

polyphenols from sage [J]. *Food Chem*, 2001, 75(2): 197-202.

[11] Khimiya R, Kafuku K, Hata C. Investigation of chemical composition of *Alchemilla vulgaris* [J]. *Biol Chem*, 2000, 66

(2): 79-85.

[12] Richard F, Collins F W, Nagase M. Studies on pharmacological activities of luteolin glucoside [J]. *J Nat Prod*, 1992, 55 (7): 970-973.

反相离子对色谱法测定黄杨木中环维黄杨星 D

谢 昀¹, 于治国^{1*}, 徐新盛², 文艳秋²

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 北京中丰天恒医药技术开发有限公司, 北京 100012)

黄杨木是黄杨科植物小叶黄杨 *Buxus microphylla* Sieb. et Zucc. var. *sinica* Rehd. et Wils. 的茎枝, 明代《本草纲目》中已有记载。黄杨木粉是治疗心血管病的有效药物, 其主要活性成分为甾体生物碱环维黄杨星 D (cyclovirobuxium D), 具有行气活血、通络止痛之功效。目前, 环维黄杨星 D 已从黄杨木及其同属植物中提取分离^[1], 并与其制剂黄杨宁片一起收载于《中国药典》(2005 年版)。黄杨木中环维黄杨星 D 的测定, 目前尚无文献报道。本实验建立了一种反相离子对液相色谱法, 测定了黄杨木中环维黄杨星 D 的量。

1 仪器、试剂与材料

岛津 LC-10ATvp 液相色谱仪, 岛津 SPD-10Avp 紫外检测器, Anashtar 色谱工作站, DT-100 光电天平。环维黄杨星 D 对照品 (质量分数 99.0%, HPLC-MS 归一化法标定, 北京中丰天恒医药技术开发有限公司提供); 黄杨木 (购自浙江, 经沈阳药科大学生药鉴定教研室孙启时教授鉴定); 十二烷基硫酸钠 (Acros Organics, Belgium 公司); 磷酸、三乙胺、氨水、氯仿均为分析纯 (北京化工厂); 甲醇、乙腈均为色谱纯 (Merk 公司), 水 (为二次蒸馏水)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Apollo C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国奥泰公司); 流动相: 0.005 mol/L 十二烷基硫酸钠溶液 (内含 0.15% 三乙胺, 磷酸调节 pH 值至 3.10)-乙腈 (54:46); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 203 nm; 柱温: 45 °C; 进样量: 20 μL。在此色谱条件下, 对照品与样品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备: 取环维黄杨星 D 对照品约 60 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用流动相溶

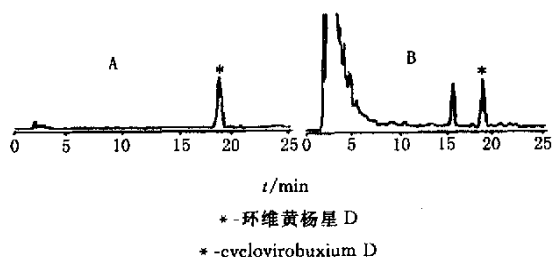


图 1 环维黄杨星 D 对照品(A)和黄杨木(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of cyclovirobuxium D (A) and branch of *B. microphylla*

解并稀释至刻度, 摇匀, 得 1.2 mg/mL 的对照品储备液。精密吸取对照品储备液 2.0 mL, 于 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.24 mg/mL 对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取黄杨木粗粉约 5.0 g, 精密称定, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加浓氨水 5 mL, 拌匀, 静置 30 min。精密加入氯仿 100 mL, 精密称定, 水浴加热回流 3 h, 放冷, 精密称定, 用氯仿补足质量。滤过, 精密吸取续滤液 50 mL, 水浴蒸干, 残渣用 0.5% 醋酸溶液 10 mL 溶解后, 稀氨水调节 pH 值至 7.0, 分别用氯仿 10 mL、醋酸乙酯 8 mL 萃取, 分离收集水相, 水浴蒸干, 残渣用流动相溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 线性范围考察: 分别精密吸取对照品储备液 (1.2 mg/mL) 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀; 进样 20 μL, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度 (mg/mL) 为横坐标 (X), 用最小二乘法计算, 得线性方程为: $Y = 9.09 \times 10^5 X + 8.29 \times 10^3$ ($r = 0.9993$), 环维黄杨星 D 在 0.062~0.62 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取对照品溶液(0.24 mg/mL),连续进样5次,记录环维黄杨星D峰面积,计算其RSD为0.8%($n=5$)。

2.6 重现性试验:精密称取同一批黄杨木粗粉5份,按2.3项方法平行制备5份供试品溶液,分别进样20 μ L,用峰面积按外标法计算环维黄杨星D的量,RSD为1.5%($n=5$)。

2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0、2、4、8、12和24 h进样20 μ L,记录色谱图,结果环维黄杨星D峰面积RSD为1.1%,表明在24 h内溶液稳定。

2.8 加样回收率:取已知量(1.04 mg/g)的黄杨木粗粉约2.5 g,精密称定,共9份,分别加入环维黄杨星D对照品1.24、2.48、3.72 mg(取1.2 mg/mL的储备液1.0、2.0、3.0 mL加入)各3份,按2.3项方法制备供试品溶液,分别进样测定,计算回收率,结果平均回收率为98.12%,RSD为1.18%。

2.9 样品测定:取3批黄杨木样品,制备供试品溶液,分别精密吸取供试品溶液和对照品溶液各20 μ L,进样测定,记录色谱图,用峰面积按外标法计算,结果见表1。

3 讨论

(上接第1662页)

桑白皮总提取物,按公式:收率=提取物质量/药材质量 $\times 100\%$,计算其收率。总黄酮的测定按照本课题组制定方法(另文报道),测定提取物中总黄酮的质量分数,计算总黄酮的实际得量,总黄酮得量=提取物质量 $\times$ 总黄酮的质量分数。经综合分析:以实际提取物中相当于总黄酮的质量为考察结果,用统计分析软件SPSS计算多元回归方程,找出加水量、煎煮时间、聚酰胺用量、乙醇洗脱体积分数和乙醇用量5种因素与提取得到总黄酮的质量(Y)之间的关系。结果 $Y=0.329 X_3+0.188 X_5-0.198$, $r=0.948$ 。可见 X_3 、 X_5 前的系数为正数,表明聚酰胺用量、乙醇用量与综合评分呈正相关。考虑到在具体的10组试验中3号条件下提取得到的总黄酮的质量分数是最高的,同时也考虑到能效的关系。因此,综合分析选择3号试验中的各个试验条件基本为最佳选择,同时适当增加药材的煎煮时间,从而得到本试验中的最佳提取工艺即桑白皮100 g,加12倍量的水浸泡并煎煮1.5 h,滤过,药渣再加10倍量水煎煮1 h,滤过,合并两次水提取液,通过100 g的30~60目聚酰胺色谱柱,用2个保留体积的水洗脱,然后用6

表1 3批黄杨木中环维黄杨星D的测定结果($n=3$)
Table 1 Determination of cyclovirobuxium D in three batches of *B. microphylla* ($n=3$)

批号	环维黄杨星D/(mg $\cdot$ g $^{-1}$)	RSD/%
1	1.04	1.5
2	1.13	1.7
3	1.01	1.0

《中国药典》(2005年版)分别采用非水滴定法和酸性染料比色法测定环维黄杨星D原料及制剂的量,测定的是总生物碱,专属性差。由于环维黄杨星D结构不含双键,笔者曾采用HPLC-ELSD检测,但受检测器对流动相的限制,未能获得理想的色谱系统,色谱峰拖尾严重。经在流动相中加入离子对试剂,在末端吸收203 nm处直接进行紫外检测,色谱条件分离效果良好,色谱峰形对称。

在供试品溶液的制备过程中,曾对甲醇、酸性乙醇、氯仿、石油醚等不同溶媒,超声、回流、索氏提取等不同提取方法进行比较,最终确定碱性条件下氯仿加热回流提取为最佳条件,提取效率高、且干扰少。

Reference:

- [1] Liang B W, Deng C A, Wang X B, et al. Isolation and structural elucidation of *Buxus* alkaloids I, II, III, IV [J]. *Chin Pharm Bull* (药学通报), 1981, 16(4): 3-5.

个保留体积的80%乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,回收乙醇,得桑白皮总黄酮提取物。

按优选方案安排试验,验证5批,桑白皮总黄酮的提取率、总黄酮的质量结果见表2。

表2 桑白皮样品总黄酮的提取结果
Table 2 Results of total flavonoids in *M. alba*

批号	提取率/%	总黄酮/%	总黄酮质量/g
1	4.38	35.43	1.55
2	3.89	34.32	1.34
3	4.02	35.86	1.44
4	3.67	37.28	1.37
5	3.78	35.65	1.35

3 讨论

本实验采用均匀设计法安排试验进行优选,利用多元回归分析确定了桑白皮总黄酮的最佳提取工艺参数,可以为桑白皮总黄酮工业化生产条件提供参考。

References:

- [1] Li J H, Zhang G G, Dong S H. The advancement in the chemical and pharmacological study of *Morus* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20(5): 386-390.
[2] Zeng Z J. *Uniformity Design and Application* (均匀设计及其应用) [M]. Shenyang: Liaoning People's Publishing House, 1994.