

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0063-04

泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸含量的影响因素考察

邢雅丽¹,毕良武^{1,2*},赵振东^{1,2},夏田娟¹,程贤¹¹中国林业科学研究院 林产化学工业研究所;生物质化学利用国家工程实验室;国家林业局 林产化学工程重点开放性实验室;
江苏省生物质能源与材料重点实验室,江苏南京 210042;²中国林业科学研究院林业新技术研究所,北京 100091

摘要:为选取适宜的泡桐叶原料,实现资源的充分有效利用,采用 HPLC 法考察了不同泡桐种属、存储方法和采集时间等条件下,泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量差异。结果表明,白花泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量最高,兰考泡桐叶次之,而毛泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量明显偏低;阴干后的泡桐叶比鲜叶和冷藏叶中熊果酸和齐墩果酸的含量稍高;从 5 月份开始,泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量逐月增加,在 10 月份达到最高。

关键词:泡桐叶;HPLC;熊果酸;齐墩果酸

中图分类号:R284.4

文献标识码:A

Study on Influencing Factors of Ursolic Acid and Oleanolic Acid from *Paulownia* Leaves

XING Ya-li¹, BI Liang-wu^{1,2*}, ZHAO Zhen-dong^{1,2}, XIA Tian-juan¹, CHENG Xian¹¹Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization; Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA; Key Lab. of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210042, China;²Institute of New Technology of Forestry, CAF, Beijing 100091, China

Abstract: In order to select the appropriate *Paulownia* leaf material, and make full and effective use of resources, the content variations of ursolic acid and oleanolic acid in *Paulownia* leaves were determined in different *Paulownia* species, with different raw material storage methods and different harvest times by HPLC. The results showed that the leaves of *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl. had the highest contents of ursolic acid and oleanolic acid, followed by the leaves of *Paulownia elongata* S. Y. Hu, while the contents of ursolic acid and oleanolic acid were significantly lower in *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. leaves. Air-dried *Paulownia* leaves showed higher contents of ursolic acid and oleanolic acid than fresh leaves and refrigerated leaves. From May, the contents of ursolic acid and oleanolic acid in *Paulownia* leaves monthly increased, reaching the highest in October.

Key words: *Paulownia* leaves; HPLC; ursolic acid; oleanolic acid

泡桐(*Paulownia* Sieb.)为玄参科(*Scrophulariaceae*)泡桐属(*Paulownia*)多年生落叶乔木,生长迅速,材质优良,具有抑菌、消炎、抗病毒、抗氧化等药用价值^[1,2]。随着现代波谱技术在天然资源研究中的应用,泡桐因所含黄酮、三萜等多种生物活性成分而受到学术界的广泛关注。泡桐叶中的三萜类活性物质熊果酸和齐墩果酸具有保肝、抗炎、抑菌、降血糖血脂等多种生理作用^[3-6],是泡桐叶的主要有效成分。本文采用 HPLC 法考察了不同种属、不同存

储方法、不同采集月份等条件下泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量差异,以期为熊果酸和齐墩果酸的提取选取合适的泡桐叶原材料,并为泡桐资源的定向培育及泡桐叶的采集、存储提供参考。

1 仪器与材料

FZ102 型植物粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司;JY99-II DN 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;SHB-III 循环水式多用真空泵,河南省太康科教器材厂;KQ5200 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;岛津高效液相色谱仪,配有 CBM-20A 系统控制器、LC-20AT 泵、SIL-20A 自动进样器、CTO-20A 柱温箱、SPD-M20A UV-VIS 检测

器,岛津公司。

熊果酸(批号:12051509,纯度:98.79%)和齐墩果酸(批号:12091104,纯度:99.44%)对照品,成都普瑞科技开发有限公司;甲醇(色谱纯)、乙醇(分析纯),南京化学试剂有限公司;磷酸(色谱纯),美国Aladdin公司;纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司。

样品1:2012年7月,采自国家林业局泡桐研究开发中心原阳试验基地的同树龄毛泡桐[*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.]、白花泡桐[*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.]、兰考泡桐(*Paulownia elongata* S. Y. Hu)及杂交泡桐(毛泡桐和白花泡桐的杂交品种)的泡桐叶;

样品2:2013年5月至11月,采自南京师范大学紫金校区的白花泡桐[*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.]叶;

样品3:2013年9月,采自中国林科院林产化学工业研究所的兰考泡桐(*Paulownia elongata* S. Y. Hu)叶。

2 实验方法

2.1 HPLC 色谱分析方法

2.1.1 对照品溶液的配制

准确称取9.3 mg 熊果酸对照品和4.4 mg 齐墩果酸对照品,用无水乙醇溶解,并定容于10 mL的容量瓶中,配成熊果酸和齐墩果酸的混合标准溶液,并用0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.1.2 HPLC 色谱条件

岛津色谱柱:Shim-pack ODS-CLC(M)(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.05% 磷酸水溶液(91.7:8.3,V/V);流速:0.6 mL/min;柱温:21 °C;检测波长:210 nm。

2.1.3 标准曲线的绘制

精密吸取标准溶液1、2、5、10、15、20 μL,在优化色谱条件下测定峰面积,并以进样量(x, μg)为横坐标,各标准品的峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得齐墩果酸和熊果酸的回归方程分别为:y = 649520x-178493(r = 0.9991),y = 502791x-294016(r = 0.9993)。齐墩果酸在0.44 ~ 8.75 μg 和熊果酸在0.92 ~ 18.37 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度实验

精密吸取标准品溶液10 μL,重复测定5次,齐

墩果酸和熊果酸峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为0.13%、0.10%,表明色谱系统的精密度良好。

2.1.5 重复性实验

准确称取同批泡桐叶粉末6份,按相同方法制得提取液,测得齐墩果酸和熊果酸峰面积的RSD分别为1.34%、0.96%。

2.1.6 稳定性实验

分别测定同一泡桐叶提取液在0、3、6、9、12、18、24 h 的齐墩果酸和熊果酸峰面积,其RSD 分别为0.99%、0.79%。说明提取样品溶液在24 h 内稳定。

2.1.7 回收率实验

精密称取已知含量的泡桐叶粉末,精密测定后,分别加入50%、100%、150% 样品含量的齐墩果酸和熊果酸标准品,制得加样提取液,HPLC 测定齐墩果酸和熊果酸含量,得齐墩果酸和熊果酸的平均回收率分别为95.14%、94.51%、96.43% 和93.69%、95.44%、93.21%。

2.1.8 样品含量测定

精密吸取提取液,用高效液相色谱仪测定,按外标法计算泡桐叶中齐墩果酸和熊果酸的质量分数,公式如下:

$$Y(OA) = \frac{m(OA)}{m_0} = \frac{[(y + 178493)/649520] \times V_0}{Vm_0}$$

$$Y(UA) = \frac{m(UA)}{m_0} = \frac{[(y + 178493)/649520] \times V_0}{Vm_0}$$

式中:Y(OA)、Y(UA) 分别为齐墩果酸和熊果酸的质量分数,mg/g;m(OA)、m(UA) 分别为齐墩果酸和熊果酸的质量,mg;m₀ 为泡桐叶的质量,g;V 为进样体积,μL;V₀ 为泡桐叶提取液体积,mL。

2.2 泡桐叶中齐墩果酸和熊果酸的超声波提取

2.2.1 不同种属泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的超声波提取

原阳试验基地采集的不同种属的泡桐叶,阴干,用植物粉碎机破碎,过筛,50 °C 烘箱干燥至质量恒定。准确称取泡桐叶粉末m₀,按液固比30:1(mL/g)加入乙醇,限定提取温度为50 °C,超声波提取40 min。过滤,并用乙醇洗涤滤渣,合并滤液,乙醇定容于100 mL的容量瓶中,摇匀,得样品试液。HPLC 分析前用0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.2.2 不同存储方法泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的超声波提取

南京师范大学紫金校区采集的白花泡桐鲜叶,

剪碎,分为3份,分别准确称取质量(计算熊果酸和齐墩果酸的质量分数时折算为阴干泡桐叶的质量,泡桐叶的干燥率为27.9%),用于立即提取、室内阴干一个月后提取、2~8℃冷藏一个月后提取。提取方法为:约10倍鲜叶量的乙醇溶液超声波提取40 min,乙醇浓度为88%,限定提取温度为50℃;提取残渣再加入5倍量乙醇溶液超声波提取10 min;合并提取液,并用乙醇溶液洗涤滤渣,旋蒸浓缩,乙醇定容于100 mL的容量瓶中,摇匀,得样品试液。HPLC分析前用0.45 μm微孔滤膜过滤。

2.2.3 不同采集月份泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的超声波提取

南京师范大学紫金校区采集的白花泡桐叶,阴干,用植物粉碎机破碎,过筛,50℃烘箱干燥至质量恒定。准确称取泡桐叶粉末 m_0 ,按液固比31:1(mL/g)加入89%的乙醇溶液,限定提取温度为50℃,超声波提取37 min。过滤,并用89%的乙醇溶液洗涤滤渣,合并滤液,定容于100 mL容量瓶中,摇匀,得样品试液。HPLC分析前用0.45 μm微孔滤膜过滤。

2.2.4 不同树龄泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸超声波提取

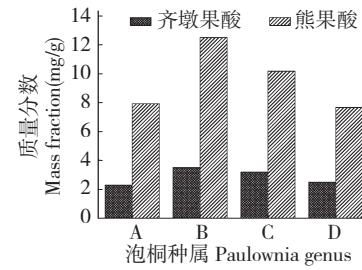
原阳试验基地采集的小树龄兰考泡桐叶、白花泡桐叶和南京林产化学工业研究所采集的大树龄兰考泡桐叶、白花泡桐叶,阴干,用植物粉碎机破碎,过筛,50℃烘箱干燥至质量恒定。准确称取泡桐叶粉末 m_0 ,按液固比31:1(mL/g)加入89%的乙醇溶液,限定提取温度为50℃,超声波提取37 min。过滤,并用89%的乙醇溶液洗涤滤渣,合并滤液,定容于100 mL容量瓶中,摇匀,得样品试液。HPLC分析前用0.45 μm微孔滤膜过滤。

3 结果与讨论

3.1 不同种属泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量差异

泡桐种类繁多,不同种属所含化合物的组成及含量也各不相同。研究不同种属泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量差异,为泡桐的定向培育和原料采集提供参考。选取具有代表性的毛泡桐、白花泡桐、兰考泡桐和杂交泡桐,测定同树龄各种属泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量。结果如图1所示,白花泡桐所含熊果酸的含量最高,为12.51 mg/g;其次是兰考泡桐,熊果酸含量为10.18 mg/g;毛泡桐及

毛泡桐与白花泡桐的杂交品种熊果酸的含量相接近,都较低,分别为7.93、7.67 mg/g。各种属泡桐叶中齐墩果酸的含量也有相同的特征,依次是白花泡桐>兰考泡桐>毛泡桐和白花泡桐的杂交品种>毛泡桐,其含量分别为:3.50、3.19、2.49、2.29 mg/g。



A:毛泡桐 *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.; B:白花泡桐 *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.;
C:兰考泡桐 *Paulownia elongata* S. Y. Hu; D:杂交泡桐 Hybrid paulownia

图1 不同种属泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量比较

Fig. 1 Content comparision of ursolic acid and oleanolic acid in different *Paulownia* genus

3.2 不同存储方法下泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量差异

不适合的存储方法可能导致物质变性或物质间的相互转化,寻找合适的原料存储方法,对进一步的研究具有重要意义。通过测定鲜泡桐叶、阴干泡桐叶、冷藏泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量,比较其中的差异,来考察阴干和冷藏两种存储方法对泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸含量的影响。结果如图2所示,阴干泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量稍高于鲜泡桐叶,而冷藏泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量与鲜泡桐叶基本无差别。这说明冷藏不会造成泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的损失,可以作为一种有

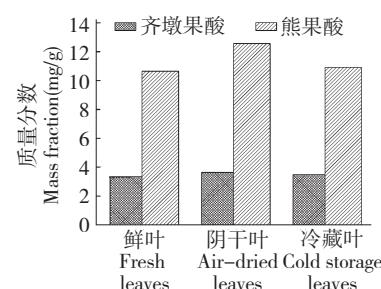


图2 不同存储方法下泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量比较

Fig. 2 Content comparision of ursolic acid and oleanolic acid in different storage methods

效的存储方式;泡桐叶阴干后,可能更有利于提取溶剂与叶细胞中熊果酸和齐墩果酸的接触溶合,使熊果酸和齐墩果酸更充分提取。比较三种存储方法,阴干存储最经济合理。

3.3 不同月份泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量差异

比较不同月份白花泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量差异,考察熊果酸和齐墩果酸含量随泡桐生长期的变化,以期为泡桐叶的适时采集提供参考。研究结果如图3所示,泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量从5月份开始逐渐增加,10月份含量均达到最高,分别为16.07、5.60 mg/g,11月份又迅速降低。因此,适宜的泡桐叶采收期应该在10月份,此时采收熊果酸和齐墩果酸的产率最高。

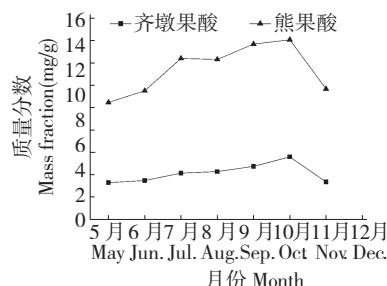
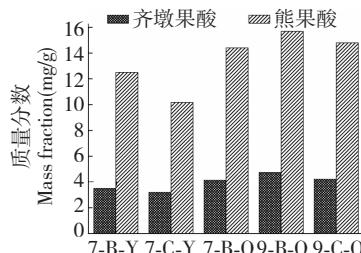


图3 不同月份泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量比较

Fig. 3 Content comparision of ursolic acid and oleanolic acid in different months

3.4 不同树龄泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量差异

除以上泡桐种类、原料存储方法和采集时间影响泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量外,泡桐树龄和生长环境等因素也可能对熊果酸和齐墩果酸的含量产生一定影响。图4显示,采自南京的大树龄



7,9:月份 July and September; B, C:泡桐种属 *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl. and *Paulownia elongata* S. Y. Hu; Y, O:树龄 Young tree and old tree

图4 不同树龄泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量比较

Fig. 4 Content comparision of ursolic acid and oleanolic acid in different tree-ages

泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量比采自河南的小树龄泡桐叶中的含量高。如此含量差异可能与泡桐树龄有关,但也可能受泡桐生长环境等因素的影响,具体有待进一步研究。

4 结论

采用超声波提取法提取泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸,并用HPLC测定其含量,研究泡桐种属、存储方法、采集时间等因素对泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸含量的影响。结果表明,白花泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量最高,兰考泡桐叶次之,毛泡桐叶中含量明显偏低;泡桐叶阴干后提取较鲜叶提取和冷藏后提取熊果酸和齐墩果酸的含量稍高;而冷藏后提取与鲜叶提取熊果酸和齐墩果酸的含量基本无差别。从5月份开始,泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸的含量逐月增加,在10月份达到最高。

本文对影响泡桐叶中熊果酸和齐墩果酸含量的因素进行了考察,为熊果酸的提取与分离研究选取适宜的泡桐叶原材料,并为泡桐资源的定向培育及泡桐叶的采集、存储等提供参考,对合理开发利用泡桐叶资源具有一定的指导意义。

参考文献

- Li ZR (李宗然), Wang BP (王保平), Li FD (李芳东). *Paulownia development strategy research*. *Forest Sci Technol Manage* (林业科技管理), 1996, 3:44-46.
- The *Paulownia* group of Chinese Academy of Forestry (中国林业科学研究院泡桐组). *Paulownia Research* (泡桐研究). Beijing: China Agriculture Press, 1980. 1-2, 257-263.
- Zhang MF (张明发), Shen YQ (沈雅琴). Research advances on hepatoprotective activities of oleanolic acid and ursolic acid. *Anti Infect Pharm* (抗感染药学), 2012, 9: 13-18.
- Cunha LCS, Silva MLAE, Furtado NAJC, et al. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 2007, 62: 668-672.
- Zhang MF (张明发), Shen YQ (沈雅琴). Research on antidiabetic pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Shanghai Med Pharm J* (上海医药), 2010, 31: 347-350.
- Li HY (李宏杨), Liu GM (刘国民), Liu F (刘飞), et al. Research of ursolic acid and similar pentacyclic triterpenoid. *J Hunan Univ Technol* (湖南工业大学学报), 2009, 23 (5): 18-21.