

苦丁茶药材有效成分动态积累研究*

Dynamic Accumulation Study on Active Ingredients of *Ilex kudingcha*

覃兰芳¹, 黄云峰¹, 胡琦敏¹, 赖茂祥^{1,2**}, 张启伟¹, 黄荣韶³

QIN Lan-fang¹, HUANG Yun-feng¹, HU Qi-min¹, LAI Mao-xiang^{1,2}, ZHANG Qi-wei¹, HUANG Rong-shao³

(1. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022; 3. 广西大学, 广西南宁 530004)

(1. Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Traditional China Medicine Quality Standards, Nanning, Guangxi, 530022, China; 3. Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:【目的】研究不同月份苦丁茶(*Ilex kudingcha*)药材中有效成分熊果酸和齐墩果酸含量变化的动态积累。【方法】采用反相高效液相色谱法测定熊果酸和齐墩果酸在苦丁茶药材中的含量。【结果】当年10月至次年2月份苦丁茶样品中熊果酸和齐墩果酸的含量分别为1.12%~1.47%及0.16%~0.21%, 3~9月份样品中熊果酸和齐墩果酸的含量分别为0.87%~1.21%及0.13%~0.18%。【结论】苦丁茶药材的最佳采收期应为当年10月至次年2月份。

关键词: 苦丁茶 动态积累 熊果酸 齐墩果酸

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2014)03-0267-04

Abstract:【Objective】The dynamic accumulation content of Ursolic acid and Oleanic acid was determined in different growth phases of *Ilex kudingcha*. 【Methods】RP-HPLC was used to measure the content of Ursolic acid and Oleanic acid. 【Results】The content of Ursolic acid and Oleanic acid from the samples in Oct-Feb is 1.12%~1.47% and 0.16%~0.21% while it is 0.87%~1.21% and 0.13%~0.18% in Mar-Sep. 【Conclusion】The optimal harvest time of *Ilex kudingcha* is Oct-Feb.

Key words: *Ilex kudingcha*, dynamic accumulation, ursolic acid, oleanic acid

【研究意义】苦丁茶具有极佳的药用功效和很好的茶饮价值,其植物来源为冬青科植物苦丁茶(*Ilex kudincha* C. J. Tseng)的干燥叶,属于药茶两用植物,

收载于《广西中药材标准》第一册,具有散风热、清头目、除烦渴的药效功能;作为茶饮具有抗衰老、降血压、降血脂等效果。由于苦丁茶市场发展迅速,仅在广西大新和天等县就有栽培面积约1000hm²,已成为广西西部山区部分农村经济发展的主要产业。近年来随着对苦丁茶药用功能研究的进一步深入,苦丁茶的应用越来越广泛,苦丁茶的需求量也在逐年增加。为了提高药材质量,本研究以苦丁茶中有效成分熊果酸和齐墩果酸为检测指标,对不同物候期的苦丁茶药材进行动态含量测定分析,为确定最佳采收期、进行合理采收提供科学依据。【前人研究进展】有关苦丁茶的化学成分和含量测定前人已经有过研究和报

收稿日期:2014-02-17

修回日期:2014-05-15

作者简介:覃兰芳(1967-),女,助理研究员,主要从事中药化学分析研究。

* 国家科技支撑计划课题(2011BAI01B04)和广西科学研究与技术开发计划项目(合同编号,桂科重1298001-2)资助。

** 通讯作者:赖茂祥(1953-),男,研究员,主要从事中草药资源研究及质量评价。E-mail:lmx1953@126.com。

道^[1~5],但对于苦丁茶不同物候期有效成分动态积累分析研究,迄今为止尚未见报道。【本研究切入点】对同一产地,不同月份采收的苦丁茶中有效成分熊果酸和齐墩果酸进行含量测定分析。【拟解决的关键问题】为苦丁茶规范化栽培、合理采收与加工、制定质量标准等提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验仪器与材料

仪器:日本岛津高效液相色谱仪(SPD-10AVP 紫外检测器, LC-10ATVP 溶剂输送泵, Ultimate XB-C₁₈ 柱(250mm×4.6mm, 5 μ m) 色谱柱); 威玛龙色谱工作站; HH-S 数显恒温水浴锅(江苏金坛医疗仪器厂); FA1004 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); B2200S 型超声清洗器(上海必能信超声有限公司); 微型植物试样粉碎机(天津斯泰特仪器有限公司)。

试药:苦丁茶叶定时定点采集于南宁市南地大院, 每批药材均经过广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为冬青科冬青属植物苦丁茶的树叶; 熊果酸对照品购自中国药品生物制品检定所(批号: 110742-200518, 含量 99.3%, 供含量测定用); 齐墩果酸对照品购自中国药品生物制品检定所(批号: 110709-200505, 含量 94.9%, 供含量测定用)。甲醇为色谱纯; 水为重蒸馏水; 其余试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件

流动相: 甲醇-水-冰乙酸-三乙胺(90:10:0.03:0.06); 检测波长: 215nm; 流速: 0.5mL/min; 进样量: 10 μ L; 灵敏度: 0.0100AUFS; 柱温: 室温。

1.2.2 对照品溶液制备

熊果酸对照品溶液: 精密称取熊果酸对照品 10mg, 置 25mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 摇匀, 得每 1mL 含熊果酸 0.4mg 的对照品溶液储液, 再精密量取 1mL 熊果酸对照品溶液储液置 2mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 摇匀, 得每 1mL 含熊果酸 0.20mg 的对照品溶液。

齐墩果酸对照品溶液: 精密称取齐墩果酸对照品 12.5mg, 置 25mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 摇匀, 得每 1mL 含齐墩果酸 0.50mg 的对照品溶液储液, 再精密量取 1mL 齐墩果酸对照品溶液储液置 2mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 摇匀, 得每 1mL 含齐墩果酸 0.25mg 的对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液制备

苦丁茶叶子研成细粉, 取约 1g, 精密称定, 置于

具塞三角瓶中, 加甲醇 50mL, 称定重量, 超声 30min 后, 放冷至室温, 再称重量, 用甲醇补足减失的分量, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

1.2.4 供试品最佳制备方法的确定

1.2.4.1 提取溶剂的选择

取苦丁茶叶子(9月份样品)粉末 3份, 每份约 1.0g, 精密称定, 各加入 50mL 纯甲醇、50% 甲醇、75% 甲醇溶剂, 称定重量, 超声提取 30min 后, 放冷至室温, 再称重量, 用甲醇补足减失的分量, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 进样检测熊果酸和齐墩果酸的含量。

1.2.4.2 提取方法的选择

取苦丁茶叶子(9月份样品)粉末 3份, 每份约 1.0g, 精密称定, 各加入 50mL 甲醇, 称定重量, 分别采用静置、超声提取、回流提取 30min 后, 放冷至室温, 再称重量, 用甲醇补足减失的分量, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 进样检测熊果酸和齐墩果酸的含量。

1.2.4.3 提取时间的选择

取苦丁茶叶子(9月份样品)粉末 3份, 每份约 1.0g, 精密称定, 各加入 50mL 甲醇, 称定重量, 分别超声提取 15min、30min、45min 后, 放冷至室温, 再称重量, 用甲醇补足减失的分量, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 进样检测熊果酸和齐墩果酸的含量。

1.2.5 标准曲线的绘制

取熊果酸对照品储液适量, 用甲醇稀释, 分别制得浓度为 0.1588mg/mL、0.1986mg/mL、0.23823mg/mL、0.31776mg/mL、0.3972mg/mL 的对照品溶液, 各取 10 μ L 进样检测, 记录熊果酸峰面积值, 以峰面积值对进样浓度(μ g)进行线性分析。

取齐墩果酸对照品储液适量, 用甲醇稀释, 分别制得浓度为 0.14235mg/mL、0.1898mg/mL、0.23725mg/mL、0.2847mg/mL、0.33215mg/mL 的对照品溶液, 各取 10 μ L 进样检测, 记录齐墩果酸峰面积值, 以峰面积值对进样浓度(μ g)进行线性分析。

1.2.6 重复性实验

精密称取同一样品(9月份样品)粉末 6份, 按供试品溶液制备方法进行处理, 依次测定熊果酸和齐墩果酸的含量。

1.2.7 精密度实验

取熊果酸和齐墩果酸对照品溶液, 按照 1.2.1 项下的色谱条件重复进样测定 6次。

1.2.8 回收率测定

精密吸取熊果酸对照品贮备液 2mL 置平底烧瓶

中,共 6 份,置水浴中减压回收至干。精密称取已知含量(熊果酸含量为 1.10%)的供试品(9 月份样品)粉末约 0.3g,分别至上述平底烧瓶中,按供试品溶液制备方法提取,进样 10 μ L,测定熊果酸含量。

精密吸取齐墩果酸对照品贮备液 2mL 置平底烧瓶中,共 6 份,置水浴中减压回收至干。精密称取已知含量(齐墩果酸含量为 0.17%)的供试品(9 月份样品)粉末约 0.5g,分别至上述平底烧瓶中,按供试品溶液制备方法提取,进样 10 μ L,测定齐墩果酸含量。

1.2.9 样品测定

取不同月份苦丁茶叶子粉碎,取约 1.0g,精密称定,按供试品配制方法制备供试品样品溶液,进样 10 μ L 检测,用外标法计算不同月份苦丁茶叶子中熊果酸和齐墩果酸的含量。

2 实验结果与分析

2.1 供试品最佳制备方法

实验结果(表 1)表明,采用甲醇做提取溶剂,超声提取 30min 提取效果最佳。

2.2 标准曲线

通过对熊果酸对照品进行线性回归分析,得到线性回归方程为 $Y = 9.21 \times 10^5 X - 1.02 \times 10^6$, $r = 0.9999$,表明熊果酸在 1.588~3.972 μ g 范围内线性关系良好,符合线性回归的要求。对齐墩果酸对照品进行线性回归分析,得到线性回归方程为 $Y =$

表 1 供试品最佳提取方法单因素实验结果

Table 1 Experimental results of the best extracting method to make test samples

	提取溶剂 Extraction solvent			提取方法 Extraction method			提取时间 Extraction time		
	纯甲醇 Pure methanol	50%甲醇 50% methanol	75%甲醇 75% methanol	静置 Sanding	回流 Reflux	超声 Ultraphonic	15min	30min	45min
齐墩果酸 Oleanic acid(%)	0.166	0.165	0.163	0.129	0.162	0.166	0.147	0.162	0.165
熊果酸 Ursolic acid(%)	1.095	1.075	1.075	0.776	1.078	1.095	0.925	1.078	1.073
总含量 Total content(%)	1.261	1.240	1.238	0.905	1.240	1.252	1.072	1.240	1.238

表 2 加样回收率实验结果

Table 2 Experimental results of recovery

编号 No.	样品含量 Sample contents(mg)		加入量 Adding amount(mg)		测得量 Measured amount(mg)		回收率 Recovery(%)		平均回收率(%) Average recovery (%)	
	齐墩果酸 Oleanic acid	熊果酸 Ursolic acid	齐墩果酸 Oleanic acid	熊果酸 Ursolic acid	齐墩果酸 Oleanic acid	熊果酸 Ursolic acid	齐墩果酸 Oleanic acid	熊果酸 Ursolic acid	齐墩果酸 Oleanic acid	熊果酸 Ursolic acid
	1	0.85952	3.1548	1.18625	0.993	2.10497	4.15766	104.99	100.99	
2	0.85034	3.1350	1.18625	0.993	2.01987	4.15310	98.59	102.53		
3	0.85680	3.1438	1.18625	0.993	2.08699	4.22275	103.70	108.66		
4	0.85017	3.1581	1.18625	0.993	2.00293	4.25492	97.18	110.46		
5	0.85034	3.1878	1.18625	0.993	2.04662	4.23191	100.85	105.15		
6	0.85034	3.2208	1.18625	0.993	2.03028	4.33431	99.47	112.14	100.8	106.72

$1.26 \times 10^6 X - 1.69 \times 10^6$, $r = 0.9999$,表明齐墩果酸在 1.4235~3.3215 μ g 范围内线性关系良好,符合线性回归的要求。

2.3 重复性实验

通过重复性试验,得到 6 份供试品中齐墩果酸的平均含量为 0.164%, RSD 为 1.80%;熊果酸的平均含量为 1.075%, RSD 为 0.36%,表明方法重复性良好,符合含量测定的要求。

2.4 精密度实验

通过仪器精密度试验,得到熊果酸峰和齐墩果酸对照品峰面积平均值分别为 805741(RSD 为 0.33%, $n = 6$)和 1272714(RSD 为 0.34%, $n = 6$),表明仪器精密度良好,可以满足含量测定的要求。

2.5 回收率测定

通过加样回收率试验,得到熊果酸的平均回收率为 106.72%, $RSD = 2.23%$ ($n = 6$),齐墩果酸的平均回收率为 100.80%, $RSD = 3.00%$ ($n = 6$)。结果见表 2。表明方法回收率良好,符合含量测定的要求。

2.6 样品测定

由样品测定实验结果(图 1)可知,苦丁茶叶中熊果酸和齐墩果酸的总含量随月份变化而呈明显变化,尤其是熊果酸随季节变化很明显。苦丁茶 3 月开始萌发新芽,9 月以后进入生长休眠期,是积累有效物质的时期,所以该阶段时间苦丁茶叶中熊果酸和齐墩

果酸的含量最高。苦丁茶叶中熊果酸和齐墩果酸的含量在每年10月至次年的2月处于相对高峰期,其中11月份的含量最高,为1.47%和0.21%;苦丁茶叶中熊果酸和齐墩果酸的总含量在每年的3~9月含量较低,其中6月份的含量最低,为0.87%和0.13%。

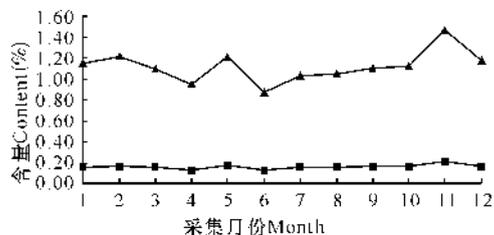


图1 不同月份苦丁茶叶中齐墩果酸和熊果酸的含量

Fig. 1 The content of Oleanolic acid & Ursolic acid in different month

▲:熊果酸 Ursolic acid, ■:齐墩果酸 Oleanolic acid

3 结论

苦丁茶叶的最佳采收期应在每年10月至次年的2月。熊果酸和齐墩果酸是同分异构体,结构相似,完全分离很困难。本研究经过多次试验发现,流动相的配比和流速是影响熊果酸和齐墩果酸分离的主要因素,当采用甲醇-水-冰乙酸-三乙胺(90:10:0.03:0.06)为流动相,流速为0.5mL/min时,能使二者的分离度达到1.50以上。

参考文献:

[1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准(第1册) [M]. 南宁:广西科学技术出版社,1990:63.

Department of Health of Guangxi Zhuang Autonomous Region. Guangxi Chinese medicine standard (1) [M]. Nanning:Guangxi Science and Technology Press,1990:63.

[2] 任秀莲,周春山,魏琦峰,等. 反相高效液相色谱法测定苦丁茶中的熊果酸[J]. 光谱实验室,2004,21(4):693-697.

Ren X L,Zhou C S,Wei Q F,et al. RP-HPLC determination of ursolic acid in *Ilex kudingcha* C J Tseng[J]. Spectrographic Laboratory,2004,21(4):693-697.

[3] 顾学芳,田澍,黄丹. 苦丁茶中熊果酸和齐墩果酸的提取及含量测定[J]. 食品研究与开发,2008,29(5):96-98.

Gu X F,Tian S,Huang D. Extraction and determination of ursolic acid and oleanolic acid in kudingcha[J]. Food Research and Development,2008,29(5):96-98.

[4] 石敏娟,朱卫丰,刘耀明. 苦丁茶中的熊果酸和齐墩果酸的含量测定[J]. 中医学报,2007,35(2):45-47.

Shi M J,Zhu W F,Liu Y M. Determination of ursolic acid and oleanolic acid in kudingcha[J]. Journal of Tradition Chinese Medicine,2007,35(2):45-47.

[5] 杨新河,刘仲华,黄建安,等. HPLC法测定苦丁茶中的熊果酸和齐墩果酸的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(10):1627-1630.

Yang X H,Liu Z H,Huang J A,et al. HPLC determination of ursolic acid and oleanolic acid in kudingcha[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis,2007,27(10):1627-1630.

(责任编辑:陈小玲)