

0.5、1.0、2.0、5.0 mL 置于 10 mL 的容量瓶中加入甲醇至刻度,制成不同质量浓度的对照液,分别进样 10 μ L,以色谱峰峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标做线性回归,回归方程为 $Y=657.53 X$, $r=0.9999$ 。结果表明茯苓酸在 0.362~9.050 μ g 与色谱峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取同一样品溶液 10 μ L,连续进样 6 次,以茯苓酸的峰面积计算,其 RSD=2.3%。结果表明:6 次测定的 RSD<2.3%,具有良好的精密性。

2.6 稳定性试验:精密吸取同一样品溶液分别于 1、2、4、8、12、24 h 各进样 10 μ L,以茯苓酸峰面积计算,其 RSD=2.12% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重现性试验:精密称定同一批药材样品 6 份,按样品液制备法制备,各吸取 10 μ L 进样测定,其 RSD=1.12%。结果表明该方法重现性良好。

2.8 回收率试验:精密称取已知量的样品约 1.0 g,分别加入定量的茯苓酸,按照供试品项下规定制备并测定其回收率,其平均回收率为 99.58%,RSD=0.802% ($n=6$)。

2.9 样品测定:取不同产地茯苓皮粗粉按供试样品项下进行操作并测定量,结果表明安徽茯苓中茯苓酸的量最高(0.573 7%),云南茯苓皮次之(0.451%),湖北茯苓皮中茯苓酸量最低(0.322 3%)。色谱图见图 2。

3 讨论

3.1 《中国药典》2000 年版中没有茯苓药材的量测定,本研究采用了流动相乙腈-0.5%磷酸水(70:

30,75:25,80:20)及梯度洗脱的方法,结果表明比流动相为 70:30 时洗脱效果较好,故本实验流动相比为 70:30。

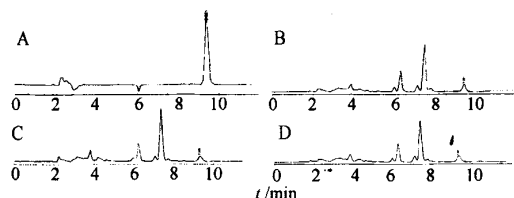


图 2 茯苓酸(A)、安徽产茯苓皮(B)、云南产茯苓皮(C)和湖北产茯苓皮(D)HPLC 图

Fig. 2 HPLC Chromatogram of tumulosic acid (A), Cortex Sclerotii Poriae in Anhui (B), Cortex Sclerotii Poriae in Yunnan (C), and Cortex Sclerotii Poriae in Hubei (D)

3.2 提取方法和提取时间的不同对茯苓酸的提取能力也不一样。结合文献资料和常规提取方法,考察了冷浸提取法,水浴提取法及超声提取法 3 种方法的提取能力。结果表明超声提取法明显优于其他两种提取方法。考察了超声 15、30、45 min 时的提取能力,结果表明超声 15 min 的提取效果与其他两个时间提取效果无明显差异,故超声时间确定为 15 min。

3.3 测定结果表明,不同产地茯苓中茯苓酸的量存在差异,其中安徽茯苓量最高,云南茯苓量较高,应用时为保证质量应注意产地。

References:

- [1] Ling Y K, Yan Z H. *The Chinese Materia Medica* (中药学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific Technical Publishers, 1984.
- [2] Xiao C H. *Chemistry of Chinese Materia Medica* (中药化学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1997.

RP-HPLC 法测定大枣中桦木醇

李 明,李明润,高向耘,王 瑛

(天津市医药科学研究所,天津 300070)

大枣为鼠李科植物 *Ziziphus jujuba* Mill. 的成熟果实,不仅是味美营养丰富的果品,还是一种常用中药,具有补中益气、补脾和胃、益气生津、养血安神等作用。大枣品种较多,化学成分十分复杂。目前国内外学者对大枣化学成分的研究做了大量工作并取得了较大进展^[1,2]。大枣主要含三萜类、皂苷类、生物碱

类、黄酮类、环磷酸腺苷(cAMP)等成分。三萜类成分有一定的药理活性,因此受到广泛关注。中草药中三萜类的 HPLC 分析方法已有报道^[3,4],但是关于大枣三萜中的桦木醇分析方法及其应用却未见详细报道。本研究建立了桦木醇的 RP-HPLC 法,测定了大枣中桦木醇,为大枣药材的质量控制提供了依据。

1 仪器与试药

日本岛津 LC—6A 高效液相色谱仪, SCL—6B 系统控制器, ANASTAR 色谱工作站, LC—6A 输液泵, CTO—6A 恒温柱箱, SPD—6AV 紫外监测器。

桦木醇对照品(自制, HPLC 归一化法计算其质量分数大于 98%), 大枣购于天津市药材公司, 经本所鉴定。

甲醇为色谱纯, 磷酸、乙醇、正丁醇等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 测定波长选择: 应用紫外分光光度计进行色谱扫描, 结果在 213 nm 处桦木醇成分有一个单一吸收峰, 故选择测定波长为 213 nm。

2.2 对照品溶液的制备: 精确称取桦木醇对照品 10 mg 溶于 10 mL 甲醇, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备^[5]: 取去核大枣 20 g、洗净、剪碎、干燥。70%乙醇索氏提取 6 h, 水浴蒸干乙醇, 水饱和正丁醇萃取, 正丁醇饱和氨水洗涤, 蒸干, 甲醇溶解, 得 5 mL 甲醇溶液(即为 4 g/mL), 作为供试品溶液。

2.4 色谱条件: 色谱柱: YWG—C₁₈(250 mm×4.6 mm, 10 μm); 流动相: 甲醇-水-磷酸(88:12:01); 检测波长: 215 nm; 灵敏度: 0.005 AUFS; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 35℃; 进样量为 20 μL。桦木醇对照品及供试品色谱图见图 1。

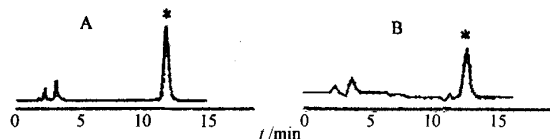


图 1 桦木醇对照品(A)和大枣(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of betulin reference substance (A) and *Z. jujuba* (B)

2.5 线性关系考察: 取桦木醇对照品溶液 0.5、1、2、4、6、8、10 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 以甲醇定容配制成 50、100、200、400、600、800、1 000 μg/mL 对照品溶液, 进样 20 μL。以进样质量为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 553.46X + 4345.1$, $r = 0.9996$, 线性范围为 50~1 000 μg/mL。

2.6 精密度试验: 精确吸取 0.6 mg/mL 桦木醇对照品溶液 20 μL, 连续进样 5 次, 测定峰面积并计算其质量分数的 RSD 为 0.88% ($n=5$)。

2.7 稳定性试验: 精密吸取供试品溶液 20 μL, 分别放置 0、1、2、4、24、48 h 进样, 测定桦木醇峰面积

并计算其质量分数 RSD 为 1.71% ($n=5$)。

2.8 重现性试验: 称取同一批样品 5 份, 按 2.3 项制备试品溶液, 进样 20 μL, 测峰面积并计算其质量分数 RSD 为 1.49% ($n=5$)。

2.9 加样回收率试验: 精确称取含桦木醇 135.10 μg/mg 样品 6 份, 各取 1.6 g 分别精密加入桦木醇对照品 100 μg, 制备供试品溶液, 按色谱条件测定, 结果桦木醇的平均回收率为 101.87%, RSD 为 0.34% ($n=6$)。

2.10 样品测定: 取 4 批大枣, 按 2.3 项制备供试品溶液, 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL 进样, 按上述色谱条件测定, 根据外标法计算桦木醇的质量分数, 测定结果见表 1。

表 1 大枣中桦木醇的测定结果 ($n=4$)

Table 1 Determination of betulin in *Z. jujuba* ($n=4$)

批号	桦木醇/(μg·g ⁻¹)	RSD/%
1	105.73	1.28
2	110.19	2.04
3	123.21	1.66
4	108.26	1.85

6 讨论

本实验提取的桦木醇为五环三萜类化合物, 与皂苷具有同样的母核结构, 故采用《中草药成分化学》中的皂苷提取与分离法进行大枣桦木醇的提取分离。大枣中桦木醇成分是一个极性较大的五环三萜类化合物, 宜采用 C₁₈ 为色谱固定相的反相色谱柱。在常规操作中, 反相高压液相 C₁₈ 柱常用的流动相为甲醇和水。实验中, 经过多次筛选, 最后确定了最适的甲醇-水的比例及流动相最适 pH 值为 4.0。

应用紫外分光光度计进行波长扫描, 结果在 213 nm 处桦木醇成分有最大吸收, 且此处无其他干扰峰, 所以确定检测波长为 213 nm。

桦木醇是大枣中有效的药理活性物质之一, 具抗肿瘤活性^[4]。桦木醇成分是补中益气、养血安神等作用的物质基础, 可作为检测大枣的标识成分。

References:

- [1] Wang B X. *Pharmacology of Modern Chinese Materia Medica* (现代中药药理学) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1997.
- [2] Zheng H Z, Dong Z H, Yu J. *Modern Research in Chinese Herbal Medicine and Application* (中药现代研究与应用) [M]. Beijing: Xueyuan Press, 1998.
- [3] Yuan K, Hu R H, Dong L M. Comparison with content of ursolic acid and oleanolic acid in different season and different place [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1998, 21(10): 519-520.
- [4] Li S Z, Zhang B. The chemistry of *Ziziphus jujuba* manages to study the general situation with the medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1983, 14(10): 39-43.
- [5] Shang M Y, Cai S Q, Li J. Studies on triterpenoids from common fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(10): 655-657.