

RP-HPLC 法测定蓝桉果实总三萜酸中三种三萜酸

刘玉明¹, 吴玉田^{2*}, 柴逸峰², 姜子洋²

(1. 海军医学研究所 新药研究中心, 上海 200433; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

蓝桉 *Eucalyptus globulus* Labill. 为桃金娘科植物, 蓝桉果实作为民间使用的一种中药, 具有治疗感冒发热、抗菌消炎、跌打损伤、抗癌以及治疗真菌引起的皮肤病等作用。本课题组已对蓝桉果实进行过资源调查^[1]、挥发性成分研究^[2], 同时在对蓝桉果实的有效部位化学成分进行研究时发现蓝桉果实富含有三萜酸^[3]。对其提取所得到的总三萜酸 (*Eucalyptus triterpenoid acids*, 简称 ETA) 曾用比色法进行过定量测定^[4], 为了进一步深入研究蓝桉果实中的 ETA, 本实验采用 RP-HPLC 法, 对其中成分明确的 3 种三萜酸——熊果酸、桦木酮酸、白桦脂酸进行了测定。本研究建立了分离效果好、专属性强的高效液相色谱法测定其中的 3 种三萜酸的方法, 结果满意, 可作为蓝桉果实中 ETA 质量控制的指标之一。

1 仪器与试剂

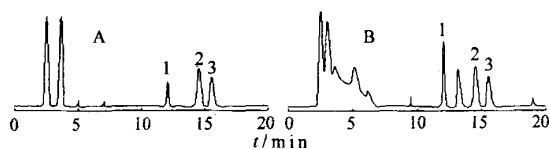
高效液相色谱仪, 包括 Waters 510 泵 (Waters 公司生产), 2487 可见-紫外检测器 (Waters 公司生产), 威玛色谱工作站; Varian Cary-100 紫外分光光度仪 (美国 Varian 公司生产); BUCHIR-200 旋转薄膜蒸发器; SB-3200 超声波清洗仪 (上海必能信超声有限公司); ETA 样品为中试工艺自制; 熊果酸、桦木酮酸、白桦脂酸对照品为自制, 分别经 IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 鉴定, HPLC 检测质量分数 > 99.0%; 乙腈、甲醇为色谱纯。蓝桉果实为资源调查时亲自采集而得, 经第二军医大学生药教研室郑汉臣教授鉴定为桃金娘科植物蓝桉 *E. globulus* Labill. 的果实。

ETA 的制备: 称取蓝桉果实 2 kg, 粉碎, 经石油醚脱脂之后, 加入 95% 乙醇 10 L, 浸泡, 收集渗漉液, 减压回收至质量浓度为 2.5 g/mL。然后经过大孔树脂吸附, 梯度洗脱后, 收集 80% 乙醇洗脱物, 减压回收, 浓缩, 得淡黄色粉末 12.8 g, 即总三萜酸。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Hypersil—C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (81:19); 柱温: 室温; 进样量: 20 μL; 体积流量: 0.8 mL/min; 灵敏度: 1.00 AUFS; 检测波长: 205 nm。

在上述色谱条件下, 所测组分的理论塔板数均大于 3 000, 分离度 > 1.5。所得的对照品、样品的色谱分离图见图 1。



1-白桦脂酸 2-熊果酸 3-桦木酮酸

1-betulinic acid 2-ursolic acid 3-betulonic acid

图 1 对照品(A)及样品溶液(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取对照品熊果酸 12.40 mg、白桦脂酸 6.18 mg、桦木酮酸 5.40 mg, 以流动相定容至 100 mL 作为对照品储备液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取自制 ETA 供试品粉末 1.01 mg, 无水乙醇溶解并稀释, 配制成 100 μg/mL 的溶液, 摇匀, 滤过, 作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察: 精密量取 3 种对照品混合溶液 1、3、5、7、10 mL, 分别用流动相定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀。分别精密吸取上述标准系列溶液 20 μL, 在上述色谱条件下测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标, 以样品质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 熊果酸、白桦脂酸、桦木酮酸的线性回归方程依次为: $Y = 69\,573 X + 27\,482$, $Y = 52\,997 X + 13\,254$, $Y = 40\,230 X - 14\,722$, 线性范围分别为 12.4 ~ 124、6.18 ~ 61.8、5.4 ~ 54.0 μg/mL, 相关系数分别为 0.999 5、0.999 0、0.999 7。

2.5 精密度试验: 精密吸取对照品溶液 20 μL, 重

收稿日期: 2006-07-10

基金项目: “十五”军队重点课题基金资助项目 (01Z064)

作者简介: 刘玉明 (1974—), 男, 山西和顺人, 药学博士, 助理研究员, 主要研究方向为质量标准及中药现代化研究。

E-mail: xiaoliu888627@sohu.com

* 通讯作者 吴玉田 E-mail: wuytk@online.sh.cn

复进样 5 次,以峰面积计算,熊果酸、白桦脂酸、桦木酮酸的 RSD 分别为 2.0%、1.3%、0.8% ($n=5$)。

2.6 重复性试验:精密称取自制 ETA 粉末 1.01 mg,加无水乙醇加热溶解,并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,滤过,同法制备 5 份样品。按 2.1“色谱条件”分别进样 5 次,样品中含熊果酸、白桦脂酸、桦木酮酸的量分别为 7.25%、33.83%、2.42% ($n=5$), RSD 为 1.3%、1.8%、0.8% ($n=5$)。

2.7 稳定性试验:取已经配制好的样品溶液,按 2.1“色谱条件”,分别在 1.0、2.0、4.0、8.0、12.0 h 进样,测定各成分的质量分数,样品中熊果酸、白桦脂酸、桦木酮酸的 RSD 分别为 2.0%、1.9%、1.0% ($n=5$)。说明 3 成分的乙醇溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验:精密量取已测定量的溶液样品 3 份,向每份样品加入 1 mL 熊果酸 (100.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、1 mL 白桦脂酸 (300.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、1 mL 桦木酮酸 (5.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的对照品溶液,然后用流动相定容于 10 mL 量瓶中,待测。精密吸取供试液 20 μL 注入 HPLC 仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,熊果酸、白桦脂酸、桦木酮酸的平均回收率分别为 102.7%、98.4%、100.9%, RSD 分别为 1.1%、0.9%、1.0%。

2.9 样品测定:精密吸取供试品溶液 20 μL 注入 HPLC 仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,测定从 3 个产地蓝桉果实中制备的 ETA 样品,样品中 3 成分结果见表 1。

表 1 样品中 3 种三萜酸测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of three triterpenic acids in samples ($n=3$)

产地	熊果酸/%	白桦脂酸/%	桦木酮酸/%
云南	7.25	33.83	2.42
井冈山	4.20	28.27	3.80
浙江	4.38	30.48	2.20

3 讨论

3.1 检测波长的选择:分别取熊果酸、白桦脂酸、白桦脂酮对照品溶液,在紫外分光光度计上进行扫描,各对照品均在 205 nm 处有最大吸收,在其他波长处无吸收,因此选 205 nm 作为检测波长。

3.2 流动相的选择:取熊果酸、白桦脂酸、桦木酮酸 3 种对照品混合溶液,进样分析。色谱柱采用 Hypersil-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm),当流动相为甲醇-水 (70:30) 时,基本能分离开,但由于甲醇末端吸收较强,基线不平稳且有漂移;之后采用甲醇-水系统的不同比例,峰形和分离度很好,但基线仍不好。改用乙腈-水系统,基线很好,考察了乙腈-水 (70:30) 为流动相,基本分离开,但保留时间较长,白桦脂酸 (21.7 min)、熊果酸 (24.6 min)、白桦脂酮 (26.8 min)。后经过调整比例到乙腈-水 (81:19) 为流动相时,峰形及分离度均较好,故选此为流动相。

3.3 ETA 作为蓝桉果实的主要药用部位,具有明显的药理活性。本实验通过对 ETA 中 3 种三萜酸的测定,可作为蓝桉果实中 ETA 质控指标。

References:

- [1] Liu Y M, Li S F, Wu Y T, et al. Resources investigation of medical plants of *Eucalyptus* L. Herit [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(10): 957-959.
- [2] Liu Y M, Chai Y F, Wu Y T, et al. Determination of chemical constituents of essential oil from the fruit of *Eucalyptus globulus* by GC-MS [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(12): 1160-1162.
- [3] Chen B, Zhu M, Wu Y T, et al. Studies on chemical constituents in fruit of *Eucalyptus globulus* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(9): 596-598.
- [4] Liu Y M, Chai Y F, Wu Y T, et al. Determination of total triterpene of fruit of *Eucalyptus globulus* Labill. in vanillin-glacial acetic acid system by spectrophotometry [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2005, 25(1): 4-6.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975年、1976年、1979年、1985-1994年(80元/年),1995-1997年(110元/年)、1998年(120元/年)、1999年(135元/年)、2000年(180元/年)、2001-2003年(200元/年)、2004年(220元/年)、2005年(260元/年)、2006年(280元/年)。1996年增刊(50元)、1997年增刊(45元)、1998年增刊(55元)、1999年增刊(70元)、2000年增刊(70元)、2001年增刊(70元)、2002年增刊(65元)、2003年增刊(65元)、2004年增刊(65元)、2005年增刊(65元)、2006年增刊(65元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821

传真:(022) 23006821

E-mail: zcyzjb@tjipr.com