

柿树及其11种寄生植物的齐墩果酸、熊果酸含量相关性

朱开昕^{1,2}, 苏本伟^{1,2}, 赵明惠^{1,2}, 裴河欢², 李静², 李永华^{3*}

(1. 钦州市中医医院, 广西 钦州 535000; 2. 钦州市中医药研究所, 广西 钦州 535000;
3. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 考察柿树及其11种寄生植物齐墩果酸、熊果酸含量的关系。方法: 采用RP-HPLC对桑寄生药材及其寄主植物齐墩果酸、熊果酸含量进行测定, 齐墩果酸、熊果酸采用乙醇超声提取30 min, 采用Agilent Eclipse XDB-C₁₈色谱柱, 流动相甲醇-乙腈-0.05%乙酸铵水溶液(12:67:21), 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长210 nm。结果: 齐墩果酸和熊果酸的线性范围分别为2.34~375($r=0.9999$), 5.21~834 mg·L⁻¹($r=0.9999$), 与峰面积呈良好线性关系, 平均加样回收率依次为99.57%, 99.72%; 柿树枝齐墩果酸质量分数为0.3826~0.5411 mg·g⁻¹, 熊果酸质量分数为0.6490~1.6258 mg·g⁻¹, 柿树叶齐墩果酸质量分数为1.7736~4.2746 mg·g⁻¹, 熊果酸质量分数为6.0237~9.3980 mg·g⁻¹; 瘤果榭寄生枝齐墩果酸质量分数为1.2214 mg·g⁻¹, 熊果酸质量分数为0, 瘤果榭寄生叶齐墩果酸质量分数为10.8158 mg·g⁻¹, 熊果酸质量分数为0; 棱枝榭寄生齐墩果酸质量分数为7.1589 mg·g⁻¹, 熊果酸质量分数为0; 余下9种寄生齐墩果酸和熊果酸质量分数均为0。结论: 柿树枝叶均含齐墩果酸、熊果酸。鞘花、三色鞘花、离瓣寄生、油茶离瓣寄生、五蕊寄生、红花寄生、小红花寄生(变种)、广寄生和大苞寄生9种寄生不含齐墩果酸、熊果酸。瘤果榭寄生和棱枝榭寄生含齐墩果酸, 不含熊果酸。

[关键词] 桑寄生; 寄主植物; 齐墩果酸; 熊果酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0055-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100055

Correlation Analysis of Oleanolic Acid and Ursolic Acid Between *Diospyros kaki* and its Eleven Kinds of Taxilli Herba ZHU Kai-xin^{1,2}, SU Ben-wei^{1,2}, ZHAO Ming-hui^{1,2}, PEI He-huan², LI Jing², LI Yong-hua^{3*}
(1. Qinzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qinzhou 535000, China; 2. Qinzhou Institute of Traditional Chinese Medicine, Qinzhou 535000, China; 3. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the component correlation of oleanolic acid and ursolic acid between *Diospyros kaki* and its eleven kinds of Taxilli Herba. **Method:** Oleanolic acid and ursolic acid were extracted with ethanol by ultrasound for 30 minutes, and determined by RP-HPLC. Agilent Eclipse XDB C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used for the separation, with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and column temperature of 25 °C. The mobile phase were methanol-acetonitrile-0.05% solution of ammonium acetate (12:67:21) and detection wavelength was 210 nm. **Result:** There were good linearity in the range of 2.34-375 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) and 5.21-834 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) for oleanolic acid and ursolic acid, respectively. The average recovery rates were 99.57% and 99.72% for oleanolic acid and ursolic acid, respectively. In *D. kaki*, the content of oleanolic acid was 0.3826-0.5411 mg·g⁻¹ (branches) and 1.7736-4.2746 mg·g⁻¹ (leaves), and ursolic acid was 0.6490-1.6258 mg·g⁻¹ (branches) and 6.0237-9.3980 mg·g⁻¹ (leaves). Ursolic acid was not detected in the eleven kinds of Taxilli Herba, and oleanolic acid was found only in *Viscum ovalifolium* and *V. diospyrosicum*. The contents of oleanolic acid were 1.2214 mg·g⁻¹ (in branches of *V. ovalifolium*), 10.8158 mg·g⁻¹ (in leaves of *V. ovalifolium*), and 7.1584 mg·g⁻¹ (in *V. diospyrosicum*), respectively. **Conclusion:** The oleanolic acid and ursolic acid were accumulated in the branches and leaves of *D. kaki*. Oleanolic acid was

[收稿日期] 20140603(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173537); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻11107009-1-12)

[第一作者] 朱开昕, 高级工程师, 从事天然药物及中药制剂研发, Tel:0777-2878552, E-mail: kaixinzhu908@126.com

[通讯作者] *李永华, 博士, 研究员, 从事天然药物开发研究, Tel:0777-2878443, E-mail: liyonghua185@126.com

accumulated in *V. ovalifolium* and *V. diospyrosicolum*, but ursolic acid was not accumulated. The oleanolic acid and ursolic acid were not accumulated in *Macrosolen cochinchinensis*, *M. tricolor*, *Helixanthera parasitica*, *H. Sampsoni*, *D. pentandra*, *S. parasitica*, *S. parasitica* var. *graciliflora*, *Taxillus chinensis* and *T. maclurei*.

[Key words] Taxilli Herba; host trees; Oleanolic acid; Ursolic acid; HPLC

柿树是广西常见的果树,其叶含有齐墩果酸、熊果酸^[1]。柿树多有寄生,有的一棵树上寄生植物多种,以桑寄生科的寄生植物为常见。考察桑寄生与其寄生植物中 1-脱氧野尻霉素含量之间的关系,发现桑寄生以一定量的形式累积寄主植物桑树中 1-脱氧野尻霉素特征性成分^[2];以夹竹桃、黄花夹竹桃为寄主植物的桑寄生中均含强心苷^[3],而 2010 年版《中国药典》规定桑寄生药材不能检测出强心苷。其他试验结果也发现桑寄生药材有累积其寄主化学成分的现象^[4-6],显示出寄主植物对桑寄生药材质量有一定的影响。本实验用 HPLC 测定柿树寄主及其 11 种寄生植物的齐墩果酸、熊果酸含量关系,对这 11 种寄生是否累积寄主柿树的化学成分齐墩果酸、熊果酸进行研究,考察柿树寄主对其寄生药材质量是否产生影响,从而为完善桑寄生药材质量标准提供科学依据。

1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津), Agilent-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), GH-252 型电子分析天平(AND), BP121S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司), LG16-W 型高速微量离心机(北京医用离心机厂), KQ-300DB 型数控超声波清洗器(昆山)。

齐墩果酸、熊果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110709-200505, 110742-200516); 乙腈、甲醇(CNW, 色谱纯), 水为超纯水,其他试剂均为分析纯。以柿树为寄主的 11 种寄生及其寄主植物的带枝茎叶均采自广西境内野生环境,采集时间为 2013 年 9 月,11 种寄生经中国科学院华南植物研究所丘华兴教授鉴定为鞘花 *Macrosolen cochinchinensis*, 三色鞘花 *M. tricolor*, 离瓣寄生 *Helixanthera parasitica*, 油茶离瓣寄生 *H. sampsoni*, 五蕊寄生 *Dendrophthoe pentandra*, 红花寄生 *Scurrula pentandra*, 小红花寄生(变种) *S. pentandra* var. *graciliflora*, 广寄生 *Taxillus chinensis*, 大苞寄生 *Tolypanthus maclurei*, 瘤果榭寄生 *V. ovalifolium* 和棱枝榭寄生 *Viscum diospyrosicolum*。将采集的样品洗净阴干,枝叶分开,粉碎过 45 目备用。样品信息见表 1。

表 1 寄生植物样品信息

Table 1 Information of Taxilli Herba

No.	寄生植物	采集地
1	广寄生	钦州市钦北区大垌镇
2	三色鞘花	钦州市钦北区大垌镇
3	瘤果榭寄生	钦州市钦北区大垌镇
4	五蕊寄生	钦州市钦北区大垌镇
5	油茶离瓣寄生	钦州市灵山县丰塘镇
6	红花寄生	桂林市平乐县二塘镇
7	小红花寄生	桂林市平乐县二塘镇
8	棱枝榭寄生	桂林市平乐县二塘镇
9	大苞寄生	桂林市平乐县同安镇
10	离瓣寄生	桂林市平乐县同安镇
11	鞘花	崇左市宁明县郊区

2 方法与结果

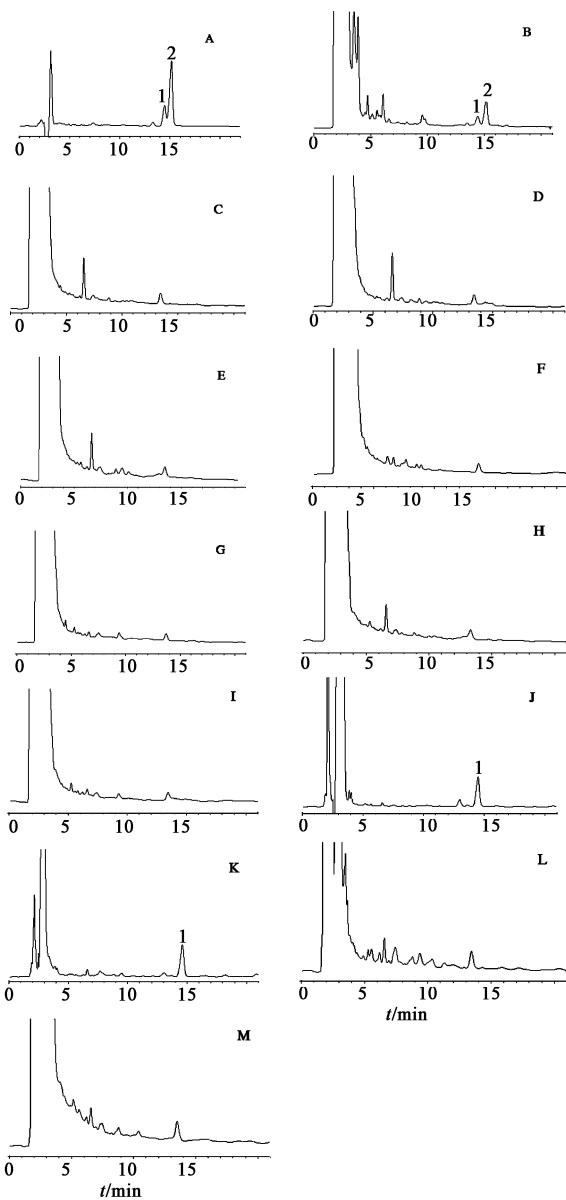
2.1 色谱条件 Agilent-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-乙腈-0.05% 乙酸铵水溶液(12:67:21), 检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温室温。见图 1。

2.2 对照品储备液的制备 精密称取齐墩果酸、熊果酸适量,加乙醇溶解并稀释成每 1 mL 中含齐墩果酸 0.375 mg 和熊果酸 0.834 mg 的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末 0.50 g,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇 25 mL,超声处理 30 min,冷却补重,摇匀,离心,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,得供试品溶液。

2.4 线性关系考察 将齐墩果酸、熊果酸混合对照品溶液母液分别稀释成质量浓度为 2.34, 11.72, 23.44, 46.88, 93.75, 187.50, 375; 5.21, 26.06, 52.13, 104.25, 208.50, 417, 834 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,进样 10 μL,测定。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y_{\text{齐墩果酸}} = 4\ 820.2X + 1\ 846.8$ ($r = 0.999\ 9$), $Y_{\text{熊果酸}} = 5\ 128.7X + 3\ 916.8$ ($r = 0.999\ 9$),结果表明齐墩果酸、熊果酸分别在 2.34 ~ 375, 5.21 ~ 834 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好线性关系。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0,



A. 对照品; B. 柿树; C. 红花寄生; D. 小红花寄生; E. 油茶离瓣寄生; F. 离瓣寄生; G. 大苞寄生; H. 鞘花; I. 三色鞘花; J. 棱枝槲寄生; K. 瘤果槲寄生; L. 广寄生; M. 五蕊寄生; 1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

图 1 柿树及其 11 种寄生样品 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Diospyros kaki* and its eleven kinds of *Taxilli Herba*

1, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样 10 μL , 测定, 结果齐墩果酸、熊果酸峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 0.8%, 表明样品在 12 h 内保持稳定。

2.6 精密度试验 取混合对照品溶液重复进样 6 次, 每次进样 10 μL , 测定, 结果齐墩果酸、熊果酸峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 1.1%, 表明仪器精密度符合要求。

2.7 重复性试验 取同一批柿叶样品, 共 6 份, 按 2.3 项下方法制备, 分别进样 10 μL , 测定, 结果齐墩

果酸、熊果酸含量的 RSD 分别为 0.9%, 1.0%, 结果表明重复性良好。

2.8 回收率试验 称取已知含量的柿叶样品 6 份, 称样量约为制备量的一半, 分别精密加入齐墩果酸、熊果酸适量, 按 2.2 项下方法制备, 吸取 10 μL 进行测定。结果见表 2。

表 2 齐墩果酸、熊果酸加样回收试验

Table 2 Recovery test of oleanolic acid and ursolic acid

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测的量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
齐墩果酸	1.006	1.01	1.985 1	96.96	99.57	2.4
	1.000	1.00	2.031 2	103.10		
	1.005	0.98	1.951 2	96.51		
	1.003	0.96	1.970 6	100.83		
	0.998	1.02	2.006 9	98.93		
	0.996	1.01	2.017 1	101.08		
熊果酸	2.177	2.16	4.257 3	96.31	99.72	1.8
	2.165	2.14	4.328 1	101.08		
	2.176	2.17	4.342 6	99.83		
	2.170	2.15	4.328 8	100.41		
	2.160	2.16	4.361 1	101.92		
	2.156	2.13	4.259 3	98.74		

2.9 含量测定 分别制备桑寄生药材及其寄主植物的供试品溶液, 进样测定, 计算齐墩果酸、熊果酸的含量, 结果见表 3。

表 3 桑寄生药材及其寄主植物齐墩果酸、熊果酸含量

Table 3 Oleanolic acid and ursolic acid between *Diospyros kaki* and its eleven kinds of *Taxilli Herba*

No.	样品名称	部位	齐墩果酸	熊果酸
1	柿树寄主	枝	0.499 4	1.547 1
		叶	3.997 7	8.652 5
	红花寄生	枝	-	-
		叶	-	-
2	柿树寄主	枝	0.479 8	1.484 4
		叶	1.773 6	6.023 7
	小红花寄生	枝	-	-
		叶	-	-
3	柿树寄主	枝	0.455 8	0.649 0
		叶	2.294 8	6.194 2
	油茶离瓣寄生	枝	-	-
		叶	-	-

续表 3

No.	样品名称	部位	齐墩果酸	熊果酸
4	柿树寄主	枝	0.471 1	1.625 8
		叶	3.993 1	9.398 0
	离瓣寄生	枝	-	-
		叶	-	-
5	大苞寄生	枝	-	-
		叶	-	-
6	柿树寄主	枝	0.382 6	1.432 2
		叶	4.274 6	9.043 9
	鞘花寄生	枝	-	-
		叶	-	-
7	柿树寄主	枝	0.541 1	1.553 7
		叶	3.204 2	7.386 3
	棱枝槲寄生	茎枝	7.158 9	-
8	柿树寄主	枝	0.524 7	0.842 3
		叶	2.955 4	7.443 2
	瘤果槲寄生	枝	1.221 4	-
		叶	10.815 8	-
9	广寄生	枝	-	-
		叶	-	-
10	三色鞘花	枝	-	-
		叶	-	-
11	五蕊寄生	枝	-	-
		叶	-	-

注:瘤果槲寄生、广寄生、三色鞘花、五蕊寄生为同一寄主;离瓣寄生和大苞寄生为同一寄主;棱枝槲寄生叶子已退化,只有茎枝。

3 讨论

本实验考察过甲醇-乙腈-0.05% 乙酸铵溶液(12:67:21),乙腈-0.15% 磷酸水(85:15)、乙腈-甲醇-水-磷酸-三乙胺(50:30:20:0.02:0.04)等条件^[7-9],通过比较,选择甲醇-乙腈-0.05% 乙酸铵溶液(12:67:21)为流动相,此条件下基线及分离较理想。

实验结果表明,柿树枝叶均含有齐墩果酸和熊果酸,鞘花、三色鞘花、离瓣寄生、油茶离瓣寄生、五蕊寄生、红花寄生、小红花寄生(变种)、广寄生和大苞寄生不含齐墩果酸、熊果酸,可推断它们对寄主

植物齐墩果酸和熊果酸成分不累积。而瘤果槲寄生和棱枝槲寄生含齐墩果酸,不含熊果酸。瘤果槲寄生和棱枝槲寄生对寄主植物熊果酸均不累积,瘤果槲寄生所含的齐墩果酸是其本身固有^[10],显示以齐墩果酸、熊果酸为指标,柿树寄主对前 10 种寄生药材质量是没有产生影响。至于棱枝槲寄生所含的齐墩果酸是否是从寄主柿树上累积的,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 邹盛勤,孙伟.反相高效液相色谱法同时测定柿叶中齐墩果酸和熊果酸[J].分析实验室,2009,28(4):18-20.
- [2] 李永华,苏本伟,张协君,等.桑寄生及其寄主植物桑树 1-脱氧野尻霉素含量相关性研究[J].中国中药杂志,2011,36(15):2102-2105.
- [3] 李永华,卢栋,朱开昕,等.桑寄生及其夹竹桃科寄主植物强心苷含量相关性研究[J].时珍国医国药,2010,21(6):1397-1401.
- [4] Dong Lu, Benwei Su, Yonghua Li, et al. Study on salicin content correlation between taxilli herba and their willow host plants[J]. Med Plants Res, 2012,6(12):2474-2475.
- [5] Zhang X J, Su B W, Li YH, et al. Analysis by RP-HPLC of mangiferin component correlation between medicinal Loranthus and their Mango Host trees[J]. J Chromatogr Sci, doi:10.1093/chromsci/bms196,2012.
- [6] 苏本伟,李永华,卢栋,等.RP-HPLC 测定桑寄生及其寄主植物黄皮树盐酸小檗碱的含量[J].世界科学技术——中医药现代化,2012,4(14):1891-1894.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:190.
- [8] 张前军,赵超,杨小生,等.高效液相色谱法测定连线草中熊果酸的含量[J].中国中药杂志,2006,31(18):1533-1537.
- [9] 戚志华,王四旺,王剑波,等.不同生长期女贞子中齐墩果酸和熊果酸的含量变化[J].中国中药杂志,2007,32(15):1583-1585.
- [10] 朱开昕,张协君,苏本伟,等.瘤果槲寄生及其 3 种寄主齐墩果酸和熊果酸的含量研究[J].中国医院药学杂志,2012,32(13):997-998.

[责任编辑 顾雪竹]