

## HPLC-DAD 测定天然橡胶乳清中白坚木皮醇

董铁山<sup>1,2</sup>, 王建龙<sup>1</sup>, 曾日中<sup>3</sup>, 黄茂芳<sup>2</sup>, 桂红星<sup>2\*</sup>

- (1. 中北大学 化工与环境学院, 太原 030051;
2. 中国热带农业科学院 农产品加工研究所, 广东 湛江 524001;
3. 中国热带农业科学院 橡胶研究所, 海南 儋州 571737)

**[摘要]** 目的:建立高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)测定天然橡胶乳清中白坚木皮醇的方法。方法:鲜胶乳清用18%的乙酸凝固过滤脱胶,加0.6%滤液量的Ca(OH)<sub>2</sub>加热煮沸脱蛋白,过滤,滤液经阴、阳离子交换树脂除去盐和类脂物,再经大孔吸附树脂吸附,60%乙醇解吸附,解吸液浓缩得结晶,溶解定容。采用Inertsil ODS-SP C<sub>18</sub>色谱柱进行分离,流动相乙腈-水(10:90),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃。结果:白坚木皮醇在0.04~4.0 g·L<sup>-1</sup>呈现良好的线性关系( $r=0.9979$ ),精密密度RSD 1.1%,加样回收率96.69%。结论:该方法操作简单、准确度和灵敏度高,适合于白坚木皮醇的检测和含量测定。

**[关键词]** 天然橡胶乳清;白坚木皮醇;高效液相色谱-二极管阵列检测器法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0045-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240045

**Determination of *L*-quebrachitol in Nature Rubber Latex Serum by HPLC-DAD** DONG Tie-shan<sup>1,2</sup>, WANG Jian-long<sup>1</sup>, ZENG Ri-zhong<sup>3</sup>, HUANG Mao-fang<sup>2</sup>, GUI Hong-xing<sup>2\*</sup> (1. College of Chemical Engineering and Environment, North University of China, Taiyuan 030051, China; 2. Agricultural Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524001, China; 3. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine *L*-quebrachitol in nature rubber latex serum by establishing high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). **Method:** Fresh latex was coagulated by 18% acetic acid and unglued by filtration. 0.6% Ca(OH)<sub>2</sub> filtration liquid was added and heated to boiling status for removing protein, then the mixture was filtered. Salt and lipid content in the filtrate was removed by anion and cation resin exchange, and the residue achieved adsorption through macroporous adsorption resins, then desorbed by 60% ethanol, and the raw quebrachitol was obtained by Vacuum condensation crystallization. The product was dissolved in ultrapure water with metered volume. *L*-quebrachitol was separated by Inertsil ODS-SP C<sub>18</sub> column with acetonitrile-water (10:90) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and column temperature of 30℃. **Result:** A good linear relationship was obtained in the range of 0.04-4.0 g·L<sup>-1</sup> for *L*-quebrachitol, with a linear correlation coefficient ( $R$ ) of 0.9979. The RSD was 1.1%, and the average recovery rate was 96.69%. **Conclusion:** This method is simple with high sensitivity and precision, suitable for determination of *L*-quebrachitol in nature rubber latex serum.

**[Key words]** nature rubber latex serum; *L*-quebrachitol; HPLC-DAD

天然橡胶乳清是天然胶乳的水溶液部分,在橡胶加工生产中常作为废水排入池塘中,年产量大。文献报道其含有白坚木皮醇、过氧化物歧化蛋白酶、游离氨基酸等药用成分<sup>[1]</sup>。

**[收稿日期]** 20141225(017)

**[基金项目]** 海南省重点科技计划项目(SQ2013ZDXM0079);中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项(1630022013007)

**[第一作者]** 董铁山,在读硕士,从事天然药物的提取、分离纯化研究,Tel:0759-2221063,E-mail:dongtianshan0811@163.com

**[通讯作者]** \*桂红星,博士,研究员,从事功能天然橡胶,天然胶乳、天然橡胶的高性能化,天然橡胶生产加工过程中的关键问题研究,Tel:0759-2202507,E-mail:guihongxing@263.net

白坚木皮醇[2-甲氧基-L-( -)-手性-肌醇],又称白雀木醇,是环多醇中的一种,因其于白坚木的树皮中分离而得名。该化合物是一种具有左旋结构的天然药物和制药原料,在活体生物代谢中起着控制细胞生长过程和细胞内信息传导等重要作用,可用于治疗胃损伤、神经退行性疾病、癌症、糖尿病和艾滋病等<sup>[2-5]</sup>。用白坚木皮醇做手性前体可以很方便地合成多种具有生理活性的旋光性肌醇衍生物和其他手性化合物<sup>[6-7]</sup>,用作抗生素、除菌剂和杀虫剂等<sup>[8-9]</sup>;由于具有清除氧自由基的特殊功效,白坚木皮醇还用作放射病的预防药物并具有保健护肤的功效,因此,近年来被广泛应用于医药原料和保健品,下游产品较多,其质量控制直接影响医药、保健品的质量水平<sup>[10]</sup>。目前关于白坚木皮醇含量测定的报告国内有薛敏等<sup>[11]</sup>采用高效液相检测了制胶废水中的白坚木皮醇,但没有对废水进行前期纯化处理,导致检测精确度不高,误差较大。王惠聪等<sup>[12]</sup>采用高效液相色谱-示差折光率检测器测定了荔枝和龙眼白坚木皮醇的含量,但由于示差检测器不容易平衡,极易受温度、压力的变化影响,导致灵敏度低。二极管阵列检测器具有灵敏度高、稳定性好、可靠性强等优点,对流动相系统温度变化也相对不敏感,可降低流动相和杂质的干扰<sup>[13]</sup>。针对以上问题,本研究采用 HPLC-DAD Inertsil ODS-SP C<sub>18</sub> 色谱柱测定天然橡胶乳清中白坚木皮醇的含量并对其方法学进行考察,为白坚木皮醇产业化过程中的质量控制提供了一种备选方法。

## 1 材料

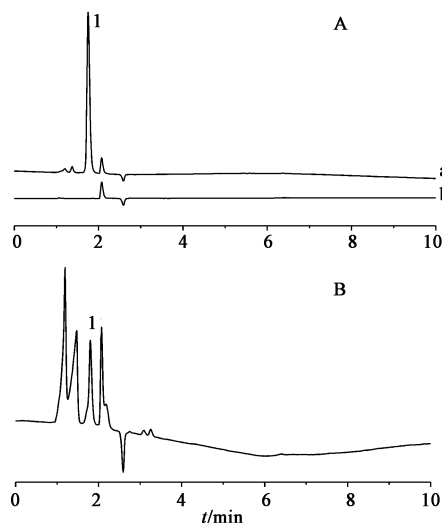
LC-20AT 型高效液相色谱(日本岛津),SPD-M20A 型二极管阵列检测器(DAD,日本岛津公司),FA2104N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),L-R4002 型旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司)。

天然橡胶胶乳(5 个批次,记 1~5#),广东农垦橡胶集团有限公司茂名分公司;D001 型阳离子交换树脂,D201 型阴离子交换树脂,HPD500 型大孔吸附树脂(河北沧州宝恩吸附树脂材料科技有限公司);树脂柱(1.2 cm×40 cm)购自湛江越泰试剂仪器有限公司,白坚木皮醇对照品(Sigma 公司,批号 S404551),乙腈色谱纯,蒸馏水为实验室制备,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Inertsil ODS-SP C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相乙腈-水(10:90),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL,柱温 30 °C,检测波长

190 nm。在上述色谱条件下,白坚木皮醇峰形良好,能够实现基线分离,对照品与样品色谱峰见图 1。



A. 对照品; a. 对照品; b. 溶剂峰; B. 供试品; 1. 白坚木皮醇

图 1 天然橡胶乳清 HPLC

Fig.1 HPLC chromatography of nature rubber latex serum

**2.2 对照品溶液的制备** 准确称取白坚木皮醇对照品 20.00 mg,置于 5 mL 量瓶中,加超纯水稀释、定容至刻度,配置成 4.0 g·L<sup>-1</sup>的对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取一定量的新鲜胶乳经超速离心机离心,取乳清层并加 18% 乙酸凝固 12 h 过滤脱胶,加 0.6% 滤液量的 Ca(OH)<sub>2</sub> 加热煮沸 20 min 除去蛋白,过滤,滤液经阴、阳离子交换树脂柱除去盐和类脂物,此时取 100.0 g 前处理液经大孔吸附树脂吸附,60% 乙醇洗脱,减压浓缩至干得白坚木皮醇粗品,用超纯水溶解并定容至 100 mL,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

**2.4 线性相关性考察** 将 4.0 g·L<sup>-1</sup>白坚木皮醇对照品溶液,依次稀释成 2.0,1.0,0.5,0.25,0.125 和 0.04 g·L<sup>-1</sup>系列对照品溶液,测定白坚木皮醇的峰面积,以进样质量浓度(X, g·L<sup>-1</sup>)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 Y = 352 273X + 65 235 (r = 0.997 9)。表明进样量在 0.04~4 g·L<sup>-1</sup>具有良好的线性。

**2.5 精密度试验** 取 1.0 g·L<sup>-1</sup>白坚木皮醇对照品溶液在 2.1 项色谱条件下连续进样 6 次,测得峰面积的 RSD 1.1%。

**2.6 稳定性试验** 取同一待测样品溶液,在 0,2,4,8,12,24 h 分别测定,结果峰面积 RSD 1.4%。表明样品溶液在 24 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 取 1#批次的新鲜胶乳 6 份,按 2.3 项下方法制备样品溶液,测定其中的白坚木皮

醇含量,结果白坚木皮醇占乳清质量比的 RSD 0.2%。表明方法重复性良好。

**2.8 回收率试验** 取同一批(1#)已知含量的胶乳前处理液约 100 g,平行 6 份精密称定,分别精密加入一定量的白坚木皮醇对照品,按照 2.3 项下方法制成加样供试品溶液,按照 2.1 项色谱条件测定含量,计算回收率,结果见表 1。

表 1 白坚木皮醇加样回收率试验

Table 1 Sample recovery rate test of L-quebrachitol

No.	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD)/%
1	100.01	95.36	95.25	186.04	95.20	
2	99.99	95.28	95.85	187.62	96.34	
3	100.00	95.32	95.25	189.83	99.22	96.69 (1.6)
4	100.02	95.39	95.65	188.94	97.80	
5	100.17	95.98	95.15	186.60	95.24	
6	100.00	95.30	95.87	187.68	96.36	

**2.9 样品测定** 按照 2.3 项下方法对 5 个批次的天然橡胶乳清中白坚木皮醇含量分别进行测定,测得在天然橡胶乳清中白坚木皮醇的质量分数分别为 0.095 41%, 0.098 64%, 0.098 42%, 0.103 9%, 0.115 9%;天然橡胶乳清提取物中白坚木皮醇质量分数分别为 26.64%, 26.89%, 27.14%, 27.58%, 27.76%。

### 3 讨论

曾考察不同提取环境对提取结果的影响,结果表明对乳清进行前期预处理及使用大孔吸附树脂分离、提取天然橡胶乳清中白坚木皮醇时,测定其含量较为一致,但高氨保存的橡胶乳清以及天然橡胶加工废水中白坚木皮醇的含量远远低于本实验方法,这是由于天然橡胶中氨含量过高能改变乳清中非橡胶成分的组成及含量,影响了胶体的稳定性,并由此阻碍了诸如白坚木皮醇等非胶成分的释放,而加工废水中含量过低则可能是由于细菌的大量繁殖消耗了白坚木皮醇的结果<sup>[14]</sup>。因此本文提供的方法适用于无氨保存的新鲜橡胶乳清和低氨保存体系中白坚木皮醇的测定。本实验操作简单易行,为天然胶乳乳清中白坚木皮醇的高值化回收利用奠定了检测基础,具有良好的应用前景。

#### [参考文献]

[1] Bateman L. Chemistry and physics of rubber-like substances[M]. Hoboken: John Wiley and sons inc, 1963:50.  
[2] De Olinda T M, Lemos T L G, Machado L L, et al.

Quebrachitol-induced gastroprotection against acute gastric lesions; Role of prostaglandins, nitric oxide and K + ATP channels[J]. Phytomedicine, 2008, 15(5): 327-333.  
[3] Nobre J H V, Cunha G M, Moraes M O, et al. Quebrachitol (2-O-methyl-L-inositol) attenuates 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat fetal mesencephalic cell cultures[J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(9):1544-1551.  
[4] Liu X, Moody E C, Hecht S S, et al. Deoxygenated phosphorothioate inositol phosphate analogs: synthesis, phosphatase stability, and binding affinity[J]. Bioorgan Med Chem, 2008, 16(6):3419-3427.  
[5] Takahashi S, Hishinuma N, Koshino H, et al. Synthesis of ovalicin starting from D-mannose[J]. Org Chem, 2005, 70(24):10162-10165.  
[6] Tiefenbacher K, Arion V B, Mulzer J. A diels-alder approach to (-)-ovalicin[J]. Angew Chem Int Ed, 2007, 46(15):2690-2693.  
[7] Kurosawa K, Nagase T, Chida N. Total synthesis of (-)-stevastelin B[J]. Chem Commun, 2002(12): 1280-1281.  
[8] Johnson S C, Dahl J, Shih T L, et al. Synthesis and evaluation of 3-modified 1D-myo-inositols as inhibitors and substrates of phosphatidylinositol synthase and inhibitors of myo-inositol uptake by cells[J]. Eur J Med Chem, 1993, 36(23):3628-3635.  
[9] Chida N, Yoshinaga M, Tobe T, et al. Total synthesis of (-)-PA-48153C (pironetin) utilizing l-quebrachitol as a chiral building block[J]. Chem Commun, 1997(11):1043-1044.  
[10] Kiddle J J. Quebrachitol: A versatile building block in the construction of naturally occurring bioactive materials [J]. Chem Rev, 1995, 95(6):2189-2202.  
[11] 薛敏,吕雉,伍英,等. 亲水色谱法分析白坚木皮醇的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(12): 1715-1718.  
[12] 王惠聪,吴子辰,黄旭明,等. 无患子科植物荔枝和龙眼白坚木皮醇的测定[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(3):315-319.  
[13] 王明娟,胡昌勤,姜少鸿. 蒸发光散射检测器在药物分析及其他方面的应用[J]. 中国药事, 2002, 16(7): 431-431.  
[14] Gopalakrishnan J, Thomas M, Abraham P A, et al. Recovery of L-quebrachitol from different latex serum sources of Hevea Brasiliensis [J]. Nat Rubber Res, 2011, 24(2):253-258.

[责任编辑 顾雪竹]