

瓜蒌子的 TLC 鉴别和 HPLC 含量测定

巢志茂^{1*}, 唐春风², 张贵峰¹, 孙文¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 广西药用植物园, 南宁 530023)

[摘要] 目的: 建立常用中药瓜蒌子的定性定量方法。方法: 以栝楼仁二醇和 α -菠菜甾醇为对照品, 建立瓜蒌子的薄层色谱(TLC)鉴别技术; 以栝楼仁二醇为对照品, 建立高效液相色谱(HPLC)-紫外(PAD)检测的含量测定技术。结果: 12 份瓜蒌子的不皂化物, 均可显示栝楼仁二醇和 α -菠菜甾醇的薄层斑点; 瓜蒌子中栝楼仁二醇的含量介于 0.056 88% ~ 0.087 28%。结论: 栝楼仁二醇作为瓜蒌子的有效成分, 可以作为瓜蒌子质量标准的一个重要指标。建议中药瓜蒌子中栝楼仁二醇的含量不得低于 0.05%。

[关键词] 瓜蒌子; 栝楼仁二醇; 薄层色谱; 高效液相色谱; 栝楼

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0086-03

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1746.038.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:46

TLC Identification and HPLC Assay on Trichosanthis Semen

CHAO Zhi-mao^{1*}, TANG Chun-feng², ZHANG Gui-feng¹, SUN Wen¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the methods of qualification and quantitation about Trichosanthis Semen, one of the commonly used Chinese material medica. **Method:** The thin-layer chromatography (TLC) method was found with the reference substance both karounidiol and α -spinasterol. The HPLC method was found with the PAD and the reference substance of karounidiol. **Result:** The unsaponifiable matter from all 12 Trichosanthis Semen samples showed the spots of both karounidiol and α -spinasterol on a TLC plate. The content of karounidiol in all 12 Trichosanthis Semen samples was 0.056 88% - 0.087 28%. **Conclusion:** Karounidiol, one of the active components of Trichosanthis Semen, can be considered as an important index of the quality standard of Trichosanthis Semen. The content of karounidiol was suggested not less than 0.05% in Trichosanthis Semen.

[Key words] Trichosanthis Semen; karounidiol; TLC; HPLC; *Trichosanthes kirilowii*

栝楼仁二醇系从葫芦科植物栝楼^[1-2]和双边栝楼^[3]的种子中获得的具有独特骨架的五环三萜类化合物, 化学结构为(3 α , 13 α , 14 β , 20 α)-3, 29-二羟基-13-甲基-26-去甲齐墩果二烯-7, 9(11)^[4], 在每耳 0.4 mg 的剂量时对 1 μ g 12-O-十四烷酰佛波醋酸酯-13 诱导的小鼠耳部炎症具有 50% 的体内抑制活

性, 在 2 μ mol 剂量时就能显著地抑制 7, 12-二甲基苯并蒽引起的小鼠皮肤肿瘤生长^[5]。栝楼仁二醇的药效活性与瓜蒌和瓜蒌子具有清热、散结的功能和对肺热、乳痈、肺痈的主治^[6]相符, 可以认为是瓜蒌子的活性成分之一。同时, 通过对油性中药的比较认为, 栝楼仁二醇对中药瓜蒌子具有特征性^[7]。因此, 制定栝楼仁二醇的定性定量技术对于评价中药瓜蒌子的质量具有实用价值。另外, α -菠菜甾醇也是栝楼和双边栝楼种子中的主要化学成分之一^[2-3], 对瓜蒌子的鉴别具有一定的意义^[7]。本文以栝楼仁二醇和 α -菠菜甾醇为对照品建立了瓜蒌子的薄层鉴别技术, 并建立了瓜蒌子中栝楼仁二醇

[收稿日期] 20120227(003)

[基金项目] 中医药行业 2011 年科研专项(201107009)

[通讯作者] * 巢志茂, 研究员, 博士生导师, 从事中药化学和分析研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: chaozhimao@yahoo.com.cn

的含量测定技术。

1 仪器与试剂

Waters 996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),PAD 检测器,Millennium 32 记录软件。上海医疗器械五厂 H. H. S11-2B 型电热恒温水浴锅,上海益恒实验仪器有限公司 DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海科贺生化技术有限公司 KH-1500 型薄层扫描摄影仪,Tstar Work Station V2.0 图像处理系统,摄影参数为亮度 108、对比 147、色饱和度 226。

高效液相所用优级纯甲醇、石油醚(60~90℃)、甲醇、乙醚、醋酸乙酯和盐酸均由北京化工厂生产,氢氧化钾由北京化学试剂公司生产,磷钼酸为天津市津科精细化工研究所生产,硅胶 H 由青岛海洋化工有限公司生产,均为分析纯。栝楼仁二醇、 α -菠菜甾醇系从瓜蒌子的不皂化物中分离获得并鉴定的化学成分^[2-3]。经分析,栝楼仁二醇样品的纯度为 98.37%。

瓜蒌子为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 或双边栝楼 *T. rosthornii* Harms 的干燥成熟种子,经中国中医科学院中药研究所巢志茂研究员鉴定,见表 1。

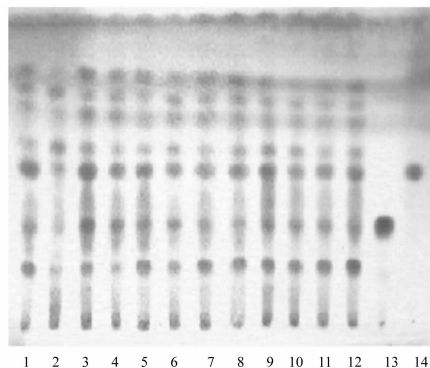
表 1 瓜蒌子样品中栝楼仁二醇的含量

产(购)地	植物学名	商品/生药	100 g 栝楼仁 二醇含量/mg
山东省长清县	栝楼	生药	80.34
福建省福州市	栝楼	商品	87.28
北京市东城区	栝楼	生药	86.86
广西桂林市	栝楼	商品	68.72
吉林省抚松县	栝楼	商品	74.04
重庆市	栝楼	商品	56.88
上海市	栝楼	商品	57.54
江苏省南京市	栝楼	商品	68.33
四川省峨眉山市	双边栝楼	商品	74.59
贵州省盘县特区	双边栝楼	生药	81.30
云南省昭通市	双边栝楼	商品	73.78
湖北省巴东县	双边栝楼	生药	74.12

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别 取瓜蒌子药材粉末(20 目筛)1.0 g,加 5% KOH-MeOH(W/V)溶液 20 mL,置水浴上加热回流 3 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水 20 mL 使溶解,水溶液用乙醚提取 3 次,每次 10 mL,合并乙醚液,用水洗涤 3 次,置水浴上蒸干,残渣加醋酸乙酯 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取栝楼仁二醇、 α -菠菜甾醇对照品,分别加醋酸乙酯制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版附录 VI B)试验。吸取上述 3 种溶液各 5 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素

钠为黏合剂的硅胶 H 薄层板上,以石油醚(60~90℃)-醋酸乙酯(2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 磷钼酸乙醇溶液,在 105℃ 烘至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。结果见图 1。

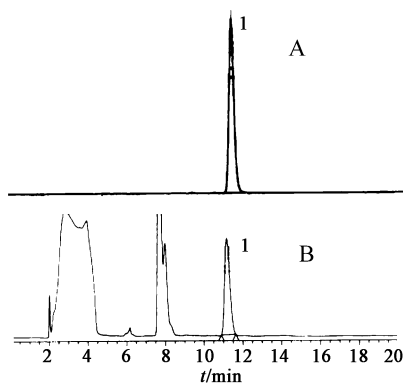


1. 云南省昭通市;2. 四川省峨眉山市;3. 江苏省南京市;
4. 上海市;5. 贵州省盘县特区;6. 广西桂林市;
7. 吉林省抚松县;8. 山东省长清县;9. 湖北省巴东县;
10. 重庆市;11. 福建省福州市;12. 北京市东城区;
13. 栝楼仁二醇;14. α -菠菜甾醇

图 1 瓜蒌子样品的薄层色谱

2.2 栝楼仁二醇的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil-C₁₈ ZY110A (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相甲醇-水(97:3),流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 239 nm,柱温 40℃,进样量 10 μ L。对照品和瓜蒌子样品分离的色谱图见图 2。



1. 栝楼仁二醇

图 2 对照品(A)、瓜蒌子供试品(B)的 HPLC

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定栝楼仁二醇对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.533 0 mg 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 瓜蒌子样品粉碎(过 20 目筛),60℃ 干燥 6 h,取粉末 10 g,精密称定,置 150 mL 平底烧瓶中,加入 5% KOH-MeOH 溶液 100 mL,称定质量,置 75℃ 水浴中加热回流 1 h,放冷,

再以 5% KOH-MeOH 溶液补足失重, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 50 mL, 回收至干, 加蒸馏水 100 mL 使溶解并全部转移至 200 mL 分液漏斗中, 用蒸馏水饱和的 AcOEt 萃取 4 次 (40 mL × 1, 30 mL × 3), 合并 AcOEt 液。AcOEt 层以蒸馏水洗涤 3 次 (10 mL × 3) 后, 蒸干。残渣加 MeOH 溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加入 1 mol · L⁻¹ HCl 溶液 0.1 mL, 以甲醇定容, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL, 进样, 按 2.2.1 色谱条件测定峰面积。以峰面积 (Y) 为纵坐标, 进样质量 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程为 $Y = 1.622 \times 10^9 X + 5.0263 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), 进样量在 1.066 ~ 5.330 μg 与峰面积线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL, 连续进样 7 次, 测定栝楼仁二醇峰面积值, 其 RSD 0.547% ($n = 7$)。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 室温放置, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 测定栝楼仁二醇峰面积, 其 RSD 2.53%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一供试品 (山东省长清县生药) 粉末 6 份, 按上述供试品溶液的制备方法制备 6 份供试品溶液, 分别进行测定, 测得栝楼仁二醇平均含量为 0.08034%, RSD 0.635%。

2.2.8 加样回收率试验 取 2.2.7 项下的瓜蒌子样品粉末 6 份, 每份约 5.0 g, 精密称定, 分别加入栝楼仁二醇对照品 3.125 mg, 按供试品溶液处理并测定栝楼仁二醇含量, 结果平均加样回收率为 100.22%, RSD 1.91%, 见表 2。

表 2 瓜蒌子中栝楼仁二醇的加样回收率 ($n = 6$)

称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
5.0002	4.017	3.175	7.202	100.31	100.22	1.91
4.9997	4.017	3.161	7.141	98.83		
4.9995	4.017	3.139	7.104	98.34		
5.0000	4.017	3.041	7.040	99.41		
4.9995	4.017	3.108	7.150	100.80		
4.9999	4.017	3.127	7.258	103.65		

2.2.9 检测限 将 0.1022 g · L⁻¹ 栝楼仁二醇甲醇溶液逐次稀释, 在选定的色谱条件下, 测得色谱峰高度为噪音峰的 3 倍高度时, 确定检测限为 20.44 ng ($S/N = 3$)。

2.2.10 样品含量测定 按 2.2.3 项方法制备供试

品溶液, 在 2.2.1 色谱条件下测定, 以峰面积代入回归方程中计算栝楼仁二醇的含量, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 TLC 鉴别 从图 1 可以看出, 在与栝楼仁二醇、α-菠菜甾醇相同的位置上, 全部瓜蒌子样品均显示相同颜色的斑点。说明用栝楼仁二醇、α-菠菜甾醇进行中药瓜蒌子的鉴别是切实可行的。

3.2 HPLC 含量测定条件的选择 在样品溶液的制备中, 我们对药材与 5% KOH-MeOH 溶液的比例 (1:10, 2:10)、KOH 的浓度 (2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% KOH-MeOH)、皂化反应的时间 (0.5, 1, 2, 3, 4, 5 h)、不皂化物的萃取溶剂 (AcOEt, Et₂O) 和不皂化物的处理方法 (不同温度放置、不同酸碱度定容) 进行了全面的考察, 从而确定了最佳的样品前处理过程。

3.3 HPLC 含量测定 栝楼仁二醇的含量测定试验结果表明, 我们建立了瓜蒌子有效成分栝楼仁二醇的 HPLC-PAD 含量测定技术。运用该技术, 对全国有代表性的 12 个产地和来源的瓜蒌子样品进行了栝楼仁二醇的含量测定。测定结果为栝楼仁二醇的含量在 56.88 ~ 87.28 mg · (100 g)⁻¹。建议对瓜蒌子药材的定量标准为栝楼仁二醇 (C₃₀H₄₈O₂) 的含量不得少于 0.05%。

[参考文献]

- [1] Akihisa T, Tamura T, Matsumoto T. Karounidiol [D:C-friedo-oleana-7,9(11)-diene-3α,29-diol] and its 3-O-benzoate: novel pentacyclic triterpenes from *Trichosanthes kirilowii*. X-ray molecular structure of karounidiol diacetate [J]. J Chem Soc Perkin Trans I, 1988 (3):439.
- [2] 巢志茂, 何波, 张颖, 等. 栝楼种子中不皂化类脂的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35(11):733.
- [3] 巢志茂, 何波. 双边栝楼种子中不皂化类脂的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2001, 36(3):157.
- [4] Chao Z M, Wang C. Extraction and crystal structure of karounidiol [J]. Chinese J Struct Chem, 2003, 22 (4):431.
- [5] Yasukawa K, Akihisa T, Tamura T, et al. Inhibitory effect of karounidiol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion [J]. Biol Pharm Bull, 1994, 17(3):460.
- [6] 中国药典. 一部 [S]. 2010:104.
- [7] 巢志茂, 张楠, 唐春风, 等. 36 种油性中药不皂化物的薄层色谱鉴别研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):79.

[责任编辑 顾雪竹]