

高效液相色谱法测定芍药中齐墩果酸和熊果酸含量

周春华, 吕三三, 张莹, 胡玥, 陶俊*
(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要:目的: 建立高效液相色谱法测定芍药不同器官中齐墩果酸和熊果酸含量的检测方法。方法: 超声波乙醇提取样品中的齐墩果酸和熊果酸, 色谱柱为 Lichrospher C₁₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(85:15, V/V), 柱温 30℃, 流速 1mL/min, 检测波长 210nm。结果: 齐墩果酸和熊果酸在 25~100 μg/mL 范围内均呈良好的线性关系, 相关系数均在 0.998($n=5$)以上; 日内差异系数和日间差异系数分别为 1.27%~2.96% 和 1.33%~3.64%, OA 和 UA 精确性分别为 1.28%~3.52% 和 0.96%~2.88%, 平均回收率分别为 98.87% 和 98.70%。结论: 该方法简单快速、结果准确, 可为测定芍药不同组织中齐墩果酸和熊果酸含量提供一种高效快速的测定方法。
关键词: 高效液相色谱法; 芍药; 齐墩果酸; 熊果酸

Analysis of Oleanolic and Ursolic Acids in Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by HPLC

ZHOU Chun-hua, LÜ San-san, ZHANG Ying, HU Yue, TAO Jun*
(College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract Objective: To establish a HPLC method to determine the contents of oleanolic acid (OA) and ursolic acid (UA) in different organs of *Paeonia lactiflora* Pall.. Method: Oleanolic and ursolic acids were extracted from samples with ethanol under the assistance of ultrasonic. The chromatographic separation was conducted on a Lichrospher C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase made up of methanol and 0.1% phosphoric acid solution (85:15, V/V) at a flow rate of 1 mL/min. The column temperature and the detection wavelength were set as 30 °C and 210 nm, respectively. Results: The linearity of OA and UA was in the range of 25 – 100 μg/mL with a correlation coefficient over 0.998 ($n=5$). The overall intra-day and inter-day variation coefficients were 1.46% – 2.84% and 1.33% – 3.32% for OA and 1.27% – 2.96% and 1.97% – 3.64% for UA, respectively. The accuracy of determination of OA and UA was 1.28% – 3.52% and 0.96% – 2.88%, respectively. Conclusion: The method is convenient, rapid and accurate, and can thus be used to separate and quantify OA and UA in different organs of *Paeonia lactiflora* Pall..

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); *Paeonia lactiflora* Pall.; oleanolic acid; ursolic acid
中图分类号: TS255.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2011)16-0265-04

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)是毛茛科芍药亚科芍药属多年生宿根草本植物, 主要分布在我国山东、浙江、安徽、河南、四川、云南、陕西和甘肃等地。芍药根具有较高的药用价值, 是一种重要的中药材, 其生物活性物质主要有单萜类化合物、三萜类化合物、挥发油、单宁、鞣质、黄酮类及酚类等, 其中单萜类化合物中的芍药苷是芍药中最主要的生物活性物质^[1-4]。

而在药用芍药栽培中, 地上部分常常被作为废弃物丢弃, 造成了资源的巨大浪费。

齐墩果酸(oleanolic acid, OA)和熊果酸(ursolic acid, UA)是近年来倍受人们关注的三萜类化合物, 两者互为同分异构体, 通常以游离或结合成苷的形式广泛存在于植物界。研究表明, 它们主要存在于女贞子^[5]、山茱萸^[6]、白花蛇舌草^[7]、柿^[8]、枇杷^[9]、枣^[10]、山

收稿日期: 2010-11-03

基金项目: 2009 年扬州大学大学生学术科技创新基金项目; “十一五” 江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2009318); 江苏省科技基础设施建设计划(科技公共服务平台)项目(BM2010590)

作者简介: 周春华(1974—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为园艺植物生物活性物质。E-mail: chzhou@yzu.edu.cn

* 通信作者: 陶俊(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向为观赏植物栽培与遗传生理。E-mail: taojun@yzu.edu.cn

植^[11]和木瓜^[12]等植物中。医学研究表明, OA 和 UA 均具有抗肿瘤^[13]、抗病毒^[14]、抗炎^[15]、抗菌^[16]、护肝^[17]、降血糖^[18]等多种生物活性。以往关于芍药的药用研究主要集中在根上, 其化学成分主要以单萜化合物为主, 迄今为止, 尚未见有关芍药三萜化合物 OA 和 UA 的研究报告。预试验研究显示, 芍药叶片、花朵、茎干中均含有 OA 和 UA 等三萜类化合物, 其中叶片含量最高。

植物中 OA 和 UA 的含量分析方法主要包括薄层扫描法(thin layer chromatography scanning, TLCS)、毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)、气相色谱法(gas chromatography, GC)和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)。其中 HPLC 是最常见的分析方法, 使用此方法在女贞子^[5]、山茱萸^[6]、白花蛇舌草^[7]、柿^[8]、枇杷^[9]、枣^[10]、山楂^[11]和木瓜^[12]等多种植物中均同时检测到了 OA 和 UA。

本实验以 OA 和 UA 的含量作为考察指标, 利用超声提取, 建立简便、快速、准确测定芍药不同组织中 OA 和 UA 含量的高效液相色谱检测方法, 为芍药资源的综合利用研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)采自扬州大学园艺与植物保护学院芍药种质资源圃内。选取“杨妃出浴”、“粉珠盘”和“红峰”3个品种, 于2009年5月1日采集上述3个品种叶片、花朵和茎干样品。所有采集的样品带回实验室后立即用液氮冷冻处理, 然后存放在-20℃冰箱中, 直至分析。

OA、UA 标准品 南京替斯艾么(TCM)中药研究所; 甲醇(HPLC级) 美国 Tedia 试剂公司; 去离子水由 Millipore 超纯水系统制备; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

2695 高效液相色谱仪[配备 2487 紫外检测器和 Lichrospher C₁₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5 μm)] 美国 Waters 公司; RE-5299 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; KQ-500B 超声波清洗器 江苏昆山超声仪器有限公司; TDL-40B 离心机 上海金鹏分析仪器有限公司; 分析天平 北京赛多利斯科学仪器有限公司; 微孔滤膜(0.22 μm)。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

OA 和 UA 的定量在高效液相色谱仪系统中进行。两种物质均在 210nm 波长处检测, 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(85:15, V/V)。流速为 1mL/min, 柱温为 30℃。

1.3.2 标准品溶液的制备及标准曲线绘制

OA 和 UA 标准样品分别用甲醇配成 2mg/mL 贮备

液。分别量取 OA 和 UA 标准样品溶液 0.025mL 置于同一个离心管中, 加入甲醇 1.975mL, 摇匀, 制成 OA 和 UA 质量浓度分别为 25 μg/mL 的混合标准溶液, 按上述方法配制 OA 和 UA 质量浓度分别为 50、75、100 μg/mL 的混合标准溶液。在进行 HPLC 测定时, 上述不同质量浓度的混合标准溶液分别进样 10 μL 测定峰面积, 用于绘制标准曲线。

1.3.3 分析方法验证

按 1.3.2 节方法制备标准溶液, 对 4 个质量浓度的 OA 和 UA 标样进行 HPLC 测定, 精密吸取每一标样溶液 10 μL, 按上述色谱条件连续 3 次进样, 根据标样质量浓度和峰面积绘制标准曲线, 进行峰面积与质量浓度的线性回归分析。

为了测定每个标样的日内差, 每个质量浓度在同 1d 内注射 5 针。然后连续 3d 进行测定以确定日间的精确度(即日间差)。

为了计算提取回收率, 在提取前于研磨好的 3g 植物材料(“杨妃出浴”叶片)中加入 30 μg OA 和 300 μg UA。此后的提取和 HPLC 分析均按照上述方法进行操作, 并计算回收率。

$$\text{回收率}/\% = \frac{A - B}{C} \times 100$$

式中: A 是加入标样后检测到的含量; B 是没有加标样时检测到的含量; C 是加入标样的量。

1.3.4 待测液的制备

用天平称取 3.0g 鲜样, 置于研钵中, 加液氮研至粉末状, 放入 10mL 离心管中, 加入 5mL 乙醇, 在超声波清洗器中提取 30min, 15℃、8000 × g 离心 10min。每样品总共提取 2 次, 合并两次滤液, 35℃ 旋转蒸发至干燥。残留物溶于 1.5mL 甲醇中, 并转移至 2mL 离心管中。在 HPLC 上样前用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。每个样品重复 3 次。

1.3.5 样品测定

将处理后的样品溶液进行液相色谱分析, 进样量 10 μL, 采用外标法定量, 测定 3 个品种芍药叶片、花朵和茎干中 OA 和 UA 的含量。

2 结果与分析

2.1 HPLC 鉴定 OA 和 UA

OA 和 UA 标样在 210nm 波长处均能检测到, 且在 210nm 左右有最大吸收峰。在甲醇(A)和 0.1% 磷酸溶液(B)配比为 85:15(V/V)时, OA 和 UA 能有效地洗脱, 而且能被同时检测。在流速为 1mL/min 时, OA 和 UA 的保留时间分别为 26.086、27.229min(图 1a)。这种 HPLC 体系能成功分离芍药叶片中的 OA 和 UA(图 1b)。

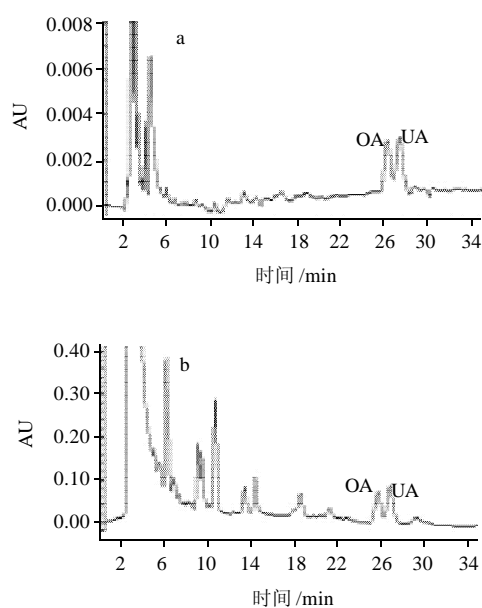


图1 OA、UA 标准品(a)和芍药叶片提取液(b)的 HPLC 图谱
Fig.1 HPLC chromatograms of mixed oleanolic acid and ursolic acid standards (a) and peony leaf extract (b)

2.2 检测方法确认

2.2.1 线性关系

两种标准品配制4种不同质量浓度(25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$)的溶液,分别重复5次测试。校准曲线均呈线性关系,峰面积(Y)与标准品质量浓度(X)的回归方程为: $Y_{\text{OA}} = 1217.2X (r = 0.998)$, $Y_{\text{UA}} = 1499.6X (r = 0.998)$,表明OA和UA在25~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内均呈良好线性关系,可用于定量分析。

2.2.2 重复性和精确度

表1 OA和UA重复性和精确性分析($n=5$)
Table 1 Repeatability and accuracy of OA and UA analysis ($n=5$)

标样	标准质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	分析值/ ($\mu\text{g/mL}$)	差异系 数/%	精确 度/%
日内差 ^A	OA	25 24.12 \pm 1.05	1.46	-3.52
		50 48.33 \pm 1.54	2.13	-3.34
		75 76.69 \pm 1.99	1.98	2.25
		100 98.72 \pm 2.16	2.84	-1.28
	UA	25 25.33 \pm 1.13	1.27	1.32
		50 48.56 \pm 1.47	1.95	-2.88
		75 74.28 \pm 1.96	2.96	-0.96
		100 101.29 \pm 2.35	2.14	1.29
日间差 ^B	OA	25 24.62 \pm 1.23	1.33	-1.52
		50 46.08 \pm 1.72	2.57	2.16
		75 76.33 \pm 2.05	1.48	2.31
		100 96.95 \pm 2.74	3.32	-3.05
	UA	25 24.47 \pm 1.14	2.06	-2.12
		50 50.48 \pm 1.58	2.38	0.96
		75 73.75 \pm 2.14	1.97	-1.67
		100 98.11 \pm 2.81	3.64	-1.89

注: A.样品在同1d内连续分析5次; B.样品连续分析超过3d以上。

3种标样的重复性和精确度采用上述方法,通过4种不同的质量浓度来分析测定(表1)。OA和UA的日内差异系数分别为1.46%~2.84%和1.27%~2.96%,日间差异系数分别为1.33%~3.32%和1.97%~3.64%。方法的精确性用测定值与所有质量浓度理论值的偏差来表示,OA和UA的精确性分别为1.28%~3.52%和0.96%~2.88%。

2.2.3 回收率实验分析

为了计算提取回收率,在提取前于研磨好的3g植物材料中加入30 μg OA和300 μg UA。然后按上述方法进行提取、检测和分析。通过计算分析值和加入量的比例分别来计算3种成分的回收率。结果表明,OA和UA的回收率分别为98.87%和98.70%(表2)。

表2 OA和UA回收率分析($n=3$)

Table 2 Mean spike recoveries for OA and UA in a blank sample ($n=3$)

标样	加入量/ μg	分析值/ μg	回收率/%
OA	30	29.66 \pm 0.77	98.87 \pm 2.59
UA	300	296.12 \pm 6.23	98.70 \pm 2.08

2.3 芍药不同器官OA和UA含量分析

由表3可知,芍药不同器官中OA和UA含量差别很大,以“杨妃出浴”、“粉珠盘”和“红峰”3个品种为例,3个品种不同组织中均检测到OA和UA,且UA含量均高于OA。对于叶片和花朵来说,3个品种中OA和UA的含量均以“杨妃出浴”最高,“粉珠盘”最低,“红峰”介于其中。而对于茎干来说,3个品种中OA和UA的含量则以“粉珠盘”最高,“红峰”最低,“杨妃出浴”介于其中。从3种不同器官OA和UA的总量来看,叶片明显高于花和茎干,其中“杨妃出浴”叶片中OA和UA总量最高,为119.56 $\mu\text{g/g}$,”粉珠盘”最低,为54.54 $\mu\text{g/g}$ 。

表3 芍药不同器官OA和UA的含量

Table 3 OA and UA contents in different organs of peony

成分	部位	杨妃出浴	红峰	粉珠盘
OA	叶片	9.66	2.76	2.58
	花朵	3.57	0.13	0.11
	茎干	1.37	0.25	1.89
UA	叶片	109.90	93.30	51.96
	花朵	3.63	2.62	1.31
	茎干	1.69	0.49	8.88

3 讨论与结论

3.1 芍药中OA和UA分析体系的建立

常用的流动相系统有甲醇-水和乙腈-水两种。甲

醇和乙腈的体积分数一般在 85%~90%^[19]。在流动相加入少量冰醋酸(0.08%~0.1%)、磷酸(0.1%)、三乙胺(0.06%~0.1%)有利于改善峰形,提高分离度^[20]。本实验曾对甲醇-磷酸缓冲液(88:12, V/V)、甲醇-水(85:15, V/V)和甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15, V/V)这3种不同流动相做过对比筛选,结果发现采用甲醇-磷酸缓冲液做流动相时,由于盐的存在,色谱柱容易堵塞。采用甲醇-水做流动相,OA和UA的分离度小于1,且峰形不好,在水中加入0.1%磷酸,其分离度较高,峰形也得到较好的改善。对流动相的流速进行选择发现,流速对出峰时间影响较大,在流速0.6mL/min时,出峰时间大约在50min左右,而当流速升到1mL/min时,出峰时间缩短到30min左右。许多文献^[7-9,11-12]中OA和UA的保留时间在18~29min之间,本实验OA和UA的保留时间分别为26.086、27.229min,和文献结果基本一致。在本实验建立的色谱条件下,芍药不同器官中OA和UA的分离良好,方法简便快速,结果准确可靠。同时用该方法对柿子果肉和果皮中OA和UA含量进行了测定,发现其峰形和分离度也较好,说明该方法有一定的普适性。

3.2 芍药不同组织器官中OA和UA的含量

研究表明,OA和UA在同种植物的不同组织器官中的含量存在着很大差异。王丽萍等^[21]研究发现,川鄂山茱萸总苞片的UA含量(1.1044%)最高、果实(0.0899%)最低,茎干、叶片和花介于中间,同一器官的不同组织部位中的OA和UA的含量也有差别。刘名权等^[22]研究显示,毛泡桐叶片中的OA含量(0.222%)约为叶柄(0.025%)的9倍,叶片中UA的含量(0.61%)约为叶柄(0.21%)的3倍。周春华^[23]研究表明枇杷花萼片的OA和UA含量最高,分别为0.68、3.65mg/g,花瓣中OA和UA的含量最低,分别为0.12mg/g和0.60mg/g,雌雄蕊和穗梗中OA和UA的含量介于萼片和花瓣之间。

本研究显示,芍药不同器官OA和UA含量差别很大,3个芍药品种“杨妃出浴”、“粉珠盘”和“红峰”的OA和UA含量均以叶片最高。OA在叶片中的含量分别是茎干的72.7、1.3、11.4倍,花的2.7、23.5、21.2倍;UA在叶片中的含量分别是茎干的30.2、39.7、35.6倍,花的65.0、5.8、190.4倍。

3.3 本研究建立了高效液相色谱测定芍药不同器官中OA和UA含量的方法,该测定方法操作简便易行,结果稳定可靠,可以快速准确地对芍药不同器官中OA和UA进行定量分析,可为芍药资源的综合开发利用研究提供参考。

参考文献:

[1] IKEDA N, FUKUDA T, JYO H, et al. Quality evaluation on *Paeoniae Radix*. I. Quantitative analysis of monoterpene glycosides constituents

of *Paeoniae Radix* by means of high performance liquid chromatography. Comparative characterization of the external figures, processing method and the cultivated areas[J]. Yakugaku Zasshi, 1996, 116(2): 138-147.

- [2] XU Shunjun, YANG Liu, LIN Qiaoling, et al. Simultaneous determination of paeoniflorin, albiflorin and benzoylpaeoniflorin in *Paeonia Radix Alba* by TLC[J]. Chromatographia, 2008, 68(5/6): 459-462.
- [3] 周红涛, 骆亦奇, 胡世林, 等. 赤芍与白芍的化学成分含量比较研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(9): 654-657.
- [4] 谷满仓, 钱亚芳, 吕圭源. 对白芍的化学成分及质量控制方法研究进展[J]. 科技通报, 2006, 22(3): 337-344.
- [5] 戚志华, 王四旺, 王剑波, 等. 不同生长期女贞子中齐墩果酸和熊果酸的含量变化[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1583-1584.
- [6] WANG Huahong, WANG Zhezhi, GUO Wubao. Comparative determination of ursolic acid and oleanolic acid of *Macrocarpium officinalis* (Sieb. et Zucc.) Nakai by RP-HPLC[J]. Industrial Crops and Products, 2008, 28(3): 328-332.
- [7] 张才华, 郭兴杰, 李芳, 等. HPLC法同时测定白花蛇舌草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(5): 358-370.
- [8] 邹盛勤, 孙伟. 反相高效液相色谱法同时测定柿叶中齐墩果酸和熊果酸[J]. 分析试验室, 2009, 28(4): 18-21.
- [9] ZHOU Chunhua, CHEN Kunsong, SUN Congde, et al. Determination of oleanolic acid, ursolic acid, and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. by HPLC[J]. Biomedical Chromatography, 2007, 21(7): 755-761.
- [10] GUO Sheng, DUAN Jinao, TANG Yuping, et al. High-performance liquid chromatography. Two wavelength detection of triterpenoid acids from the fruits of *Ziziphus jujuba* containing various cultivars in different regions and classification using chemometric analysis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 49(5): 1296-1302.
- [11] 邹盛勤. 高效液相色谱法同时测定山楂中乌索酸和齐墩果酸的含量[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 87-89.
- [12] 王岱杰, 王晓, 耿岩玲, 等. 反相高效液相色谱测定不同品种皱皮木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 497-499.
- [13] YAN S L, HUANG C Y, WU S T, et al. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines[J]. Toxicology in Vitro, 2010, 24(3): 842-848.
- [14] ZHU Yongming, SHEN Jingkan, WANG Huikang, et al. Synthesis and anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2001, 11(24): 3115-3118.
- [15] SINGH G B, SINGH S, BANI S, et al. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1992, 44(5): 456-458.
- [16] 王茜, 樊明文, 边专, 等. 熊果酸的提取及其对牙周病原菌的作用[J]. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(5): 388-390.
- [17] 熊筱娟, 陈武, 肖小华, 等. 乌索酸与齐墩果酸对小实验肝性损伤保护作用的比较[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2004, 28(6): 540-543.
- [18] 洪晓华, 于魏林, 李艳荣, 等. 女贞子提取物总三萜酸降血糖作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(增刊1): 121-123.
- [19] 张静. 枇杷叶提取物中熊果酸的分离及提取物抗氧化作用的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- [20] 乔非, 马双成, 林瑞超. 回心草药材中熊果酸的研究[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(2): 208-210.
- [21] 王丽萍, 宋良科, 董关涛, 等. 川鄂山茱萸不同部位中熊果酸的含量测定[J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(5): 60-62.
- [22] 刘名权, 邹盛勤, 陈武. 超声辅助HPLC法测定毛泡桐中乌索酸和齐墩果酸含量[J]. 广东微量元素科学, 2007, 14(5): 19-22.
- [23] 周春华. 枇杷花、果主要生物活性组分与抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.