

25.05,  $r=0.9920$ , 结果表明熊果酸在 0.75~3.75  $\mu\text{g}$  与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 稳定性试验:精密吸取对照品溶液 1  $\mu\text{L}$ , 同上法点样, 展开, 显色, 扫描, 每隔半小时进行测定, 结果表明本法在显色后 2 h 内斑点面积值基本稳定。

## 2.6 精密度试验

2.6.1 同板精密度试验:精密吸取熊果酸对照品溶液 2  $\mu\text{L}$ , 在同一薄层板上点 5 个点, 按标准曲线条件下依次扫描测定, 其面积积分值  $\text{RSD}=2.3\%$  ( $n=5$ )。

2.6.2 异板精密度试验:精密吸取对照品溶液 2  $\mu\text{L}$ , 分别点于 5 块不同的薄层板上, 依法测定, 其面积积分值  $\text{RSD}=3.1\%$  ( $n=5$ )。

2.7 重现性试验:精密称取相同量的枇杷叶粗粉 5 份, 按上述供试品溶液制备方法处理, 得供试品溶液。分别吸取上述溶液 2  $\mu\text{L}$ , 对照品溶液 1、3  $\mu\text{L}$ , 点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上, 按上述薄层色谱条件展开, 显色, 扫描计算,  $\text{RSD}=2.35\%$  ( $n=5$ ), 表明方法重现性良好。

2.8 加样回收率试验:取枇杷叶粉末样品 5 份, 每份 10 g, 分别精密加入熊果酸对照品 2 mg, 按 2.1 项方法制得供试品溶液, 依法测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 97.64%,  $\text{RSD}$  为 2.16% ( $n=5$ )。

2.9 样品测定:精密吸取供试品溶液 2  $\mu\text{L}$ , 熊果酸对照品溶液 1、3  $\mu\text{L}$  分别交叉点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄

层板上, 展开, 晾干, 显色, 扫描, 测定积分值, 用外标两点法计算, 结果见表 1。熊果酸平均质量分数 0.504%,  $\text{RSD}$  为 1.03% ( $n=5$ )。

表 1 样品中熊果酸的测定结果

Table 1 Determination of ursolic acid in *Eriobotrya* leaves by TLC scanning

| 样品批号 | 熊果酸/% | 样品批号 | 熊果酸/% |
|------|-------|------|-------|
| 1    | 0.503 | 4    | 0.510 |
| 2    | 0.501 | 5    | 0.498 |
| 3    | 0.509 |      |       |

## 3 讨论

3.1 多数文献报道, 测定熊果酸的展开剂均为环己烷-氯仿-醋酸乙酯系统, 但试验时发现熊果酸的斑点有一定拖尾, 加入适量冰醋酸能明显改善拖尾, 使斑点圆整。

3.2 本试验结果表明, 枇杷叶中熊果酸的量较高。实验所采用的枇杷叶采自云南红河州云阳县, 考虑到枇杷叶在全国分布较广, 产地较多, 不同产地与不同采收期枇杷叶中定有差异。对此, 笔者将以后做进一步研究。

## References:

- [1] Chen Y Y, Zhu B L, Lin Y L. Study on *Eriobotrya* leaves of Fujian [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2001, 13(1): 42.
- [2] Huang J, Sun Y, Lu S X. Experimental study on apoptosis induced by ursolic acid isolated from asparagusin HL60 cells [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1999(5): 201-203.

# 白藜芦醇及其糖苷在虎杖中的存在形式及测定

刘志杰, 李晓峰, 万谦宏

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

白藜芦醇是虎杖中的主要有效成分。具有抗菌、抗炎、抗氧化、调节血脂的作用, 是一种极有前途的抗癌新药<sup>[1,2]</sup>。白藜芦醇在自然条件下, 以自由态和糖苷两种形式存在。从化学结构上看, 白藜芦醇及其糖苷还存在顺式和反式两种异构体。有关白藜芦醇的药理作用和中药中白藜芦醇的色谱分析方法的报道很多<sup>[3,4]</sup>, 但对白藜芦醇及其糖苷的顺、反式两种结构的药理作用和效价差别尚没有进行系统的比较与研究。有关白藜芦醇顺、反异构体的互变以及确认原药材中白藜芦醇及其糖苷的存在形式, 未见研究报道。因此建立一种可同时分离和检测白藜芦醇 4

种单体的分析方法, 无论是对中药材的成分分析还是对药品的质量控制都具有重要意义。本实验首先研究了白藜芦醇在紫外光照射下的异构化反应, 然后建立了一种可同时检测 4 种单体的分析方法, 最后将此方法用于实际样品虎杖的分析。

## 1 仪器与试剂

TJ—2000 高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司); HP8543 紫外分光光度计(惠普公司); ZF—1 型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂); 反式白藜芦醇对照品、反式白藜芦醇糖苷对照品(天津尖峰天然产物研究开发公司提供, 质量分数分别

为 98.49%、98.32%);虎杖饮片(购于天津市协和药店,经天津大学药学院高文远教授鉴定);水为重蒸水;甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为实验室自制  $C_{18}$  (150 mm×4.6 mm, 8  $\mu$ m);流动相:甲醇-水(40:60);体积流量:1 mL/min;检测波长:300 nm;柱温:室温;进样量:10  $\mu$ L。色谱图见图 1。

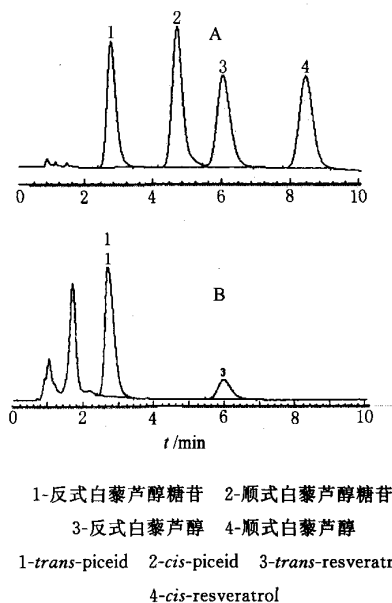


图 1 白藜芦醇对照品(A)及虎杖样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of four isomers of resveratrol reference substance (A) and *P. cuspidatum* (B)

2.2 顺式异构体的制备:由于顺式白藜芦醇和顺式白藜芦醇糖苷不稳定,无商品供应。顺式白藜芦醇和顺式白藜芦醇糖苷对照品用配好的对应两种反式对照品溶液在紫外光(365 nm, 136  $\mu$ W/cm<sup>2</sup>)照射 6 h 而获得。紫外照射后,白藜芦醇以及白藜芦醇糖苷样品的最大吸收波长,分别从 308、310 nm 蓝移到 288、286 nm。紫外吸收波谱的蓝移是反式结构向顺式结构转变的典型特征,此最大吸收波长与顺式白藜芦醇及其糖苷的文献报道值完全一致<sup>[5]</sup>。因此可以证明紫外照射后,有对应顺式异构体生成。

2.3 供试品溶液的制备:将虎杖饮片粉碎,过 40 目筛。取药材粉末 0.5 g,精密称定,分别用 50、30、30 mL 甲醇超声提取 3 次,合并滤液,减压浓缩。置 25 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度。

2.4 对照品溶液的配制:分别精密称取一定量的反式白藜芦醇、反式白藜芦醇糖苷对照品,甲醇溶解,

配成母液,存于-4  $^{\circ}$ C 冰箱避光保存。

2.5 线性关系的考察:将对照品溶液稀释释成 5 个梯度,进样 10  $\mu$ L。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标绘制标准曲线。白藜芦醇 4 种单体的线性回归结果见表 1。

表 1 白藜芦醇 4 种单体的标准曲线( $n=5$ )

Table 1 Calibration curve of four isomers of resveratrol ( $n=5$ )

| 样 品      | 标准曲线                                           | $r$     | 线性范围/ $\mu$ g |
|----------|------------------------------------------------|---------|---------------|
| 反式白藜芦醇糖苷 | $Y = -2.543 \times 10^5 + 5.253 \times 10^6 X$ | 0.999 7 | 0.22~5.50     |
| 反式白藜芦醇   | $Y = -4.574 \times 10^5 + 9.267 \times 10^6 X$ | 0.999 7 | 0.22~5.50     |
| 顺式白藜芦醇糖苷 | $Y = -5.157 \times 10^5 + 2.092 \times 10^6 X$ | 0.999 2 | 0.19~4.86     |
| 顺式白藜芦醇   | $Y = -4.814 \times 10^4 + 3.578 \times 10^6 X$ | 0.999 2 | 0.20~4.86     |

2.6 精密度试验:取同一供试品溶液,按上述色谱条件连续进样 5 次,分别进样 10  $\mu$ L,测得反式白藜芦醇糖苷、顺式白藜芦醇糖苷、反式白藜芦醇和顺式白藜芦醇的峰面积的 RSD 分别为 0.52%、0.82%、0.80%、1.02%( $n=5$ )。

2.7 稳定性试验:取供试品溶液分别于 0、2、4、6 h 进样 10  $\mu$ L,测得样品中反式白藜芦醇糖苷与反式白藜芦醇峰面积值的 RSD 分别为 0.82%和 0.93%( $n=5$ )。

2.8 重现性试验:精密称取虎杖样品 5 份,按上述方法制成供试品溶液,分别进样 10  $\mu$ L,测得反式白藜芦醇糖苷、反式白藜芦醇峰面积的 RSD 分别为 1.02%和 1.32%( $n=5$ )。

2.9 回收率试验:在已知质量分数的样品溶液中,精密加入白藜芦醇对照品(约为已知样品质量分数的 80%、100%、120%),按样品制备方法制得供试品。再分别按上述色谱条件测定,计算回收率。结果反式白藜芦醇糖苷与反式白藜芦醇的平均回收率分别为 98.46%和 99.12%,RSD 分别为 0.89%和 1.98%( $n=5$ )。

2.10 样品测定:将上述供试品溶液用微孔滤膜(0.45  $\mu$ m)滤过,按上述色谱条件进样 10  $\mu$ L 分析,根据标准曲线计算质量分数,结果反式白藜芦醇糖苷和反式白藜芦醇质量分数分别为 15.80、3.38 mg/g,RSD 分别为 1.12%、1.38%( $n=3$ )。顺式白藜芦醇和顺式白藜芦醇糖苷未测出。色谱图见图 1。

## 3 讨论

(下转第 1114 页)

油中多不饱和脂肪酸的工艺方法,通过对压力和温度的控制得到含不同多不饱和脂肪酸的各级鱼油产品,当蒸馏温度为 110℃ 以上,蒸馏压力为 20 Pa 以下时,经过 3 级串联分子蒸馏,得到高碳链不饱和脂肪酸质量分数为 90.96% 的鱼油产品<sup>[21]</sup>。应用分子蒸馏法提取  $\alpha$ -LNA 还有待进一步研究。

### 3 结语

国内外的大量研究结果表明, $\alpha$ -LNA 对心血管和癌症等一些重大疾病具有显著预防和作用。然而对  $\alpha$ -LNA 的分离纯化,传统或化学方法应用技术还不够成熟,难以获得高纯度的  $\alpha$ -LNA,且收率也比较低,达不到工业化生产的要求。SFE 和分子蒸馏技术的研究和应用可解决上述的问题,并具有巨大的开发潜力和应用前景。

### References:

- [1] Wang Y Q, Lai B S, Yan X L, et al. Analysis the composition of fatty acid from *Perilla frutescens* seeds and linseed with GC/MS [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物志), 1999, 20(2): 62-64.
- [2] Yin L J, Wang Y, Zu Y G. Purification of  $\alpha$ -linolenic acid from fruit oil of *Campotheca acuminata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(1): 22-23.
- [3] Ezaki O, Takahashi M, Shigematsu T, et al. Long-term effects of dietary alpha-linolenic acid from perilla oil on serum fatty acids composition and on the risk factors of coronary heart disease in Japanese elderly subjects. [J]. *Nutr Sci Vitaminol*, 1999, 45(6): 759-772.
- [4] Renaud S, Lanzmann-Petithory D. Dietary fats and coronary heart disease pathogenesis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2002, 4(6): 419-424.
- [5] Ding G L, Hu D Y, Wang B. Suppression of transient outward current by linolenic acid in atria myocytes from patients with heart failure [J]. *Bull med Res* (医学研究通讯), 2000, 29(6): 8-9.
- [6] Lin H, Shen J Q, Xin D, et al. Effects of flaxseed on blood lipids on rats [J]. *J Capital Univ Med Sci* (首都医科大学学报), 2001, 22(2): 104-106.
- [7] Chen J, Stavro P M, Thompson L U. Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor [J]. *Nutr Cancer*, 2002, 43(2): 187-192.
- [8] Xie L T, Huang J Q. Cytotoxic action and effect of unsaturated fatty acids and their selenides on DNA synthesis in BEL-7402 human hepatocarcinoma cell [J]. *J Chin Tumour*

*Clin* (中国肿瘤临床), 1998, 25(7): 501-504.

- [9] Lee J Y, Kim Y S, Shin D H. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Agric Food Chem*, 2002, 50(7): 2193-2199.
- [10] Kaku S, Yunoki S, Ohkura K, et al. Interactions of dietary fats and proteins on fatty acid composition of immune cells and LTB4 production by peritoneal exudate cells of rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65(2): 315-321.
- [11] Suresh Y, Das U N. Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus. Effect of omega-3 fatty acids [J]. *Nutrition*, 2003, 19(3): 213-228.
- [12] Ikemoto A, Fukuma A, Fujii Y, et al. Lysosomal enzyme activities are decreased in the retina and their circadian rhythms are different from those in the pineal gland of rats fed an alpha-linolenic acid-restricted diet [J]. *Nutrition*, 2000, 130(12): 3059-3062.
- [13] Xu Z H, Shao Y F. Effect of  $\alpha$ -linolenic acid on rat's behavior, retina, and liver, brain fatty acid composition [J]. *Chin Public Health* (中国公共卫生), 2002, 18(3): 301-304.
- [14] Umezawa M, Kogishi K, Tojo H, et al. High-linoleate and high-alpha-linolenate diets affect learning ability and natural behavior in SAMR1 mice [J]. *Nutrition*, 1999, 129(2): 431-437.
- [15] Zhang H M, Liu F Z, Dai L M. Purity method of  $\alpha$ -linolenic acid on the theory of urea adduction fractionation (I)—study on the noticeable factors affecting purification behavior of  $\alpha$ -linolenic acid [J]. *Chin Lipid* (中国油脂), 2001, 26(2): 41-44.
- [16] Zhu D, Wang S C, Guo Y, et al. Purification of  $\alpha$ -linolenic acid from *Perilla frutescens* oil. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(6): 242-243.
- [17] Wang W, Li M J, Liu J H, et al. Research on the quality standardization criterion on *Perilla frutescens* I. Preparation and identification ethanol  $\alpha$ -linolenic ester [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(4): 267-268.
- [18] Szentmihalyi K, Vinkler P, Lakatos B, et al. Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods [J]. *Bioresour Technol*, 2002, 82(2): 195-201.
- [19] Shen X J, Lai B S, Chen Z T, et al. Effect of time of supercritical fluid extraction on quality of fatty acids in plant medicines oil [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2002, 33(11): 533-535.
- [20] Chen Y, Yang J C. Studies on supercritical carbon dioxide extraction of linseed oil [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 13(3): 14-19.
- [21] Fu H, Gan A Y. Preparation of polyunsaturated fatty acid from fish oil with molecular distillation [J]. *J Wuxi Univ Light Ind* (无锡轻工大学学报), 2002, 21(6): 617-621.

(上接第 1088 页)

对反式白藜芦醇及其糖苷的紫外异构化进行了考察。在异构化过程中,紫外照射波长以及照射时间都是影响转化过程的主要因素。选择 254、365 nm 两个照射波长照射,结果发现,在 365 nm 波长下异构化速度较快。固定 365 nm 的照射波长考察照射时间对转化过程的影响。当照射时间超过 6 h 后,转化率基本不随时间变化,这表明转化已达平衡。因此本实验选择照射波长为 365 nm,照射时间为 6 h。

研究结果表明,白藜芦醇及其糖苷在虎仗样品中是以反式结构存在的。在样品制备过程中如果不注意避光保存,在色谱图中就会出现顺式白藜芦醇和顺式白藜芦醇糖苷的峰,说明反式白藜芦醇及其糖苷发生了异构化反应,所以反式白藜芦醇及其糖

苷应注意避光保存。

与以往测定白藜芦醇的方法相比,本实验实现了顺、反式两种异构体的分离分析,从而能更有效、准确地测定和控制样品中白藜芦醇及其糖苷的量。

### References:

- [1] Jiang M, Cai L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 1997, 275: 218-220.
- [2] Stewart J R, Arttime M C, O' Brian C A. A candidate nutritional substance for prostate cancer prevention [J]. *J Nutr*, 2003, 133(7): 2440-2443.
- [3] Xiang Y, Zhang T. Quantitative analysis of resveratrol from grape seeds and grape skins by high performance liquid chromatography method [J]. *J Hyg Res* (卫生研究), 2003, 32(5): 490-492.
- [4] Celotti E, Ferrarini R, zironi R, et al. Resveratrol content of some wines obtained from dried *Vapolicella* grapes: Recioto and amarone [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 730: 47-52.
- [5] Trella B C, Waterhouse A L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44: 1253-1257.