

# 分光光度法测定山茱萸及其保健酒中三萜酸的含量

杨剑芳<sup>1</sup>, 路福平<sup>1,\*</sup>, 黄明勇<sup>2</sup>, 高文远<sup>3</sup>, 杜连祥<sup>1</sup>

(1.天津工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;

2.泰达生态园林发展有限公司, 天津 300457; 3.天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

**摘要:** 以熊果酸为标准品, 5% 香草醛-冰醋酸、高氯酸为显色剂, 用紫外-可见分光光度法在 538nm 处测定山茱萸及其保健酒中三萜酸的含量。结果表明, 熊果酸的线性范围为 26.4~158.4 μg, 回归方程为  $A=0.0071C-0.0941$  ( $R^2=0.9994$ ), 平均回收率为 98.94%, RSD 为 2.31% ( $n=5$ ); 山茱萸及其保健酒中三萜酸含量分别为 2.511%、2.091%。该方法简便、快捷、重复性好, 适合于山茱萸及其保健酒中三萜酸的含量测定。

**关键词:** 山茱萸; 山茱萸保健酒; 三萜酸; 紫外-可见分光光度法

## Determination of Triterpenoidic Acid in *Cornus officinalis* and Its Health Wine by Spectrophotometry

YANG Jian-fang<sup>1</sup>, LU Fu-ping<sup>1,\*</sup>, HUANG Ming-yong<sup>2</sup>, GAO Wen-yuan<sup>3</sup>, DU Lian-xiang<sup>1</sup>

(1.Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2.Tianjin TEDA Eco-landscaping Development Co. Ltd., Tianjin 300457, China;

3.School of of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** Based on ursolic acid as reference standard and 5% vanillin-acetum and perchloric acid as color developer, the contents of triterpenoidic acid in *Cornus officinalis* and its health wine were determined by spectrophotometry at 538 nm. The results showed that in the range of 26.4 to 158.4 μg for ursolic acid, the linear correlation equation is  $A=0.0071C-0.0941$  ( $R^2=0.9994$ ) and the average recovery rate is 98.94%, with RSD 2.31% ( $n=5$ ); The contents of triterpenoidic acid in *Cornus officinalis* and its health wine are 2.511% and 2.091% respectively. This method is fast, accurate, reliable and suitable for determination of triterpenoidic acid.

**Key words:** *Cornus officinalis*; health wine of *Cornus officinalis*; triterpenoidic acid; spectrophotometry

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0321-03

山茱萸是山茱萸科植物山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc)除去果核的干燥成熟果肉, 始载于《神农本草经》, 又名蜀枣、药枣、山萸肉、枣皮、肉枣等, 列为中品, 具有补益肝肾、收敛固涩的功效, 用于眩晕耳鸣、肝虚寒热等症。《中国药典》各版均有收载, 并被列入了国家保健食品药食兼用的大名单之中。除药用外, 现已开发成山茱萸酒、山茱萸营养饮料、山茱萸果茶<sup>[1-3]</sup>, 山茱萸果脯蜜饯、果酱和罐头<sup>[4]</sup>等多种功能食品。三萜酸类广泛地存在于自然界, 且有广泛的生物活性, 如抗炎、抗肿瘤、抗菌和抗病毒, 以及降胆固醇、降血糖、调节免疫、杀软体动物活性等<sup>[5]</sup>。目前报道的山茱萸中的三萜类成分有熊果酸(又名

乌苏酸、乌索酸)、齐墩果酸(又名庆四素或土当归酸), 和白桦脂酸(又名桦木酸), 三者均为五环三萜酸, 都是山茱萸中的有效成分。本实验采用紫外-可见分光光度法<sup>[3]</sup>测定山茱萸及其保健酒中总三萜酸的含量。作为控制山茱萸药材及其保健酒质量的依据之一, 并为山茱萸保健酒的功能评价提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

山茱萸药材 购自河南安阳。经天津大学药学院高远教授测定, 符合《中华人民共和国药典》2005年版

收稿日期: 2007-07-02

作者简介: 杨剑芳(1971-), 女, 博士研究生, 研究方向为生物制药。E-mail: hmy5219@sina.com

\* 通讯作者: 路福平(1967-), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物工程。E-mail: lfp@tust.edu.cn

一部相关项下规定;葡萄酒活性干酵母 VL3 购自法国。

熊果酸标准品(ursolic acid, 批号 110742-200415)中国药品生物制品检定所;所用试剂均为分析纯。

核酸分析仪 日立公司;GB204 电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司;SB25-120 超声清洗机 宁波新芝生物科技有限公司;数显电热恒温水浴锅 金坛市金城国胜实验仪器厂。

## 1.2 方法

### 1.2.1 熊果酸标准品溶液的制备

精密称取熊果酸标准品 2.2mg, 置 25ml 量瓶中, 用无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得每 1ml 含 0.088mg 的熊果酸标准品溶液。

### 1.2.2 山茱萸药材供试品溶液的制备

取山茱萸粗粉约 0.4g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加乙醚适量, 加热回流提取 4h, 提取液回收乙醚至干, 残渣用石油醚(30~60℃)浸泡 2 次, 每次 15ml(约浸泡 2min), 倾去石油醚, 残渣加无水乙醇-氯仿(3:2)混合液微热使溶解, 转移至 100ml 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 作为山茱萸药材回流提取供试品溶液<sup>[7]</sup>。

取山茱萸粗粉约 0.4g, 精密称定, 于具塞烧瓶中, 精密加入氯仿 100ml 超声处理 30min, 取出, 过滤, 滤液回收氯仿至干, 15ml 石油醚(30~60℃)浸泡脱脂约 2min, 倾去石油醚, 重复一次后残渣用甲醇溶解, 定容至 100ml, 作为山茱萸药材氯仿超声提取供试品溶液<sup>[7]</sup>。

取山茱萸粗粉约 0.4g, 精密称定, 于具塞烧瓶中, 精密加入 100ml 无水乙醇, 称定重量, 超声波振荡 30min(水温过热换水), 放冷, 用无水乙醇补足减失的重量, 取适量离心, 上清液作为山茱萸药材无水乙醇超声提取供试品溶液<sup>[8]</sup>。

### 1.2.3 山茱萸保健酒供试品溶液的制备

山茱萸肉经浸泡压榨后加 Viscozyme L(诺维信戊聚糖复合酶)40~50℃保温 2h, 分离得果汁, 用 SO<sub>2</sub> 处理后加入经活化的葡萄酒活性干酵母 VL3, 加糖降酸, 20℃发酵, CO<sub>2</sub> 失重平衡后结束发酵, 再进行澄清、调配和成分调整制得的山茱萸保健酒, 适量稀释, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作山茱萸保健酒供试品溶液。

### 1.2.4 确定测定波长供试品的制备

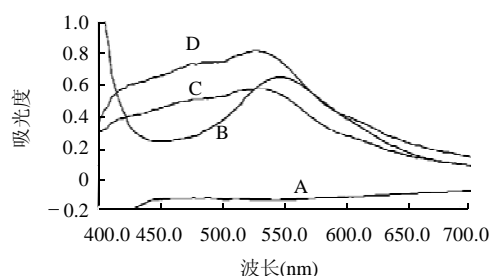
取一定量熊果酸标准品溶液、山茱萸药材无水乙醇超声提取供试品溶液和山茱萸保健酒供试品溶液于具塞试管中, 挥去溶剂; 依次加入 0.2ml 新配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 0.8ml 高氯酸, 摇匀, 于 60℃水浴上加热 15min; 取出, 冰水冷却, 加入 5ml 冰醋酸, 摇匀, 即得供试品溶液; 同时取一定量的山茱萸药材无水乙醇超声提取供试品溶液, 不加显色剂 5% 香草醛-冰

醋酸溶液和高氯酸, 同法制得空白对照溶液。以未加供试品但加显色剂 5% 香草醛-冰醋酸溶液和高氯酸制得的供试品调基线, 于波长 400~700nm 内扫描, 确定最佳的测定波长。

## 2 结果与分析

### 2.1 测定波长的确定

由各供试品的可见光吸收图知, 熊果酸标准品溶液在 545~548nm 处有最大吸收, 山茱萸药材及山茱萸保健酒供试品溶液在 530~532nm 处有最大吸收。综合来看, 538nm 处均有较理想的吸收, 故以 538nm 为测定波长, 空白无干扰, 测得的结果以熊果酸为基准计算总三萜酸的含量。



A. 空白对照; B. 熊果酸标准品; C. 超声样品; D. 保健酒样品。

图1 供试品可见光吸收图

Fig.1 Absorbance curve of samples

### 2.2 线性关系考察

分别精密量取熊果酸标准品溶液 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8ml 于具塞试管中, 挥去溶剂。按显色条件显色, 35min 后测定吸光度, 建立的回归方程为  $A = 0.0071C - 0.0941$ ,  $R^2 = 0.9994$  ( $n = 6$ )。在 26.4~158.4 μg 范围内, 熊果酸标准品显色后的吸光度(A)与取样量(C)的线性关系良好。

### 2.3 稳定性实验

取山茱萸药材无水乙醇超声提取供试品溶液适量于具塞试管中, 挥去溶剂, 按显色条件显色后每 5min 测定一次吸光度, 测定至显色后 80min, 结果见图 2。结果表明, 三萜酸显色后 0~35min 内的吸光度变化较大, 其 RSD 为 7.48%, 而在 35~80min 内基本稳定, RSD 为 2.46%。由此可见样品必须在显色 35min 后测定吸光度。

### 2.4 精密度实验

取熊果酸标准品溶液于具塞试管中, 挥去溶剂。按显色条件显色, 35min 后连续测定吸光度 5 次, RSD 为 0.61%。

### 2.5 重现性实验

取同一批山茱萸药材, 按 1.2.2 制备山茱萸药材无水乙醇超声提取供试品溶液 5 份, 置具塞试管中, 挥去溶剂, 显色 35min 后测定吸光度, RSD 为 2.84%。

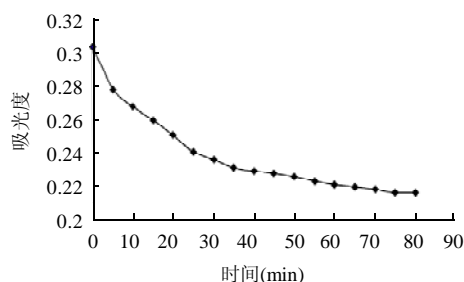


图 2 显色后测定时间的确定  
Fig.2 Determination of time after coloring

## 2.6 加样回收率实验

取已知含量的山茱萸粗粉 5 份约 0.2g, 分别添加一定量的熊果酸标准品, 按 1.2.2 制备山茱萸药材无水乙醇超声提取供试品溶液, 挥去溶剂, 显色后 35min 测定吸光度。平均回收率为 98.94%, RSD 为 2.31%, 结果见表 1。

表 1 熊果酸加样回收率实验  
Table 1 Recovery rate of spiked ursolic acid

实验号	1	2	3	4	5
药材中三萜酸含量(mg)	4.591	4.415	4.488	4.685	4.606
添加熊果酸的量(mg)	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
实测三萜酸的量(mg)	5.213	5.058	5.142	5.311	5.227
回收率(%)	97.19	100.47	102.19	97.81	97.03
平均回收率(%)	98.94				
相对标准偏差(%)	2.31				

## 2.7 样品含量测定

### 2.7.1 样品含量测定方法的确定

三种不同的方法制备的供试品溶液, 用索氏提取器提取者含三萜酸 0.583%(n=3), 用氯仿超声提取的为 0.283%(n=3), 用无水乙醇超声提取的为 2.644%(n=3) 无水乙醇超声提取的供试品三萜酸含量最高, 故用无水乙醇超声提取制备样品。

### 2.7.2 超声提取时间考察

精密称取山茱萸粗粉约 0.4g, 于具塞烧瓶中, 精密加入 100ml 无水乙醇, 称定重量, 分别超声波振荡 15、30、45、60min(水温过热换水), 放冷, 用无水乙醇补足减失的重量, 取适量离心, 上清液作为供试品溶液, 测定吸光度。超声波振荡 15、30、45、60min 的三萜酸含量分别为 2.080%、2.184%、2.615%、2.616%。可知超声 60min 时三萜酸提取率最高, 但超声提取 45min 的提取率达超声 60min 的 99.96%, 故超声提取时间定为 45min(n=3)。

### 2.7.3 山茱萸药材和山茱萸浸泡酒中三萜酸含量测定

取三批山茱萸药材粗粉适量, 精密称定, 依法用无水乙醇超声提取制备供试品; 精密量取三批山茱萸保健酒适量制备供试品, 依法测定, 计算三萜酸的含量。

山茱萸药材中三萜酸含量均值为 2.511%(n=3), 山茱萸保健酒中均值为 2.091%(n=3)。

## 3 讨论

3.1 此外 - 可见分光光度法测定总三萜酸含量作为山茱萸药材及其制品的质量控制标准之一。《中国药典》<sup>[6]</sup> 用薄层扫描的方法测定其中熊果酸的含量作为山茱萸药材的质量控制标准, 但实验发现, 在薄层板上应用此条件无法将熊果酸和齐墩果酸分离开, 由此测得的熊果酸含量实际为熊果酸与齐墩果酸含量的总和。欲用高效液相法分别测定熊果酸和齐墩果酸的含量以作为山茱萸质量控制指标之一, 但二者为差向异构体, 性质极为相近, 测定难以实现。曾参照文献尝试用甲醇 - 水、甲醇 - 水 - 酸、甲醇 - 水 - 酸 - 三乙胺, 乙腈 - 水、乙腈 - 水 - 酸、乙腈 - 磷酸二氢钠、甲醇 - 乙腈 - 水 - 酸、甲醇 - 乙腈 - 水 - 乙酸胺等多种流动相以不同流速进行分离, 二者的保留时间基本一致。以熊果酸和齐墩果酸标准品溶液等量混匀后注入, 仅现一个略宽的吸收峰, 因此认为用高效液相色谱紫外检测器分离这二者有很大难度。高效液相色谱蒸发光散射检测器可同时测定齐墩果酸和熊果酸含量, 但生产和科研中这种检测器并未普及。另一方面, 熊果酸和齐墩果酸在天然植物中似乎共生共存。因此以熊果酸为标准品, 用宏观、简便、快捷、适于生产在线检测的紫外 - 可见分光光度法<sup>[6]</sup> 测定山茱萸中总三萜酸的含量不仅可作为山茱萸药材及其制品质量控制和功能评价的标准之一, 也可为山茱萸相关制剂的生产工艺监控提供合理手段。

3.2 提取溶剂。三萜酸含极性的羧基, 故用极性较小的乙醚和氯仿的提取率比无水乙醇要低。

3.3 5% 香草醛 - 冰醋酸溶液必须新鲜配制。曾用隔夜配制者同法操作, 结果表明隔夜配制的 5% 香草醛 - 冰醋酸溶液测定同一样品的吸光度约为新鲜配制的 91.02%(n=3)。

3.4 由于香草醛 - 冰醋酸试剂与三萜酸的显色反应极为灵敏, 温度、时间对实验结果影响较大, 因此显色时间和温度应严格控制, 并且加热显色前一定要充分振摇, 否则实验误差较大。

## 参考文献:

- [1] 徐怀德, 沈冠清, 刘兴华, 等. 澄清山茱萸汁制作技术研究[J]. 食品工业, 1994(5): 40-41.
- [2] 祝美云, 艾志录, 孔黎黎, 等. 山茱萸饮料的加工工艺研究[J]. 中国畜产与食品, 1997, 4(5): 208-210.
- [3] 张德权, 陈锦屏. 澄清方法对山茱萸肉澄清汁品质影响[J]. 食品科学, 1999, 20(3): 28-31.
- [4] 徐怀德, 韩虎群. 山茱萸系列产品加工技术[J]. 食品工业, 1995(6): 47-48.
- [5] 姚新生, 吴立军. 天然药物化学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 306.
- [6] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典: 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 28; 22.
- [7] 王花红. 山茱萸有效成分的含量测定及其指纹图谱研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2004: 19.
- [8] 尹小英, 欧阳栋. 高效液相色谱法测定山茱萸中熊果酸的含量西安[J]. 江西中医学院学报, 2001, 13(3): 114-121.