

鞣花酸和三萜类物质在石榴不同器官中的分布

张立华¹, 张元湖^{2,*}, 孙 蕾³, 赵登超³

(1. 枣庄学院生命科学院, 山东 枣庄 277160; 2. 山东农业大学 作物生物学国家重点实验室, 山东 泰安 271018;

3. 山东省林业科学研究院, 山东 济南 250014)

摘 要: 采用高效液相色谱法分析鞣花酸(ellagic acid, EA)、齐墩果酸(oleanolic acid, OA)和熊果酸(ursolic acid, UA)在枣庄大青皮石榴不同部位的分布规律。结果显示, EA含量: 花瓣(5.78 mg/g) > 花托(5.22 mg/g) > 花蕊(4.93 mg/g) > 叶片(3.67 mg/g) > 果皮(2.12 mg/g); UA含量: 花蕊(6.22 mg/g) > 花瓣(5.91 mg/g) > 叶片(2.90 mg/g) > 花托(1.06 mg/g) > 果皮(0.33 mg/g); OA含量: 花瓣(6.62 mg/g) > 花蕊(4.02 mg/g) > 叶片(1.41 mg/g) > 花托(0.79 mg/g) > 果皮(0.28 mg/g)。表明石榴的叶、果皮和花均可作为制取EA和三萜类物质的原料, 2类物质的含量在石榴花中最高, 更具开发利用前景。

关键词: 石榴; 鞣花酸; 熊果酸; 齐墩果酸; 分布

Distribution of Ellagic Acid and Triterpenes in Different Organs of Pomegranate

ZHANG Lihua¹, ZHANG Yuanhu^{2,*}, SUN Lei³, ZHAO Dengchao³

(1. College of Life Sciences, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China; 2. State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 3. Shandong Academy of Forestry, Jinan 250014, China)

Abstract: The distribution of ellagic acid (EA), oleanolic acid (OA) and ursolic acid (UA) in the petals, receptacle stamens, leaves and peel of 'Daqingpi' pomegranate in Zaozhuang of Shandong province was studied using high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the content of EA was in the decreasing order of petals (5.78 mg/g) > receptacle (5.22 mg/g) > stamens (4.93 mg/g) > leaves (3.67 mg/g) > peel (2.12 mg/g); for UA, the decreasing order was stamens (6.22 mg/g) > petals (5.91 mg/g) > leaves (2.90 mg/g) > receptacle (1.06 mg/g) > peel (0.33 mg/g); and for OA, the decreasing order was petals (6.62 mg/g) > stamens (4.02 mg/g) > leaves (1.41 mg/g) > receptacle (0.79 mg/g) > peel (0.28 mg/g). It is suggested that leaves, peel and flowers of pomegranate may be used as raw materials for extracting EA and triterpene. Especially, the flowers have better prospects for development and utilization.

Key words: pomegranate; ellagic acid; ursolic acid; oleanolic acid; distribution

中图分类号: R297.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)06-0136-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201506025

石榴(*Punica granatum* L.)为石榴科石榴属植物。原产地为中亚地区, 中国部分地区有引种。中国药典规定石榴的果皮入药, 其功效为涩肠止泻、止血、驱虫; 用于治疗久泻、久痢、便血、脱肛、崩漏、白带和虫积腹痛等。除了果皮以外, 石榴的其他部位也可作药用。石榴叶水提取物和石榴果汁具有较强的抗氧化和调血脂作用^[1-2]。石榴花可以用于治疗中耳炎^[3], 在印度等国被用于治疗糖尿病及其并发症^[4]。

近年来研究发现, 石榴含有丰富的活性成分, 国内外学者对其进行了广泛的研究, 石榴含有多酚、黄酮、生物碱、甾体类以及三萜类化合物等次生代谢物^[5], 其中

多酚含量较高, 据报道石榴皮中多酚含量占其干质量的10.4%~21.3%^[6], 石榴中多酚又包括几十种化合物^[5], 而对其鞣花酸(ellagic acid, EA)做了深入研究, EA的分子结构具有多个酚羟基, 能中和自由基, 表现出极强的抗氧化活性^[7], 以4 g/kg的剂量饲喂小鼠实验表明EA具有抑制多种肿瘤的作用^[8]; 三萜类物质是另一类重要的药用成分, 主要有熊果酸(ursolic acid, UA)和齐墩果酸(oleanolic acid, OA), 二者为同分异构体, 在分子结构上仅存在一个甲基位置的不同, UA和OA具有抗突变、抗癌^[9]及免疫双向调节作用^[10], 能够作用于胰岛的 β -细胞促进胰岛素的分泌^[11], 已作为用于治疗恶性肿瘤^[12]、肝硬

收稿日期: 2014-08-11

基金项目: 公益性行业(林业)科研专项(201204402); 山东省自然科学基金项目(ZR2013BL018)

作者简介: 张立华(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物资源开发及采后生理。E-mail: chinazhanglh@163.com

*通信作者: 张元湖(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物次生代谢及分子调控。E-mail: yhzhang9@163.com

化等疾病临床药物^[13]。有学者研究了采摘季节和品种对石榴叶中EA含量的影响^[14],其中采摘季节的影响较为明显,EA的含量随生长时间的延长而不断增加。张立华等^[15]研究了石榴叶中多酚、黄酮及生物碱的季节性变化情况。至今,未见有关三萜类物质及EA在石榴不同器官的分布规律的报道。本研究比较了石榴不同器官中EA和三萜类物质的含量,为更有效开发石榴资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品均从枣庄石榴园主栽品种大青皮石榴果树上采集,其中石榴皮在9月下旬由成熟的石榴果实剥取,石榴花在5月中下旬采集,石榴叶在9月下旬采集。把采集的材料先在烘箱内(105℃)杀青处理15 min,然后在鼓风干燥箱内(80℃)干燥至恒质量,粉碎后过40目筛,备用。

EA(纯度≥98%) 上海源叶生物科技有限公司;
OA、UA(纯度≥98%) 美国Sigma公司;甲醇(色谱纯) 天津市康科德科技有限公司;所用水为重蒸水,其他试剂为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

510型高效液相色谱仪 美国Waters公司;KQ-100DE型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;数显HH-4恒温水浴锅 国华电器有限公司;RE-52AA旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;JA103型电子分析天平(感量0.01 mg) 上海越平科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 EA含量的分析

参照Lei Fan等^[16]的方法,并稍加改动。

1.3.2 EA标准品溶液配制

使用JA103型电子分析天平精确称取EA标准品1.30 mg,用甲醇溶解,定容至1 000 mL,得质量浓度为1.3 μg/mL标准液。

1.3.3 EA样品溶液制备

准确称取石榴各样品粉末0.50 g,加入甲醇溶液30 mL,回流提取60 min,过滤,残渣用20 mL提取溶剂重复提取1次,合并滤液,定容于50 mL容量瓶中,经0.45 μm滤膜过滤,滤液用于高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定。

1.3.4 色谱条件

色谱柱为Symmetry C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A相为甲醇,B相为质量分数0.2%磷酸;梯度洗脱,0~10 min,A相10%→30%,B相

90%→70%;10~40 min,A相30%→100%,B相70%→0%;洗脱液流速1 mL/min;检测温度30℃;进样量20 μL;检测波长254 nm。

1.3.5 OA和UA含量的分析

测定样品中的OA含量和UA含量参照王岱杰等^[17]的方法,并略加改动。

1.3.5.1 标准品溶液配制

精确称取OA 3.24 mg和UA 7.81 mg,分别置于10 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,作为标准品溶液,其质量浓度分别为0.324 mg/mL和0.781 mg/mL。

1.3.5.2 样品溶液制备

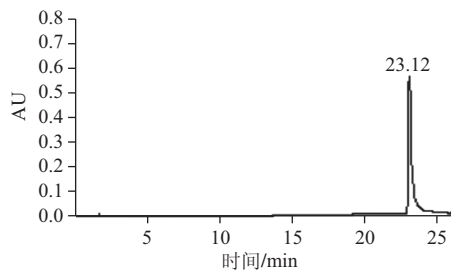
精确称取各样品粉末1.00 g,置于具塞锥形瓶中,加无水乙醇30 mL,超声波处理2 h,过滤,残渣用20 mL乙醇洗涤2次,洗涤液并入滤液,旋转蒸发器蒸去乙醇,残余物用甲醇溶解并转移至10 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,用0.45 μm滤膜过滤,滤液作为样品溶液。

1.3.5.3 色谱条件

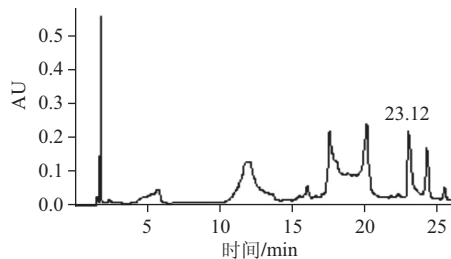
色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(88:12:0.1, V/V);检测器Waters UV-2487;检测波长210 nm;灵敏度0.6 AUFS;流速1 mL/min;柱温:室温;进样量10 μL。外标法定量分析,UA和OA分离度为1.95;理论塔板数均大于13 000。

2 结果与分析

2.1 EA含量的测定



A.鞣花酸标准品



B.石榴叶提取物

图1 鞣花酸标准品及样品的HPLC色谱图

Fig.1 Liquid chromatograms of EA standard and leaf extract

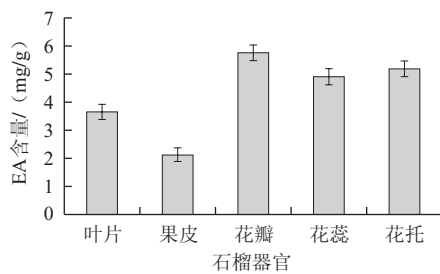
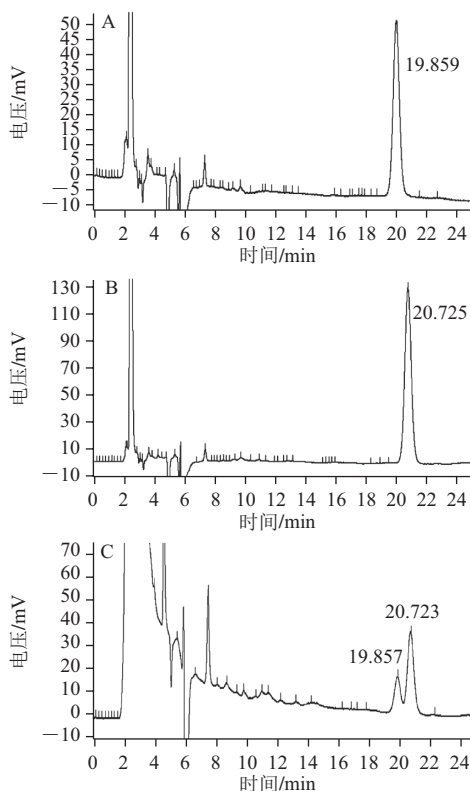


图2 石榴不同器官中EA的含量

Fig.2 The contents of EA in different organs of pomegranates

图1为EA的液相色谱, EA的保留时间为23.12 min。石榴各器官EA的含量见图2, 其中花瓣中EA的含量最高, 5.78 mg/g, 其次是花托>花蕊>叶片>果皮, 果皮中含量最低, 为2.12 mg/g。Xiang Lan等^[14]测定了11个品种石榴叶在7~10月中EA含量在1.30~6.46 mg/g范围之内, 本研究所用石榴叶为9月底采集的样品, EA含量为3.67 mg/g, 与文献[14]中的结果基本一致。石榴叶和果皮等材料中含有大量的多聚鞣花酸, 也叫鞣花单宁^[15], 用酸性溶液作提取溶剂, 在一定的温度条件下, 可把多聚鞣花酸水解为EA单体^[18]。本研究的提取溶剂不含酸, 所以所测定的EA含量是植物材料中存在的游离EA单体。说明石榴的多个器官部位均可作为提取EA的资源材料或作为生药资源, 尤其是石榴花。

2.2 OA和UA的含量



A.OA标准品; B.UA标准品; C.石榴花瓣提取物。

图3 OA和UA标准品及样品的HPLC色谱图

Fig.3 Liquid chromatograms of OA and UA standards and petal extract

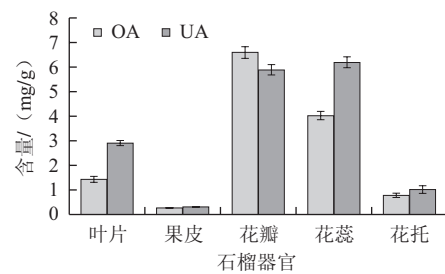


图4 石榴不同器官中OA和UA的含量

Fig.4 The contents of OA and UA in different organs of pomegranates

OA和UA的液相色谱如图3所示, 二者的保留时间分别为19.859 min和20.725 min。不同器官中2种三萜类物质的含量见图4所示, OA含量最高的部位是花瓣, 占干质量的6.62 mg/g, 其次是花蕊、叶片、花托, 果皮中含量最低。UA含量最高的部位是花蕊, 6.22 mg/g, 其次是花瓣、叶片、花托, 果皮中的含量也最低。在叶片和花蕊中UA的含量明显高于OA, 花瓣中OA含量高于UA, 在果皮和花托中二者的含量相差不大。三萜类物质结构复杂, 目前不能人工合成, 从植物材料中提取是其主要来源, 常用的植物材料如女贞子、木瓜、山楂、夏枯草、槲木等, 有报道^[19]女贞子中OA的含量约为干质量的1%, 也有人比较了15个品种木瓜中OA和UA的含量, 以金宝绿香玉木瓜中的含量最高, 两者质量分数之和为0.156 6%^[17]。欧洋等^[20]测定了OA和UA在西藏木瓜中的质量分数分别为0.18%和0.49%。除石榴果皮中2种三萜类成分的含量(质量分数0.06%)比木瓜低之外, 其他部位均比木瓜的含量高, 因此, 石榴的花、叶、果皮都可以作为制取OA和UA的植物材料, 尤其石榴花部分。

3 结论

采用HPLC法分析了EA、OA和UA在枣庄大青皮石榴不同部位的分布规律, 结果显示, EA含量: 花瓣(5.78 mg/g)>花托(5.22 mg/g)>花蕊(4.93 mg/g)>叶片(3.67 mg/g)>果皮(2.12 mg/g); UA含量: 花蕊(6.22 mg/g)>花瓣(5.91 mg/g)>叶片(2.90 mg/g)>花托(1.06 mg/g)>果皮(0.33 mg/g); OA含量: 花瓣(6.62 mg/g)>花蕊(4.02 mg/g)>叶片(1.41 mg/g)>花托(0.79 mg/g)>果皮(0.28 mg/g)。表明大青皮石榴的叶、果皮和花均可作为制取EA和三萜类物质的原料, 2类物质的含量在石榴花中最高, 更具开发利用前景。

参考文献:

- [1] 李定格, 苏传勤, 孙力, 等. 石榴叶调节血脂和清除氧自由基作用的研究[J]. 山东中医药大学学报, 1999, 23(5): 380-381.
- [2] LEI Fan, ZHANG X N, WANG Wei, et al. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice[J]. International Journal of Obesity, 2007, 31(6): 1023-1029.

- [3] 茹克娅木·沙德克. 维吾尔常用药材学[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993: 128-129.
- [4] LI Yuhao, QI Yanfei, HUANG T H W, et al. Pomegranate flower: a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR- α/γ activator properties[J]. Diabetes Obesity and Metabolism, 2008, 10(1): 10-17.
- [5] LANSKY E P, NEWMAN R A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 109(2): 177-206.
- [6] 李云峰, 郭长江, 杨继军, 等. 石榴皮抗氧化物质提取及其体外抗氧化作用研究[J]. 营养学报, 2004, 26(2): 144-147.
- [7] OSWA T, IDE A, SU J D, et al. Inhibiting of lipid peroxidation by ellagic acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35(5): 808-812.
- [8] BOUKHARTA M, JALBERT G, CASTONGUAY A. Efficacy of ellagitannins and ellagic acid as cancer chemo preventive agents[J]. Bull Liaison-Group Polyphenols, 1992, 16(1): 245-249.
- [9] OVESNA Z V, ACHALKOVA A, HORVATHOVA K, et al. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds minireview[J]. Neoplasma, 2004, 51(5): 327-333.
- [10] KAPIL A, SHARMA S. Effect of oleanolic acid on complement in adjuvant and carrageen-an-induced inflammation in rats[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1995, 47(7): 585-587.
- [11] TEODORO T, ZHANG L, ALEXANDER T, et al. Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic β -cells[J]. FEBS Letters, 2008, 582(9): 1375-1380.
- [12] 李丽庆. 齐墩果酸治疗恶性肿瘤患者的临床Ⅱ期研究[J]. 中国肿瘤临床, 1992, 19(6): 412-414.
- [13] 屈戎英. 齐墩果酸治疗病毒性肝炎[J]. 广州医药, 1981, 12(3): 411.
- [14] XIANG Lan, XING Dongming, LEI Fan, et al. Effects of season, variety, and processing method on ellagic acid content in pomegranate leaves[J]. Tsinghua Science and Technology, 2008, 13(4): 460-465.
- [15] ZHANG Lihua, GAO Yujiao, ZHANG Yuanhu, et al. Changes in bioactive compounds and antioxidant activities in pomegranate leaves[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 123(4): 543-546.
- [16] LEI Fan, XING Dongming, XIANG Lan, et al. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract[J]. Journal of Chromatography B, 2003, 796(1): 189-194.
- [17] 王岱杰, 王晓, 耿岩玲, 等. 反相高效液相色谱测定不同品种皱皮木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 497-499.
- [18] LU Jingjing, YUAN Qipeng. A new method for ellagic acid production from pomegranate husk[J]. Journal of Food Process Engineering, 2008, 31(4): 443-454.
- [19] 刘圣, 唐丽琴, 陈礼明, 等. 大孔吸附树脂分离技术优选女贞子提取工艺研究[J]. 中成药, 2007, 29(1): 139-141.
- [20] 欧洋, 马静, 张朝阳, 等. 西藏木瓜的鉴别及其齐墩果酸、熊果酸的测定[J]. 华西药理学杂志, 2014, 29(6): 670-672.