

圆萼刺参中的芦丁, 熊果酸和齐墩果酸的定性定量分析

于瑞涛^{1,2}, 赵晓辉^{1,2}, 梅丽娟¹, 陶燕铎^{*1}, 邵 贇¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 采用薄层色谱法(TLC)和反相高效液相色谱法(RP-HPLC)对藏药材圆萼刺参中的芦丁, 熊果酸和齐墩果酸进行定性和定量的分析。定性分析: TLC法检定芦丁和熊果酸和齐墩果酸成分, 薄层色谱条件是以 V(乙酸乙酯):V(丁酮):V(甲酸):V(水) = 10:5:1:2 为展开剂, 喷以 10 g/L NaNO₂ 的 1% 甲醇溶液在 105 °C 检定芦丁, 以 V(CHCl₃):V(乙酸乙酯) = 1:1 为展开剂, 喷以 V(H₂SO₄):V(甲醇) = 1:2 溶液在 105 °C 检定熊果酸和齐墩果酸。定量分析: RP-HPLC 法测定圆萼刺参中芦丁, 流动相: V(甲醇):V(0.4% H₃PO₄ 溶液) = 38:62; 检测波长 340 nm; RP-HPLC 法测定熊果酸和齐墩果酸, 流动相: V(甲醇):V(0.2% H₃PO₄) 溶液 = 85:15; 检测波长 215 nm; 圆萼刺参中的齐墩果酸, 在本种植物中首次发现。

关键词: 圆萼刺参; 芦丁; 熊果酸; 反相高效液相色谱

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0720(2008)04-018-04

《中华人民共和国卫生部药品标准》(藏药第一册) 1995 年载入的刺参为川续断科 Dipsacaceae 植物白花刺参 *Morina alba* Hand-Mazz. 圆萼刺参 *Morina chinensis* (Bat.) Diels 或青海刺参 *Morina kokonorica* Hao 的干燥地上部分。具有催吐, 健胃的作用, 用于关节痛, 小便失禁, 腰痛, 眩晕和口眼歪斜; 外用治疮疖, 化脓创伤, 肿瘤^[1]。圆萼刺参的化学成分主要为 4-O- α D-呋喃阿洛酮糖- α D-吡喃葡萄糖和芦丁, 积雪草酸, 胡萝卜甙, 芥子醇, 6 α , 23-二羟基熊果酸, 熊果酸及葡萄糖^[2]。芦丁和熊果酸均为圆萼刺参中的主要有效成分之一, 有关文献报道, 芦丁, 熊果酸和齐墩果酸均具有较强的生理、药理活性, 而圆萼刺参中的芦丁, 熊果酸和齐墩果酸的定性定量分析尚未见报道。我们采用 TLC 法对圆萼刺参中芦丁和熊果酸以及齐墩果酸进行了定性分析, 并且采用 RP-HPLC 法进行了定量分析。实验结果表明, 本方法灵敏, 准确, 重现性好, 为进一步开发和利用圆萼刺参奠定了基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters515 高效液相泵, Waters2996DAD 检测器, Waters Empower 色谱工作站, Waters 色谱柱恒温箱, WFT-203B 三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司), 电子分析天平。硅胶 GF254 薄层板(青岛海洋化工), DZKW-C 型电子恒温水浴锅(北京化玻医疗器械公司)。甲醇为色谱纯, 自制重蒸水, CHCl₃, 乙酸乙酯, 甲酸, H₃PO₄ 均为分析纯。芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0080-9705), 熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110742-200415), 齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110709200304), 纯度均大于 98%。圆萼刺参于 2005 年 7 月采自青海省海南兴海县河卡乡海拔 3320 米处, 并经中国科学院西北高原生物研究所潘锦堂教授和梅丽娟工程师鉴定。

* 收稿日期: 2006-11-22; 修订日期: 2007-02-01

基金项目: 中国科学院知识创新领域前沿(CXLY2002-9)项目资助

作者简介: 于瑞涛(1979-), 女, 硕士研究生; E-mail: yuruitao521@163.com

1.2 实验方法

1.2.1 芦丁的鉴别 圆萼刺参地上部分阴干, 粉碎过孔径 0.175 mm 筛。取本品粉末 0.5 g 加甲醇 20 mL, 超声 10 min, 过滤, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使其溶解, 作为供试品溶液。另取芦丁对照品, 加甲醇制成 5 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述供试品溶液和对照品溶液各 5 μ L 点于同一硅胶 G 板上, 以 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{丁酮}) : V(\text{甲酸}) : V(\text{水}) = 10 : 6 : 1 : 2$ 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10 g/L NaNO_2 的 1% 甲醇溶液^[3], 置 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘至显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

1.2.2 熊果酸的鉴别 取圆萼刺参粉末 0.5 g 加乙酸乙酯 10 mL, 超声处理 15 min, 过滤, 滤液蒸干, 残渣加无水乙醇 2 mL 使其溶解, 作为供试品

溶液。另取熊果酸和齐墩果酸适量加无水乙醇制成 1 mg/mL 作为对照品溶液, 吸取上述供试品溶液和对照品溶液各 5 μ L 点于同一硅胶 G 板上, 以 $V(\text{CHCl}_3) : V(\text{乙酸乙酯}) = 1 : 1$ 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 $V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{甲醇}) = 1 : 2$ 溶液, 置 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘至显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品相应的位置上, 显相同紫红色的斑点。紫外光灯 365 nm 显相同橙黄色荧光斑点。

2 结果与讨论

2.1 芦丁测定的色谱条件

2.1.1 芦丁测定的色谱条件 THERMO C_{18} 色谱柱 (4.6 mm i. d. $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相 $V(\text{甲醇}) : V(0.4\% \text{H}_3\text{PO}_4)$ 溶液 = 38 : 62^[3]; 检测波长 340 nm; 见图 1。

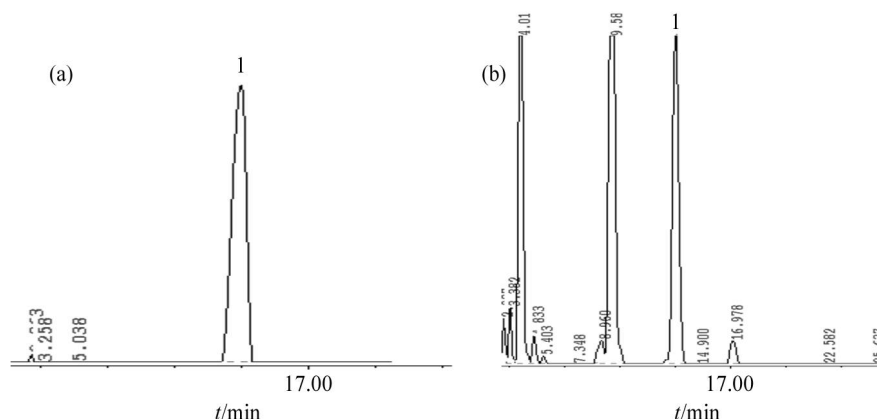


图 1 圆萼刺参 HPLC 图

Fig. 1 High performance liquid chromatogram of Morina chinensis

(a) 芦丁对照品; (b) 圆萼刺参供试品

2.1.2 对照品溶液的制备 准确称取芦丁对照品适量, 加甲醇制成每 80 μ g/mL 芦丁的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 圆萼刺参地上部分阴干, 粉碎过孔径 0.175 mm 筛。称取本品粉末 1.0005 g。置具塞锥形瓶中, 加入 50 mL 体积分数 50% 甲醇, 称量, 超声处理 30 min。放冷, 再称量, 用 50% 甲醇补足减失量, 摇匀, 静置, 取上清液用微孔滤膜 (0.45 μ m) 过滤, 取续滤液^[4]。

2.1.4 线性关系考察 用 25 μ L 微量进样器分别准确吸取 0.08 mg/mL 芦丁对照品溶液 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0 μ L 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以芦丁对照品进样量 (μ g) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果表明, 芦丁在

0.48~1.28 μ g 线性关系良好, 其回归方程为: $y = 9350211m + 77425.26$, $r = 0.9995$ 。

2.2 熊果酸和齐墩果酸测定

2.2.1 熊果酸和齐墩果酸测定的色谱条件

THERMO C_{18} 色谱柱 (4.6 mm i. d. $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相 $V(\text{甲醇}) : V(0.2\% \text{H}_3\text{PO}_4)$ 溶液 = 85 : 15; 检测波长 215 nm; 见图 2。

2.2.2 对照品溶液的制备 准确称取熊果酸和齐墩果酸对照品适量, 加甲醇制成 160 μ g/mL 熊果酸和 32 μ g/mL 齐墩果酸的混标溶液。

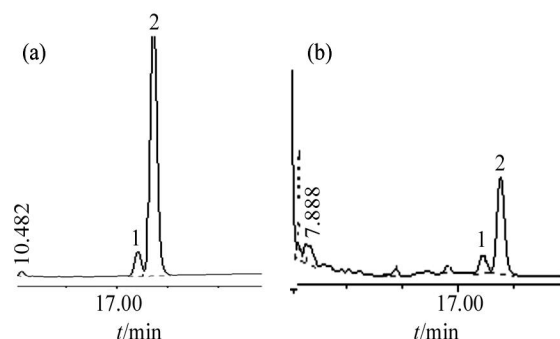


图 2 圆萼刺参 RP-HPLC 图

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of Morina chinensis

1 - 齐墩果酸; 2 - 熊果酸

(a) 熊果酸和齐墩果酸混标溶液; (b) 圆萼刺参供试品溶液

2.2.3 供试品溶液的制备 准确称取本品粉末 1.0008 g。置具塞锥形瓶中, 精密加入无水乙醇 40 mL, 浸泡 12 h。超声处理 30 min。定容于 50 mL 容量瓶中, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 取续滤液。

2.2.4 线性关系考察 用 25 μL 微量进样器分别吸取熊果酸和齐墩果酸混标溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以熊果酸和齐墩果酸对照品进样量 (μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果表明, 熊果酸在 0.32~1.6 μg , 齐墩果酸在 0.064~0.32 μg 线性关系良好。回归方程分别为 $y = 1996719m - 315418$, $y = 4206601.6m - 129896.5$, r 分别为 0.9995 和 0.9991。

2.3 稳定性实验

分别准确吸取同一供试品溶液 5 μL , 于 0, 4, 8, 12, 15 h 测定, 峰面积积分值 RSD 分别为 1.9%, 0.77% 和 1.7%。

2.4 精密度实验

分别准确吸取同一芦丁对照品溶液, 熊果酸和齐墩果酸混标溶液, 各 4 μL , 分别重复进样 5 次。峰面积积分值 RSD 分别为 0.72%, 0.77% 和 2.3%。

2.5 重复性实验

取同一样品 5 份, 分别按定量测定项下方法测定, 记录芦丁, 熊果酸和齐墩果酸峰面积积分值, RSD 分别为 0.86%, 0.95% 和 2.0%。

2.6 加标回收率

分别取 5 份圆萼刺参样品约 0.10 g, 分别准确加入芦丁, 熊果酸, 齐墩果酸对照品, 按样品测定项下方法测定, 平均回收率分别为 99.18%、97.66% 和 95.28%, RSD 分别为 1.4%、1.7% 和 2.5%。

3 结论

在提取芦丁的过程中采用体积分数 50% 甲醇超声法, 甲醇回流法, 甲醇索氏提取法测定, 结果表明, 采用 50% 甲醇超声所得芦丁质量分数最高, 为 0.569%。在提取熊果酸和齐墩果酸的过程中, 采用无水乙醇超声提取和无水乙醇回流提取, 结果表明, 无水乙醇超声提取所得熊果酸和齐墩果酸含量最高, 熊果酸和齐墩果酸质量分数分别为 0.600% 和 0.053%。在提取过程中, 超声法明显优于回流和索氏提取法, 因为回流和索氏提取所用时间较长, 提取方法比较繁琐, 而超声法利用其空化作用^[5], 即一定频率的超声波作用于溶液时, 液体中尺寸适宜的小气泡发生共振现象, 强烈的冲击波使细胞壁破裂, 有效成分溶出^[6]。超声法所用时间短, 得率高, 且设备简单, 操作方便。

在圆萼刺参中检出并测定了齐墩果酸。

在薄层鉴别时熊果酸和齐墩果酸分离不理想, 分析原因, 其一, 可能是二者本是同分异构体, 化学性质相近, 难以分开。这一点在 RP-HPLC 色谱中也有证明。其二, 在圆萼刺参中齐墩果酸的量很少, 所以在样品中出现的紫红色斑点大部分是熊果酸的作用。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 《中华人民共和国卫生部药品标准》(藏药第一册), 1995. 56
- [2] 张国林, 周正质, 李伯刚. 天然产物研究与开发, 1997, 12(9): 10
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2005 年版). 北京: 化学工业出版社, 2005. 36
- [4] 李 琰, 杜 勇, 张小茜. 中国中药杂志, 2006, 31(2): 165
- [5] 郭孝武. 天然产物研究与开发, 1999, 11(3): 37
- [6] 霍丹群, 张 文, 李奇琳等. 中成药, 2004, 12(26): 1063

Qualitative and quantitative analysis of rutin, ursolic acid and oleanolic acid in *Morina chinensis*

YU Rui-tao^{1,2}, ZHAO Xiao-hui^{1,2}, MEI Li-juan¹, TAO Yan-duo^{*1} and SHAO Yun¹ (1. Northwest Plateau of Biology Institute, CAS. Xining 810008; 2. Graduate University of CAS. Beijing 100049), Fenxi Shiyanshi, 2008, 27(4): 18~21

Abstract: Rutin, ursolic acid and oleanolic acid were determined by TLC and RP-HPLC. The qualitative analysis of rutin was performed by TLC under the following conditions: ethyl acetate-butanone-formic acid-water (10:6:1:2), was used as a developing agent and 1% methanol solution containing 1% sodium nitrite was used as a coloring agent at 105 °C. The qualitative analysis of ursolic acid and oleanolic acid were done by TLC with trichloromethane-ethyl acetate (1:1) as the developing agent and the solution of sulfuric acid and methanol (1:2) as the coloring agent at 105 °C. The quantitative analysis for rutin were performed by HPLC on a C₁₈ column with methanol-water (38:62) containing 0.4% phosphate as the mobile phase at a wavelength of 340 nm. The determination of ursolic acid and oleanolic acid was done on a C₁₈ column with methanol-water (85:15) containing 0.2% phosphate as the mobile phase at 215 nm. Oleanolic acid was discovered for the first time in *Morina chinensis*.

Keywords: *Morina chinensis*; Rutin; Ursolic acid; RP-HPLC

(上接第 13 页)

(一) 公司展示了用于扩大样品通量的新型综合性 LC-MS 制药研发流程。新流程将赛默飞世尔 Aria™ LX 多元化(Multiplexing)技术与 QuickQuan™软件整合起来,使用户在高通量 LC-MS 检测中的化合物处理通量提高四倍。该仪器最大化利用单个 MS 检测器创造流水线工作流程,大大提高了药物公司的制药研发速度。赛默飞世尔科技 TSQ Quantum™三重四极杆质谱仪和一台 Aria LX-4 系统能处理和四台单独的 LC-MS/MS 系统一样多的样品。多路 HPLC 系统确保了质谱的最高性能,方便用户在工作效率的同时确保分析的质量及灵敏度。

(二) 公司宣布为其荣誉产品 LTQ Orbitrap® 系列高分辨组合质谱增加电子转移解离(ETD)和基质辅助激光解析电离(MALDI)能力。新 MALDI LTQ Orbitrap 系列产品通过消除样品制备过程简化了完整组织、生物样本和高聚物样本的分析过程。赛默飞世尔科技 ETD 技术为 LTQ Orbitrap XL 增加了高灵敏度翻译后修饰分析能力。ETD 与 LTQ Orbitrap XL 联用组成了最先进的蛋白质组学平台,可以提供三个互补性解离技术,用于蛋白./多肽表征,翻译后修饰(PIM)分析(尤其是磷酸化),及 Top-down 或 Middle-down 的蛋白和多肽序列分析。

(三) 公司宣布推出一种新型高灵敏度组织成像平台,该平台由赛默飞世尔 MALDI LTQ XL™质谱和 ImageQuest™软件组成。新型高灵敏度组织成像平台可使科学家更方便的分析整个组织,生物样本和聚合物样本,而无需复杂的样本制备工作。在 LTQ XL 离子阱质谱中引入 MALDI(基质辅助激光解吸电离)能提供用于消解后的蛋白,多肽和翻译后修饰(PIMs)分析所必须的信息量丰富的质谱图。该组织成像方案能为研究者提供线性离子阱技术无以伦比的灵敏度和无比匹敌的多级质谱 MSn 质谱性能。

(四) 隆重宣布推出了革命性的赛默飞世尔科技外离子源 ITQ™系列气相色谱/质谱联用仪(GC/MS)离子阱质谱。新型 ITQ 700™, ITQ 900™和 ITQ1100™离子阱质谱组成了专为提供高性能和高特异性的完全可升级系统,为常规 GC/MS 系统开发出广泛的应用领域,这些新型 GC/MS 系统切合了环境、食品安全、制药 QA/QC、法医毒物学工业和科学实验室的实际分析需求。

欲获取更多相关信息,请访问 www.thermo.com/hcs.