



别对枳椇子醇提物进行了定性鉴别及含量测定。结果:含量测定中,槲皮素在 1.32 ~ 5.28 μg 线性关系良好 ( $r = 0.999 9$ ),回收率为 98.78 %, RSD 为 1.08 %。结论:TLC 鉴别方法专属性强;含量测定方法精密度高,重复性好,简便快速,可用于枳椇子的质量控制。

[关键词] 枳椇子;槲皮素;质量标准;高效液相色谱法

[中图分类号] R282.5 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2006)05-0538-03

## Quality control of *Hovenia dulcis* Thunb extraction

WEN Wei, ZHANG Hong, ZENG Rong (The Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Wuhan 430060, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To establish a quality standard of *Hovenia dulcis* extraction. **METHODS** The presence of quercetin was identified and assayed by TLC and HPLC, respectively. **RESULTS** Linearity of marker was obtained over the range of 1.32 - 5.28 g ( $r = 0.999 9$ ). The average recovery rate was 98.78 % (RSD was 1.08 %). **CONCLUSION** TLC identification is specific. The assay method is accurate, and suitable for the quality control of *Hovenia dulcis* Thunb.

**KEY WORDS:** *Hovenia dulcis* Thunb; quercetin; quality standard; HPLC; TLC

枳椇子是植物枳椇的带肉质果柄的果实或种子,为鼠李科 (*Rhamnaceae*) 拐枣属 (*Hovenia*) 植物,又名鸡距子、拐枣。具有止渴除烦、解酒毒、镇惊、利尿之功效,用于热病烦渴、呕吐、二便不利、解酒毒。枳椇子醇提取物能提高急性肝损伤小鼠的还原型谷胱甘肽 (GSH) 氧化功能、增强谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 催化的 GSH 结合反应,增加超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (Cat) 活性,拮抗乙醇所致的小鼠急性肝损伤,75 % 乙醇提取物具有明确抗肝纤维化作用<sup>[1-3]</sup>。已从枳椇子中分离得到含有槲皮素等多种黄酮类化合物,可能是其药效部分<sup>[5]</sup>,关于枳椇子的质量控制尚未报道。本研究以槲皮素为对照品,采用薄层层析 (TLC) 法和高效液相色谱 (HPLC) 法对枳椇子进行质量控制,为枳椇子的开发和利用奠定基础。

### 1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦);薄层板为以羧甲基纤维钠为黏合剂的硅胶 G 预制板。槲皮素对照品 (中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号 081-9003);枳椇子药材 (湖北省药材公司,经武汉大学药学院鉴定为鼠李科植物枳椇 (*Hovenia dulcis* Thunb.) 的种子;水为注射用水;乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 TLC 鉴别** 取 3 批枳椇子粗粉各 0.5 g,分别以 75 % 乙醇为溶剂,索氏提取 3.5 h,提取液过滤,减压回收乙醇至无醇味,热水分散,放冷,石油醚 (60 ~ 90) 脱脂 3 次,水液浓缩 80 干燥制成干浸膏,粉碎成细粉。加醋酸乙酯 10 mL,回流提取 2 次,每次 15 min,每次 5 mL。合并醋酸乙酯液,水浴蒸干,残渣

加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取槲皮素对照品,加乙醇制成每 1 mL 含 0.33 mg 的溶液,作为对照品溶液,照薄层层析法<sup>[6]</sup>,吸取上述 2 种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,先以醋酸乙酯-甲酸-水 (8:1:0.8, v/v) 为展开剂,饱和 10 min,展至约 4 cm,取出,晾干;再以甲苯-甲酸乙酯-甲酸 (5:5:2:0.3, v/v) 为展开剂,展至约 10 cm,取出,晾干,喷以 1 % 三氯化铝乙醇溶液,待乙醇挥干后,置紫外光灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上,显相同颜色的荧光斑点,  $R_f = 0.38$ 。

### 2.2 含量测定

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取经五氧化二磷减压干燥器中干燥至恒重的槲皮素对照品 16.5 mg 于 25 mL 量瓶中,加乙醇溶解并稀释至刻度,定容,摇匀,即得 660 mg L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2.2 样品溶液的制备** 取枳椇子粗粉 0.5 g,按 2.1 项下同法操作“..粉碎成细粉”。精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇 25 mL,称定重量,超声处理 (功率 125 W,频率 40 kHz) 15 min,放冷,再称定重量,用乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

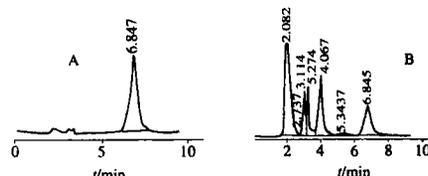


图 1 枳椇子的 HPLC 色谱图

A. 槲皮素对照品; B. 枳椇子供试品

Fig 1 HPLC chromatogram of *Hovenia dulcis* and quercetin

A. reference substance; B. *Hovenia dulcis*

**2.2.3 色谱条件** ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.02 mol L<sup>-1</sup>

磷酸二氢钾(35 65)(用磷酸调节 pH 值为 4.1);检测波长:256 nm;流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:30℃,理论塔板数按槲皮素峰计算不低于 2 500。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加乙醇定容,摇匀,分别取各浓度对照品进样 20 μL,按上述色谱条件依序进样测定,以槲皮素对照品浓度(mg·L<sup>-1</sup>)为横坐标,色谱峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,建立回归方程: $A = 19.23 + 793.01C$ ,  $r = 0.9999$ ,结果表明槲皮素浓度在 1.32 ~ 5.28 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取 660 mg·L<sup>-1</sup>槲皮素对照品溶液 2.0 mL,重复进样 5 次,测得日内 RSD 为 1.30%,隔日再重复进样 5 次,测得日间 RSD 为 2.1%。

2.2.6 重现性试验 取同一批次样品按供试品溶液制备方法处理样品 5 份,依序进样测定槲皮素含量,结果平均含量为 2.67 mg·L<sup>-1</sup>,RSD 为 1.6%。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,依法测定,由峰面积积分值统计结果可见样品溶液在 24 h 内保持稳定,RSD 为 2.7%。

2.2.8 加样回收率试验 精密称定已知槲皮素含量的枳椇子粉末适量,共 5 份,分别以高、中、低 3 个浓度水平准确加入一定量的槲皮素对照品,按上述供试品溶液制备方法和色谱条件进行测定并计算回收率,平均回收率为 98.78%,RSD 为 1.08%。结果见表 1。

表 1 槲皮素含量测定加样回收率(n=5)

Tab 1 Recovery of quercetion(n=5)

试验号	加入量 / mg	测定值 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
1	2.112	2.093	99.10		
2	2.112	2.061	97.59		
3	2.640	2.651	100.4	98.78	1.08
4	2.640	2.605	98.67		
5	3.168	3.109	98.14		

2.2.9 样品的含量测定 取 3 批提取物,按上述供试品溶液制备方法及色谱条件进行测定,以外标法

计算含量,结果槲皮素平均含量为 0.884 mg·g<sup>-1</sup>,并经统计学处理,规定枳椇子药材中槲皮素含量不得少于 0.704 mg·g<sup>-1</sup>。

### 3 讨论

本研究曾对枳椇子药材采用不同溶剂,不同方法进行提取,以干浸膏得率和总黄酮及槲皮素含量为指标,并结合药效学实验结果进行了验证对比,结果表明,枳椇子提取方法以 75%乙醇为提取溶剂,索氏提取法效果较佳。

对槲皮素对照品溶液进行紫外可见光扫描,在 360 nm 和 256 nm 处均有较大吸收,比较相同色谱条件下 360 nm 和 256 nm 波长下的色谱图,检测波长为 256 nm 时的色谱图具有分离度好、灵敏度高、杂质干扰少的优点,因此采用 256 nm 为检测波长。

在枳椇子槲皮素含量测定条件中,流动相中磷酸的加入可抑制黄酮苷酚羟基的电离,改善分离效果,防止拖尾,使峰形尖锐、对称,缩短分离时间;再者,流动相的 pH 值对测定影响显著,采用磷酸调节一系列不同 pH 值的缓冲溶液进样检测,结果显示:pH 值偏大或偏小,分离效果不好,拖尾现象较严重,因此优选 pH 4.1,分离效果好。

### 参考文献:

- [1] Leonie B, Betty W, Albert G, et al. The preferential homing of a platelet derived growth factor receptor-recognizing macromolecule to fibroblast-like cells in fibrotissue[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 66: 1307-1317.
- [2] 张洪, 何文, 李志建. 枳椇子提取物对乙醇所致小鼠肝损伤的拮抗作用[J]. *广东药学院学报*, 2001, 17(3): 180-181.
- [3] 施震, 张洪, 尹银嘉. 枳椇子提取物抗实验性纤维化[J]. *中国医院药学杂志*, 2002, 22(9): 534-536.
- [4] 李克明, 任丽娟. 枳椇子化学成分研究. 黄酮类成分的分离与鉴定[J]. *中草药*, 1999, 30(增刊): 60-60.
- [5] 丁林生, 梁侨丽, 腾艳芬. 枳椇子黄酮类成分研究[J]. *药学报*, 1997, 32(8): 600-602.
- [6] 中国药典. 一部[M]. 2000. 附录. VIB.
- [7] 张洪, 叶丽萍, 张如洪, 等. 枳椇子有效部位的初步研究[J]. *广东药学院学报*, 2003, 19(2): 111-115.
- [8] 胡志林, 刘文娜, 张永军. 枳椇子中总黄酮提取工艺研究[J]. *中成药*, 2004, 26(12): 1065-1067.

[收稿日期]2005-07-03

## 高效液相-质谱法测定大鼠肝组织中黄芩苷浓度

赵绪元, 肖兰, 王峰 (中南大学湘雅二医院临床药理学研究室, 湖南 长沙 410011)

[摘要] 目的:建立用于测定黄芩苷大鼠肝组织中浓度的高效液相-质谱联用分析方法。方法:采用 Thermo C<sub>18</sub>柱(4.6 mm ×

[作者简介] 赵绪元,男,副教授,硕士生导师,电话:0731-8800329 [通讯作者] 肖兰,女,硕士,讲师,电话:0731-4535262,13874976039, E-mail:xl73110@yahoo.com.cn