

青钱柳叶片、愈伤组织及悬浮细胞中 齐墩果酸和熊果酸测定

张月红,上官新晨*,尹忠平,陈继光

(江西农业大学 食品科学与工程学院,江西省高校天然产物研究与开发重点实验室,江西 南昌 330045)

摘要: 建立高效液相色谱(HPLC)法测定青钱柳叶片、愈伤组织及悬浮细胞中齐墩果酸和熊果酸含量。考察齐墩果酸和熊果酸在不同色谱柱及流动相下的分离效果,并进行比较分析,确定色谱条件为:色谱柱 Waters Symmetry C₁₈(4.6 mm × 250 mm 5 μm),流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(87:13,V/V),流速0.85 mL/min,检测波长210 nm,柱温40℃。结果表明,齐墩果酸和熊果酸标品进样量在0.1~20 μg时线性关系良好,相关系数R²均大于0.999,平均加样回收率分别为97.87%、96.91%,RSD为1.90%、2.08%,青钱柳叶片、愈伤组织、悬浮细胞中齐墩果酸、熊果酸的含量差异较大。该方法简便快速,准确可靠,可用于青钱柳齐墩果酸和熊果酸含量的测定。

关键词: 青钱柳; 悬浮细胞; 愈伤组织; 齐墩果酸; 熊果酸

中图分类号: TS207.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)02-0363-06

Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Leaf, Callus and Suspension Cultured Cell of *Cyclocarya paliurus*

ZHANG Yue-hong, SHANGGUAN Xin-chen*,
YIN Zhong-ping, CHEN Ji-guang

(Key Laboratory of Natural Product Research and Development, College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: HPLC method was established for the determination of oleanolic acid and ursolic acid in leaf of *Cyclocarya paliurus* callus and suspension cultured cell. The chromatography method was used and the suitable conditions were determined through comparative analysis on the separation performance of oleanolic acid and ursolic acid at different C₁₈ columns and mobile phases. The samples were separated by Waters C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 0.85 mL/min velocity of the mobile phase which consisted of methanol and 0.1% phosphoric acid (87:13, V/V). The detective wavelength was set at 210 nm and the column temperature was 40℃. The calibration curves of oleanolic acid and ursolic acid exhibited good linearity over a concentration range from 0.1 to 20 μg, with correlation coefficients above 0.999. The average recoveries of oleanolic acid and ursolic acid were 97.87% and 96.91% respectively, RSD were 1.90% and 2.08%. The contents of oleanolic acid and ursolic acid in leaf, callus and suspension cultured cell of *Cyclocarya paliurus* were of large difference. This method was simple, accurate and stable, and thus was fit for determining the contents of oleanolic acid and ursolic acid in *Cyclocarya paliurus*.

收稿日期: 2011-10-26 修回日期: 2012-01-01

基金项目: 江西省主要学科学术和技术带头人项目(2009DD00900)和江西省科技厅支撑项目(2007BG09700)

作者简介: 张月红(1986—), 硕士生, 主要从事天然产物提取分离与利用研究, E-mail: yuehong955@163.com; * 通讯作者: 上官新晨, 教授, 博士生导师, E-mail: shangguanxc_818@sina.com。

Key words: *Cyclocarya paliurus*; suspension cultured cell; callus; oleanolic acid; ursolic acid

青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja) 又名摇钱树、青钱李等,系胡桃科青钱柳属,为我国特有的单种属珍稀植物,是国家重点保护的濒危植物之一^[1]。研究表明,青钱柳中含有萜类、多糖、黄酮等多种对人体有益的生理活性和药理功能物质^[2-5],具有较高的开发应用价值。然而,现有的青钱柳自然资源较少,且零星分布于一些自然保护区和深山老林中,国内外亦无成功大量人工繁殖和栽培的经验,这在一定程度上影响了青钱柳的开发利用及其产业化进程。因此在充分利用现有野生青钱柳资源外,利用青钱柳悬浮细胞和愈伤组织的大规模培养来获得高含量功效成分的原料,可解决青钱柳资源短缺问题。齐墩果酸和熊果酸是青钱柳中重要的五环三萜类化合物,具有降糖、降脂、抗肿瘤、抗爱滋、抗菌、抗炎、保肝等功效,在保健食品、药品和化妆品中有广泛的应用^[6-11]。齐墩果酸和熊果酸的分析方法主要包括薄层色谱法、气相色谱法、毛细管胶束电动色谱法、高效液相色谱法等,其中高效液相色谱法是最常见的分析方法^[12]。近年来,采用高效液相色谱法对植物中齐墩果酸和熊果酸含量测定的研究报道较多,但对青钱柳中齐墩果酸和熊果酸含量测定目前尚未见报道。本文建立了同时测定青钱柳叶片、愈伤组织和悬浮细胞中齐墩果酸和熊果酸含量的高效液相色谱法,为利用细胞工程方法生产齐墩果酸和熊果酸提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Waters 高效液相色谱仪(Waters1525 泵、Waters2487PDAD 检测器),Waters Symmetry C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm 分析柱); Phenomenex Luna C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm 分析柱)、Agilent Eclipse (250 mm × 4.6 mm, 5 μm 分析柱); HF-2.5B 超声循环提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司); Anke LXJ-II B 型低速离心机(上海安亭科学仪器厂)等。

甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯;齐墩果酸、熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所);超纯水为自制。青钱柳叶片、愈伤组织和悬浮细胞由江西农业大学食品科学与工程学院提供,常压干燥,粉碎后过60目筛备用。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm; 5 μm),检测波长 210 nm; 柱温 40 °C; 流动相为体积分数甲醇-0.1% 磷酸溶液(87:13, V/V); 流速 0.85 mL/min; 固定环进样量: 20 μL。

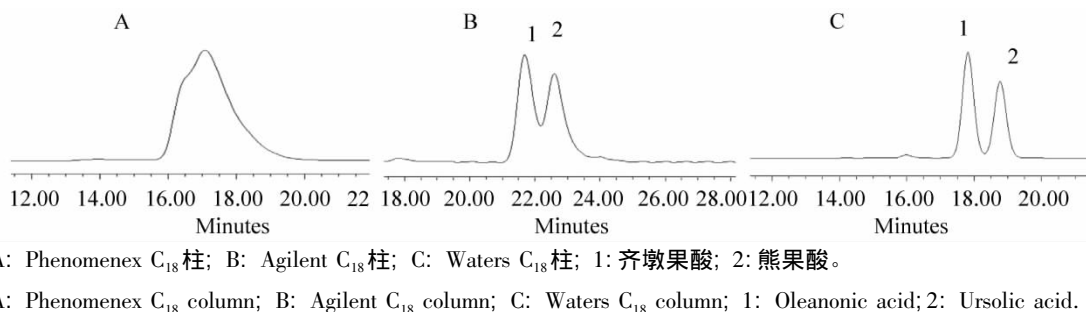
1.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取齐墩果酸、熊果酸对照品,用甲醇超声溶解配成齐墩果酸和熊果酸各含 2.0 mg/mL 的混合对照品储备液,并用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。齐墩果酸和熊果酸混合对照品溶液:取齐墩果酸和熊果酸的混合对照品储备液适量,用色谱甲醇逐级稀释成浓度为 2.0 mg/mL、1.0 mg/mL、0.5 mg/mL、0.1 mg/mL、0.01 mg/mL 一系列混合对照品溶液。

1.2.3 样品溶液的制备 精密称取青钱柳叶片、愈伤组织和悬浮细胞干粉各 500 mg,分别用 6 mL 乙酸乙酯 60 °C 超声提取 30 min 后离心(3 000 r/min) 10 min,取上层清液,重复提取 1 次,合并提取的上层清液,60 °C 恒温挥干乙酸乙酯,再分别以 10 mL 色谱甲醇充分溶解,并用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液作为样品溶液备用。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 色谱柱 色谱柱是高效液相色谱的核心,其分离效果将直接影响检测结果。本实验考察了在相同色谱条件下(流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液体积分数 87:13,检测波长 210 nm,柱温 40 °C,流速 0.85 mL/min) Phenomenex Luna、Agilent Eclipse、Waters Symmetry 3 种不同品牌的 C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm; 5 μm)对齐墩果酸和熊果酸的分离效果,结果如图 1 所示: Phenomenex C₁₈柱分离效果较差,齐墩果酸和熊果酸完全没有分开; Agilent C₁₈柱的分离效果优于 Phenomenex C₁₈柱,齐墩果酸和熊果酸保留时间分别为 21.685 min

图1 不同 C₁₈ 柱色谱图Fig. 1 HPLC chromatograms of different C₁₈ column

和 22.595 min, 但两色谱峰未能达到基线分离; Waters C₁₈ 柱的分离效果优于前两者, 两色谱峰达到基线分离, 而且齐墩果酸和熊果酸保留时间少于 Agilent C₁₈ 柱。所以确定 Waters Symmetry C₁₈ 柱为本实验色谱柱。

2.1.2 流动相 本实验在借鉴文献[13-16]的基础上, 分别以甲醇:0.1%磷酸溶液的体积比为 85:15、87:13、90:10 为条件进行测试, 结果如图 2 所示。随甲醇用量的增加, 齐墩果酸和熊果酸的保留时间缩短, 峰高增加, 峰宽降低, 峰型呈现更高更窄的趋势。甲醇:0.1%磷酸溶液体积比为 85:15 时虽然分离度大于 1.5, 但齐墩果酸和熊果酸的保留时间将近 30 min, 保留时间较长。在对不同的样品进行测定时发现, 对于悬浮细胞和愈伤组织样品, 甲醇:0.1%磷酸溶液为 87:13 和 90:10 时, 分离效果差别不大; 但对青钱柳叶片样品, 甲醇:0.1%磷酸溶液 = 90:10 时, 齐墩果酸和熊果酸与其他峰产生叠加, 而采用甲醇:0.1%磷酸溶液 = 87:13, 能有效地分开。因此选用甲醇:0.1%磷酸溶液体积比为 87:13 作为流动相。

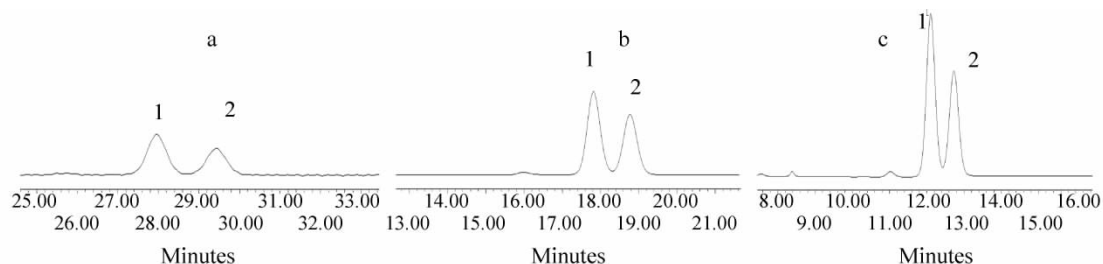


图2 不同甲醇:0.1%磷酸溶液体积比流动相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of different mobile phase

2.2 系统适用性实验

分别取混合对照品溶液和样品溶液, 按“1.2.1”项色谱条件进行测定。结果齐墩果酸和熊果酸色谱峰能达到基线分离, 且样品中齐墩果酸和熊果酸保留时间与相应对照品基本一致, 结果见图 3~6。

2.3 标准曲线的制备

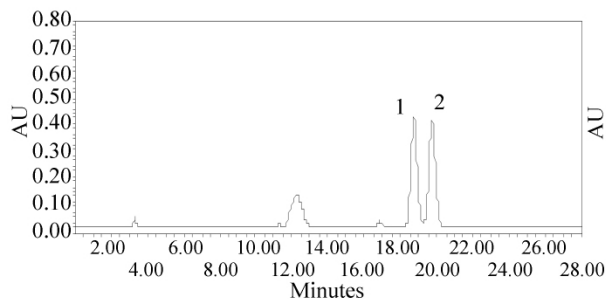
精密吸取按“1.2.2”项方法制备浓度为 0.01、0.10、0.50、1.00、2.00 mg/mL 混合对照品溶液, 每一浓度进样 10 μL, 在“1.2.1”项色谱条件下测定峰面积积分值。以峰面积积分值为纵坐标, 对照品进样量(μg)为横坐标绘制标准曲线, 齐墩果酸和熊果酸线性回归方程分别为: $y = 417.185x + 59.989$, $R^2 = 0.9998$; $y = 393.576x + 27.870$, $R^2 = 0.9993$ 。表明当齐墩果酸和熊果酸进样量分别为 0.1~20 μg 时, 进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度实验

取“1.2.2”项下浓度为 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液, 按照上述色谱条件进行测定, 重复进样 5 次, 每次 20 μL, 数据见表 1。齐墩果酸、熊果酸峰面积的 RSD 分别为 1.57% (n=5)、0.97% (n=5), 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性实验

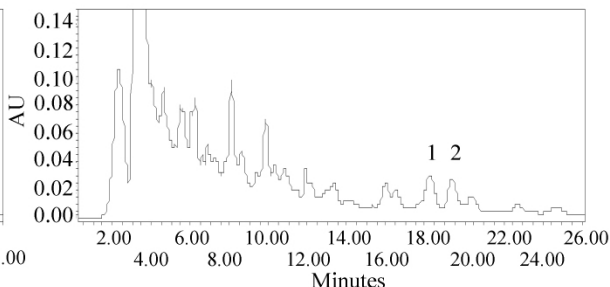
按“1.2.3”项方法制备悬浮细胞样品溶液, 分别于 0、1、2、4、8 h 精密吸取 10 μL 进样测定, 数据见



1: 齐墩果酸; 2: 熊果酸。1: Oleanolic acid; 2: Ursolic acid.

图 3 齐墩果酸和熊果酸对照品 HPLC 图谱

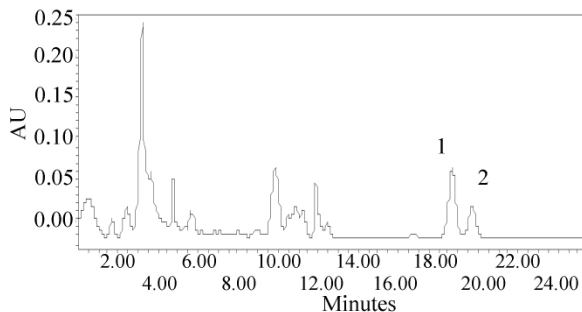
Fig. 3 HPLC chromatograms of oleanolic acid and ursolic acid



1: 齐墩果酸; 2: 熊果酸。1: Oleanolic acid; 2: Ursolic acid.

图 4 叶片样品 HPLC 图谱

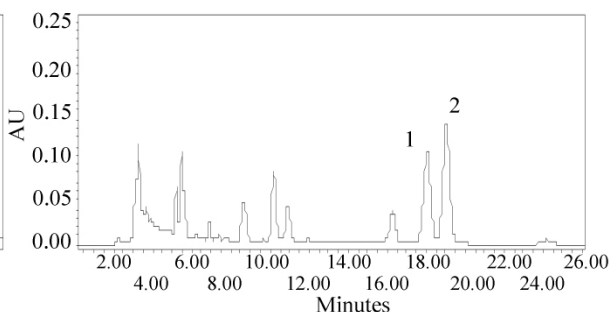
Fig. 4 HPLC chromatograms of leaves sample



1: 齐墩果酸; 2: 熊果酸。1: Oleanolic acid; 2: Ursolic acid.

图 5 愈伤组织样品 HPLC 图谱

Fig. 5 HPLC chromatograms of callus sample



1: 齐墩果酸; 2: 熊果酸。1: Oleanolic acid; 2: Ursolic acid.

图 6 悬浮细胞样品 HPLC 图谱

Fig. 6 HPLC chromatograms of suspension cells sample

表 1 精密度实验

Tab. 1 Precision test

样品号 Number	进样量/ μL Sample size	峰面积 Peak area		平均峰面积 Average peak area		相对标准偏差/% RSD	
		齐墩果酸 Oleanolic acid	熊果酸 Ursolic acid	齐墩果酸 Oleanolic acid	熊果酸 Ursolic acid	齐墩果酸 Oleanolic acid	熊果酸 Ursolic acid
1	20	149 250	122 145				
2	20	147 536	123 756				
3	20	153 295	124 811	150 822	123 363	1.57	0.97
4	20	151 787	122 089				
5	20	152 243	124 012				

表 2。齐墩果酸、熊果酸峰面积 RSD 分别为 1.71% ($n = 5$)、2.05% ($n = 5$)。结果表明样品溶液在 8 h 内稳定性较好。

2.6 重复性试验

精密称取悬浮细胞样品 5 份, 每份 500 mg, 按“1.2.3”方法制备 5 份悬浮细胞样品溶液进行测定。

表 2 稳定性实验

Tab. 2 Stability test

时间/h Time	进样量/ μL Sample size	峰面积 Peak area		平均峰面积 Average peak area		相对标准偏差/% RSD	
		齐墩果酸 Oleanolic acid	熊果酸 Ursolic acid	齐墩果酸 Oleanolic acid	熊果酸 Ursolic acid	齐墩果酸 Oleanolic acid	熊果酸 Ursolic acid
0	10	2 839 458	3 651 889				
1	10	2 798 711	3 682 950				
2	10	2 816 769	3 573 378	2 786 889	3 592 212	1.71	2.05
4	10	2 720 025	3 546 275				
8	10	2 759 483	3 506 566				

数据见表 3。齐墩果酸、熊果酸含量的 *RSD* 分别为 1.66% ($n=5$)、1.12% ($n=5$)，方法重现性良好。

表 3 重复性实验

Tab. 3 Repeatability test

样品号 Number	进样量/ μL Sample size	样品含量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ Sample content		平均值/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ Average value		相对标准偏差/% <i>RSD</i>	
		齐墩果酸 Oleanolic acid	熊果酸 Ursolic acid	齐墩果酸 Oleanolic acid	熊果酸 Ursolic acid	齐墩果酸 Oleanolic acid	熊果酸 Ursolic acid
		1	10	6.450	9.055		
2	10	6.541	9.008				
3	10	6.380	9.147	6.42	9.01	1.66	1.12
4	10	6.256	8.940				
5	10	6.459	8.888				

2.7 加样回收率实验

称取已知含量的悬浮细胞样品(齐墩果酸含量为 12.86 mg/g,熊果酸含量为 18.07 mg/g) 5 份,分别加入齐墩果酸和熊果酸混合对照品适量,按“1.2.3”方法制成加标样品溶液,在“1.2.1”项色谱条件下进样测定熊果酸和齐墩果酸的含量,计算加样回收率。数据见表 4。

表 4 齐墩果酸和熊果酸回收率结果($n=5$)Tab. 4 Recoveries of oleanolic acid and ursolic acid($n=5$)

分类 Sort	样品含量/ μg Sample content	加标量/ μg Additional mark quantity	总测量/ μg Overall measurement	回收率/% Recovery rate	平均回收率/% Average recovery rate	相对标准偏差/% <i>RSD</i>
齐墩果酸 Oleanolic acid	6.403	1.5	7.907	100.27	97.87	1.90
	6.505	1.5	7.956	96.73		
	6.213	1.5	7.705	99.47		
	6.302	1.5	7.752	96.67		
	6.593	1.5	8.036	96.20		
熊果酸 Ursolic acid	9.125	1.5	10.615	99.33	96.91	2.08
	9.270	1.5	10.698	95.20		
	8.854	1.5	10.284	95.33		
	8.981	1.5	10.464	98.87		
	9.396	1.5	10.833	95.80		

2.8 样品含量测定

取青钱柳叶片、愈伤组织和悬浮细胞样品,每样品 3 份,按“1.2.4”项方法操作,制成样品溶液,分别在“1.2.1”项色谱条件下进行测定。结果表明青钱柳叶片、愈伤组织与悬浮细胞中齐墩果酸和熊果酸的含量差别较大,其中悬浮细胞、愈伤组织中齐墩果酸和熊果酸的含量均高于叶片,数据见表 5 和表 6。

3 讨论

(1) 齐墩果酸和熊果酸为同分异构的五环三萜化合物,性质非常相近,用液相进行分离时因其保留时间十分接近而很难分离。本实验参考文献[14-16],采用 HPLC 法,选择 210 nm 为检测波长同时测定青钱柳叶片、愈伤组织、悬浮细胞中齐墩果酸和熊果酸的含量。考察了在相同色谱条件下 Phenomenex Luna、Agilent Eclipse、Waters Symmetry 3 种不同品牌的 C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm; 5 μm) 对齐墩果酸和熊果酸的分离效果,结果表明 Waters C_{18} 柱的分离效果优于其他,确定为本实验色谱柱。并通过甲醇-0.1% 磷酸以不同比例(85:15、87:13、90:10) 混合作为流动相,考察其分离效果,结果 210 nm 为检测

表 5 样品中齐墩果酸含量的测定 (n=3)

Tab.5 Oleanolic acid contents of different samples (n=3)

样品 Sample	齐墩果酸含量/(mg·g ⁻¹) Oleanolic acid content			平均值/(mg·g ⁻¹) Average value	相对标准偏差/% RSD
悬浮细胞 Suspension cultured cell	12.705	12.769	13.096	12.86	1.63
愈伤组织 Callus	2.518	2.540	2.467	2.51	1.49
叶片 Leaf	0.209	0.220	0.213	0.21	2.60

表 6 样品中熊果酸含量的测定 (n=3)

Tab.6 Ursolic acid contents of different samples (n=3)

样品 Sample	熊果酸含量/(mg·g ⁻¹) Ursolic acid content			平均值/(mg·g ⁻¹) Average value	相对标准偏差/% RSD
悬浮细胞 Suspension cultured cell	18.146	17.879	18.201	18.07	0.95
愈伤组织 Callus	0.820	0.831	0.849	0.83	1.76
叶片 Leaf	0.141	0.135	0.139	0.14	2.21

波长 流速 0.85 mL/min, 甲醇:0.1% 磷酸 (87:13) 样品中齐墩果酸、熊果酸分离较好。该方法简便快速 结果准确可靠 精密度高, 重复性及线性关系良好, 回收率较好, 可用于青钱柳悬浮细胞和愈伤组织规模化生产中齐墩果酸和熊果酸的定量分析, 也可为含青钱柳功能性食品的含量测定提供依据。

(2) 通过悬浮细胞和愈伤组织等生物反应器生产所需要的代谢产物来解决野生资源匮乏的问题, 已逐渐引起人们的关注与重视。实验表明由青钱柳叶诱导培养所获得的愈伤组织、悬浮细胞都能够产生齐墩果酸和熊果酸, 而且悬浮细胞中齐墩果酸和熊果酸含量相对较高, 分别为 12.86 mg/g、18.07 mg/g; 愈伤组织与叶片中齐墩果酸的含量相对较少分别为 2.51 mg/g、0.21 mg/g; 而熊果酸含量则更低为 0.83 mg/g 和 0.14 mg/g。可见利用青钱柳细胞反应器规模化生产具有相关功能活性的代谢产物具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1]徐庆,宋芸娟.青钱柳的研究概况[J].华夏医学,2004,17(3):451-453.
 [2]谢明勇,谢建华.青钱柳研究进展[J].食品与生物技术学报,2008,27(1):113-121.
 [3]陈金华,黄建安,刘仲华.青钱柳叶的化学成分分析[J].食品工业科技,2009,30(7):159-160,278.
 [4]Xie Ming yong, Li Lei, Nie Shao ping, et al. Determination of speciation of elements related to blood sugar in bioactive extracts from *Cyclocarya paliurus* leaves by FIA-ICP-MS[J]. Eur Food Res Technol, 2006, 223: 202-209.
 [5]尹忠平,上官新晨,黎冬明,等.超声辅助提取青钱柳叶总三萜化合物研究[J].江西农业大学学报,2010,32(2):373-377.
 [6]李宏杨,刘国民,刘飞,等.熊果酸及五环三萜同类的研究进展[J].湖南工业大学学报,2009,23(5):18-21,51.
 [7]高大威.齐墩果酸抗糖尿病作用及其机理研究[D].秦皇岛:燕山大学,2007.
 [8]Ma C, Cai S, Cui J R, et al. The Cytotoxic activity of ursolic acid derivatives[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 40: 582-589.
 [9]Li J, Guo W J, Yang Q Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15[J]. World Journal of Gastroenterology, 2002, 8: 493-495.
 [10]Huang Jian, Tang Xiaohui, Takashi Ikejima, et al. A new triterpenoid from *Panax ginseng* exhibits cytotoxicity through p53 and the caspase signaling pathway in the HepG2 cell line[J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(3):323-329.
 [11]René V Bensasson, Vincent Zoete, Gaston Berthier, et al. Potency ranking of triterpenoids as inducers of a cytoprotective enzyme and as inhibitors of a cellular inflammatory response via their electron affinity and their electrophilicity index[J]. Chemico-Biological Interactions, 2010, 186(2):118-126.
 [12]盛艳乐,赵大球,周春华,等.植物熊果酸和齐墩果酸分析的研究进展[J].中国农学通报,2009,25(23):347-350.
 [13]杜丰玉,陈钧,许月明,等.高效液相色谱法测定枇杷叶中熊果酸和齐墩果酸含量[J].中国医院药学杂志,2008,28(1):21-23.
 [14]沈晓丹,袁杰,徐乃玉,等.HPLC测定蓝萼香茶菜中齐墩果酸和熊果酸含量[J].中成药,2010,32(12):2182-2183.
 [15]李华荣,高逢喜,任贻军.资木瓜中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[J].时珍国医国药,2010,21(10):2563-2564.
 [16]邹盛勤,周蓉,刘名权.RP-HPLC-PAD法同时测定枸骨中熊果酸和齐墩果酸含量[J].北京中医药大学学报,2009,32(1):53-55.