

## 天然产物中齐墩果酸和熊果酸提取和分析方法研究进展

徐畅, 廖依依, 张英霞, 邓世明, 宋彦廷\*

(海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海南大学海洋学院药理学系, 海南海口 570228)

**摘要** 对不同天然产物中熊果酸和齐墩果酸的提取纯化方法及分析方法进行综述, 并比较了各方法的优缺点。**关键词** 天然产物; 熊果酸; 齐墩果酸; 提取纯化方法; 分析方法

中图分类号 R284 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)19-0113-03

**Research Progress of Extraction and Analysis Methods of Oleanolic Acid and Ursolic Acid from Natural Products**

XU Chang, LIAO Yi-yi, ZHANG Ying-xia, SONG Yan-ting\* et al (Key Laboratory of Tropical Biological Resources of the Ministry of Education, Department of Pharmaceutical Sciences, College of Marine Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228)

**Abstract** The extraction purification and analysis methods of oleanolic acid and ursolic acid from different natural products were summarized, and the advantages and disadvantages of each method were compared.**Key words** Natural products; Ursolic acid; Oleanolic acid; Extraction purification methods; Analysis method

齐墩果酸(oleanolic acid, OA)和熊果酸(ursolic acid, UA)是互为异构体的2种五环三萜类化合物,常同时存在于同一种药用植物中。齐墩果酸具有降血糖、消炎、局部止血等作用<sup>[1]</sup>,熊果酸也在各项研究中被发现具有抗病毒、抗炎抑菌等药理作用<sup>[2]</sup>。因此,对于同时含有OA和UA的药用植物而言,建立一种有效的提取分离测定方法是必不可少的。笔者通过对不同药用植物中OA和UA的提取分离方法进行综述,并总结了各检测手段的优缺点,旨在为含OA和UA的天然产物的药效研究提供试验基础及科学依据。

**1 提取纯化方法研究****1.1 溶剂提取**

**1.1.1 超声波强化溶剂提取。**超声波强化提取技术是利用超声波产生的强振动、高速度、快搅拌以及空化效应等作用,使药物有效成分快速进入溶剂,具有操作简便、快速、使用溶剂少、产率高、提取温度低等优点<sup>[3]</sup>,当改变提取溶剂的类型和配比时,还能用于广范围中药有效成分的提取。李坤平等<sup>[4]</sup>利用超声波强化溶剂成功提取了姜味草中OA和UA,并且优化了提取工艺,以乙醇作为溶剂时,提取的最佳条件是:乙醇体积分数为90%,固液比为1:15,功率为360 W,频率为40 kHz,使用超声波提取2次,每次20 min,OA和UA总得率为0.732%;与回流提取相比,产率有所提高,操作方法、试验条件也更简便。霍文兰等<sup>[5]</sup>利用超声波溶剂提取技术提取了山楂果中OA和UA,并利用正交分析法对提取条件进行了优化,在最佳条件下,提取出OA、UA的含量分别为1.522、4.782 mg/g。

**1.1.2 微波辅助萃取。**微波辅助萃取技术是通过利用微波能加热且升温均匀快速等优点,来提高萃取效率的,不同物质对微波能的吸收程度不同,特定加热基体物质的某些组分,从而呈现出较好的选择性<sup>[6]</sup>。黄建林等<sup>[7]</sup>使用微波萃取

技术提取了番石榴叶中的OA和UA,优化后的微波萃取条件为60~80 mesh番石榴叶、10 mL乙醇、80℃和10 min;与索氏萃取得到的产率相当,但时间仅为索氏萃取的1/24。汪文浩等<sup>[8]</sup>利用微波辅助技术提取了枇杷花中OA和UA,并对提取条件进行优化后,OA和UA提取量分别达0.482、3.118 mg/g。

**1.1.3 加速溶剂萃取。**加速溶剂萃取技术具有耗时短、样品和溶剂使用量少、有机溶剂不易暴露等特点,并且通过提温和加压,萃取效率明显提高<sup>[9]</sup>。王文俊等<sup>[10]</sup>利用加速溶剂萃取技术提取了女贞子中的齐墩果酸和熊果酸,优化后的萃取条件为:萃取压力6.9 MPa,萃取温度为100℃,萃取时间为5 min,萃取次数为2次;优化后的缓冲体系为40 mmol/L硼砂、1 mmol/Lβ-环糊精、pH 9.5、6%甲醇。将该法与索氏提取及超声提取所得结果进行对比,发现该法的产率高于超声提取,虽与索氏提取的产率相近,但该法的样品用量少、提取时间短。

**1.1.4 分散液相微萃取。**分散液相微萃取是目前倡导的环境友好型“绿色化学”技术,它包含分散剂、萃取剂和含分析物的样品这3个体系,能将萃取、纯化、浓缩一步到位,具有操作简单、低毒、价廉等特点<sup>[11-12]</sup>。郝耀梅<sup>[13]</sup>使用分散液相微萃取技术-高效液相色谱成功测定了中草药枇杷叶和白花蛇舌草中OA和UA的含量,并对萃取条件进行了优化,当萃取剂为氯仿、体积为70 μL,分散剂为甲醇、体积为300 μL,供相体积为5 mL、pH为2,盐浓度为10%、萃取时间为2 min、离心转速为1 500 r/min、时间为4 min时,富集倍数分别达1 378和933。贾小燕等<sup>[14]</sup>利用基于离子液体的分散液相微萃取技术提取了蓝花楹中的OA和UA,并对提取工艺进行优化,OA和UA提取量分别达2.96、1.147 mg/g。

**1.2 固相萃取** 固相萃取是样品前处理中应用广泛的方法之一,该方法能将痕量被测组分进行浓缩(富集),并对样品组成进行简化,将介质进行转移<sup>[15]</sup>。

**1.2.1 C<sub>18</sub>固相萃取剂。**盛灵慧等<sup>[16]</sup>利用固相萃取-高效液相色谱测定枣中OA和UA,样品经乙醇提取后,减压浓

**基金项目** 国家自然科学基金项目(21505029);海南省自然科学基金项目(20158363)。**作者简介** 徐畅(1992—),女,湖南湘潭人,硕士研究生,研究方向:药物分析。\*通讯作者,讲师,博士,从事药物分析研究。**收稿日期** 2017-06-07

缩, C18 固相萃取小柱净化后, 有效去除了枣中多糖、黄酮、皂苷等与目标分析物性质相似的化合物, 为后期色谱手段分离测定提供了条件。

**1.2.2 硅胶固相萃取剂。**江铁军<sup>[17]</sup>利用固相萃取-反向高效液相色谱测定了女贞子中 OA 和 UA 的含量, 使用硅胶作为固相萃取的填料, 成功消除了女贞子药材中杂质成分的干扰; 试验还对 11 种不同来源的女贞子中 OA 和 UA 进行测定, 发现含量有 20 倍以上差异。

**1.2.3 分子印迹聚合物固相萃取剂。**分子印迹聚合物(MIPs)是一种具有预定选择性、专一选择性、高度稳定性且使用寿命长的新型材料, 通过使用这种材料, 大大降低了非特异性吸附对选择性的影响, 减少“包埋”现象, 使目标化合物能成功地被洗脱和识别出来<sup>[18-21]</sup>。杨律文等<sup>[22]</sup>通过将 UA 为模板分子, 4-乙炔基吡啶(4-VP)为功能单体, 二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)为交联剂, 利用表面分子印迹技术, 合成出一种表面分子印迹聚合物, 这种聚合物对于 UA 选择性极高。通过对复合物进行紫外光谱扫描, 发现当功能单体浓度增大时, UA 的紫外特征吸收峰也相对增强, 并且出现红移现象; 该研究还将熊果酸及其类似物 OA 都在 MIPs 上进行吸附和洗脱, 除去 OA, 对 UA 进行富集和分离, 发现 UA 的富集因子提高了 30 倍, 而非分子印迹聚合物(NMIPs)柱则不具有这种选择性。张朝晖等<sup>[23]</sup>以聚乙烯醇修饰的多壁碳纳米管(MWCNTs)为基材, UA 为模板分子, 甲基丙烯酸(MAA)为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为交联剂, 在碳纳米管表面, 成功合成出对 UA 选择性高的分子印迹聚合物(MWCNTs-MIPs); 将该印迹物装填于固相萃取柱中, 可将 OA 和 UA 进行分离; 并对萃取条件进行了优化, 淋洗液为 100% 甲醇、洗脱液为 10% 乙酸-甲醇时, 回收率是最高的。

## 2 分析方法研究

**2.1 薄层色谱法** 薄层色谱法具有简便、易行、专属、灵敏等特点, 是应用最为广泛的分离测定方法。严华等<sup>[24]</sup>使用薄层色谱法, 以环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(20.0:5.0:8.0:0.1)为展开剂展开, 以 10% 硫酸乙醇溶液为显色剂, 105 °C 加热显色, 在大枣、女贞子、连钱草、马鞭草、山茱萸、山楂、夏枯草 7 种药材中均同时检出 OA 和 UA; 该方法对于含有这 2 种成分的中药成方制剂也是同样适用的。都述虎等<sup>[25]</sup>以氯仿-甲醇(40:1)为展开剂, 10% 硫酸乙醇溶液为显色剂, 利用双波长薄层扫描法, 测定波长( $\lambda_s$ )为 640 nm, 参比波长( $\lambda_R$ )为 535 nm, 成功测定了木瓜中 OA 的含量; 同时还对比了不同产地木瓜中 OA 的含量, 发现宣木瓜中 OA 含量最高, 而产地相同、粒度不同的木瓜中, OA 的含量也有很大差异。

**2.2 胶束毛细管电泳色谱法** 胶束毛细管电泳(MECC)色谱是一种通过将表面活性剂加入到电泳缓冲溶液中, 当其浓度超过临界胶束浓度时, 分子间的疏水基团聚集形成胶束, 溶质由于在胶束相以及水相间分配系数不同, 从而得以分离; 该方法具有高效、快速、操作简便等特点。肖美添等<sup>[26]</sup>

通过将改性环糊精类化合物加入运行缓冲液中, 大大提高了 MECC 的分离能力, 并将此法成功运用于测定枇杷叶中 OA 和 UA 的含量, 回收率分别为 97.8% (RSD 为 2.9%) 和 98.1% (RSD 为 3.3%)。王瑞等<sup>[27]</sup>利用胶束电动毛细管色谱法测定了茱萸中 OA 和 UA, 最佳操作条件为 60 mmol/L 十二烷基硫酸钠、2.5 mmol/L 磷酸二氢钠、2.5 mmol/L 硼砂、8 mmol/L 二甲基- $\beta$ -环糊精、8 mmol/L  $\beta$ -环糊精和 30% (V/V) 异丙醇, 加样回收率 OA 为 99.30% ~ 101.85%, UA 为 98.30% ~ 98.59%。

**2.3 气相色谱法** OA 和 UA 分子中都含有羧基和羟基, 挥发性差, 不适合气相色谱直接测定。闫花丽等<sup>[28]</sup>利用重氮甲烷为衍生化试剂, 将 OA 和 UA 制成甲酯衍生物, 该衍生物具有易气化的特点, 通过气相色谱法-氢焰检测器进行检测, 成功测定了夏枯草中的 OA 和 UA, 回收率分别为 83.53% (RSD 为 3.5%), 94.18% (RSD 为 3.0%)。黄建林等<sup>[29]</sup>使用双(三甲硅烷)三氟乙酰胺(BSTFA)为衍生化试剂, 将 OA 和 UA 制成三甲硅烷衍生物, 该衍生物具有易气化的特点; 然后采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术, 对番石榴叶中的 OA 和 UA 进行了定性和定量测定, 回收率分别为 77.1% 和 89.4% (RSD 分别为 3.7% 和 3.5%)。

**2.4 高效液相色谱** 高效液相色谱(HPLC)广泛应用于定量定性分析的各个领域, 具有以下检测器: 紫外波长检测器(UV)、二极管阵列检测器(DAD 或 PDA)、蒸发光散射检测器(ELSD)。

**2.4.1 HPLC-UV。**王雨梅等<sup>[30]</sup>建立了快速测定毛建草中 OA 和 UA 含量的 HPLC-UV 方法。选用 ODS 色谱柱, 乙腈-甲醇-水-醋酸铵(70:14:16:0.05)为流动相, 检测波长为 210 nm, OA 和 UA 的回收率分别为 99.5% (RSD 为 2.0%)、100.6% (RSD 为 2.2%)。该方法对于进一步开发和利用蒙药植物资源具有重大意义。

**2.4.2 HPLC-DAD(PDA)。**罗智敏等<sup>[31]</sup>利用 HPLC-DAD 测定血满草中 OA 和 UA 含量, 并进行方法学考察。选用 Fusion-RP C<sub>18</sub> 柱, 甲醇-0.2% 磷酸水溶液(90:10)为流动相, 检测波长为 210 nm, 回收率分别为 101.4% 和 98.3% (RSD 分别为 0.72% 和 1.13%); 对血满草不同部位中 OA 和 UA 的含量进行测定, 发现血满草花中 OA 和 UA 含量最高, 而根中含量最低。王欢等<sup>[32]</sup>利用 HPLC-DAD 同时测定了白花蛇舌草中 OA 和 UA, 发现 OA 和 UA 的平均回收率分别为 98.17% (RSD 为 1.89%)、99.31% (RSD 为 2.62%)。

**2.4.3 HPLC-ELSD。**赵韶华等<sup>[33]</sup>建立了 HPLC-ELSD 法同时测定连翘叶中 OA 和 UA, 选用 Waters Symmetry C18 柱, 甲醇-0.4% 冰醋酸溶液(93:7, V/V)为流动相, 检测波长为 210 nm, OA 和 UA 的回收率分别为 98.67% 和 98.56% (RSD 分别为 2.61% 和 1.64%); 该方法操作简便、结果可靠、重现性好。廖壹<sup>[34]</sup>利用 HPLC-ELSD 同时测定了泽兰中 OA 和 UA 的含量, 在优化的条件下, OA 和 UA 获得较好的分离, 且该方法准确、重现性好。

**2.4.4 HPLC-MS。**杨晓静等<sup>[35]</sup>建立了一种同时检测中药

材中齐墩果酸和熊果酸含量的超高效液相色谱-三级四极杆质谱(UPLC-TQMS)方法;选用 Waters Acquity UPLC BEH C18 柱,乙腈-5 mmol/L 乙酸铵水溶液(氨水调至 pH 9.24)为流动相,梯度洗脱,负离子模式下检测;齐墩果酸和熊果酸的回收率分别为 101.1% 和 100.8% (RSD 分别为 1.80% 和 0.04%);使用该法对 10 种不同中药材中齐墩果酸和熊果酸含量进行检测,与已报道方法相比,该方法具有有机溶剂用量少、干扰小、准确度高且超高效分离的特点。李成等<sup>[36]</sup>开发了测定枣中 OA 和 UA 含量的 HPLC-MS 定性定量分析方法,OA 和 UA 的加标回收率分别为 80.17% (RSD 为 9.54%)、95.93% (RSD 为 2.87%)。

### 3 总结

天然产物中齐墩果酸和熊果酸的提取纯化方法众多,一般分为液相萃取和固相萃取两大类,液相萃取方法简便、价廉,缺点是耗时长、反应条件不温和,不符合当今“绿色化学”的主题;固相萃取优点包括耗时短、有机溶剂使用量少,由于特定的固相吸附剂,得到的富集倍数更高,但对于大范围内药有效成分的富集提取不太适合。总而言之,2 种方法各有所长。

而对于天然产物中齐墩果酸和熊果酸的分析方法而言,运用最为广泛的是 HPLC,色谱条件也较为成熟,不同检测器得到的结果有些许差别,超高效液相色谱-三级四极杆质谱法得到的结果最佳。

近年来,对于 OA 和 UA 药效方面的研究层出不穷,而如何从各种天然产物中将这 2 种目标化合物提取分离出来,对于进一步的药理学研究意义重大,该研究为含有 OA 和 UA 的天然产物的药效研究提供试验基础及科学依据。

### 参考文献

- [1] 王立新,韩广轩,刘文庸,等. 齐墩果酸的化学及药理研究[J]. 药学实践杂志,2001,19(2):104-107.
- [2] 李开泉,陈武,熊筱娟,等. 乌索酸的化学、药理及临床应用进展[J]. 中成药,2002,24(9):709-711.
- [3] 牛波,邱海霞,田景振,等. 超声强化提取技术[J]. 山东中医杂志,2000,19(10):629-630.
- [4] 李坤平,潘天玲,贾永光,等. 超声波强化溶剂提取姜味草中熊果酸和齐墩果酸[J]. 林产化学与工业,2009,29(3):111-114.
- [5] 霍玉兰,范小芹,赵天聪. 超声法提取山楂果中熊果酸和齐墩果酸的工艺研究[J]. 应用化工,2013,42(10):1832-1835.
- [6] 卢彦芳,张福成,安静,等. 微波辅助萃取应用研究进展[J]. 分析科学学报,2011,27(2):246-252.
- [7] 黄建林,张展霞. 微波萃取-高效液相色谱法测定番石榴叶中的齐墩果酸和熊果酸[J]. 化学与生物工程,2005,22(4):52-54.
- [8] 汪文浩,郑美瑜,陆胜民. 微波辅助提取枇杷花中齐墩果酸和熊果酸的工艺优化[J]. 食品工业科技,2013,34(22):227-231.
- [9] RICHTER B E, JONES B A, EZZELL J L, et al. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation[J]. Analytical chemistry, 1996, 68(6):1033-1039.
- [10] 王文俊,白玮玮,李军超,等. 一种测定女贞子中齐墩果酸和熊果酸的新方法[J]. 西北植物学报,2011,31(9):1894-1899.

- [11] BERIJANI S, ASSADI Y, ANBIA M, et al. Dispersive liquid-liquid micro-extraction combined with gas chromatography-flame photometric detection; Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water [J]. Journal of chromatography A, 2006, 1123(1):1-9.
- [12] LEONG M I, CHANG C C, FUH M R, et al. Low toxic dispersive liquid-liquid microextraction using halosolvents for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples [J]. Journal of chromatography A, 2010, 1217(34):5455-5461.
- [13] 郝耀梅. 液相微萃取在中药齐墩果酸和熊果酸分析及其与蛋白结合中的应用研究[D]. 太原:山西医科大学,2013.
- [14] 贾小燕,李念兵,罗红群. 基于离子液体的分散液相微萃取高效液相色谱法同时测定蓝花楹中的熊果酸和齐墩果酸[J]. 分析化学,2009,37(S1):208.
- [15] 傅若农. 近年国内固相萃取-色谱分析的进展[J]. 分析试验室,2007,26(2):100-122.
- [16] 盛灵慧,高运华,王晶,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定枣中熊果酸和齐墩果酸[J]. 化学分析计量,2008,17(4):18-20.
- [17] 江铁军. SPE- RP-HPLC 法测定女贞子药材中齐墩果酸、熊果酸的含量[J]. 广东药学院学报,2007,23(5):513-515.
- [18] HILAL N, KOCHKODAN V. Surface modified microfiltration membranes with molecularly recognising properties [J]. Journal of membrane science, 2003, 213(1/2):97-113.
- [19] KIM T H, KI C D, CHO H, et al. Facile preparation of core-shell type molecularly imprinted particles; Molecular imprinting into aromatic polyimide coated on silica spheres [J]. Macromolecules, 2005, 38(15):6423-6428.
- [20] YANG H H, ZHANG S Q, TAN F, et al. Surface molecularly imprinted nanowires for biorecognition [J]. Journal of the American chemical society, 2005, 127(5):1378-1379.
- [21] 徐伟箭,项伟中,周晓,等. 基于硅胶表面修饰的分子印迹技术研究进展[J]. 应用化学,2003,20(10):919-923.
- [22] 杨律文,刘含茂,屈贺磊,等. 硅胶表面熊果酸分子印迹聚合物的制备和分子识别特性 [J]. 应用化学,2008,25(2):137-141.
- [23] 张朝晖,杨潇,张华斌,等. 多壁碳纳米管表面熊果酸印迹聚合物的制备及固相萃取[J]. 高分子学报,2011,40(12):1470-1476.
- [24] 严华,王宝葵,鲁静. 薄层色谱法分离齐墩果酸和熊果酸[J]. 药物分析杂志,2009,29(12):2168-2170.
- [25] 都述虎,饶金华,耿武松. 薄层扫描法测定木瓜中齐墩果酸的含量[J]. 中草药,2003,34(1):35-37.
- [26] 肖美添,叶静,黄雅燕,等. 胶束毛细管电泳测定枇杷叶中熊果酸和齐墩果酸的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(5):724-727.
- [27] 王瑞,王淑美,梁生旺,等. 胶束电动毛细管色谱法分离分析山茱萸中齐墩果酸和熊果酸[J]. 中药材,2007,30(8):946-950.
- [28] 闫花丽,赵陆华,朱丹妮,等. 衍生化气相色谱法测定夏枯草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国中药杂志,1999,24(12):744-745.
- [29] 黄建林,张展霞. GC-MS 同时测定番石榴叶中的齐墩果酸和熊果酸[J]. 分析测试技术与仪器,2005,11(3):178-181.
- [30] 王雨梅,杜瑞芳,刘卫东,等. HPLC 法同时测定毛建草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 西北药学杂志,2008,23(2):84-85.
- [31] 罗智敏,ELISA LINARES NAVARRO,陶燕铨,等. HPLC-DAD 法测定血满草中熊果酸和齐墩果酸的含量[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(6):1095-1098.
- [32] 王欢,吴莹,黄嫣,等. HPLC-DAD 同时测定白花蛇舌草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中药与临床,2016,7(1):20-22.
- [33] 赵韶华,刘敏彦,王玉峰,等. HPLC-ELSD 法同时测定连翘叶中齐墩果酸和熊果酸[J]. 食品科学,2012,33(2):224-226.
- [34] 廖彦. HPLC-ELSD 法测定泽兰中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 西部中医药,2015,28(6):29-31.
- [35] 杨晓静,陈丽娜,秦瑶,等. UPLC-MS/MS 法测定中药材中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 分析测试学报,2016,35(6):753-757.
- [36] 李成,何义,陈灿,等. HPLC-MS 法测定枣中的齐墩果酸和熊果酸[J]. 食品研究与开发,2013,34(15):75-77.

(上接第 112 页)

- [15] 解开治,徐培智,严超,等. 不同土壤改良剂对南方酸性土壤的改良效果研究[J]. 中国农学通报,2009,25(20):160-165.
- [16] 胡德春,李贤胜,尚健,等. 不同改良剂对棕红壤酸性的改良效果[J]. 土壤,2006,38(2):206-209.
- [17] 孟赐福,傅庆林,水建国,等. 浙江中部红壤施用石灰对土壤交换性钙、镁及土壤酸度的影响[J]. 植物营养与肥料学报,1999,5(2):129-136.

- [18] 王宁,李九玉,徐仁扣. 土壤酸化及酸性土壤的改良和管理[J]. 安徽农学通报,2007,13(23):48-51.
- [19] 刘琼峰,蒋平,李志明,等. 湖南省水稻主产区酸性土壤施用石灰的改良效果[J]. 湖南农业科学,2014(13):29-32.
- [20] 于树增,隋春青,林秀渠. 熟石灰在西洋生产上的应用试验[J]. 人参研究,2005(2):24-26.
- [21] 鲁衍声. 石灰改良酸性红壤研究现状及展望[J]. 贵州农业科学,1987(5):46-52.