

壮药大头陈中桦木酸的分离鉴定及含量测定

陆国寿¹, 黄秋洁^{2*}, 叶勇³, 卢文杰^{1,4}, 牙启康¹, 黄伟城³

(1. 广西中医药研究院, 南宁 530022; 2 广西中医药大学, 南宁 530001;

3. 广西医科大学, 南宁 530021; 4. 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022)

[摘要] 目的: 对大头陈中的化学成分进行研究; 采用 HPLC 法对大头陈中桦木酸的含量进行测定。方法: 采用溶剂提取、萃取、硅胶色谱柱分离纯化, 利用色谱技术进行化学结构鉴定; HPLC 法进行含量测定的色谱条件为: 采用 SHISEIDO-SPOLAR C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.2% 磷酸水溶液 (82:18), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 205 nm, 柱温 35 °C。结果: 从大头陈药材中分离得到一化合物, 经鉴定为桦木酸; 桦木酸在 0.048 ~ 0.48 μg 与其峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率 99.84%, RSD 1.35%。结论: 该化合物首次从该植物中分离得到。所建立的 HPLC 简便、准确、重复性好。结果准确可靠, 可用于大头陈中桦木酸的测定。

[关键词] 大头陈; 桦木酸; 球花毛麝香

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2014) 09-0090-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014090090

Separation and Determination of Betulinic Acid in *Adenosma indianum* (Lour.) Merr. by HPLC

LU Guo-shou¹, HUANG Qiu-jie^{2*}, YE Yong³, LU Wen-jie^{1,4}, YA Qi-kang¹, HUANG Wei-cheng³

(1. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Guangxi Nanning 530022, China;

2. Guangxi University of Chinese medicine, Nanning 530001, China;

3. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 4. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of *Adenosma indianum* (Lour.) Merr. and the contents of betulinic acid in *Adenosma indianum* (Lour.) Merr. by HPLC. **Method:** The chemical constituents were isolated by column chromatography over silica gel. The Structures of the compound was elucidated by spectroscopic and chromatographic analysis. SHISEIDO-SPOLAR C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with methanol-0.2% phosphoric acid (82:18) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection wavelength was 205 nm and the column temperature was 35 °C. **Result:** The compound was identified as betulinic acid. The linear response range of betulinic acid were 0.048-0.48 μg, respectively. The average recovery of this compound was 99.84%, RSD 1.35%. **Conclusion:** The betulinic acid was isolated from *Adenosma indianum* (Lour.) Merr. for the first time. This established method in this study is simple, reliable, reproducibile and accurate for the analysis of betulinic acid in *Adenosma indianum* (Lour.) Merr.

[Key words] Datouchen; betulinic acid; *Adenosma indianum* (Lour.) Merr.

[收稿日期] 20130830(009)

[基金项目] 广西卫生厅中医药科技专项 (GZKZ1135)

[第一作者] 陆国寿, 本科, 从事中药化学研究, Tel: 0771-5868986, E-mail: luguoshou@foxmail.com

[通讯作者] * 黄秋洁, 硕士, 从事药剂学研究, Tel: 0771-2328276, E-mail: hqj8@163.com

壮药大头陈为玄参科植物球花毛麝香 *Adenosma indianum* (Lour.) Merr. 的全草,主要分布于广西、云南、广东等地。大头陈壮药名野样夺,具有祛寒毒、除湿热、通谷道的作用,用于治疗贫痧(感冒)、呖疔(疮疔)、货烟妈(咽痛)、疔疖(疔积)和白冻(泄泻)等症^[1]。

为了深入的研究壮药大头陈,充分发掘其药用价值。笔者从大头陈中提取、分离得到了桦木酸,这一化合物在大头陈中首次发现。此外,本实验亦首次采用高效液相色谱法对大头陈中桦木酸含量进行了测定。可考虑作为大头陈的质量控制手段,为壮药大头陈的开发利用提供了现代理论依据。

1 材料

熔点用国产 X-4 型熔点仪; Nicolet 4700FTIR 型红外光谱仪器, Bruker Am-600 MHz 型核磁共振谱仪, Agilent 1100 LC-MSD TRAPSL 型质谱仪, KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司), LC-20A 型高效液相色谱仪岛津, EL204 型 1/万天平, XS205 型分析天平(海特勒托利多仪器有限公司), CD-UPH-II-20L 型超纯水器(成都越纯科技有限公司)。

大头陈药材采于南宁市郊区,经本单位赖茂祥研究员鉴定为玄参科植物球花毛麝香 *Adenosma indianum* (Lour.) Merr. 的全草;桦木酸对照品(自制,经结构鉴定并采用 HPLC 归一化法测定含量大于 98%),HPLC 用试剂为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

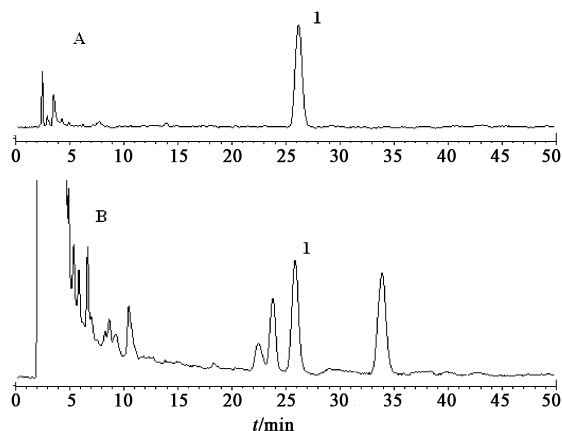
2.1 提取分离 取大头陈药材 3.85 kg 阴干,粉碎,95%乙醇提取 5 次,每次 10 L,滤过,合并药液,浓缩至无醇味,加水适量使其混悬均匀,分别采用依次用石油醚(60~90℃)、三氯甲烷、乙酸乙酯萃取。三氯甲烷部位回收溶剂后得三氯甲烷提取物 54.5 g。进行柱层析硅胶色谱分离,用三氯甲烷-甲醇(98:2→80:20)梯度洗脱,得 247 个流份,第 18~24 流份合并,反复重结晶,得一白色针状结晶(41.2 mg)。

2.2 结构鉴定 白色针状结晶(三氯甲烷-甲醇)。mp.: 315~317℃。IR(KBr) cm^{-1} : 3 413, 2 948, 2 887, 1 725, 1 653。EI-MS m/z 456 $[\text{M}]^+$, 438, 423, 410, 395, 248, 207, 189, 175, 135, 121, 107, 95, 81, 69。¹H-NMR(600 MHz, CDCl_3) δ 4.75(1H, s, H-29), 4.62(1H, s, H-29'), 3.20(1H, dd, $J=11.5, 4.7$ Hz, H-3), 1.71(3H, s, $-\text{CH}_3$), 0.99(3H, s, $-\text{CH}_3$), 0.98(3H, s, $-\text{CH}_3$), 0.95

(3H, s, $-\text{CH}_3$), 0.84(3H, s, $-\text{CH}_3$), 0.77(3H, s, $-\text{CH}_3$)。¹³C-NMR(150 MHz, CDCl_3) δ 178.77(C-28), 150.57(C-20), 109.84(C-29), 79.17(C-3), 56.42(C-17), 55.52(C-5), 50.70(C-9), 49.45(C-19), 47.05(C-18), 42.61(C-14), 40.87(C-8), 39.02(C-4), 38.88(C-1), 38.55(C-13), 37.37(C-10), 37.18(C-22), 34.50(C-7), 32.32(C-16), 30.72(C-15), 29.86(C-21), 28.14(C-23), 27.56(C-2), 25.68(C-12), 21.02(C-11), 19.53(C-30), 18.45(C-6), 16.28(C-25), 16.19(C-26), 15.49(C-24), 14.85(C-27)。以上数据与文献[2-3]一致,鉴定为桦木酸(betulinic acid)。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适应性 色谱柱 SHISEIDO-SPOLAR C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相 甲醇-0.2% 磷酸水溶液(82:18), 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 205 nm, 柱温 35℃, 在此色谱条件下,桦木酸与其他杂质分离良好,理论塔板均计 >3 000,分离度均 >1.5。见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 桦木酸

图 1 大头陈 HPLC 图

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取桦木酸对照品 12.0 mg, 置 50 mL 量瓶, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.240 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品储备液。精密量取对照品储备液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即 0.024 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 大头陈药材粉碎, 过 60 目筛, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 95% 甲醇 50 mL, 精密称定, 超声提取(250 W, 40 kHz) 90 min, 放冷, 精密称定, 用 95% 甲醇补足质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3.4 线性关系的考察 精密吸取上述桦木酸对

照品溶液(0.024 g·L⁻¹)2,6,10,14,18,20 μL,依次进样检测。以桦木酸对照品进样量(X, μg)为横坐标,色谱峰面积(Y)为纵坐标,绘制得标准曲线为Y=6 089 952.7X+1 154.5(r=0.999 9),表明该检测方法和条件下,桦木酸进样量在0.048~0.48 μg与峰面积均呈良好线性关系。

2.3.5 精密密度试验 精密吸取上述对照品溶液,按**2.3.1**项下色谱条件进样10 μL,连续进样6次,以桦木酸峰面积计算,RSD 1.07%,结果表明本法精密密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,按**2.3.1**项下色谱条件,分别在0,2,4,6,8,12 h进样,测定色谱峰面积。以桦木酸峰面积计算。RSD 1.20%。结果表明供试品中桦木酸在12 h内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 取同一批大头陈药材粉末,共6份,每份约1 g,精密称定,照**2.3.3**项下供试品溶液制备方法操作,按**2.3.1**项下色谱条件进样分析,记录峰面积,测定桦木酸的含量。测得桦木酸平均含量为0.991 4 mg·g⁻¹,RSD 1.98%。结果表明,本方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取已知含量(含量为0.991 4 mg·g⁻¹)的大头陈药材粉末6份,每份0.5 g,精密称定,分别精密加入桦木酸对照品溶液(0.240 g·L⁻¹,2.0 mL),按**2.3.3**项下样品溶液制备方法制备,按**2.3.1**色谱条件进样,测定,计算得加样回收率平均值为99.84%,RSD 1.35%(表1)。

表1 桦木酸的加样回收率试验

No.	取样量 /g	样品 中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.502 4	0.498 1	0.972 1	98.75		
2	0.500 9	0.496 6	0.979 7	100.65		
3	0.501 2	0.496 9	0.973 2	99.23		
4	0.506 1	0.501 7	0.972 4	98.06	99.84	1.35
5	0.502 7	0.498 4	0.984 6	101.29		
6	0.501 6	0.497 3	0.982 5	101.08		

注:加入量均为0.480 0 mg。

2.3.9 样品含量测定 取不同采集时间的大头陈药材3批,按**2.3.3**项下方制备供试品溶液,精密吸取对照品溶液和供试品溶液,注入液相色谱仪,依照**2.3.1**项下色谱条件测定,计算含量。3批大头陈药材中桦木酸的含量分别为0.991 4,0.995 1,1.003 1 mg·g⁻¹。

3 讨论

桦木酸具有抗肿瘤、抗艾滋病病毒、抗炎和体外抗疟病作用等多种生物活性^[4-7],符合当今医学重点研究方向,具有一定的研究价值。本实验通过采用溶剂提取、萃取、硅胶色谱柱分离纯化等方式,首次从壮药大头陈药材中得到了桦木酸,为大头陈的深入研究开发提供一个途径。

采用了甲醇-0.2%磷酸体系做为流动相,对甲醇-0.2%磷酸体系的不同比例(70:30,75:25,85:15,82:18)的分离效果进行了考察^[8-10],并综合考虑分离度、对称度、基线分离等因素,确定了最终条件。在此色谱条件下,桦木酸有足够大的峰值,基线噪音小,样品中的桦木酸与其他组分间有较好的分离度。

[参考文献]

[1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准[M]. 第一卷. 南宁:广西科学技术出版社,2008:31.

[2] 成军,梁鸿,王媛,等. 中药鸡血藤化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(12):1153.

[3] Siddiqui S, Hafeez F, Begum S, et al. Oleanderol, A new pentacyclic triterpene from the leaves of nerium oleander[J]. J Nat Prod, 1988, 51(3/4):229.

[4] 张秀娟,凌莉莉,季宇彬,等. 桦木酸生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(3):508.

[5] 张秀娟,马悦,凌莉莉,等. 桦木酸对S180 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡及细胞周期的影响[J]. 中药材,2008,2(31):276.

[6] 黄燕,吴怀恩,韦志英,等. 大头陈挥发油的化学成分分析及其抗菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):79.

[7] 牙启康,卢文杰,陈家源,等. 大头陈的化学成分研究[J]. 华西药学杂志,2011,26(6):519.

[8] 潘萍,贾凌云,孙启时,等. RP-HPLC 测定大叶紫珠中桦木酸的含量[J]. 中国中药杂志,2008,7(33):753.

[9] 高远,许泓瑜,陆震鸣,等. 桦褐孔菌子实体和发酵菌丝体中甾类化合物的定量测定[J]. 色谱,2009,27(6):745.

[10] 朱根华,万彦婷,卢珂,等. 三重四级杆液质联用法测定金樱子中白桦脂酸[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):55.

[责任编辑 顾雪竹]