

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.18.002

木姜叶柯中根皮苷与三叶苷含量测定研究*

张亚洲¹, 王涛¹, 朱晶晶^{1,2}, 刘学^{1,2}, 周福才³, 王强^{2△}

(1. 贵州理工学院食品药品制造工程学院, 贵州 贵阳 550003; 2. 贵阳中医学院附属第二医院, 贵州 贵阳 550001; 3. 广西普亮健生物技术有限公司, 广西 南宁 530001)

摘要:目的 测定 15 份木姜叶柯样品中根皮苷与三叶苷的含量并比较其差异。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法, 色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长为 280 nm, 流动相为乙腈-水(0.1% 的磷酸), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min。结果 根皮苷进样量在 0.250~5.000 μg 范围内与峰面积相关性较好, 回归方程为 $C=0.000\ 603A-0.021$, $r=0.999\ 8$ ($n=7$); 三叶苷进样量在 0.575~5.750 μg 范围内与峰面积相关性较好, 回归方程为 $C=0.000\ 470A-0.041$, $r=0.999\ 6$ ($n=7$)。15 份木姜叶柯样品中根皮苷含量为 0.62%~9.04%, 三叶苷含量为 0.30%~22.79%。结论 该方法简便, 结果准确可靠, 可用于测定木姜叶柯中根皮苷与三叶苷含量。

关键词: 木姜叶柯; 根皮苷; 三叶苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)18-0005-04

Content Determination of Phlorizin and Trilobatin in *Lithocarpus litseifolius* by HPLC

Zhang Yazhou¹, Wang Tao¹, Zhu Jingjing^{1,2}, Liu Xue^{1,2}, Zhou Fucan³, Wang Qiang²

(1. College of Food and Pharmaceutical Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang, Guizhou, China 550003; 2. The Second Affiliated Hospital of Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou, China 550001; 3. Guangxi Ganliangjian Biotechnology Co., Ltd., Nanning, Guangxi, China 530001)

Abstract: Objective To determine the content of phlorizin and trilobatin in 15 samples of *Lithocarpus litseifolius*, and to compare their differences. **Methods** HPLC method was adopted, the chromatographic column was Phenomenex Gemini C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the detection wavelength was 280 nm, the mobile phase was acetonitrile-water (0.1% phosphoric acid), gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** The concentration of phlorizin in the range of 0.250–5.000 μg showed a good correlation, and the regression equation was $C=0.000\ 603A-0.021$, $r=0.999\ 8$ ($n=7$). The concentration of trilobatin in the range of 0.575–5.750 μg showed a good correlation, and the regression equation was $C=0.000\ 470A-0.041$, $r=0.999\ 6$ ($n=7$). The content of phlorizin in 15 samples was in the range of 0.62%–9.04%, and trilobatin was in the range of 0.30%–22.79%. **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be used for the content determination of phlorizin and trilobatin in *Lithocarpus litseifolius*.

Key words: *Lithocarpus litseifolius*; phlorizin; trilobatin; HPLC; content determination

木姜叶柯为壳斗科柯属植物 *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun., 属常绿乔木, 别名甜茶(通称)、甜叶子树(云南)、胖桐(广东)、甜味菜、大叶稠子、甘茶(贵州)、多穗石柯等, 以野生状态分布于我国长江以南各省区海拔 500~2 500 m 的低山密林中, 印度、泰国也有分布^[1]。现代研究表明, 木姜叶柯中的黄酮类成分是其化学成分, 主要有根皮苷与三叶苷, 属二氢查尔酮类成分^[2-4]。木姜叶柯(甜茶)使用广泛, 于 2017 年 6 月通过了国家卫生计生委的新资源食品评审, 其具有降血糖、降血压、调血脂及抗过敏、抗炎等作用, 尤其所含根皮苷防治糖尿病及其并发症有独特效果^[5-8]。本研究中对收集的主要产区的木姜叶柯各种市售甜茶成品及原植物中根皮苷与三叶苷含量进行测定, 以了解市场上产品及原植物中根皮苷及三叶苷的含量, 为木姜叶柯产品

开发提供借鉴。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 Series 型高效液相色谱仪(包括 1260 DAD 型检测器, 美国安捷伦科技有限公司); BSA124S 型分析天平(赛多利斯科学仪器 <北京>有限公司); KQ-300DB 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司, 功率为 250 W, 频率为 40 kHz)。

1.2 试剂

乙腈, 甲醇(均为 HPLC 级, 成都科龙试剂有限公司); 磷酸(分析纯, 北京化工厂); 水为娃哈哈纯净水; 根皮苷对照品(含量 > 99%, 批号为 20161012), 三叶苷对照品(含量 > 98%, 批号为 20160825), 均购于成都德思特生物技术公司。木姜叶柯样品为广西

*基金项目: 国家自然科学基金[81760857]; 贵州理工学院博士启动基金[XJGC20141106]。

第一作者: 张亚洲, 男, 博士研究生, 副教授, 主要研究方向为食品开发, (电话)0851-88210126(电子信箱)670566181@qq.com。

△通信作者: 王强, 女, 博士研究生, 副教授, 主要研究方向为神经性疾病的中医治疗, (电话)0851-85283157(电子信箱)liukangjing2006@163.com。

昔亮健生物技术公司供应或通过购买获得,样品均经贵阳中医学院董立莎教授鉴定为木姜叶柯,详见表1。

表1 收集的木姜叶柯原植物部位及茶的样品信息

编号	产地	备注	采集人	采集时间
1	广西南宁南阳乡	枝干	赵东进	2017年7月
2	湖南省隆回县金石桥镇长龙村	茶	张亚洲	2017年8月
3	广西南宁南阳乡	老叶(2)	赵东进	2016年10月
4	广东省中山市沙溪镇	茶	张亚洲	2017年7月
5	广西南宁南阳乡	红茶1	赵东进	2017年7月
6	广西南宁南阳乡	老叶(1)	赵东进	2017年8月
7	江西省萍江市安源区凤凰街	茶	张亚洲	2017年7月
8	湖南省洞口县长塘乡	茶	张亚洲	2017年7月
9	湖南省芷江县大树坳乡	茶	张亚洲	2017年7月
10	重庆市梁平区龙胜乡	茶	张亚洲	2017年8月
11	广西南宁南阳乡	红茶2	赵东升	2017年8月
12	广西南宁南阳乡	嫩叶1	谢仁康	2017年8月
13	广西南宁南阳乡	嫩叶2	谢仁康	2017年10月
14	广西南宁南阳乡	绿茶1	谢仁康	2017年10月
15	广西南宁南阳乡	红茶3	谢仁康	2017年10月

2 方法与结果^[9-15]

2.1 药材水分测定

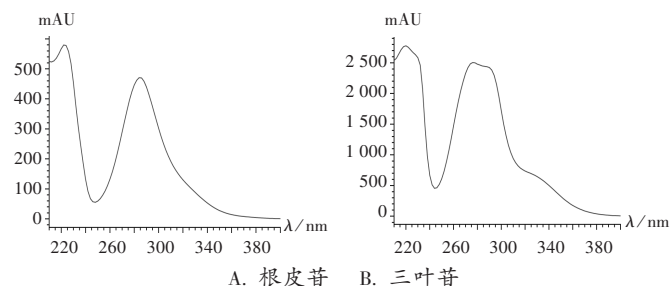
参照2015年版《中国药典(四部)》附录0832(干燥失重测定法第二法)测定药材水分。结果见表2。

表2 木姜叶柯药材水分测定结果($n=3$)

药材编号	水分(%)	药材编号	水分(%)	药材编号	水分(%)
1	9.67	6	8.86	11	10.04
2	7.14	7	8.31	12	10.22
3	9.44	8	7.75	13	8.98
4	7.08	9	6.13	14	9.37
5	6.80	10	5.17	15	8.02

2.2 检测波长选择

紫外-可见吸收光谱(UV)图显示根皮昔在285 nm波长处有最大吸收,而三叶昔在275 nm波长处有最大吸收(见图1),综合考虑,确定检测波长为280 nm。



2.3 样品溶液制备与超声时间选择

称取以上木姜叶柯样品0.2 g,精密称定并平行称取3份,分别置100 mL容量瓶中,用甲醇超声10,20,30 min使溶解,放冷后用甲醇稀释至刻度,摇匀。用

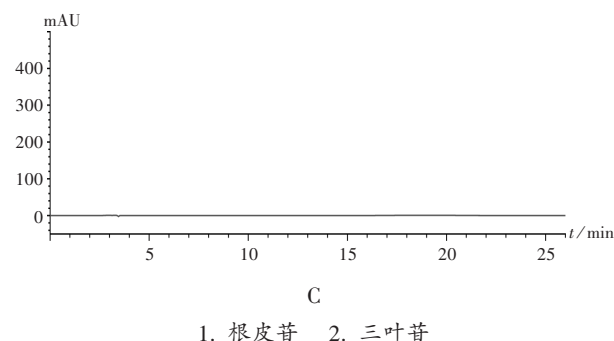
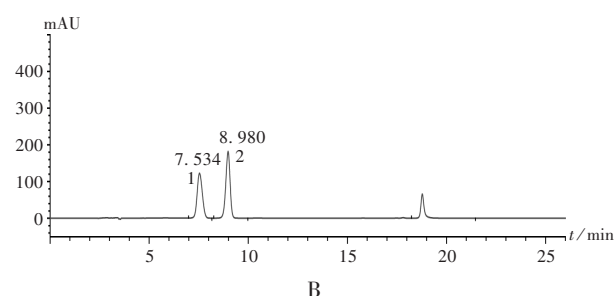
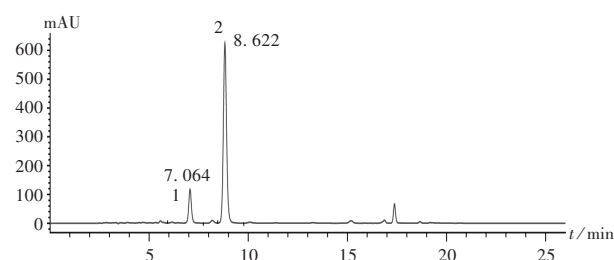
0.45 μm 微孔滤膜滤过,取滤液20 μL 进样。结果样品超声20 min内测定效果良好。

2.4 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ,美国菲罗门公司);流动相:0.1% 磷酸水溶液(A) - 乙腈(B),梯度洗脱(见表3);流速:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;进样量20 μL 。在此条件下,根皮昔、三叶昔理论板数均大于4 000,分离度均大于1.5,色谱条件符合相关要求(见图2)。

表3 流动相梯度洗脱表(%)

时间(min)	A	B
0	72	28
10	72	28
15	60	40
20	60	40
26	72	28



1. 根皮昔 2. 三叶昔
A. 供试品溶液 B. 对照品溶液 C. 甲醇溶剂
图2 高效液相色谱图

2.5 方法学考察

线性关系考察:称取根皮昔对照品25.0 mg,精密称定,置20 mL容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得A溶液;精密称取三叶昔对照品23.0 mg置

20 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 B 溶液。分别精密吸取 A 溶液 4.00,3.00,2.00,1.00,0.50,0.20,0.10 mL,B 溶液 5.00,4.00,3.00,2.00,1.00,0.50,0.25 mL;置 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列质量浓度溶液,进样,记录色谱图。结果见表 4。

表 4 线性关系考察结果

组分	线性回归方程	<i>r</i>	<i>n</i>	进样量线性范围(μg)
根皮苷	$C=0.000603A-0.021$	0.999 8	7	0.250~5.000
三叶苷	$C=0.000470A-0.041$	0.999 6	7	0.575~5.750

注:C为进样量,A为峰面积。

精密度试验:取 2.5 项下对照品溶液,摇匀,连续进样 6 次,每次 20 μL,计算峰面积。结果根皮苷、三叶苷峰面积平均值分别为 2 968.5 和 10 383.9, *RSD* 分别为 0.47% 和 0.37% (*n* = 6),表明仪器精密度较好。

稳定性试验:取 2.3 项下方法制备的同一样品溶

液,摇匀后,用微孔滤膜滤过,分别于 0,2,4,6 h 时进样 20 μL。平行操作 2 次,测定峰面积,计算含量。结果根皮苷的相对百分含量分别为 100.00%,100.18%,99.96%,100.24%,三叶苷的相对百分含量分别为 100.00%,99.84%,99.93%,100.10%,表明样品溶液在 6 h 内测定稳定性良好。

重复性试验:称取同一份样品(编号 12)0.2 g(称样量分别为 0.200 3,0.201 2,0.200 2 g),精密称定并平行称取 3 份,分别用 2.3 项下样品溶液制备方法配制,进样 20 μL。结果根皮苷和三叶苷的平均峰面积分别为 14 856.4 和 51 200.5, *RSD* 分别为 0.68% 和 0.18% (*n* = 6),表明方法的重复性良好。

加样回收试验:称取已知含量样品(编号 12)0.1 g,精密称定并平行称取 9 份,分别平行加入已知含有根皮苷(1.996 g/L)、三叶苷(6.034 g/L)的高、中、低浓度(125%,100%,75%)对照品溶液各 3 份,按样品含量测定方法进样测定,记录色谱图。结果见表 5。

表 5 加样回收试验结果(*n* = 9)

取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		<i>RSD</i> (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.100 9	0.100 9	8.906	22.995	6.786	16.895	15.763	40.120	101.04	101.36				
0.101 2	0.101 2	8.933	23.063	6.786	16.895	15.776	40.203	100.84	101.45				
0.100 3	0.100 3	8.853	22.858	6.786	16.895	15.851	39.959	103.12	101.22				
0.100 2	0.100 2	8.845	22.836	8.982	22.929	17.949	45.937	101.36	100.75				
0.101 6	0.101 6	8.968	23.155	8.982	22.929	18.067	46.431	101.30	101.51	101.38	101.22	0.68	0.27
0.100 8	0.100 8	8.898	22.972	8.982	22.929	17.952	46.214	100.81	101.36				
0.102 1	0.102 1	9.012	23.269	11.178	28.963	20.343	52.452	101.37	100.76				
0.101 0	0.101 0	8.915	23.018	11.178	28.963	20.225	52.361	101.18	101.31				
0.100 2	0.100 2	8.845	22.836	11.178	28.963	20.183	52.163	101.43	101.26				

注:A为根皮苷,B为三叶苷。

2.6 样品含量测定

按 2.3 项下样品处理方法处理样品,依法测定含量。结果见表 6。

表 6 药材样品中根皮苷、三叶苷含量测定结果(*n* = 2)

编号	根皮苷 (%)	三叶苷 (%)	合计 (%)	编号	根皮苷 (%)	三叶苷 (%)	合计 (%)
1	4.63	0.30	4.93	9	0.66	22.49	23.15
2	0.87	19.07	19.94	10	0.98	18.62	19.60
3	5.17	0.55	5.72	11	3.19	23.39	26.58
4	5.96	14.08	20.04	12	8.83	22.79	31.62
5	1.85	14.09	15.94	13	1.62	7.56	9.18
6	9.04	1.48	10.53	14	3.33	19.18	22.51
7	4.87	14.99	19.87	15	3.01	11.34	14.35
8	0.62	24.35	24.97				

3 讨论

木姜叶柯在民间当茶叶使用,其成分至今较为明确的有根皮素、根皮苷和三叶苷等,有降血糖、降血压、调

血脂及抗过敏、抗炎等作用。

曾探索在同一色谱条件下同时对根皮素、根皮苷和三叶苷进行分析,结果发现,大部分样品中根皮素含量太低,导致无法同时与根皮苷和三叶苷进行测定。对部分市场上及自采的木姜叶柯样品进行检测,发现收集到的不同产地的 15 批样品根皮苷与三叶苷的含量存在一定差异。老叶与枝条中成分以根皮苷为主,最高含量达 9.04%,茶叶制品与鲜叶中成分以三叶苷为主,最高含量达 24.35%。另就根皮苷与三叶苷总量而言,茶叶制品与鲜叶远大于老叶和枝条,其中以标示产地为广西南宁南乡木姜叶柯种植地区的质量较优,根皮苷与三叶苷总的含量相对较高,达 31.62%,分析原因在于为鲜叶加工而成,成分含量较高,且均以三叶苷为主。

因加工方法的不同,木姜叶柯有绿茶及红茶 2 个品系,但从成分上来讲,制茶加工过程并未改变鲜叶中三叶苷含量多数大于根皮苷的情况,故建议木姜叶柯茶制品应在 4 月至 9 月用其鲜叶加工,所得品次较高。