

广西苦丁茶嫩叶和老叶中槲皮素和山柰素的含量测定

黄雪梅, 蒙大平, 荣延平 (广西壮族自治区人民医院药剂科, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 比较广西苦丁茶嫩叶与老叶中槲皮素和山柰素含量的差异。方法 用甲醇、乙醇、水分别提取苦丁茶的嫩叶与老叶,用高效液相色谱法测定提取液中槲皮素和山柰素的含量。结果 苦丁茶老叶中槲皮素和山柰素的含量为 $500 \sim 750 \mu\text{g/g}$ 和 $500 \sim 1000 \mu\text{g/g}$,嫩叶中槲皮素和山柰素的含量为 $1100 \sim 1800 \mu\text{g/g}$ 和 $80 \sim 160 \mu\text{g/g}$ 。结论 不同部位的苦丁茶叶中槲皮素和山柰素的含量存在着一定差别,在苦丁茶老叶的甲醇提取中两者含量较高,广西苦丁茶老叶可利用价值较高。

关键词: 苦丁茶;槲皮素;山柰素

中图分类号: R931.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)05-0383-03

Determination of quercetin and kaempferol in the burgeon leaves and old leaves of Guangxi Kudingcha

HUANG Xue-mei, MENG Da-ping, RONG Yan-ping (The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The contents of quercetin and kaempferol in the burgeon leaves or old leaves of Guangxi Kudingcha were compared. **METHODS** The burgeon and old leaves of Guangxi Kudingcha were extracted with methanol, ethanol or water. Contents of quercetin and kaempferol from different extracted solution were determined by HPLC. **RESULTS** The contents of quercetin and kaempferol were $500 \sim 750 \mu\text{g/g}$ and $500 \sim 1000 \mu\text{g/g}$ in the burgeon leaves; While they were $1100 \sim 1800 \mu\text{g/g}$ and $80 \sim 160 \mu\text{g/g}$ in old leaves. **CONCLUSIONS** The contents of the components in the different leaves have some difference. The contents of quercetin and kaempferol in old leaves extracted with methanol are higher more. The old leaves of Guangxi Kudingcha will be more valuable in use.

KEY WORDS: Kudingcha; quercetin; kaempferol

广西苦丁茶 *Ilex kudingcha* C. J. Tseng 为冬青科冬青属植物^[1]。苦丁茶不但是一种中药,性凉,味甘苦,具有清热解毒、消炎、调节肠胃等功效,而且是民间一种较为高级的茶品。广西苦丁茶产业已具有规模,天等、大新等山区大面积种植达 10 万亩,年产量茶青(嫩叶)近 3 万吨,老叶约 2 万吨。有文献报道^[2,3]苦丁茶中含有丰富的黄酮类化合物,熊果酸及多种皂苷,其中有些黄酮苷元(槲皮素、山柰素、异鼠李素等)含量与银杏叶相当^[3]。为了对广西苦丁茶老叶进行废物开发利用,提取具有明显生理活性的槲皮素及山柰素等黄酮类成分,本实验考察了不同提取方法时苦丁茶嫩叶和老叶中槲皮素及山柰素的含量差异。

1 样品来源

样品采摘于广西天等县茶场,经鉴定为冬青科植物苦丁茶冬青 (*Ilex kudingcha* C. J. Tseng) 的叶。将苦丁茶叶分为嫩叶(一芽两叶)和老叶(未脱落的老茶叶),将采摘的苦丁茶叶分别用自来水洗净,风干,于 80°C 恒温干燥 2h 备用。

2 仪器与材料

Waters 液相色谱仪 (Waters 600 泵, 7725 i 六通阀, 996 二极管阵列检测器, Millennium 32 数据处理系统)。METTLER

AE240 型电子天平 (瑞士)。槲皮素及山柰素对照品 (中国药品生物制品检定所,批号分别为 0081-9304, 0861-200002); 甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

3 方法与结果

3.1 样品处理^[4]

3.1.1 用甲醇提取 将苦丁茶嫩叶和老叶分别剪碎后,称取样品 20g,加甲醇 200mL,水浴回流 1.5h,过滤,残渣再加甲醇 100mL,回流 1h;合并滤液,用甲醇定容至 250mL 量瓶中,得苦丁茶甲醇提取液。

3.1.2 用乙醇提取 称取已剪碎的苦丁茶叶 20g,加体积分数为 70%乙醇 200mL,水浴回流 1.5h,过滤,残渣再加体积分数为 70%乙醇 100mL,回流 1h;合并滤液,用体积分数为 70%乙醇定容至 250mL 量瓶中,得苦丁茶乙醇提取液。

3.2.3 用水提取 称取已剪碎的苦丁茶叶 20g,加 200mL 的水煮提取 1.5h,过滤,残渣再加水 100mL 煮 1h;合并滤液浓缩至 50mL,再加体积分数为 95%乙醇 140mL 搅匀使沉淀,静置 24h,抽滤,滤渣用体积分数为 80%乙醇洗涤,滤液合并置于 250mL 量瓶中,用体积分数为 80%乙醇定容至刻度,摇匀,即得苦丁茶水提取液。

基金项目:广西科学研究与技术开发计划项目(编号:桂科攻 0330001-1C)

作者简介:黄雪梅(1968-),女,广西北海人,副主任药师,理学学士,主要从事药品质量检验和临床药学工作。电话 0771-2186377(0), 13978807926, E-mail: hxmeil009@yahoo.com.cn.

3.2 提取液中槲皮素和山柰素的含量测定

3.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters 公司 Nova-Pak C₁₈ 柱 (3.9mm × 300mm, 4μm); 流动相为甲醇-0.4% 磷酸溶液 (50:50); 流速是 0.7mL · min⁻¹; 检测波长为 360nm; 柱温为 40°C; 理论塔板数按槲皮素峰计算约为 3000。

3.2.2 标准曲线制备 精密称取槲皮素对照品 8.12mg 和山柰素对照品 8.34mg 分别置 50mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度。2 种溶液分别精密吸取 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0mL 置 10mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件分别进样 20μL, 测定槲皮素及山柰素峰面积。以进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程: 槲皮素 $Y = 5392003X - 67439$ ($r = 0.99989$); 山柰素 $Y = 5304855X + 478$ ($r = 0.99994$)。

结果表明, 槲皮素的进样量在 0.03248~1.624μg 范围内, 山柰素的进样量在 0.03336~1.668μg 范围内, 峰面积与进样量呈良好的线性关系。槲皮素峰的 T_R 约为 7min, 山柰素峰的 T_R 约为 10min, 色谱图见图 1, 图 2。

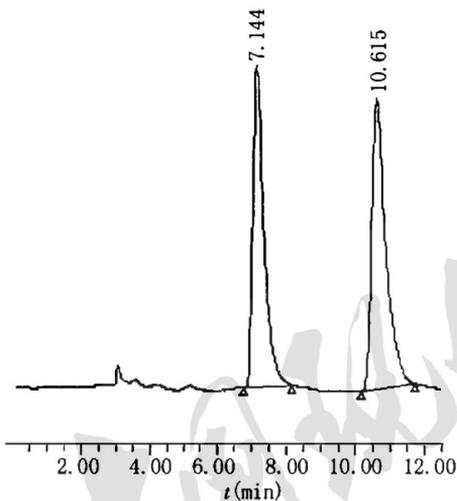


图 1 槲皮素和山柰素对照品色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of quertetin and kaempferol reference substance

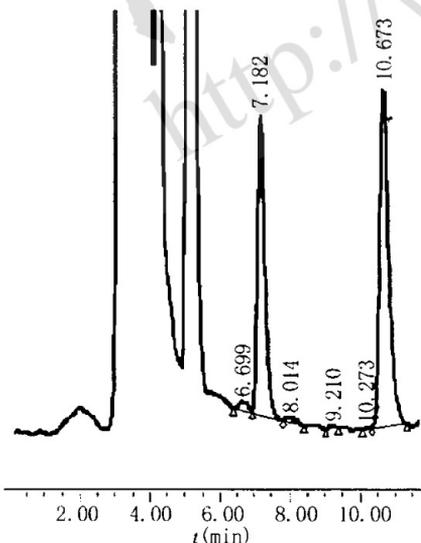


图 2 样品色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of sample

3.2.3 样品的含量测定 精密量取 20mL 苦丁茶提取液, 水浴挥干, 加 20mL 甲醇溶解残渣 (甲醇提取液则免此步骤), 加 25% HCL 溶液 5mL, 水解 0.5h 取出后迅速冷至室温, 转移并用甲醇定容至 50mL 量瓶中, 摇匀, 用 0.45μm 微孔滤膜过滤, 进样 10μL, 测定苦丁茶提取液中槲皮素和山柰素的含量。结果见表 1。

表 1 广西苦丁茶叶中槲皮素、山柰素含量的测定结果 (μg/g)

Tab 1 Results of content determination in leaves of Guangxi Kudingcha ($n = 5$)

| 样品 | 乙醇提取液 | | 甲醇提取液 | | 水提取液 | | |
|----|--------|------|-------|------|------|------|-----|
| | 槲皮素 | 山柰素 | 槲皮素 | 山柰素 | 槲皮素 | 山柰素 | |
| 老叶 | 040317 | 530 | 907 | 631 | 988 | 485 | 526 |
| | 040412 | 681 | 854 | 741 | 1083 | 503 | 538 |
| | 040413 | 588 | 746 | 703 | 950 | 496 | 515 |
| | 040414 | 566 | 729 | 649 | 940 | 499 | 511 |
| 嫩叶 | 040315 | 1629 | 136 | 1851 | 135 | 1324 | 106 |
| | 040412 | 1392 | 116 | 1698 | 147 | 1142 | 92 |
| | 040414 | 1365 | 81 | 1662 | 96 | 1106 | 87 |
| | 040415 | 1240 | 101 | 1434 | 166 | 1085 | 87 |

3.2.4 加样回收率试验

精密吸取已知含量的苦丁茶老叶甲醇提取液 (批号 040412) 15.0mL 共 12 份, 分为 2 组, 分别加入 5.0mL 的槲皮素和山柰素对照品溶液, 按“3.2.3”项下处理后, 各进样 10μL, 计算槲皮素和山柰素平均回收率分别为 99.66% (RSD = 2.36%) 和 99.31% (RSD = 1.90%)。结果见表 2 表 3。

表 2 槲皮素的回收率试验考察结果 ($n = 6$)

Tab 2 Results of recovery test of quertetin ($n = 6$)

| 编号 | 样品量 (μg) | 加入量 (μg) | 实测量 (μg) | 回收率 (%) | 平均值 (%) | RSD (%) |
|----|----------|----------|----------|---------|---------|---------|
| 1 | 888.8 | 812 | 1712.8 | 101.5% | | |
| 2 | 888.8 | 812 | 1701.1 | 100.0% | | |
| 3 | 888.8 | 812 | 1689.3 | 98.6% | 99.7% | 2.4% |
| 4 | 888.8 | 812 | 1676.3 | 97.0% | | |
| 5 | 888.8 | 812 | 1682.5 | 97.7% | | |
| 6 | 888.8 | 812 | 1726.4 | 103.2% | | |

表 3 山柰素的回收率试验考察结果 ($n = 6$)

Tab 3 Results of recovery test of kaempferol ($n = 6$)

| 编号 | 样品量 (μg) | 加入量 (μg) | 实测量 (μg) | 回收率 (%) | 平均值 (%) | RSD (%) |
|----|----------|----------|----------|---------|---------|---------|
| 1 | 1300.1 | 834 | 2128.5 | 99.3% | | |
| 2 | 1300.1 | 834 | 2136.4 | 100.3% | | |
| 3 | 1300.1 | 834 | 2109.2 | 97.0% | 99.3% | 1.9% |
| 4 | 1300.1 | 834 | 2120.2 | 98.3% | | |
| 5 | 1300.1 | 834 | 2154.6 | 102.5% | | |
| 6 | 1300.1 | 834 | 2120.7 | 98.4% | | |

3.2.5 重复性试验 精密吸取苦丁茶老叶的甲醇提取液 20.0mL (批号 040412) 共 5 份, 依样品测定项下方法测定, 计算含量。结果表明方法的重现性良好, 槲皮素的 RSD 为

1.67% ($n=5$), 山柰素的 RSD 为 2.12% ($n=5$)。

3.2.6 精密度和稳定性试验 取槲皮素对照品溶液 (浓度为 $32.48\mu\text{g/mL}$) 和山柰素对照品溶液 (浓度为 $33.36\mu\text{g/mL}$) 分别连续进样 5 次, 每次 $10\mu\text{L}$, 结果槲皮素峰面积的 RSD 为 1.47%, 山柰素峰面积的 RSD 为 1.28%。

新配制样品溶液 1 份置冰箱冷藏, 每隔 1h 精密吸取 $10\mu\text{L}$ 进样测定 1 次, 共测定 6 次, 结果槲皮素和山柰素的日内 RSD 分别为 1.82% 和 2.08%, 说明在 5h 内样品溶液稳定性良好。

4 讨论

从测试结果可知, 广西苦丁茶老叶中槲皮素含量为 $500\sim 750\mu\text{g/g}$, 较嫩叶中含量 ($1100\sim 1800\mu\text{g/g}$) 要低; 山柰素含量为 $500\sim 1000\mu\text{g/g}$, 较嫩叶中含量 ($80\sim 160\mu\text{g/g}$) 要高。不同部位的苦丁茶叶中槲皮素和山柰素含量存在着一定差别; 就槲皮素和山柰素的含量来分析, 苦丁茶老叶的可利用价值较高, 而苦丁茶嫩叶则制成上乘的茶叶, 通过综合开发使山区茶叶获得良好的经济效益。

就苦丁茶老叶的提取而言, 用甲醇作溶剂提取效果最好, 70%乙醇次之, 水的提取效果较差。同时从提取液的颜色及提取过程观察, 甲醇与 70%乙醇的提取液呈草绿色, 澄

清, 容易过滤; 而水的提取液呈浅棕黄色且过滤较难, 浓缩液用乙醇稀释时出现大量沉淀。

本实验仿照中国药典里银杏提取物中总黄酮醇苷的测定方法^[5], 对苦丁茶中的槲皮素和山柰素进行含量测定, 而异鼠李素在苦丁茶叶中含量很低, 故不作为定量指标。本方法操作重复性良好, 准确度较高, 能应用于苦丁茶系列产品的质量控制。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 (上册) [M]. 上海科学技术出版社, 1985: 1288.
- [2] 欧阳明安, 汪汉卿, 苏军华, 等. 苦丁茶化学成分的结构研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(3): 19.
- [3] 郁建平, 万晴娇, 张迪清, 等. 贵州苦丁茶黄酮研究 [J]. 贵州科学, 1998, 16(4): 286.
- [4] 梁红, 潘伟明, 张伟锋. 银杏叶黄酮提取方法比较 [J]. 植物资源与环境, 1999, 8(3): 12.
- [5] 中国药典. 增补版 [S]. 2002: 6.

收稿日期: 2004-06-22