雪花梨梨花中熊果苷的含量最高,达10.7 mg/g,而杜梨(野生梨)和红茄梨(西洋梨)的梨花中熊果苷含量最低,约为3.4 mg/g。

3 讨论

熊果苷是一种天然的皮肤美白剂,以往曾报道其存在于熊果、越桔、岩白菜、鹿衔草等中草药中。本研究组发现在梨花中有高含量的熊果苷,但由于其中同时也含有其他植物多酚类成分如绿原酸等^[6,9],因此不宜采用分光光度法进行定量分析。本项研究开发了一种简便的等度淋洗高效液相色谱法,可以使熊果苷与梨花中的其他多酚类物质很好



图中:1.雪花梨 2.黄冠梨 3.黄金梨 4.鸭梨 5.绿宝石 6.红安久 7.八月红 8.红茄梨 9.杜梨
1. Xuehuali pear 2. Huangguanli pear 3. Whangkeumbae pear 4. Yali pear 5. Lvbaoshi pear 6. Red Dánjiu 7. Bayuehong pear 8. Starkrimson 9. *Pyrus betulaeifolia* Bunge

图3 9种梨花样品的色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of pear flower samples from 9 cultivars

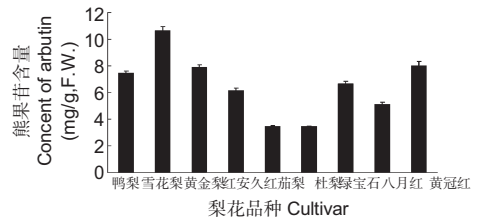


图4 不同品种梨花中熊果苷的含量 ($n=5$)

Fig. 4 Comparison of arbutin content in pear flowers among species and cultivars ($n=5$)

的分离,以便获得可靠的含量分析结果。试验结果表明,这种方法具有良好的精密度和准确度。采用此方法对梨花样品进行了实际分析,结果表明,不同种和品种的9份梨花样品中,熊果苷含量在3.5~10.5 mg/g之间。在花芽到开花的生长过程中,伴随梨花的膨大开放,鲜样中熊果苷的浓度由30 mg/g以上逐渐下降到10 mg/g左右。在梨的春季栽培管理中,经常会根据果树营养分配的需要实施疏花疏果的管理,以往疏掉的花朵都是被当作废物丢弃。另外,为了生产人工授粉用的梨花粉,每年梨的产区都会采集大量的梨花生产花粉,其中的花萼、花瓣也都是被丢弃的,我们的结果表明,这些梨花都可以作为提取化妆品美白剂熊果苷的天然原料,因而为这种潜在生物资源的开发利用提供了重要的科学依据。

参考文献

- Laiyang Agricultural University of Shandong(山东省莱阳农业大学). Pear(梨). Beijing: Science Press, 1978. 1.