

• 方药研究 •

苦丁茶提取物质量分析

胡顺莉¹, 俞致², 吴虹¹, 李辉¹, 陈缙筠¹, 陈建¹, 代苗苗¹, 王伟¹, 孙亮亮¹

(1. 安徽中医药大学药学院 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230031;

2. 安徽省妇幼保健院药剂科, 安徽 合肥 230001)

[摘要]目的 对苦丁茶药材水提物进行质量分析。方法 以槲皮素、山柰素作为对照品, 采用薄层色谱法对苦丁茶药材中黄酮类化合物进行定性鉴别; 采用反相高效液相色谱法测定苦丁茶药材中槲皮素和山柰素含量。结果 薄层色谱鉴别结果表明, 供试品色谱中在与对照品色谱相应的位置上, 显现相同颜色的斑点。槲皮素、山柰素进样量分别在 0.1~3.2 μg 、0.01~0.32 μg 范围内, 与峰面积线性关系良好(槲皮素 $r_1=0.9999$; 山柰素 $r_2=0.9998$), 槲皮素及山柰素的平均加样回收率分别为 102.34% 和 101.24%, RSD 分别为 3.26% 和 3.15% ($n=9$)。结论 薄层色谱法和反相高效液相色谱法简便、准确, 重复性好, 可作为苦丁茶药材水提物的质量分析方法。

[关键词]苦丁茶; 质量分析; 薄层色谱法; 反相高效液相色谱法

[中图分类号]R284.1 **[文献标志码]**A **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2014.02.028

苦丁茶是大叶冬青(*Ilex latifolia Thunb*)系冬青科冬青属常绿乔木的树叶, 大叶冬青主要分布于浙江、江苏、安徽、福建、湖北等地, 是华东地区苦丁茶的主要原植物, 是一种传统的纯天然保健饮料。苦丁茶中含有苦丁皂苷、氨基酸、维生素 C、多酚类、黄酮类、咖啡碱、蛋白质等 200 多种成分。其成品茶

清香味苦、而后甘凉, 具有清热消暑、明目益智、生津止渴、利尿强心、润喉止咳、降压减肥、抑癌防癌、延缓衰老、活血脉等多种功效^[1-2], 素有“保健茶”“美容茶”“减肥茶”“降压茶”“益寿茶”等美称。随着人们自我保健意识的增强, 发掘利用苦丁茶的药用保健价值已成为广大科技工作者关注的课题。

近年来对苦丁茶的研究较多, 其种类以及提取部位的化学成分、药理作用、保健功能等也越来越明确^[3-4]。已有关于苦丁茶含片的质量标准研究, 但苦

作者简介: 胡顺莉(1988-), 女, 硕士研究生

通信作者: 吴虹, hongw@aliyun.com

Growth-Promoting Effects of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino and *Lycium barbarum* L. on *Lactobacillus*

JIANG Qi, FENG Lan, XIN Yi, LI Xin-li

(Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

[Abstract] **Objective** To study the growth-promoting effects of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino and *Lycium barbarum* L. on *Lactobacillus* and to provide a theoretical basis for the development of microecologies and proper use of traditional Chinese medicines. **Methods** Different concentrations of water extracts of *P. alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino and *L. barbarum* L. were added into the *in vitro* culture medium of *Lactobacillus delbrueckii*, and then viable count was performed after 48 h of culture at 37 °C. **Results** The growth of *L. delbrueckii* was significantly promoted by 2% and 5% water extracts of *P. alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino and 0.5% and 1% of water extracts of *L. barbarum* L. ($P<0.01$); 5% water extract of *P. alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino had the best growth-promoting effect, and it led to an about 1.6-fold increase in the number of bacteria as compared with that in the control group. However, the growth-promoting effects of the two medicines decreased significantly as their concentrations increased. **Conclusion** The growth of *Lactobacillus* can be promoted by certain concentrations of water extracts of *P. alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino and *L. barbarum* L.

[Key words] *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino; *Lycium barbarum* L.; *Lactobacillus*; Growth-promoting effect

丁茶药材水提物的质量标准研究暂无文献报道。本实验对苦丁茶药材水提物的质量标准进行初步研究,为苦丁茶药材的广泛应用提供实验依据。

1 仪器、试剂与试药

1.1 仪器 Agilent 1200 液相色谱仪(DAD 检测器);RE-52AA 旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵;KQ200-KDB 型高功率数控超声波清洗器:江苏省昆山市超声仪器有限公司;CP255D 型万分之一电子天平:德国 Sartorius 公司;芬兰百得移液枪;HB-RO/05 纯水机:杭州惠邦净水设备有限公司;Milli-Q 超纯水机:Reference 公司;ZK-8ZA 型真空干燥箱:上海实验仪器总厂。

1.2 试剂和试药 甲醇和磷酸均为色谱纯;水为纯化水、超纯水;山柰素对照品(批号 110861-220707)和槲皮素对照品(批号 100081-200406):均由中国药品生物制品检定所提供;冬青科大叶苦丁茶药材(批号 130101-130105):产地四川省。

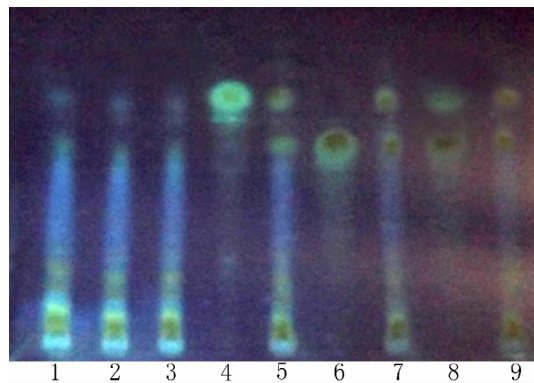
2 方法与结果

2.1 提取物制备方法 取 5 批苦丁茶(批号分别为 130101、130102、130103、130104、130105)适量,据课题组前期研究,各加 12 倍的水浸泡 20 min,加热煮沸后开始计时,60 min 后,冷却过滤。滤渣重复上述操作提取 2 次,合并煎液,蒸发得浸膏,置真空干燥箱中干燥得干浸膏,研细。苦丁茶药材水提物呈黄褐色,味微苦。

2.2 鉴别 取“2.1”项下研细后的苦丁茶药材提取物粉末 2 g,加入甲醇 40 ml,超声处理 20 min,放冷,过滤,滤液蒸干。残渣加正丁醇 15 ml,水浴温浸 15 min,并时时振摇。放冷,过滤,滤液蒸干。残渣加 2 ml 无水乙醇使溶解,作为供试品溶液。另取槲皮素和山柰素标准品适量,加无水乙醇制成 1 mg/ml 的混合对照溶液。再取苦丁茶对照药材水提浸膏 1 g,按供试品制备方法制备对照药材溶液。按薄层色谱法(2010 年版《中华人民共和国药典》^[5]一部附录 VI B)试验。分别吸取上述各种溶液各 10 μ l,

点于同一含 4% 醋酸钠的硅胶 G 板上,以乙酸乙酯-丙酮-甲醇-水(10:3:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,以 2% 三氯化铝乙醇溶液浸板显色,紫外灯(365 nm)下检视。

供试品色谱中,在对照品色谱和对照药材色谱相应位置上显现相同颜色的荧光斑点。见图 1。



注:1、3、5、7、9 为供试品溶液,2 为苦丁茶对照药材溶液,4 为山柰素标准溶液,6 为槲皮素标准溶液,8 为槲皮素和山柰素混合对照溶液。

图 1 苦丁茶药材提取物中槲皮素和山柰素薄层色谱图

2.3 重金属和砷盐检查

2.3.1 重金属检查:按照 2010 年版《中华人民共和国药典》一部附录 IX E 重金属检查法第二法进行检查。实验结果符合药典规定。

2.3.2 砷盐检查:按照 2010 年版《中华人民共和国药典》一部附录 IX F 砷盐检查法第一法进行检查。实验结果符合药典规定。

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件及系统适用性实验:色谱柱:依利特 Hpersil ODS2(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m);流动相:甲醇-0.5%磷酸(53:47);检测波长:360 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:40 $^{\circ}$ C;理论塔板数按槲皮素峰计算应不低于 8 000。在此色谱条件下,槲皮素的保留时间约为 7 min;山柰素的保留时间约为 10 min,结果见图 2。

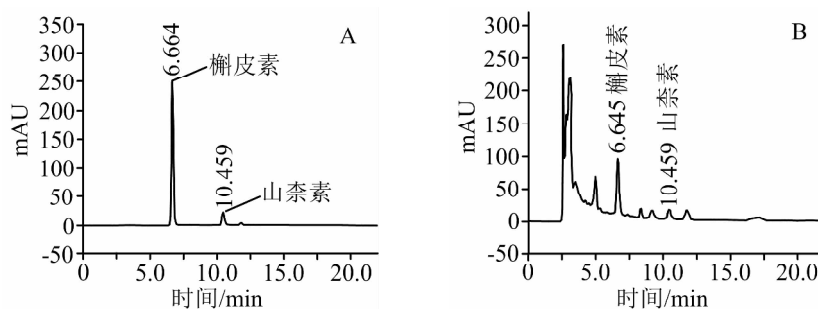


图 2 槲皮素和山柰素对照品(A)和苦丁药材水提物供试品(B)高效液相色谱图

2.4.2 溶液的制备

1) 槲皮素、山柰素对照品溶液的制备:精密称取槲皮素对照品和山柰素对照品适量,加甲醇制得浓度为 0.040 mg/ml 的槲皮素对照液和浓度为 0.002 mg/ml 的山柰素对照液。

2) 供试品溶液的制备:精密称取“2.1”项下苦丁茶药材水提物粉末 2.0 g,至 100 ml 锥形瓶中,精密加入 25 ml 甲醇,称定质量。超声 30 min,取出放冷后,补足减失质量。过滤,弃去初滤液,精密量取续滤液 10 ml 至 25 ml 量瓶中,精密加入 25% 盐酸溶液 5 ml,用色谱甲醇定容至刻度,摇匀。精密移取 10 ml,至磨口瓶中,称定质量,回流 1 h,冷却后补足减失质量,取适量过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

2.4.3 线性关系考察:分别精密吸取“2.4.2”第一项下配制的槲皮素对照液和山柰素对照液各 50、100、200、400、800、1 600 μl 置同一 10 ml 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,按上述色谱条件,进样 20 μl,测定槲皮素及山柰素的峰面积。以浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线。槲皮素回归方程为: $y_1 = 59\,576\,x_1 + 101.33$ ($r_1 = 0.999\,9$);山柰素回归方程为: $y_2 = 73\,466\,x_2 - 1.766\,8$ ($r_2 = 0.999\,8$)。结果表明,槲皮素的进样量在 0.1~3.2 μg 范围内,山柰素的进样量在 0.01~0.32 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.4 精密度实验:精密吸取上述混合对照品溶液(槲皮素 0.04 mg/ml;山柰素 0.002 mg/ml)20 μl,连续进样 6 次,结果槲皮素峰面积的 RSD = 0.06%,山柰素峰面积的 RSD = 0.88%。

2.4.5 稳定性试验:精密吸取新制供试品溶液 20 μl,分别在 0、2、4、6、8、10、12、18 h 测定。测得槲皮素和山柰素含量的 RSD 分别为 0.36% 和 1.45% ($n = 6$),结果表明在 18 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.4.6 重复性实验:取同一批苦丁茶药材水提物样品 6 份,每份 2 g,分别按“2.4.2”项下第二项方法制备供试品溶液,进样测定含量。测得槲皮素和山柰素含量的 RSD 分别为 1.95% 和 1.77% ($n = 6$),表明本方法的重复性良好。

2.4.7 加样回收率实验:精密称取 9 份已知含量的同一批苦丁茶药材提取物样品细粉适量(约相当于槲皮素 0.123 5 mg,山柰素 0.022 mg),分别精密加入一定量的槲皮素和山柰素对照品,按照“2.4.2”项下第二项方法“精密加入 25 ml 甲醇”操作,制备供试液,滤过(0.45 μm),弃去初滤液,取续滤液在上述色谱条

件下进样 20 μl,按样品含量测定方法测定,计算平均回收率,结果见表 1 和表 2。槲皮素的平均回收率为 102.34%,RSD = 3.26% ($n = 9$);山柰素的平均回收率为 101.24%,RSD = 3.15% ($n = 9$)。

表 1 槲皮素加样回收率实验

样品号	称样量/ g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均 回收率/%	RSD/ %
1	0.601 3	0.123 7	0.105 7	0.241 7	105.36		
2	0.600 7	0.123 6	0.116 8	0.231 6	96.34		
3	0.600 9	0.123 7	0.138 6	0.265 7	101.30		
4	0.600 7	0.123 6	0.140 0	0.271 1	102.85		
5	0.601 2	0.123 7	0.108 8	0.238 7	102.67	102.34	3.26
6	0.600 2	0.123 5	0.166 9	0.293 5	101.07		
7	0.601 4	0.123 8	0.168 0	0.305 7	104.76		
8	0.600 8	0.123 6	0.166 0	0.294 6	101.73		
9	0.601 4	0.123 8	0.134 1	0.270 8	105.00		

表 2 山柰素加样回收率实验

样品号	称样量/ g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均 回收率/%	RSD/ %
1	0.601 2	0.022 1	0.018 0	0.042 0	104.74		
2	0.599 3	0.021 6	0.018 0	0.039 6	100.00		
3	0.600 7	0.022 0	0.018 0	0.039 7	99.30		
4	0.600 1	0.022 0	0.022 0	0.046 1	104.77		
5	0.602 7	0.022 4	0.022 0	0.043 4	97.75	101.24	3.15
6	0.598 5	0.021 4	0.022 0	0.045 3	104.38		
7	0.600 4	0.022 0	0.026 2	0.047 3	98.13		
8	0.601 2	0.022 1	0.026 2	0.047 3	97.93		
9	0.600 3	0.022 0	0.026 2	0.050 2	104.15		

2.4.8 样品含量测定:精密称取 5 份苦丁茶药材提取物按“2.4.2”项下第二项方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下,分别精密吸取“2.4.2”项下对照品溶液及上述供试品溶液各 20 μl 进样,测定各自峰面积,按外标峰面积法计算苦丁茶药材中槲皮素及山柰素的含量。见表 3。

表 3 苦丁茶药材水提物样品中槲皮素、山柰素含量

样品号	槲皮素 含量/ (mg/g)	槲皮素 平均 含量/%	RSD/ %	山柰素 含量/ (mg/g)	山柰素 平均 含量/%	RSD/ %
1	0.203 5			0.035 7		
2	0.185 2			0.035 0		
3	0.213 4	0.207 9	6.81	0.037 8	0.037 3	4.97
4	0.217 6			0.038 6		
5	0.219 9			0.039 3		

3 讨论

3.1 指标性成分的选择 有文献报道,苦丁茶中黄酮类(槲皮素、山柰素等)化合物含量丰富^[6-7],因此本实验选择上述主要成分作为鉴别和含量测定的指标性成分。

3.2 薄层色谱法鉴别时的条件选择 薄层板的选择:对苦丁茶药材水提物中槲皮素和山柰素进行薄层色谱法鉴别时,起初用的是普通的硅胶 G 板,结

果发现槲皮素和山柰素两种成分的斑点分离度不佳,考虑到两者极性差别小,利用两者酸碱性的差异(化学结构式相差一个酚羟基),将硅胶板用4% NaAc 改性,然后进行薄层鉴别分析,所得斑点分离度较好。

3.3 供试品制备方法的选择 制备含量测定用供试品溶液时,曾用加热回流1 h 和超声提取1 h(200 W, 40 kHz)两种方式,进样所得色谱图显示:超声提取1 h 检测槲皮素和山柰素含量不如加热回流1 h 的含量大,最终选用加热回流1 h 的方式制备供试品溶液。

3.4 高效液相色谱法条件选择 参照《中华人民共和国药典》银杏叶片中总黄酮醇苷的测定方法规定的色谱条件对样品中成分分离进行考察。发现以甲醇-0.1%磷酸(50:50)为流动相进行洗脱时,槲皮素的保留时间为10 min。将流动相调整为甲醇-0.5%磷酸(53:47),并将柱温升高至40℃后,槲皮素的保留时间提前为7 min,样品中各组分获得较好的

分离。

参考文献:

- [1] 庄辉发. 大叶冬青苦丁茶的研究现状与发展前景[J]. 热带学, 2009, 29(8): 51-54.
- [2] 刘韶, 秦勇, 杜方麓. 苦丁茶化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 834-836.
- [3] 任廷远, 安玉红, 王华. 苦丁茶的研究进展[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2008(5): 22-24.
- [4] 王新, 陆慧宁, 林少琨. 苦丁茶冬青叶化学成分及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 366-370.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [6] 黄雪梅, 蒙大平. 苦丁茶的研究进展及开发利用[J]. 广西医学, 2008, 30(7): 1022-1025.
- [7] 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]. 中医药学报, 2007, 35(2): 45-46.

(收稿日期: 2013-10-07)

Quality Analysis of Kudingcha Aqueous Extract

HU Shun-li¹, YU Zhi², WU Hong¹, LI Hui¹, CHEN Jin-yun¹, CHEN Jian¹, DAI Miao-miao¹, WANG Wei¹, SUN Liang-liang¹

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine & Anhui Key Laboratory of Chinese Medicine Research and Development, Anhui Hefei 230031, China; 2. Department of Pharmacy, Anhui Maternal and Child Health Hospital, Anhui Hefei 230001, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the quality of Kudingcha aqueous extract. **Methods** With quercetin and kaempferol as reference substances, thin-layer chromatography (TLC) was adopted for the identification of flavonoids in Kudingcha. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to determine the content of quercetin and kaempferol in Kudingcha. **Results** The TLC showed that the test samples had the dots of the same color at the corresponding positions as the reference samples. The sample amounts of quercetin and kaempferol showed a good linear relationship with peak areas within 0.1-3.2 μg and 0.01-0.32 μg (quercetin $r_1=0.999\ 9$; kaempferol $r_2=0.999\ 8$). The average recovery rates of quercetin and kaempferol were 102.34% and 101.24%, with relative standard deviations of 3.26% and 3.15% ($n=9$). **Conclusion** The TLC and RP-HPLC methods are simple, accurate, and repeatable and can be used for the quality analysis of Kudingcha aqueous extract.

[Key words] Kudingcha; quality analysis; thin-layer chromatography; reversed-phase high-performance liquid chromatography