

## HPLC 测定柿子中齐墩果酸与熊果酸的含量

韦建华, 李耀华, 蔡少芳, 杨夏梅, 甄汉深\*  
(广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定不同产地的柿子中齐墩果酸与熊果酸的含量。方法: 以大连依利特 Hypersil ODS2 C<sub>18</sub>柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm), 甲醇-0.1% 磷酸(85:15)为流动相; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 25 °C; 检测波长 210 nm。结果: 齐墩果酸和熊果酸分别在 0.095 ~0.95 μg 和 0.095 ~0.95 μg 呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 99.91% 和 98.38%, RSD 分别为 2.5% 和 2.2%。结论: 在相同测定条件下, 平乐柿子中的齐墩果酸及熊果酸的含量最高, 恭城柿子次之, 南宁柿子最低。该方法简便、快速、准确, 有助于柿子质量控制方法的研究。

[关键词] 柿子; 齐墩果酸; 熊果酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0048-03

## Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in *Diospyros kaki* by HPLC

WEI Jian-hua, LI Yao-hua, CAI Shao-fang, YANG Xia-mei, ZHEN Han-shen\*  
(Guangxi University of Traditional Chinese Medical, Nanning 530001, China)

**[Abstract] Objective:** To establish the method for determination of the content of oleanolic acid and ursolic acid in *Diospyros kaki* (Thunb) by HPLC. **Method:** The Hypersil ODS2 C<sub>18</sub> column (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was methanol-0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85:15). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; the detection wavelength was at 210 nm; the temperature was set at 25 °C. **Result:** The linear range of oleanolic acid was 0.095-0.95 μg, the linear range of ursolic acid was 0.095-0.95 μg. The average recovery of oleanolic acid and ursolic acid was 99.91% and 98.38%, with RSD 2.5% (n=6) and 2.2% (n=6) respectively. **Conclusion:** The method is simple, rapid and accurate. It can be used for determination of the content of oleanolic acid and ursolic acid in *Diospyros kaki* (Thunb).

**[Key words]** *Diospyros kaki* (Thunb); oleanolic acid; ursolic acid; HPLC

柿子是柿科植物柿 *Diospyros kaki*(Thunb) 的果实<sup>[1]</sup>。其味甘、涩, 性寒, 归肺经。《本草纲目》中记载“柿乃脾、肺、血分之果也。其味甘而气平, 性涩而能收, 故有健脾涩肠, 治嗽止血之功。”即具有清肺生津, 清热止血, 涩肠健脾, 解酒降压的功效。柿子含有

丰富的蔗糖、果糖、纤维素等碳水化合物, 还含有蛋白质、钙、磷等营养成分。此外, 柿子尚含有五环三萜类化合物, 其中齐墩果酸与熊果酸是其主要成分。齐墩果酸与熊果酸结构极为相似。齐墩果酸具有消炎, 增强免疫力, 抑制血小板聚集, 降血糖等多方面的临床药理作用, 是治疗急性黄疸型肝炎和慢性病毒性肝炎较理想的药物, 且毒性低, 不良反应少<sup>[1]</sup>。熊果酸具有多种生物活性, 尤其在抗肿瘤、抗氧化、抗炎保肝、降血脂方面的作用显著<sup>[2]</sup>。目前《中国药典》只收载柿蒂<sup>[3]</sup>, 柿子没有被收载, 相关文献显示, 柿子只被收载为蒙药<sup>[4]</sup>。本实验研究采用反相 HPLC 法测定不同产地的柿子果实中齐墩果酸与熊果酸的含量, 为柿子含量控制提供依据。

[收稿日期] 20100630(006)

[第一作者] 韦建华, 硕士, 讲师, 从事中药、民族药有效成分和质量标准研究, Tel: 13977166476, E-mail: weijianhua607@tom.com

[通讯作者] \* 甄汉深, 教授, 博士生导师, 主要从事中药有效成分与质量标准研究, Tel: 0771-2219867, E-mail: 8zhen@163.com

## 1 材料

**1.1 仪器** Agilent 1100 型高效液相色谱仪; Agilent 1100 LC 化学工作站(美国安捷伦);赛多利斯 BP211D 电子天平(德国赛多利斯);LG16-W 型高速微型离心机(北京医用离心机厂);

**1.2 试药** 齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 110742-200415);熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 110709-200304);乙腈、甲醇为色谱纯(美国 Fisher);水为超纯水,其他试剂均为分析纯。柿子采于广西平乐、恭城、南宁,经广西中医学院中药鉴定教研室廖月葵高级实验师鉴定为柿科植物柿 *Diospyros kaki* Thunb. 的果实,烘干,粉碎成粗粉,备用。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱依利特 Hypersil ODS2 C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇-0.1% 磷酸(85:15),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长 210 nm;柱温 25℃。进样量 10 μL

**2.2 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取减压干燥至恒重的齐墩果酸与熊果酸对照品 3.39 mg 和 3.20 mg 分别置 10.0 mL 量瓶中,用无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取齐墩果酸对照品贮备液 2 mL,熊果酸对照品贮备液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 分别称取平乐、南宁、恭城的柿子粉末 2 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇 15 mL,密塞,超声处理 30 min,取出,放冷,补重,滤过,取续滤液约 1 mL 于离心管中,离心 10 min,10 000 r·min<sup>-1</sup>,即得供试品溶液。

**2.4 干扰试验** 分别取 2.2 项下齐墩果酸、熊果酸混合对照品溶液,2.3 项下供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,依照 2.1 项下色谱条件进行测定,供试品溶液中齐墩果酸和熊果酸峰保留时间与相应对照品峰的保留时间一致,临近位置无干扰峰出现。色谱图见图 1。

**2.5 线性关系考察** 分别精密吸取齐墩果酸对照品溶液(0.339 g·L<sup>-1</sup>) 1, 2, 3, 4, 5 μL,熊果酸对照品溶液(0.32 g·L<sup>-1</sup>) 1, 2, 4, 6, 8 μL,分别进行色谱测定,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积,以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得回归方程分别为  $Y_{\text{齐墩果酸}} = 3.29 \times 10^3 X - 1.73$ ,  $r = 0.9999$

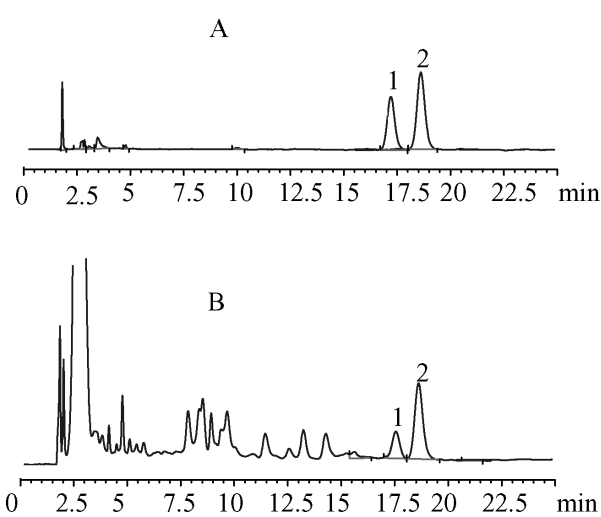


图 1 齐墩果酸与熊果酸 HPLC 图  
A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

( $n=6$ );  $Y_{\text{熊果酸}} = 3.10 \times 10^3 X - 3.29$ ,  $r = 0.9999$  ( $n=6$ )。结果齐墩果酸在进样量 0.095 ~ 0.95 μg,熊果酸在进样量 0.095 ~ 0.95 μg 呈良好的线性关系。

**2.6 精密度试验** 分别精密吸取齐墩果酸对照品溶液(0.0678 g·L<sup>-1</sup>),熊果酸对照品溶液(0.128 g·L<sup>-1</sup>),分别连续进样 6 次。测峰面积,结果齐墩果酸峰面积 RSD 为 0.88%,熊果酸峰面积的 RSD 为 0.78%。表明此法精密度良好。

**2.7 重复性试验** 按 2.3 项下制备方法和 2.1 项下色谱条件,分别对平乐产的柿子供试品溶液平行实验 5 份,测得齐墩果酸和熊果酸峰面积 RSD 分别为 1.16% 和 1.52%,表明此法重复性好。

**2.8 稳定性试验** 精密吸取按 2.3 项下制备的平乐产的柿子供试品溶液 10 μL,按 2.1 项下色谱条件,分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进样测定,测得峰面积,齐墩果酸和熊果酸峰面积 RSD 分别为 1.77% 和 0.55%,表明供试品溶液 24 h 内稳定。

**2.9 回收率试验** 称取平乐产的柿子粉末 6 份,各 1 g,精密称定,精密加入齐墩果酸对照品(0.339 g·L<sup>-1</sup>) 储备液 1 mL,再精密加入熊果酸对照品(0.320 g·L<sup>-1</sup>) 储备液 1 mL。按 2.3 项下供试品溶液制备操作,按 2.1 项下色谱条件测定其峰面积,计算其含量和回收率,结果齐墩果酸和熊果酸平均加样回收率分别为 99.91% 和 98.38%,RSD 分别为 2.5% 和 2.2%。

**2.10 样品测定** 分别称取平乐、恭城、南宁产地的柿子粉末约 2.0 g 各 3 份(每份平行测定 3 次),精密称定,按 2.3 项下制备供试品溶液,精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,依照 2.1 项下色谱条件测定,按外标法计算各样品中

的齐墩果酸和熊果酸的含量, 结果见表 1, 2。

表 1 不同产地样品中齐墩果酸含量测定 ( $n=3$ )

产地	齐墩果酸含量 /mg·g <sup>-1</sup>			平均值 /mg·g <sup>-1</sup>	RSD/%
平乐	0.305 0	0.298 2	0.302 5	0.301 9	1.2
恭城	0.236 7	0.231 0	0.239 8	0.236 2	2.1
南宁	-	-	-	-	-

表 2 不同产地样品中熊果酸含量测定

产地	熊果酸含量 /mg·g <sup>-1</sup>			平均值 /mg·g <sup>-1</sup>	RSD/%
平乐	1.204 3	1.208 8	1.247 4	1.220 2	2.0
恭城	0.848 9	0.851 2	0.849 6	0.849 7	1.3
南宁	0.134 1	0.133 7	0.129 8	0.132 2	2.3

### 3 讨论

**3.1 提取方法的选择** 考察回流、超声处理 2 种提取方法, 结果以超声提取得到的齐墩果酸和熊果酸含量最高, 最终选择超声提取的提取方法。该法简便、省时。

**3.2 提取溶剂的选择** 分别选用不同浓度的甲醇和乙醇为提取溶剂, 进行超声提取, 结果表明以 50%, 70% 的甲醇和乙醇提取含量低, 仅有熊果酸色谱峰; 100% 甲醇和 95% 乙醇的提取含量较高, 但差异不大, 又由于乙醇为无毒性溶剂, 故选用 95% 乙醇为提取溶剂。

**3.3 提取时间的选择** 分别进行了超声提取时间 30, 45, 60, 90 min 的比较, 结果表明 60, 90 min 提取含量较 30, 45 min 提取含量稍高, 而 30, 45 min 提取

含量差异性不大, 从节省时间的角度考虑, 故选用超声提取 30 min。

**3.4 提取溶剂体积的选择** 分别进行了溶剂体积 15, 20, 25 mL 的比较, 结果表明 15, 20, 25 mL 提取含量差异性不大, 故选用溶剂体积 15 mL 提取。

### [参考文献]

- [1] 刘界红. 柿树秋冬季的管理 [J]. 湖南林业, 2008 (10): 26.
- [2] 张雅利, 郭辉, 田忠民. 柿子的药理作用研究及临床应用 [J]. 中成药, 2006, 28(5): 720.
- [3] 马兰花. 柿子药用成分分析及研究 [J]. 山西林业, 2001(5): 29.
- [4] 李中岳. 柿子与柿子茶 [J]. 安徽林业, 1997(5): 27.
- [5] 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.
- [6] 陈武, 熊筱娟, 李开泉. 乌索酸的药理作用研究 [J]. 宜春学院学报: 自然科学, 2003, 25(4): 1.
- [7] 马鹏敏, 申翠波. 绿色柿子标准化生产技术 [J]. 山西农业科学, 2009, 37(8): 87.
- [8] 李述广. 柿子树栽培管理经验浅述 [J]. 科技信息, 2007(17): 239.
- [9] 高洁, 卢守信, 王丽红, 等. 庭院柿子栽培管理技术 [J]. 河北农业科技, 2008(11): 34.
- [10] 徐胜龙, 杨建雄. 柿子醇提取物的体外抗氧化作用 [J]. 食品科学, 2008, 29(4): 131.

[责任编辑 顾雪竹]