

RP-HPLC 同时测定柿叶中白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸

梁晋军^{1,2}, 张嘉嘉^{1,2}, 梁玉琴^{1,2}, 韩卫娟^{1,2}, 傅建敏^{1,2*}

¹国家林业局泡桐研究开发中心; ²中国林业科学研究院经济林研究开发中心, 郑州 450003

摘要: 建立柿叶中白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸的反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析方法。色谱条件为 Thermo C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈: 磷酸水溶液(pH = 3.0) = 85: 15; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 209 nm; 柱温: 30 °C。白桦脂酸进样量在 0.124 ~ 3.100 μg 范围内线性关系良好, $r = 0.9996$, 平均加样回收率为 98.22%; 齐墩果酸进样量在 0.160 ~ 4.000 μg 范围内线性关系良好, $r = 0.9994$, 平均加样回收率为 95.23%; 熊果酸进样量在 0.288 ~ 7.200 μg 范围内线性关系良好, $r = 0.9998$, 平均加样回收率为 103.87%。磨盘柿叶中白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸含量为 0.872、1.406 和 4.598 mg/g。本法可作为柿叶中白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸含量的测定方法。

关键词: 柿叶; 反相高效液相色谱; 白桦脂酸; 齐墩果酸; 熊果酸

中图分类号: Q599; O657.7 + 2

文献标识码: A

Simultaneous Determination of Betulinic Acid, Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Persimmon Leaves by RP-HPLC

LIANG Jin-jun^{1,2}, ZHANG Jia-jia^{1,2}, LIANG Yu-qin^{1,2}, HAN Wei-juan^{1,2}, FU Jin-min^{1,2*}

¹China Paulownia Research Center, Zhengzhou 450003, China; ²Non-timber Forest Research and Development Center of CAF, Zhengzhou 450003, China

Abstract: A RP-HPLC method was established for the simultaneous determination of betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid in persimmon leaves. Thermo C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for the chromatographic separation, acetonitrile-phosphoric acid aqueous solution(pH = 3.0) (85: 15) was used as the mobile phase with a flow rate of 0.8 mL/min. The detection wave length was 209 nm and the temperature of the column was 30 °C. The linear ranges for betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid were 0.124-3.100 μg ($r = 0.9996$), 0.160-4.000 μg ($r = 0.9994$) and 0.288-7.200 μg ($r = 0.9998$), respectively. The average recoveries of the developed HPLC method were 98.22% for betulinic acid, 95.23% for oleanolic acid and 103.87% for ursolic acid. The content of betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid in the leave of MoPan were 0.872, 1.406 and 4.598 mg/g, respectively. The developed method can be used to simultaneously determine the content of betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid in persimmon leaves.

Key words: *Diospyros kaki* leaves; RP-HPLC; betulinic acid; oleanolic acid; ursolic acid

柿(*Diospyros kaki*)为柿科(*Ebenaceae*)柿属(*Diospyros*)植物^[1], 中国为其主要的栽培国家之一, 栽培面积和产量均居世界第一位。柿叶为我国的传统中药, 其入药最早见于《滇南本草》, 具有抗菌消炎、抗氧化、抗癌、软化血管、降脂降压等作用^[2]。目前国内外对白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸药理作用研究较多, 研究表明这三种物质在抗肿瘤活性方面有好的效果, 尤其是白桦脂酸不仅具有有效杀死肿瘤细胞而不损伤健康细胞的特殊功效^[3-6], 而且在抗

艾滋病病毒方面有独特的疗效^[7,8]。

柿叶齐墩果酸和熊果酸的测定方法报道较多, 测定方法主要有高效液相色谱法和薄层扫描法^[9,10], 采用高效液相色谱法同时测定柿叶中齐墩果酸和熊果酸含量的方法也比较成熟^[11,12]。国内外虽然有一些关于白桦脂酸的测定方法的研究^[13-15], 但有关柿叶白桦脂酸含量测定方法未见报道, 同时测定柿叶白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸的方法也鲜有报道, 本文旨在探索一种用反相高效液相色谱同时测定白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸含量的方法, 并对三个品种柿叶进行测定, 以便建立一种更有效、快速对柿叶中这3种成分含量测定方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

柿叶于2013年8月采自河南省新乡市原阳县原武镇靳屋村(国家林业局泡桐研究开发中心原阳基地柿属植物资源圃),采集柿叶品种有磨盘柿,火晶柿和冬青柿,所采柿叶均为生长健康、无病虫害的成熟叶片,其中磨盘柿叶也作为重复性,回收率测定的品种。

1.2 仪器与试剂

Waters1525 高效液相色谱仪;2998 光电二极管阵列检测器(PAD);Waters2707 自动进样器;HT-300BQ 型数控超声波清洗器;雷磁 pH 计;优普超纯水机;AL204 分析天平;RE-52AA 旋转蒸发器;分液漏斗。

白桦脂酸(betulinic acid, BA)(批号:20120504)、齐墩果酸(oleanolic acid, OA)(批号:20120828)和熊果酸(ursolic acid, UA)(批号:20130123)标准品均购自上海源叶生物科技有限公司;乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇(分析纯);磷酸;乙酸乙酯(分析纯);甲醇(分析纯)。

1.3 标准品溶液制备

准确称取白桦脂酸 3.10 mg,齐墩果酸 4.00 mg,熊果酸 7.20 mg 置于 25 mL 的容量瓶中,加无水乙醇溶解,并稀释至刻度,得 3 种物质混合标准溶液,置-20℃冰箱中备用(白桦脂酸需避光、低温保存)。

1.4 样品溶液制备

柿叶样品在干燥箱中干燥后,粉碎。精密称取 1.0 g,置于 50 mL 大塑料离心管中,加入 10 mL 甲醇,浸泡 24 h,在 40% 的功率下,超声提取 40 min;

然后再在 50% 的功率下,超声提取 20 min;抽滤,滤液在 40℃ 下进行减压旋转蒸发,得浸膏,将浸膏分散于 15 mL 水中,加入等量乙酸乙酯萃取,进行分液处理,取上层乙酸乙酯溶液于 40℃ 下进行减压旋转蒸发,得浸膏,用无水乙醇定容到 25 mL 的容量瓶中,得样品溶液,置-20℃冰箱中备用^[14]。

1.5 色谱条件

色谱柱:Thermo C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈:磷酸水溶液(pH = 3.0) = 85:15 (v:v);流速 0.8 mL/min;检测波长:209 nm;柱温 30℃;进样量:20 μL。

2 结果与讨论

2.1 样品提取

综合考虑 3 种成分在甲醇、乙醇和丙酮等常用有机溶剂中的溶解度,选择甲醇做本次提取的提取溶剂。由于白桦脂酸在甲醇中溶解度很低,所以提取料液比成为能否完全有效提取白桦脂酸的一个关键因素,为了考察料液比对提取率的影响,本次实验进行预实验时,保持其它条件不变,料液比(g:mL)分别为 1:5、1:10、1:15,测定含量结果分别为:0.0250%、0.0380%、0.0384%,比较得出:料液比为 1:10 时,柿叶中白桦脂酸已基本提取完全。

2.2 检测波长的选择

采用 PAD 检测器在 190~400 nm 波长范围内扫描,标准品和样品中白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸在流动相中最大吸收波长分别是 196.5、195.4、195.4 nm 见图 1。但由于流动相在低波长处有较强的末端吸收,为减少干扰,通过比较提取不同波长的色谱得出:209 nm 为最适宜的检测波长,可保证基线平稳和检测的灵敏度。

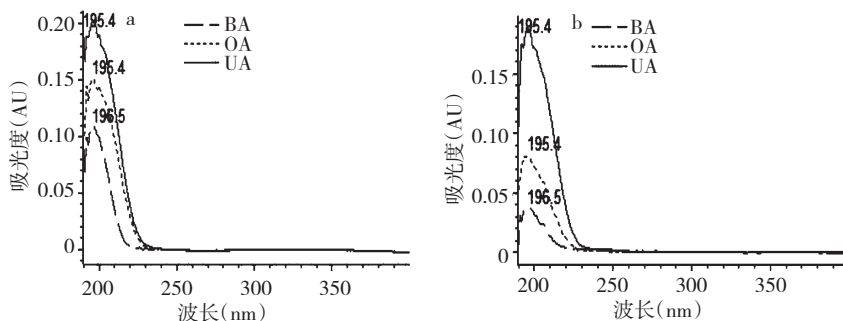


图 1 混合标准液(a)和样品溶液(b)中白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸的紫外光谱图

2.3 色谱条件的优化

为了探索实验色谱条件,分别考察了流动相甲醇-0.2%磷酸(87:13),流速:0.8 mL/min;流动相乙腈-水(80:20),流速:1.0 mL/min;乙腈:磷酸水溶液(pH=3.0),流速0.8 mL/min,3种流动相-流速体系,结果表明:甲醇-0.2%磷酸(87:13)流动相体系基线不稳;乙腈-水流动相体系基线良好,峰型严重前置,分离度较低;乙腈:磷酸水溶液(pH=3.0)峰型良好,分离度较好(白桦脂酸与杂峰的分离度为

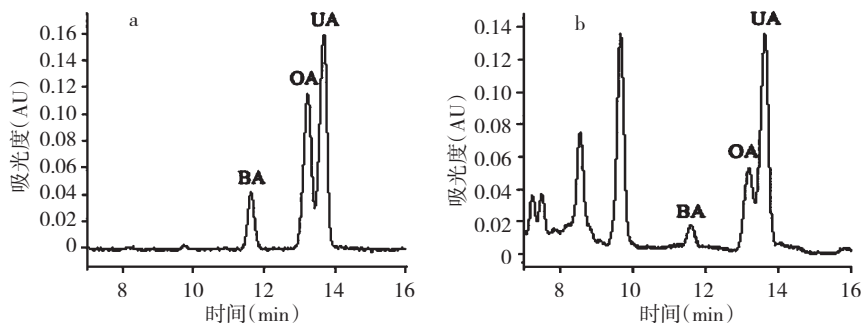


图2 混合标准液(a)和样品溶液(b)中白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸的色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of betulinic acid(BA), oleanolic acid(OA) and ursolic acid(UA) in the mixed standard(a) and the sample(b)

2.4 线性关系考察

分别进“1.3”中配好的混合标准液1、5、10、15、20、25 μL ,测定3种物质的峰面积。以进样质量

(μg)为横坐标,色谱峰面积A为纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程见表1。

表1 3种组分的线性回归方程

Table 1 Linearity of calibration curves of three components

标准溶液 Standard component	保留时间 Retention time (t/min)	线性范围 Linear range (μg)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient
白桦脂酸 betulinic acid	11.629	0.124-3.100	$y = 0.3749 \times 10^6 X - 0.0785 \times 10^6$	0.9996
齐墩果酸 oleanolic acid	13.288	0.160-4.000	$y = 0.8940 \times 10^6 X - 0.1493 \times 10^6$	0.9994
熊果酸 ursolic acid	13.629	0.288-7.200	$y = 0.6034 \times 10^6 X - 0.0784 \times 10^6$	0.9998

2.5 精密度重复性试验

2.5.1 精密度试验

以同一批白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸的混合标准品溶液进行进样分析,重复进样5次,计算得出:白桦脂酸峰面积相对标准偏差(RSD)为1.1% ($n=5$),齐墩果酸峰面积相对标准偏差(RSD)为1.5% ($n=5$),熊果酸峰面积相对标准偏差(RSD)为1.3% ($n=5$)。

2.5.2 重复性试验

精密称取同一批柿叶样品,按“1.3”样品溶液

的制备方法制备5份样品溶液,测定。计算得出:白桦脂酸平均峰面积的RSD为2.1% ($n=5$),齐墩果酸为平均峰面积的RSD为1.8% ($n=5$),熊果酸平均峰面积的RSD为1.7% ($n=5$)。

2.6 加标回收率试验

精密称取柿叶样品(磨盘柿)6份,分别加入已精密称定的白桦脂酸,齐墩果酸,熊果酸标准品,按“1.4”处理方法将其制成供试样品溶液,按“1.5”色谱条件测定加样回收率,结果见表2,由表2可以看出回收率结果令人满意。

表2 柿叶中3种组分回收率实验结果($n=6$)Table 2 Recoveries of three components in persimmon leaves($n=6$)

成分 component	样品量 Original (mg)	加入量 Added (mg)	测得 Found (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery rate(%)	RSD(%)
白桦脂酸 betulinic acid	0.8722	0.66	1.5103	96.68	98.22	2.3
	0.8722	0.66	1.5137	97.2		
	0.8722	0.66	1.5466	102.18		
	0.8722	0.66	1.5248	98.88		
	0.8722	0.66	1.5219	98.44		
	0.8722	0.66	1.5055	95.95		
齐墩果酸 oleanolic acid	1.406	1.35	2.7169	97.1	95.23	1.5
	1.406	1.35	2.6996	95.82		
	1.406	1.35	2.7064	96.33		
	1.406	1.35	2.6716	93.75		
	1.406	1.35	2.666	93.33		
	1.406	1.35	2.6892	95.05		
熊果酸 ursolic acid	4.5977	1.84	6.4825	102.43	103.87	1.1
	4.5977	1.84	6.4954	103.14		
	4.5977	1.84	6.4981	103.28		
	4.5977	1.84	6.5147	104.18		
	4.5977	1.84	6.5428	105.71		
	4.5977	1.84	6.5194	104.44		

2.7 样品成分测定

按“1.5”色谱条件测定3种柿叶样品白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸峰面积,平行3次,按外标法

计算柿叶样品中白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸的含量,结果见表3。

表3 柿叶中白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸含量测定结果($n=3$)Table 3 Contents of betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid in persimmon leaves($n=3$)

样品 Sample	含量 content($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)		
	白桦脂酸 betulinic acid	齐墩果酸 oleanolic acid	熊果酸 ursolic acid
磨盘柿 Mo pan	0.872	1.406	4.598
火晶柿 Huo jing	0.425	0.713	1.951
冬青柿 Dong qing	0.384	0.486	1.370

3 结论

本文采用高效液相色谱同时测定了柿叶中白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸的含量。较好地优化了色谱条件,使得齐墩果酸和熊果酸这两种同分异构体能够较好的分离。

由表3可知,不同品种间柿叶中3种成分变化差异很大,所以本法可用于测定不同品种间柿叶含量,选择出含量最高的品种作为栽培目标。本次实验研究出一种能有效、快速同时测定柿叶中白桦脂

酸、齐墩果酸和熊果酸的方法,为将来测定不同柿种柿叶的白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸提供重要的技术支持。同时也为其他同类型天然作物测定白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸起到很好参考作用。

参考文献

- 1 Northwest Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (中国科学院西北植物研究所). Flora of Qinling. 1st ed. 4th Volume(秦岭植物志(第一卷第4册)). Beijing: Science Press. 1983:58.

- 2 Dong XN(董晓宁),Tao L(陶蕾),Zhao Q(赵强),*et al.* Chemical components and pharmacological activity research progress of persimmon leaf. *J Trad Chin Veterinary Med*(中兽医医药杂志),2011,23(3):23-25.
- 3 Liviu Holonec,*et al.* Evaluation of betulin and betulinic acid content in birch bark from different forestry areas of western carpathians. *Not Bot Horti Agrobo*,2012,40(2):99-105.
- 4 Leopoldo C. Barattoa,*et al.* Preparation of betulinic acid derivatives by chemical and biotransformation methods and determination of cytotoxicity against selected cancer cell lines. *European J Med Chem*,2013,68:121-131.
- 5 Se Young Park,*et al.* Betulinic acid, a bioactive pentacyclic triterpenoid, inhibits skeletal-related events induced by breast cancer bone metastases and treatment. *Toxicol Appl Pharm*, 2014,23:1-11.
- 6 Hung HY,*et al.* A-ring modified betulinic acid derivatives as potent cancer preventive agents. *Bioorgan & Med Chem Lett*, 2014,24:1005-1008.
- 7 Fumio Hashimoto,*et al.* Anti-AIDS agents--XXVII. synthesis and anti-HIV activity of betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives. *Bioorgan & Med Chem*,1997,5:2133-2143.
- 8 Zhao D,*et al.* Synthesis of betulinic acid derivatives as entry inhibitors against HIV-1 and bevirimat-resistant HIV-1 variants. *Bioorgan & Med Chem Lett*,2012,22:5190-5194.
- 9 Yuan JF(原江锋),Yang JX(杨建雄),Zhang ZQ(张志琪). Determination of rutin and oleanolic acid in the leaves of persimmon in different seasons by RP-HPLC. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2006,18:1023.
- 10 Zeng HS(甌汉深),Huang SY(黄珊映),Tang WH(唐维宏). The determination of oleanolic acid in persimmon leaves. *Trad Chin Med Mater*(中药材),1998,21:354-355.
- 11 Zou SQ(邹盛勤),Sun W(孙伟). Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in persimmon Leaves by RP-HPLC. *Chin J Anal Lab*(分析实验室),2009,28(4):18-21.
- 12 Wang TY(王天勇),Yang WY(杨文远). RP-HPLC determination of oleanolic acid in seven Chinese medical herbs. *J Instrum Anal*(分析测试学报)1995,14(4):82-84.
- 13 Chen B L(陈宝林),Yang X(杨昕),Yang G(杨光). Content determination of betulinic acid in spina date seed by HPLC-ELSD. *Chin Pharm*(中国药房),2007,18:923-925.
- 14 Priyanka Srivastava,Rakhi Chaturvedi. Simultaneous determination and quantification of three pentacyclic triterpenoids-betulinic acid, oleanolic acid, and ursolic acid-in cell cultures of Lantana camaraL. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*,2010,23:549-557.
- 15 Ding Q(丁晴),Xu DR(徐德然),Wang ZT(王峥涛). HPLC determination of oleanolic acid and ursolic acid in pills of six drugs with rehmannia and capsule of six drugs with rehmannia. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2002,27:587-589.

(上接第 222 页)

- 7 Eichhorn S, Winterhalter P. Anthocyanins from pigmented potato varieties. *Food Res International*,2005,38:943-948.
- 8 Wang WD(王卫东),Li C(李超),Xu SY(许时婴). HPLC-ESI-MS for the Analysis of Anthocyanins in Blackberry. *Friut. Food Sci*(食品科学),2009,30:230-234.
- 9 Mai Mai Ti YM(买买提依明),Xu L(徐立),Wu C(武春),*et al.* Extraction and Analysis of flavonoids and polyphenols in Xinjiang Mulberry. *North Sericulture*(北方蚕业),2008,29(4):12-14.
- 10 Zhang F(张帆),Liu HB(刘宏炳),Tian SG(田树革),*et al.* Ultrasonic Extraction and Determination of flavonoids and polysaccharides in Xinjiang Mulberry. *J Nor Pharm*(西北药学杂志),2008,23:282-283.
- 11 Zhou J(周静),Yan DL(严栋林). Analysis and Evaluation of nutritional components of three kinds of Mulberry in Xinjiang. *Food Sci*(食品科学),2004,25:155-158.
- 12 Sun ZW(孙中武). Plant Chemistry(植物化学). Harbin: Northeast Forestry university Press,2001,311-314.
- 13 Kong JM,Chia LS,*et al.* Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*,2003,64:923-933.
- 14 Anna M. Bakowska-Barczak, Myles Marianchuk, Paul Kolodziejczyk. Survey of bioactive components in Western Canadian berries. *Can. J. Physiol. Pharmacol*,2007,85:1139-1150.
- 15 Lu Y(陆英),Li JY(李佳银),Luo J(罗晋),*et al.* Preparative isolation of Anthocyanins from purple sweet potato by HSCCC. *Chinese J Analytical Chem*(分析化学),2011,39:851-856.