

HPLC测定迷迭香中齐墩果酸、熊果酸的含量

李历茹, 郑玉丽, 丁杰*

四川轻化工大学化学工程学院, 四川 自贡

收稿日期: 2022年10月17日; 录用日期: 2022年11月14日; 发布日期: 2022年11月22日

摘要

利用高效液相色谱法, 同时检测迷迭香中齐墩果酸、熊果酸的含量, 用安捷伦色谱分析柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 氨水(0.1%): 乙腈(磷酸调节pH = 7.3) (35:65)为流动相, 流速1.2 mL/min, 柱温25°C, 测量波长为206 nm。结果: 1) 齐墩果酸在13.7 min左右出峰, 在194~970 μg/mL内的线性关系良好, R值为0.9992, 平均回收率为98.83%, RSD为1.96%; 2) 熊果酸在15.0 min左右出峰, 在52.75~1055 μg/mL内线性相互作用良好, R值为0.9994, 平均回收率为99.36%, RSD为1.93%。两者分离度为1.81, 理论塔板数大于5000。结论: 该方法实现了迷迭香中齐墩果酸、熊果酸的分离及含量检测, 且方法准确、可靠。经检测, 迷迭香样品含有齐墩果酸约1.54%、熊果酸约2.97%, 开发了丰富的齐墩果酸、熊果酸植物资源。

关键词

高效液相色谱, 迷迭香, 齐墩果酸, 熊果酸

Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in *Rosmarinus officinalis* by HPLC

Liru Li, Yuli Zheng, Jie Ding*

College of Chemical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong Sichuan

Received: Oct. 17th, 2022; accepted: Nov. 14th, 2022; published: Nov. 22nd, 2022

Abstract

The contents of oleanolic acid and ursolic acid in *Rosmarinus officinalis* were simultaneously determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), and Agilent chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), acetonitrile: ammonia (0.1%) (adjusted pH = 7.3 by phosphoric

*通讯作者。

acid) (65:35) as the mobile phase, flow rate of 1.2 mL/min, column temperature of 25°C, measurement wavelength of 206 nm. Results: 1) oleanolic acid peaked at about 13.7 min, ranging from 194 to 970 µg/mL. The linear relationship was good in the range of 0.9992, the average recovery was 98.83%, and the RSD was 1.96%; 2) Ursolic acid peaked at about 15.0 min, ranging from 52.75 to 1055 µg/mL. The linear interaction was good in the range of 0.9994, the average recovery was 99.36%, and the RSD was 1.93%. The separation of the two is 1.81 and the number of theoretical trays is more than 5000. Conclusion: the method can be used for the separation and determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Rosmarinus officinalis*, and the method is accurate and reliable. After testing, the sample of *Rosmarinus officinalis* contains about 1.54% oleanolic acid and about 2.97% ursolic acid. It has developed rich plant resources of oleanolic acid and ursolic acid.

Keywords

HPLC, *Rosmarinus officinalis*, Oleanolic Acid, Ursolic Acid

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

迷迭香(*Rosmarinus officinalis*), 是双子叶花卉纲、唇形科迷迭香属花卉, 迷迭香全株均具有较为广泛的药用以及食品、化妆品用途, 原产于中欧和非洲以北的地中海沿岸, 后引入我国并有大规模的种植。迷迭香中含有丰富的药用资源[1], 蕴含的酚类是其主要的成分, 属于酚酸类的鼠尾草酚、鼠尾草酸、绿原酸、咖啡酸类都是工业生产与应用广泛的天然抗氧化剂[2]。水溶性成分迷迭香精油具有清除自由基、蛋白质和酯类的抗氧化作用[3], 迷迭香精油中的樟脑成分、 α -蒎烯类具有抗菌的功效[4]。迷迭香中的五环三萜类成分齐墩果酸及熊果酸的含量在近年来的研究提取、分离中被广泛关注, 两者拥有多种生物活性, 可以护血管、降血脂、降压、护肝、护肾、抗焦虑、调控免疫[5]。特别是近年来, 有关于熊果酸、齐墩果酸的抗肿瘤活性和延缓衰老的研究成为热点, 两者目前主要来源为天然药物提取。但由于齐墩果酸与熊果酸均为五环三萜型的同分异构体, 仅 29、30 位之间的甲基位置差异, 很难将二者完全分离, 检测二者的色谱条件不理想、分离度较差[6] [7] [8] [9]。此外, 新版药典[10]中的色谱条件分离效果也不太理想。有研究报道[11]利用 HPLC 法测定一些中草药中两种三萜酸的含量, 代琪[12]等、孟文静[13]等分别对木瓜和枇杷叶中的齐墩果酸、熊果酸进行了 HPLC 的含量分析, 但有关迷迭香药材中齐墩果酸、熊果酸的分析方法以及应用情况却尚未见详尽研究。本实验开发了一种新的色谱方法, 分离并测定了迷迭香中两者的含量, 获取了从天然植物中提取更高含量的齐墩果酸和熊果酸的新途径, 并为迷迭香药物开发质量分析和控制、迷迭香药材中提取分离齐墩果酸和熊果酸工艺研究提供可靠的检测方法和科学依据。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

UV1900 双光束紫外可见分光光度计(上海佑科), 日立高效液相色谱仪(Primaide Primaide 1410 UV 检测器, 1210 自动进样器, 1310 柱温箱), 安捷伦色谱分析柱(ZORBAX SB-C₁₈, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm), SHIMADZU AUY120 电子天平(岛津公司), SB-3200 DT 型超声波清洗机(频率 40 KHz, 超声功率 180 W, 加热功率 400 W, 新芝公司)。

齐墩果酸对照品(B20954, 含量 HPLC $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司), 熊果酸对照品(B21403, 含量 HPLC $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司), 迷迭香药材(购于安徽亳州药材市场); 乙腈试剂与甲醇试剂(色谱级, 赛默飞公司), 实验室自制超纯水。

2.2. 对照品溶液的配制

分别精密称取 25.00 mg 的两种标准对照品, 少量甲醇配成溶液后倒入 25 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度线, 摇匀, 制成各为 1.00 mg/mL 的对照品溶液。

2.3. 供试液的制备

精密称定迷迭香粉末 0.50 g, 精密加甲醇 10.00 mL, 混合均匀后称量, 50°C 下超声 1 h 后, 冷却到室温, 甲醇溶剂补足重量, 抽滤, 取滤液备用, 滤渣中重新加入 10.00 mL 甲醇溶液, 重复上述条件超声处理, 合并两次滤液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 即得。

2.4. 检测波长的选择

双光束紫外可见分光光度计测定熊果酸、齐墩果酸标准品溶液和迷迭香提取液紫外吸收曲线(图 1), 显示最大吸收波长都在 206 nm 处, 设定 206 nm 为工作波长。

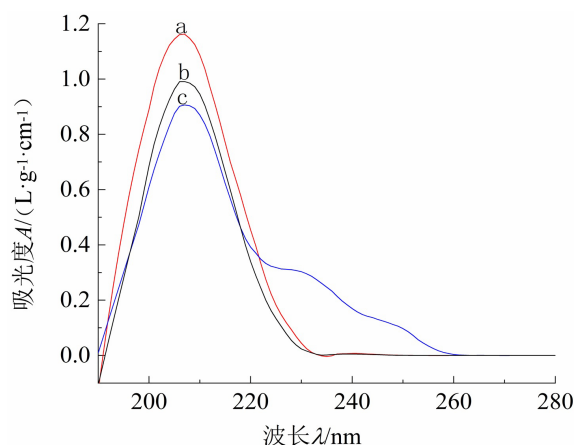


Figure 1. Ultraviolet wavelength scanning Diagram. (a) Oleanolic acid; (b) Ursolic acid; (c) *Rosmarinus officinalis* extract

图 1. 紫外波长扫描图。(a) 齐墩果酸; (b) 熊果酸; (c) 迷迭香提取液

2.5. 色谱条件的确定

《中国药典》中还未收录迷迭香药材。依据《中华人民共和国药典》2020 版第一部木瓜中齐墩果酸、熊果酸含量测定项的方法[14], 选择用甲醇-冰醋酸-水-三乙胺、甲醇-乙腈-0.5%醋酸铵溶液、乙腈-0.2%醋酸水溶液、乙腈-0.2%乙酸铵水溶液、乙腈-0.1%氨水等体系, 对熊果酸、齐墩果酸组分色谱过程的流动相进行了检测筛选。

3. 结果与讨论

3.1. 流动相的确定

试验结果表明, 甲醇-冰醋酸-水-三乙胺(65:0.1:34.85:0.05)为流动相(图 2), 测定波长 206 nm, 柱

温 16℃~18℃, 在此色谱条件下的齐墩果酸和熊果酸分离度小于 1.5。甲醇-乙腈-0.5%醋酸铵溶液(12:67:21)为流动相(图 3), 检测波长为 206 nm, 此色谱条件下的齐墩果酸和熊果酸分离度不好; 乙腈-0.2%醋酸水溶液(88:12)(图 4)、乙腈-0.2%乙酸铵水溶液(83:17)(图 5), 分离度均低于 1.5, 齐墩果酸和熊果酸分离不佳。

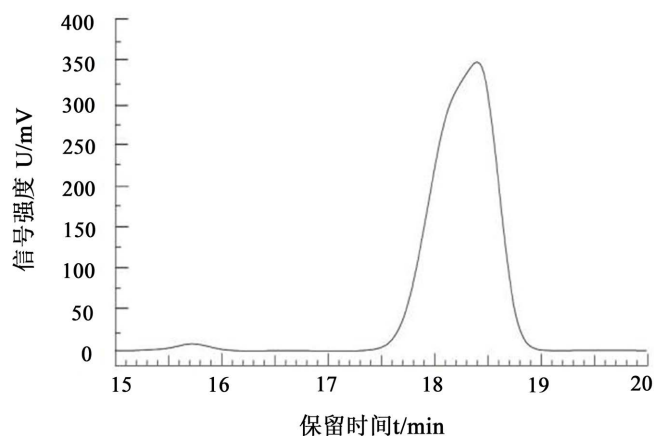


Figure 2. Methanol-glacial acetic acid-water-triethylamine (65:0.1:34.85:0.05)

图 2. 甲醇-冰醋酸-水-三乙胺(65:0.1:34.85:0.05)

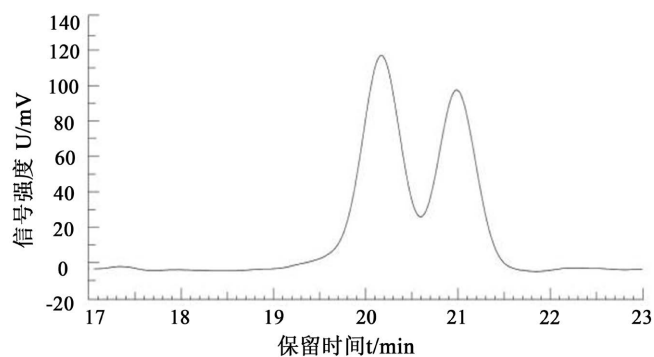


Figure 3. Methanol-acetonitrile-0.5% ammonium acetate solution (12:67:21)

图 3. 甲醇-乙腈-0.5%醋酸铵溶液(12:67:21)

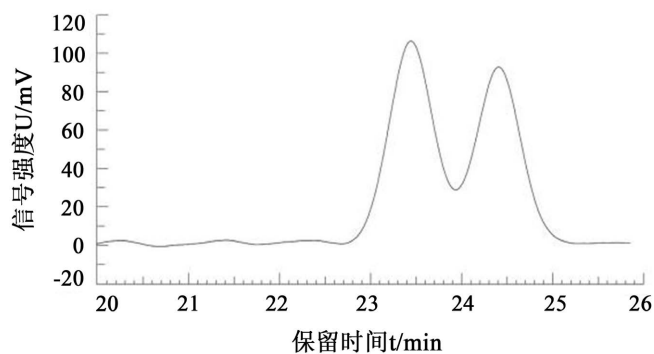


Figure 4. Acetonitrile-0.2% acetic acid aqueous solution (83:17)

图 4. 乙腈-0.2%醋酸水溶液(83:17)

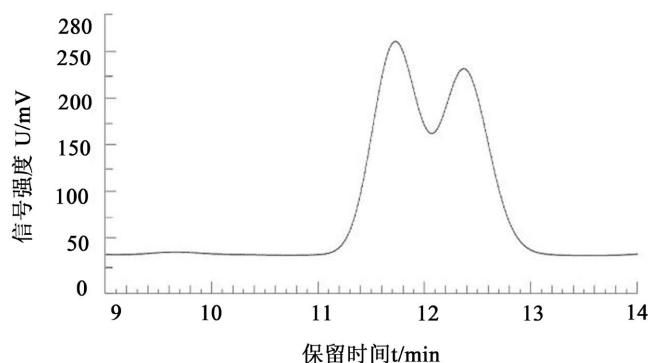


Figure 5. Acetonitrile-0.2% ammonium acetate aqueous solution (83:17)

图 5. 乙腈-0.2% 乙酸铵水溶液(83:17)

乙腈 - 氨水 - 磷酸体系, 经多次实验, 结果基线平稳, 再现性好, 可用于检测植物中熊果酸、齐墩果酸, 并发现 pH 对分离起着至关重要的作用。对比于 pH = 6.8、7.0、7.4、7.8 的色谱过程, pH ≤ 7.0 时, 齐墩果酸和熊果酸并不能得到有效分离; pH 处于碱性时, 两物质成离子化状态, 有利分离, 在 pH = 7.4 和 7.8 时, 分离效果相同, 但色谱分析柱的 pH 耐受范围一般为 2~8 之间, 设定 pH 为 7.4。考察不同质量分数的氨水(0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%)时, 0.05% 氨水分离度达不到规定要求, 0.1%~0.2% 的浓度分离度和理论塔板数基本相同, 选择质量分数为 0.1% 的氨水溶液。调节流动相比比例, 最后确定的色谱条件为乙腈-0.10% 氨水(65:35) (磷酸调 pH = 7.4), 流量为 1.2 mL/min, 基线平直稳定, 齐墩果酸的出峰时间约为 13.767 min; 熊果酸的出峰时间约为 15.033 min (图 6), 且峰形较好, 理论塔板数大于 5000, 分离度为 1.81, 达到完全分离。对迷迭香样品提取液进行检测, 液相色谱图如图 7 所示。

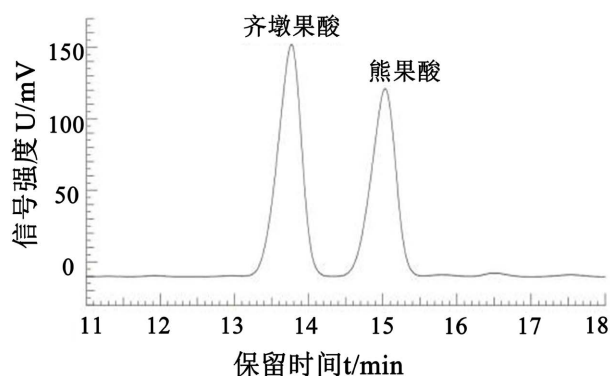


Figure 6. Chromatogram of mixed solution of oleanolic acid and ursolic acid reference substance

图 6. 齐墩果酸、熊果酸对照品混合液色谱图

3.2. 标准曲线及线性关系

精密吸取齐墩果酸、熊果酸两种标准品溶液混匀, 置于 5 mL 容量瓶中, 甲醇溶液定容, 分别吸取混合液并制成不同浓度梯度的标准品溶液。取 10 μL 进样检测, 经线性回归处理, 所得齐墩果酸和熊果酸的回归方程式依次为 $Y = 6283.2X + 284028$ ($R^2 = 0.9992$); $Y = 5455.8X + 154524$ ($R^2 = 0.9994$), 实验结果表明, 齐墩果酸浓度在 97.00~970.00 μg/mL (如图 8 所示)、熊果酸浓度在 52.75~1055.00 μg/mL 范畴内有着较好的线性关系(如图 9 所示)。

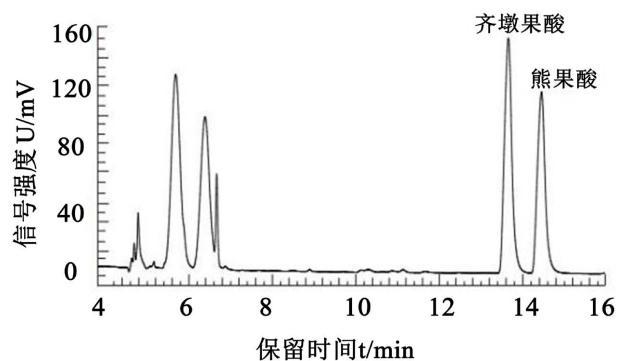


Figure 7. Chromatogram of *Rosmarinus officinalis* extract

图 7. 迷迭香提取液色谱图

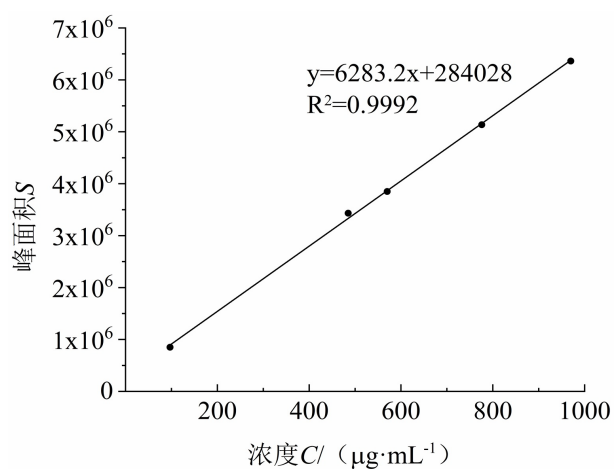


Figure 8. Standard curve of oleanolic acid

图 8. 齐墩果酸标准曲线图

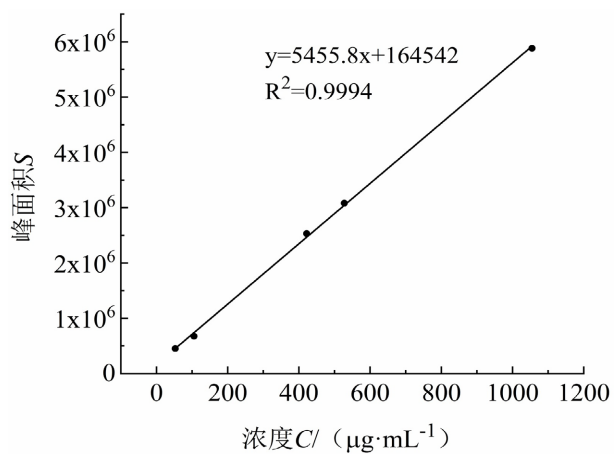


Figure 9. Standard curve of ursolic acid

图 9. 熊果酸标准曲线图

3.3. 迷迭香中熊果酸和齐墩果酸含量测定

精密称定迷迭香粉末 0.50 g, 精密加入 15.00 mL 甲醇溶剂, 混匀称量, 50℃下超声一小时后, 放冷,

补足比量, 过滤后, 得续滤液备用, 再取上层滤渣重新加入 5.00 mL 甲醇溶液并重新于相同条件下超声处理, 再重复第一次操作后, 经证明滤渣中已无齐墩果酸和熊果酸, 合并上述两次滤液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 进样检测, 色谱图如图 9 所示, 迷迭香粉末中含有齐墩果酸 1.54%, 含有熊果酸 2.97%, 含量与文献[15]报道基本吻合。

3.4. 精密度实验

吸取以上两个对照品混合溶液 0.10 mL, 置于 1 mL 容量瓶中, 补液得混合标准液。精密吸取混标 10 μL 后, 于上述色谱条件要求下重复进样 5 次, 记录峰面积。齐墩果酸和熊果酸的 RSD 分别为 0.472% 和 0.717%, RSD 均 < 3.00%, 精密度良好。

3.5. 稳定性试验

取供试品, 间隔 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 进样, 进样量均为 10 μL , 记录峰面积。齐墩果酸 RSD = 0.24%, 熊果酸 RSD = 0.61%, 试验证明供试品溶液在 24 小时内稳定。

3.6. 重复性试验

称取迷迭香粉 0.50 g, 制备供试品, 设定色谱条件, 记录峰面积, 齐墩果酸 RSD = 1.60%, 熊果酸 RSD = 2.60%, 试验结果表明方法的重现性良好。

3.7. 回收率试验

称取已知含量的迷迭香粉, 共九份, 然后精密加入齐墩果酸和熊果酸对照品溶液, 按照 2.3.2 项的制备工艺制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 设定色谱条件, 记录峰面积, 并计算加样回收率。齐墩果酸 RSD = 1.96%, 熊果酸 RSD = 1.93%, 实验结果表明回收率良好, 见表 1、表 2。

Table 1. Recovery rate test of oleanolic acid

表 1. 齐墩果酸加样回收率试验

本底值 m/ μg	加入量 m/ μg	测得量 m/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
225.8	150.1	373.1	99.7		
223.9	150.1	370.1	100.1		
215.4	150.1	373.0	99.9		
224.5	450.3	676.6	100.4		
229.1	450.3	678.7	97.6	98.83	1.96
229.8	450.3	687.6	101.6		
227.4	1050.1	1677.4	96.6		
221.2	1050.1	1686.0	97.7		
220.1	1050.1	1658.5	95.8		

Table 2. Ursolic acid sample adding recovery test

表 2. 熊果酸加样回收率试验

本底值 m/ μg	加入量 m/ μg	测得量 m/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
283.8	250.0	531.4	99.04		
280.1	250.0	532.5	100.9		

Continued

283.2	250.0	524.0	96.3		
284.5	812.5	1081.1	98.04		
283.3	812.5	1102.9	100.8	1.93	1.93
280.2	812.5	1065.2	96.6		
283.2	1250.0	1546.0	100.0		
283.4	1250.0	1539.0	100.4		
289.5	1250.0	1551.0	95.8		

4. 讨论

1) 二者同分异构体的结构,使得分离及检测时选择合适的色谱条件难度极大,文献报道[16]中的高效液相色谱条件分离度小于 1.5,而本研究所确定的高效液相色谱条件分离度大于 1.5,且通过对方法性能及可靠性的考察,适用于不同种药材中齐墩果酸、熊果酸的含量分析。

2) 通过本方法的液相色谱条件,分离并测定了迷迭香药材中齐墩果酸、熊果酸的含量,实验结果表明,迷迭香中含有齐墩果酸约 1.54%,熊果酸约 2.97%,相较于市场上主要从枇杷叶中提取所得的两种物质,迷迭香中有更多的含量。

3) 化学性质很相似的齐墩果酸和熊果酸经过离子化途径,改变二者在流动相中原本相似的性质,实现了两种同分异构体的柱分离途径。

4) 本实验还比较了甲醇、乙醇、异丙醇等提取溶剂中齐墩果酸及熊果酸的溶出效果,得出了最佳溶出条件,即取 40 目磨碎的迷迭香粉 0.50 g 于甲醇溶剂中,料液比为 1:30,在 50 摄氏度下超声提取 1 个小时,此优化条件下可以确认齐墩果酸、熊果酸的在迷迭香的含量,为后续大规模提取及含量分析提供实验数据基础条件。

齐墩果酸与熊果酸是三萜酸同分异构体,提纯分离难度很大,而两者又几乎同时出现在一种植物中,一般的分离手段无法将两者分开,增加了植物资源的利用难度。目前齐墩果酸、熊果酸的含量分析方法包括紫外分光光度法、薄层扫描法、液质联用法以及本文中所应用的 HPLC 法,紫外分光光度法存在分辨率低等问题,薄层色谱法存在定量不准确等问题,液质联用成本则较高,实验条件要求严苛。HPLC 法定量分析化学物质已经有较为成熟的研究基础,HPLC 的优势在于分离以及定量,随着科技的发展,HPLC 已经可以与许多复杂的定性定量设备联用,且实验过程简便、快速,弥补了 HPLC 无法准确定性的缺点。本实验利用 HPLC 法检测,操作简单、方法稳定可靠,可快速检测迷迭香中两种化学成分的含量,经实验证明该方法同样适用于其它富含齐墩果酸、熊果酸的植物中的分离检测,且结果准确。

参考文献

- [1] 路朝,侯梅芳,徐荣艳,迷迭香的化学成分和药用研究进展[J]. 应用技术学报,2020,20(4): 361-366.
- [2] 许艺凡,刘普,刘佩佩,等. HPLC-DAD 法测定迷迭香茎和叶中 11 种抗氧化活性成分[J]. 中草药,2018,49(9): 2153-2157.
- [3] 汪镇朝,张海燕,邓锦松,等. 迷迭香的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(24): 211-218.
- [4] Da Silva Bomfim, N., et al. (2015) Antifungal Activity and Inhibition of Fumonisin Production by *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chemistry*, **166**, 330-336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.019>
- [5] 张明发,沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸的血管药理作用研究进展[J]. 药物评价研究,2017,40(10): 1510-1519.

- [6] 毕良武, 李大伟, 赵振东, 李冬梅. 迷迭香资源的综合开发利用综述[J]. 生物质化学工程, 2011, 45(3): 53-56.
- [7] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸抗脑瘤作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 132-135.
- [8] 陈学松, 罗达龙, 刘慧妍. HPLC 检测白花蛇舌草中齐墩果酸和熊果酸的方法[P]. 中国专利, CN108169360A. 2018-6-15.
- [9] 王向红, 崔同, 齐小菊, 等. HPLC 法测定不同品种枣及酸枣中的齐墩果酸和熊果酸[J]. 食品科学, 2002, 23(6): 137-138.
- [10] 国家药典委员会. 中国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 213.
- [11] 段和祥, 刘绪平, 陈希, 等. HPLC 法同时测定白花蛇舌草中 6 种有机酸类成分的含量[J]. 中药材, 2019, 42(8): 1842-1845.
- [12] 国家药典委员会. 中国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 62.
- [13] 袁珂, 李根林, 李俊芝, 杨怡. 车前草中熊果酸、齐墩果酸的 HPLC 测定[J]. 中草药, 1999, 30(12): 901-903.
- [14] 代琪, 罗霄, 叶俏波. HPLC 法测定木瓜中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(6): 81-85.
- [15] 孟文静, 苑青艳, 吴金梅, 汪德刚. HPLC 法测定枇杷叶中齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(10): 36-39.
- [16] 刘慧妍, 黄馨慧, 张艳海. HPLC 法快速测定 8 种中药齐墩果酸和熊果酸[J]. 中草药, 2017, 48(10): 1998-2001.