

苦丁茶中熊果酸和齐墩果酸的同步分析方法研究*

Research on Method of Synchronization Analysis of Ursolic Acid and Oleanolic Acid in *Ilex kudincha*

蒋珍藕,赖茂祥**,孙翠,张启伟

JIANG Zhen-ou, LAI Mao-xiang, SUN Cui, ZHANG Qi-wei

(广西中医药研究院,广西中药质量标准研究重点实验室,广西南宁 530022)

(Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:【目的】分析苦丁茶(*Ilex kudincha* C. J. Tseng)中熊果酸和齐墩果酸,并对不同部位、不同采收时间、不同产地的苦丁茶进行比较。【方法】采用原位预处理-薄层色谱法。【结果】熊果酸、齐墩果酸能够很好地被分离,可以同时被检出。【结论】苦丁茶中熊果酸含量较高,而齐墩果酸含量较低。

关键词:苦丁茶 原位预处理-薄层色谱法 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)03-0271-04

Abstract:【Objective】Ursolic acid and oleanolic acid were analyzed in *Ilex kudincha*. 【Methods】In situ pretreatment-TLC was adopted to determine the content of both ursolic acid and oleanolic acid in *Ilex kudincha*, of which different parts, harvesting time and collected places were compared. 【Results】The ursolic acid and oleanolic acid in *Ilex kudincha* could be well separated and identified simultaneously. 【Conclusion】In *Ilex kudincha*, the content of ursolic acid was higher and the content of oleanolic acid was lower.

Key words: *Ilex kudincha* C. J. Tseng, in situ pretreatment-TLC, ursolic acid, oleanolic acid

【研究意义】苦丁茶(*Ilex kudincha* C. J. Tseng)为冬青科冬青属植物,是我国南部地区广泛应用的药、茶两用植物,主产于广西、广东、海南等地,是保健茶中的佼佼者;药用具有散风热,清头目,除烦渴的功效,用于头痛,齿痛,目赤,耳鸣,耳中流脓,热病烦渴,痢疾等^[1];茶饮具有生津、提神、益智、抗衰老、降血压、降血脂等效果。在我国,就栽培面积大小、产量多少和民间应用的广泛程度而言,除了茶以外,位居其次的便是苦丁茶。市面上苦丁茶的种类繁多,品种复杂,随着其商品的多样化,同名异物不断增多。因此,制定科学可靠的质量控制方法显得意义重大。【前人研究进展】苦丁茶含有熊果酸和齐墩果酸活性成

分^[2~4],由于这两个化合物是同分异构体,结构相似,性质相近,用一般的薄层色谱法难以分离。【本研究切入点】目前尚没有采用薄层色谱法同时检出苦丁茶中熊果酸和齐墩果酸的文献报道。【拟解决的关键问题】本文参照文献^[5,6],采用原位预处理法,建立苦丁茶中同时鉴别熊果酸和齐墩果酸的薄层色谱方法,并对不同部位、不同采收时间、不同产地的苦丁茶进行比较,为制定苦丁茶质量标准奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

B2200S型超声波清洗器;电热恒温干燥箱(上海精密实验设备有限公司);ZF-2型三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂);YOKO-ZS薄层色谱成像仪(武汉药科新技术开发有限公司)。

薄层层析硅胶G预制板(批号20121108,青岛海洋化工有限公司);薄层层析硅胶G(化学纯,批号060320,青岛海洋化工有限公司,国家药典委员会监制);其余所用试剂均为分析纯。

熊果酸对照品(批号110742-200518,供含量测

收稿日期:2014-01-10

修回日期:2014-02-10

作者简介:蒋珍藕(1964-),女,主任中药师,硕士,主要从事中草药开发研究及质量评价。

* 国家科技支撑计划课题(2011BAI01B04),广西科学研究与技术开发计划项目(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

定用,中国食品药品检定研究院提供);齐墩果酸对照品(批号 110709-200505,供含量测定用,中国药品生物制品检定院提供)。

本实验所用药材样品均由广西中医药研究院中药资源研究所提供,所有药材样品均经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为苦丁茶。

1.2 方法

1.2.1 供试品溶液的制备

取样品粉末 1 g,加乙醇 30 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。

1.2.2 对照品溶液的制备

取熊果酸、齐墩果酸对照品,分别加无水乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 溶液,作为对照品溶液。

1.2.3 薄层原位预处理

吸取供试品溶液 5 μ L、齐墩果酸对照品溶液和熊果酸对照品溶液各 3 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上。将薄层板点样的一端浸入质量分数 1% 碘-二氯甲烷溶液约 12~15 mm,使溶液浸过迅速取出,立即覆以一玻璃板,30 min 后取下玻璃板,挥去薄层板上残留的溶液。

1.2.4 薄层色谱条件

表 1 不同产地的苦丁茶嫩芽样品

Table 1 The samples of kudincha shoot from different places

编号 No.	采集时间 Harvesting time	产地 Place	编号 No.	采集时间 Harvesting time	产地 Place
1	2011.07.12	广西天等县天茗茶厂 Guangxi Tiandeng County Tianming tea factory	4	2011.07.13	广西大新县苦丁村 Guangxi Daxin County Kuding Village
2	2011.07.12	广西天等县上映乡 Guangxi Tiandeng County Shangying Country	5	2012.02.10	广东梅州市大浦县 Guangdong Meizhou City Dapu County
3	2011.07.13	广西大新县苦丁村 Guangxi Daxin County Kuding Village			

表 2 不同产地的苦丁茶老叶样品

Table 2 The samples of kudincha old leaf from different places

编号 No.	采集时间 Harvesting time	产地 Place	编号 No.	采集时间 Harvesting time	产地 Place
1	2011.07.12	广西天等县都康乡 Guangxi Tiandeng County Dukang Country	7	2011.12.24	广西宾阳县思陇镇 Guangxi Binyang County Silong Town
2	2012.03.29	广西大新县苦丁村 Guangxi Daxin County Kuding Village	8	2012.01.01	广西植物研究所 Guangxi Institute of Botany
3	2011.07.24	广西南宁地区大院 Guangxi Nanning Region Courtyard	9	2012.02.10	广东梅州大浦县 Guangdong Meizhou City Dapu County
4	2011.12.21	广西武鸣县罗波镇 Guangxi Wuming County Luobo Town	10	2012.02.11	广东清远市清新县 Guangdong Qingyuan City Qingxin County
5	2011.12.21	广西马山县白山镇 Guangxi Ma Shan County Baishan Town	11	2012.08.25	海南省保亭县 Hainan Province Baoting County
6	2011.12.22	广西上林县镇圩镇 Guangxi Shanglin County Zhenyu Town			

以环己烷-丙酮-乙酸乙酯-甲酸(9:2:1:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以质量分数 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点清晰,置紫外灯(365 nm)下检视,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

1.2.5 不同产地的苦丁茶嫩芽的薄层色谱分析

(1) 供试样品见表 1。

(2) 分别取上述供试样品制成供试品溶液,按上述方法进行薄层试验。

1.2.6 不同产地的苦丁茶老叶的薄层色谱分析

(1) 供试样品见表 2。

(2) 分别取上述供试样品制成供试品溶液,按上述方法进行薄层试验。

1.2.7 不同采集时间苦丁茶老叶的薄层色谱分析

(1) 供试样品来自广西南宁地区大院,时间分别为 2011 年 9~10 月的 13 号,11 月 18 号,12 月 16 号,2012 年 1~7 月的 18 号,8 月 26 号。

(2) 分别取上述供试样品制成供试品溶液,按上述方法进行薄层试验。

1.2.8 苦丁茶嫩叶和老叶比较的薄层色谱分析

(1) 供试样品见表 3。

表 3 苦丁茶嫩叶和老叶样品

Table 3 The samples of kudincha shoot and old leaf

编号 No.	采集时间 Harvesting time	产地 Place	药用部位 Part	编号 No.	采集时间 Harvesting time	产地 Place	药用部位 Part
1	2011.07.12	广西天等县天茗茶厂 Guangxi Tiandeng County Tianming tea factory	嫩芽 Shoot	4	2011.07.12	广西天等县都康乡 Guangxi Tiandeng County Dukang County	老叶 Old leaf
2	2011.07.13	广西大新县苦丁村 Guangxi Daxin County Kuding Village	嫩芽 Shoot	5	2012.03.29	广西大新县苦丁村 Guangxi Daxin County Kuding Village	老叶 Old leaf
3	2012.02.10	广东梅州市大浦县 Guangdong Meizhou City Dapu County	嫩芽 Shoot	6	2012.02.10	广东梅州市大浦县 Guangdong Meizhou City Dapu County	老叶 Old leaf
7	2012.02.11	广东清远市清新县 Guangdong Qingyuan City Qingxin County	老叶 Old leaf	8	2012.08.25	海南省保亭县 Hainan Province Baoting County	老叶 Old leaf

(2)分别取上述供试样品制成供试品溶液,按上述方法进行薄层试验。

2 结果与分析

2.1 不同产地苦丁茶嫩芽的薄层试验

不同产地苦丁茶嫩芽的薄层实验结果见图 1。从图 1 看,不同产地的苦丁茶嫩芽均能检出熊果酸,但斑点大小不同,表明含量有一定差异;采自广西天等县天茗茶厂、广西天等县上映乡及广西大新县苦丁村的嫩芽(样品 1~3)在本文的薄层色谱条件下检不出明显的齐墩果酸斑点,可能是因为样品中齐墩果酸含量较低的缘故。

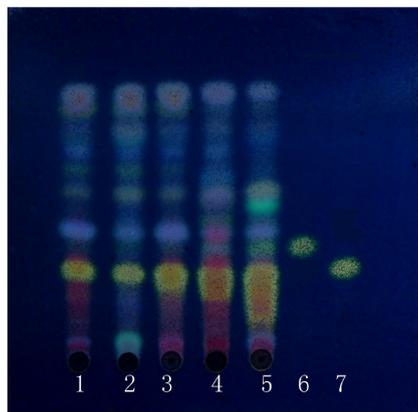


图 1 不同产地的苦丁茶嫩芽的薄层色谱

Fig. 1 The thin-layer chromatogram of kudincha shoot from different places

1~5:苦丁茶嫩芽样品,6:齐墩果酸对照品,7:熊果酸对照品

1~5:the samples of kudincha shoot,6:oleanolic acid,7:ursolic acid

2.2 不同产地苦丁茶老叶的薄层试验

不同产地苦丁茶老叶的薄层试验结果见图 2。从图 2 看,不同产地的苦丁茶老叶均能检出熊果酸和齐墩果酸,其中熊果酸斑点均很明显,而齐墩果酸的斑点则相对较弱,表明熊果酸的含量较高,齐墩果酸的含量较低。

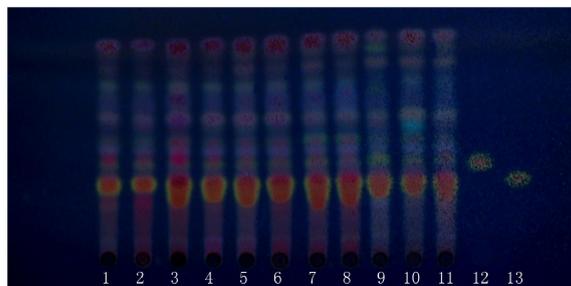


图 2 不同产地的苦丁茶老叶的薄层色谱

Fig. 2 The thin-layer chromatogram of kudincha old leaf from different places

1~11:苦丁茶老叶样品,12:齐墩果酸对照品,13:熊果酸对照品。

1~11:the samples of kudincha old leaf,12:oleanolic acid,13:ursolic acid

2.3 不同采集时间苦丁茶老叶的薄层试验

不同采集时间苦丁茶老叶的薄层试验结果见图 3。

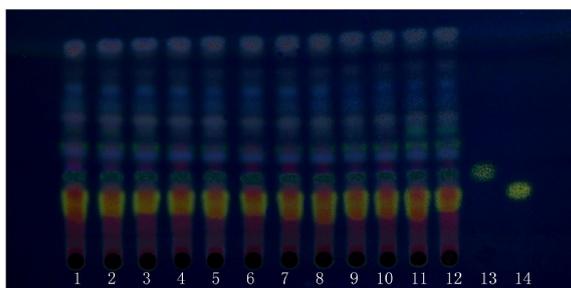


图 3 不同采集时间的苦丁茶老叶的薄层色谱

Fig. 3 The thin-layer chromatogram of kudincha old leaf of different harvesting time

1~12:苦丁茶老叶样品,13:齐墩果酸对照品,14:熊果酸对照品

1~12:the samples of kudincha old leaf,13:oleanolic acid,14:ursolic acid

从图 3 看,不同采集时间的苦丁茶老叶均能检出熊果酸和齐墩果酸,其中熊果酸斑点均很明显,而齐墩果酸的斑点则相对较弱,表明熊果酸的含量较高,

齐墩果酸的含量较低。

2.4 苦丁茶嫩叶和老叶比较的薄层试验

苦丁茶嫩叶和老叶比较的薄层试验结果见图4。从图4看,苦丁茶老叶(样品4~8)均能检出熊果酸和齐墩果酸,而产自广西天等县天茗茶厂和广西大新县苦丁村的苦丁茶嫩芽(样品1~2)则没能明显检出齐墩果酸,表明传统的应用中苦丁茶一般只用其嫩芽是不够科学的,其老叶同样具有药用价值,应充分利用苦丁茶老叶资源。

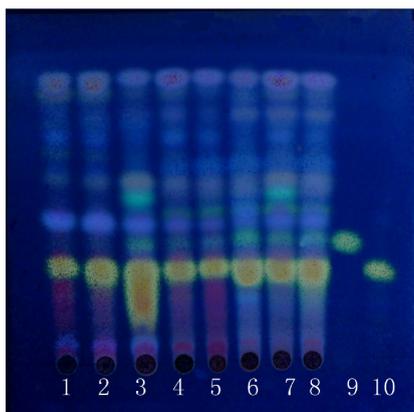


图4 苦丁茶嫩叶和老叶比较的薄层色谱

Fig. 4 The thin-layer chromatogram of kudinch shoot and old leave

1~8:苦丁茶样品,9:齐墩果酸对照品,10:熊果酸对照品

1~8; the samples of kudinch, 9:oleanolic acid, 10 ursolic acid

3 结论

本文建立的薄层色谱法能同时检识苦丁茶中熊果酸和齐墩果酸,该法分离效果较佳,重现性好,为制定苦丁茶质量标准奠定了实验基础。苦丁茶中熊果酸的含量较高,齐墩果酸的含量较低。苦丁茶老叶不失其药用价值,应充分利用苦丁茶老叶资源。

参考文献:

[1] 广西壮族自治区卫生厅编. 广西中药材标准[M]. 南宁:

广西科学技术出版社,1990:63.

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

[2] 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.

[3] 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):45-46.

Shi M J, Zhu W F, Liu Y M. Content determination of ursolic acid and oleanolic acid in kudingcha[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2007, 35(2):45-46.

[4] 李宏杨,刘飞,张凤琴,等. 冬青科苦丁茶中熊果酸和齐墩果酸含量的测定[J]. 安徽农业科学,2010,38(14):7244-7246.

Li H Y, Liu F, Zhang F Q, et al. Determination of ursolic acid and oleanolic acid in Kudingcha Species of Aquifoliaceae [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(14):7244-7246.

[5] 严华,苏健,王宝琴. 药材中齐墩果酸和熊果酸质控指标的探究[J]. 药物分析杂志,2009,29(8):1400-1406.

Yan H, Su J, Wang B Q. Discussion on oleanolic acid and ursolic acid as indicator of quality control of Chinese medical material[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2009, 29(8):1400-1406.

[6] 严华,王宝琴,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.

Yan H, Wang B Q, Lu J. TLC separation of oleanolic and ursolic acids[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2009, 29(12):2168-2170.

(责任编辑:尹 闯)