

文从醋柳黄酮中提取分离熊果酸并建立了其含量测定方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

岛津 LC-10 A 高效液相色谱仪；SPD-10AV 紫外检测器；N2000 色谱工作站（浙江大学智达信息有限公司）；BP211D 电子天平（德国 Sartorius 公司）；XRC-1 型显微熔点测定仪（四川大学科仪厂制造）；Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS 分光光度计；Bruker Advance 600 MHz 超导核磁共振仪；柱层析硅胶（200~300 目）和薄层层析硅胶 G（青岛海洋化工厂），石油醚（60℃~90℃）、氯仿为工业级，重蒸后使用；高效液相用甲醇等试剂均为色谱纯，水为重蒸水；熊果酸对照品（中国药品生物制品检定所提供，批号 110741~200415，供含量测定用）；醋柳黄酮（四川美大康药业股份有限公司提供）。

1.2 提取分离与结构鉴定

取醋柳黄酮 200 g，依次用 20 倍量的石油醚、氯仿冷浸提取 3 次，每次 6 h，分别合并滤液，减压浓缩为稠浸膏，水浴蒸干。取氯仿部位稠浸膏用硅胶拌样后，上硅胶柱（200~300 目），氯仿-乙酸乙酯梯度洗脱，每 100 mL 收集一瓶，合并 21~28 瓶后，有沉淀析出，经氯仿-甲醇重结晶，得白色粉末状结晶。经氯仿-甲醇重结晶后测熔点为 257℃~259℃，与文献报道的熊果酸熔点一致。Liebermann-Burchard 反应为阳性，能溶于三氯甲烷、甲醇。¹³C-NMR 显示 30 个碳原子的峰，初步推断为三萜类化合物。¹³C-NMR 显示出 7 个甲基、9 个亚甲基、8 个次甲基和 6 个季碳，碳烯 δ 125.6（次甲基峰）和 δ 139.2（季碳峰），另外 ¹H-NMR 中烯氢质子信号 δ 5.23 仅一个氢，表示为环内双键，说明该三萜是 $\Delta^{12(13)}$ 乌苏烷型三萜。¹³C-NMR 中的 δ 179.8 季碳峰，可能为 28 位上羧酸的羰基， δ 78.1 次甲基可能为 3 位上连有羟基。¹H-NMR (MeOD, 600 Hz)：0.78, 0.84, 0.91, 0.97, 1.02 (³H×5, 5CH₃, s), 0.89 (³H, d, J=6.4 Hz, CH₃), 0.98 (³H, d, J=6.2 Hz, CH₃), 3.15 (¹H, dd, J=11.2, 4.6 Hz, H-3 α) 为 3 位氢，5.22 (¹H, t, J=3.5 Hz, H-12) 为 12 位氢，较其余的环上的氢原子向低场位移。在 0.1~2.0 之间有堆积成山型的亚甲基及角甲基的吸收峰信号，为三萜皂苷的 ¹H-NMR 鉴别特征。以及 ¹³C-NMR 中双键碳信号 δ 138.2 (C-13) 和 125.5 (C-12)，示为 $\Delta^{12(13)}$ 乌苏烷型三萜。¹³C-NMR 数据与文献[3]~[4]报道的熊果酸的 ¹³C-NMR 数据一致，故鉴定该化合物为熊果酸。

1.3 醋柳黄酮中熊果酸的 HPLC 含量测定

1.3.1 色谱条件

色谱柱：Diamondsil™（钻石）C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)；流动相：甲醇-8 mmol·L⁻¹四丁基溴化铵溶液-三乙胺 (90 : 10 : 0.2)；流速：1 mL·min⁻¹；柱温：40℃；检测波长：210 nm。结果如图 1 所示。

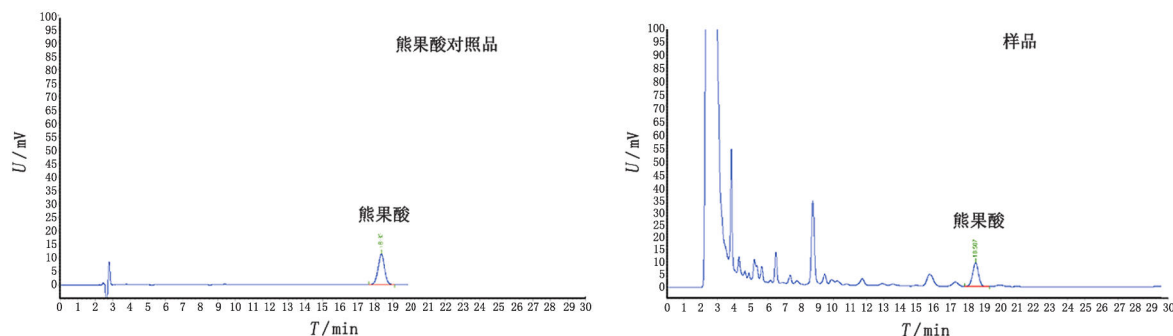


图 1 醋柳黄酮中熊果酸色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of ursolic acid in sea-buckthorn flavonoid solution

1.3.2 供试品溶液的制备

取醋柳黄酮0.1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加氯仿25 mL 超声提取30 min, 滤过, 滤液回收氯仿, 残渣加少量甲醇溶解并转移至10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 即得。

1.3.3 对照品溶液的制备

精密称取熊果酸对照品适量, 加无水乙醇制成 0.59×10^{-3} g/L 的熊果酸溶液, 即得。

1.3.4 标准曲线的制备

分别精密吸取浓度熊果酸对照品溶液1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 15.0 μL 注入液相色谱仪, 测定其峰面积。并以峰面积(Y) 为纵坐标、进样量(X) 为横坐标绘制标准曲线, 得到回归方程: $Y=34\ 818X+2\ 884.8$ 。结果表明: 在上述色谱条件下, 熊果酸在0.59~8.85 μg 范围内, 样品进样量与峰面积线性关系良好。

1.3.5 精密度实验

精密吸取熊果酸对照品溶液10 μL, 按上述色谱条件, 连续进样5次, 测得熊果酸峰面积的相对标准偏差(RSD) 为0.55%。

1.3.6 稳定性实验

取批号为040601的醋柳黄酮样品约0.1 g, 精密称定。照“1.3.2”的方法处理, 分别于0, 1, 2, 4, 8 h 进样, 在给定的色谱条件下测定供试品溶液中熊果酸峰面积, 结果表明: 在8 h 内供试液基本稳定, RSD 为0.98%。

1.3.7 重复性试验

取批号为040601的醋柳黄酮样品约0.1 g, 平行取样6份, 精密称定。照“1.3.2”的方法处理, 在给定的色谱条件下进行测定, 结果熊果酸含量的RSD 为1.21%。

1.3.8 加样回收率

取批号为040601的醋柳黄酮样品6份, 约0.05 g, 精密称定。分别精密加入熊果酸对照品溶液0.35, 0.45, 0.55 mL, 照“1.3.2”的方法处理, 在给定的色谱条件下进行测定, 计算回收率, 结果如表1所示。

表1 醋柳黄酮中熊果酸加样回收率实验结果
Tab.1 Results of ursolic acid recovery rate in sea-buckthorn flavonoid

编号	取样量/g	样品值/mg	加入值/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.048 1	0.243 4	0.206 5	0.443 8	97.50	97.11	1.20
2	0.047 0	0.237 8	0.206 5	0.434 3	95.79		
3	0.050 7	0.256 5	0.265 5	0.512 9	96.44		
4	0.050 9	0.257 6	0.265 5	0.520 8	99.12		
5	0.051 7	0.261 6	0.324 5	0.579 1	97.32		
6	0.051 5	0.260 6	0.324 5	0.575 9	96.47		

1.3.9 样品含量测定

分别取3批醋柳黄酮样品, 照“1.3.2”的方法制备供试品溶液, 在给定的色谱条件下进行测定, 以外标法计算熊果酸含量, 结果如表2所示。

表2 醋柳黄酮样品中熊果酸含量测定结果
Tab.2 Contents of ursolic acid in sea-buckthorn flavonoid

批号	平均含量/mg · g ⁻¹ (n=3)	RSD/%
040601	5.074	0.19
040602	5.491	0.62
040603	5.238	0.84

2 讨论

1) 在流动相的选择中, 文献[5]曾考察甲醇— $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠溶液 (9 : 91)、甲醇—水 (15 : 85)、乙腈—水 (10 : 90) 以及四氢呋喃—水 (8 : 92) 等系统, 结果在流动相为甲醇— $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四丁基溴化铵溶液—三乙胺 (90 : 10 : 0.2), 熊果酸与其他组分均能达到基线分离, 故选其为流动相。

2) 用 HPLC 法测定醋柳黄酮中熊果酸的含量, 该方法精密度、重复性及线性关系良好, 结果灵敏、准确, 可用于醋柳黄酮及其配伍制剂的质量控制。

[参考文献] (References)

- [1] 高彦祥, 崔亚娟. 沙棘中黄酮类化合物的研究进展[J]. 饮料工业, 2006, 9 (1): 17~23.
GAO Y X, CUI Y J. Advances in study on flavonoids in sea buckthorn[J]. The Beverage Industry, 2006, 9(1): 17~23. (in Chinese)
- [2] 黄镜, 孙燕. 熊果酸的抗肿瘤活性[J]. 中国新药杂志, 1997, 6 (2): 23~26.
HUANG J, SUN Y. The anti-tumor activity of ursolic acid[J]. Chinese Journal of New Drugs, 1997, 6(2): 23~26. (in Chinese)
- [3] MAHATO S B, KUNDU A P. ^{13}C -NMR spectra of pentacyclic triterpenoids: a compilation and some salient features [J]. Phytochemistry, 1994(37): 1517~1519. (in Chinese)
- [4] 王毓杰, 张艺, 杜娟, 等. 民族药青刺尖抗炎活性成分的初步研究[J]. 华西药学杂志, 2006, 21 (2): 152~154.
WANG Y J, ZHANG Y, DU J, et al. Study on the anti-inflammatory active constituents of *Prinsepia utilis* [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 21(2): 152~154. (in Chinese)
- [5] 袁珂, 杨中汉. 车前草中熊果酸的超声提取及高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2006, 17 (12): 2466~2467.
YUAN K, YANG Z H. Ultrasonic extraction and determination of ursolic acid by HPLC from *Herba plantaginis* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2006, 17(2): 2466~2467. (in Chinese)