

文章编号:1674-7054(2010)01-0017-04

6种冬青科苦丁茶总三萜类物质含量的比较研究

李宏杨^{1,2}, 刘飞³, 张凤琴³, 李小龙³, 刘国民^{1,2}

(1. 海南大学 热带生物资源教育部国家重点实验室, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 苦丁茶研究所, 海南 海口 570228;
3. 湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用湖南省重点实验室, 湖南 株洲 412007)

摘要: 用 $\varphi = 5\%$ 的香草醛-冰醋酸-高氯酸显色, 以熊果酸纯品为对照, 在波长 548 nm 处用分光光度法测定了 6 种冬青科苦丁茶功能叶和 4 种市售苦丁茶冬青嫩芽产品中的总三萜含量。结果显示: 大叶冬青功能叶中的总三萜类物质含量最高, 市售苦丁茶冬青的嫩芽产品中其总三萜类物质含量最低。6 种供试的冬青科苦丁茶样品中总三萜类物质的质量分数依次排序为: 大叶冬青(4.209%) > 枸骨(3.866%) > 霍山冬青(3.064%) > 华中枸骨(2.775%) > 苦丁茶冬青(2.74%) > 五棱冬青(2.648%)。

关键词: 苦丁茶; 总三萜; 熊果酸

中图分类号: Q 949.754.6; O 657.32

文献标志码: A

大多数三萜类(Triterpenes)化合物是一类基本母核由 30 个碳原子(含 6 个异戊二烯单位)缩合而成的萜类化合物, 也是一类重要的中药化学成分。目前已发现的三萜类化合物, 多数为四环三萜和五环三萜, 少数为链状、单环、双环和三环三萜。三萜类化合物具有广泛的生理活性, 其生物活性及毒性研究结果显示, 它们具有溶血、抗癌、抗炎、抗菌、抗病毒、降低胆固醇、杀软体动物、抗生育等功效。其中, 熊果酸(Ursolic acid)是重要的有待开发的新型五环三萜类药物。近年来, 熊果酸及三萜同类物不断地被报道具有抗肿瘤、抗 HIV、抗糖尿病、抗菌、抗病毒、增强免疫功能和降血脂等效果。

苦丁茶具有独特的营养保健功效, 长江以南各省均有分布, 涉及 12 个科 13 属, 至少有 30 种植物(包括变种、变型)^[1]。已有研究表明, 苦丁茶中熊果酸含量很高($w = 0.8\% \sim 1\%$), 是提取熊果酸的主要原料植物。除熊果酸以外, 苦丁茶尚含有若干种含量较低的其他三萜类化合物, 如齐墩果酸、乙酰熊果酸, 2α -羟基熊果酸, 甘草酸, 18β -甘草次酸等^[2-5]。因此, 有必要开展不同种类的苦丁茶或不同产地的同一种苦丁茶中总三萜类物质含量特点的研究, 指导熊果酸加工时选择合适的原料, 并为熊果酸的产业化开发提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 苦丁茶的来源 实验所用的冬青科苦丁茶材料来源于湖南、广东、海南、云南、浙江、广西和安徽等省。6 种苦丁茶功能叶均于 2008 年 9 月采于海南大学苦丁茶研究所的种质资源圃, 为冬青科冬青属植物苦丁茶冬青(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng)、大叶冬青(*I. latifolia* Thunb.)、五棱冬青(*I. pentagona* S. K. Chen, Y. X. Feng et C. F. Liang)、枸骨(*I. cornuta* Lindl.)、霍山冬青(*I. huoshanensis* Y. H. He)和华中枸骨(*I. centrochinesis* X. Y. Hu)。粉碎, 过 40 目筛, 备用。

1.2 总三萜类物质的提取方法 苦丁茶粉末于烘箱中 50 ℃ 烘干至恒重, 称取约 1 g, 按 1:20(W:V)的比

收稿日期: 2009-09-02

基金项目: 国家科技支撑计划项目子课题(子课题编号: 2007BAD76B05-02)

作者简介: 李宏杨(1983-), 男, 河南信阳人, 海南大学农学院作物遗传育种专业 2007 级硕士研究生。

通信作者: 刘国民(1955-), 男, 湖南祁东人, 海南大学苦丁茶研究所所长, 教授, 博士生导师。

例加入 $\varphi = 95\%$ 的乙醇,于提取装置中加热回流提取 2 次,每次 3 h。滤纸过滤后合并 2 次提取液,定容于 100 mL 容量瓶中。参照文献[6]的方法,取 10 mL 溶液用质量浓度为 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液调节 pH 至 11.0,静置 30 min 后用 $0.45 \mu\text{m}$ 膜过滤去除沉淀(多酚类物质)。滤液用 $\varphi = 10\%$ 的 H_2SO_4 溶液调节 pH 至 4.5,然后加入 1 倍体积 pH = 4.0 的 HCl 溶液稀释,静置结晶 60 min 后 $0.45 \mu\text{m}$ 膜过滤收集沉淀。沉淀水洗至中性,此沉淀为总三萜化合物,50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干后作为定量分析样品。

1.3 总三萜类物质的显色方法 取提取后的总三萜样品,加入 50 mL 无水乙醇溶解定容。依据文献[7]的方法,取 1.5 mL 溶液于具塞试管中,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热挥干溶剂。再加入 $\varphi = 5\%$ 香草醛-冰醋酸 0.2 mL、高氯酸 0.8 mL,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热显色 15 min。冷却后加入冰醋酸约 4 mL,溶液呈紫红色。

1.4 分光光度法萜类物质(熊果酸)标准曲线的建立 称取熊果酸标准品 5.5 mg,无水乙醇定容于 50 mL 容量瓶中,配制 $0.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的熊果酸标准溶液,取 6 个梯度,按上述方法显色。加入冰醋酸定容于 5 mL 容量瓶中,以试剂空白为对照,于 548 nm 处测定溶液吸光值,建立标准曲线和进行回归分析。

精密度实验采用 0.2 mL 熊果酸标准品溶液显色后连续重复测量 6 次,稳定性实验采用 0.2 mL 熊果酸标准品溶液显色后每 30 min 测定一次吸光度值,然后进行数据统计分析。

1.5 仪器试剂和统计方法 实验所用试剂均为国产分析纯,熊果酸($w = 99\%$)标准品购自中国药品生物制品检定所。光谱扫描采用 U-0080D 型二极管阵列分光光度计(日本日立),吸光值测定采用 T6 型紫外可见分光光度计(北京普析)。采用 origin 6.0 进行一般统计、回归分析和显著性检验。

2 结果与讨论

2.1 测定波长的选择 吸取 $0.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的熊果酸标准溶液 1 mL,按上述方法进行显色后,在 U-0080D 型二极管阵列分光光度计上从 400 ~ 800 nm 范围进行波长扫描,样品溶液同法操作,同时以试剂空白作参比,结果(见图 1、图 2)表明,熊果酸在 548 nm 处有最大吸光度,且空白对照干扰小。

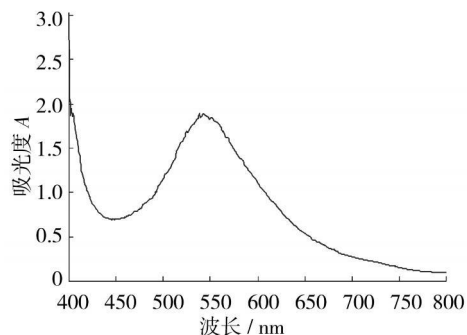


图 1 苦丁茶中总三萜物质的光谱图

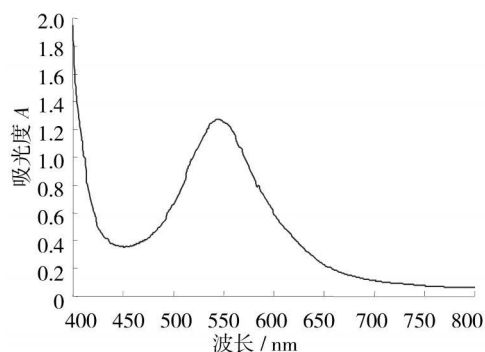


图 2 熊果酸标准品光谱图

2.2 标准曲线与回归方程的建立 实验表明(见图 3),熊果酸的质量浓度在 $4.4 \sim 26.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈良好线性关系,回归方程为: $C = 17.504A + 1.5437$,相关系数 $R^2 = 0.9965$ 。

2.3 不同产地苦丁茶中总三萜含量的特点 结果见表 1。

1) 6 种冬青科苦丁茶功能叶中均含有较多量的三萜类物质,其中大叶冬青和枸骨中的含量最高,与文献[8]报道一致。所以,大叶冬青和枸骨在供试的 6 种冬青科苦丁茶中最适合用于分离提取三萜类物质。有关

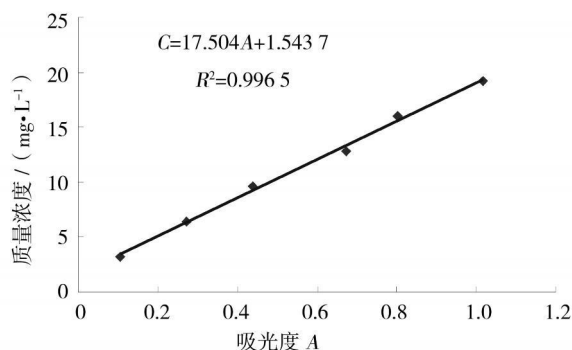


图 3 熊果酸的标准曲线与回归方程

霍山冬青中三萜类物质的研究以往未见文献报道,其总三萜含量高于苦丁茶冬青和五棱冬青,故霍山冬青在分离提取三萜类化合物时也可以考虑加以开发利用。

2) 市售苦丁茶产品的总三萜含量明显低于其原植物苦丁茶冬青的功能叶中的总三萜含量。这可能是由于苦丁茶在制作过程中三萜类物质受到了一定程度的损失,或用于制作产品的苦丁茶冬青嫩芽本身的总萜类化合物含量较之功能叶中的含量明显要低一些。

3) 同一种冬青科苦丁茶,由于其立地条件不同,或由于其基因型不同,其叶片中的内含化合物的含量亦有所不同。其中,海南保亭的苦丁茶冬青总三萜含量明显高于其他几个产地的苦丁茶冬青;浙江产的 4 种大叶冬青总三萜含量差异较小;中科院昆明植物研究所枸骨总三萜含量也明显高于其他几个产地的枸骨。

4) 三萜类物质是苦丁茶所含有的主要有效成分之一,冬青科不同物种的苦丁茶及其同一物种不同产地的苦丁茶总三萜含量差异可以作为评价其产品质量的参考指标之一。

表 1 不同产地苦丁茶中总三萜质量含量

物 种	实验材料	粗粉平均 质量/g	总三萜 质量分数/%	总三萜平均 质量分数/%
苦丁茶冬青	广西南宁苦丁茶冬青	1.009	2.436	2.74
	海南保亭苦丁茶冬青	1.009	3.078	
	海南保亭苦丁茶冬青	1.017	3.151	
	广东清新苦丁茶冬青	1.013	2.527	
	广东清新苦丁茶冬青	0.997	2.491	
	云南江城苦丁茶冬青	0.997	2.757	
大叶冬青	浙江磐安大叶冬青	1.036	4.223	4.209
	浙江磐安大叶冬青	1.018	4.178	
	浙江磐安大叶冬青	1.005	4.151	
	浙江新昌大叶冬青	1.007	4.285	
五棱冬青	湘西五棱冬青	1.035	2.703	2.648
	湘西五棱冬青	1.006	2.85	
	广西马山五棱冬青	1.091	2.32	
	湘西五棱冬青	1.055	2.721	
霍山冬青	安徽霍山霍山冬青	1.019	3.049	3.064
	安徽霍山霍山冬青	1.007	3.015	
	安徽霍山霍山冬青	1.015	3.102	
	安徽霍山霍山冬青	1.007	3.089	
枸骨	海南大学校园枸骨	1.016	3.863	3.866
	中科院昆明植物研究所枸骨	1.006	4.2	
	湖南衡阳枸骨	1.01	3.732	
	湖南衡阳枸骨	0.999	3.669	
华中枸骨	湖南衡阳华中枸骨	1.007	2.775	2.775
			2.775	
苦丁茶产品	云南江城市售苦丁茶产品	1.006	2.125	2.08
	广西马山市售苦丁茶产品	1.006	1.907	
	云南江城市售苦丁茶产品	1.004	2.12	
	云南江城市售苦丁茶产品	1.015	2.166	

3 结 论

文献报道苦丁茶中含量最多的三萜类化合物是熊果酸。由于熊果酸与其他三萜类同类物分子结构相似,故选择熊果酸标准品绘制标准曲线来计算总三萜的含量方法简便、合理。采用分光光度法测定苦丁茶中的熊果酸含量,操作简便,线性关系良好,测定范围宽,稳定性好。但是采用分光光度计法只能测

定苦丁茶中总三萜的含量,从而粗略地估算熊果酸含量水平,要想精确地知道冬青科苦丁茶植物中熊果酸的含量,需要使用高效液相色谱法对样品溶液做进一步分析。

参考文献:

- [1] 刘国民. 中国木犀科代茶植物的多样性与开发状况[J]. 贵州科学, 2003, 21(1): 69 – 77.
- [2] 文永新, 陈秀珍, 金静兰, 等. 苦丁茶化学成分研究[J]. 广西植物, 1990, 10(4): 364 – 368.
- [3] 文永新, 梁小燕, 成桂仁, 等. 苦丁茶甙元 I 的结构鉴定[J]. 植物学报, 1999, 41(2): 206 – 208.
- [4] OUYANG Ming-an, YANG Chong-ren, CHEN Zi-li, *et al.* Triterpenes and triterpenoid glycosides from the leaves of *Ilex kudingcha* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(3): 871 – 877.
- [5] 欧阳明安, 汪汉卿, 苏军华, 等. 苦丁茶冬青化学成分的结构研究[J]. 天然产物研究开发, 1997, 9(3): 19 – 23.
- [6] 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.
- [7] 李国章, 于华忠, 卜晓英, 等. 分光光度法测定湘产苦丁茶中熊果[J]. 光谱实验室, 2006, 23(2): 401 – 404.
- [8] 牟利辉. 苦丁茶中熊果酸的提取及含量测定研究[J]. 广东化工, 2005(3): 49 – 50.

Comparative Study on Contents of Total Triterpenoid of 6 Kudingcha Species in Aquifoliaceae

LI Hong-yang^{1,2}, LIU Fei³, ZHANG Feng-qin³, LI Xiao-long, LIU Guo-min^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Researches. MOE, Hainan University, Haikou 570228;

2. Kudingcha Research Institute of Hainan University, Haikou 570228, China;

3. Hunan Key Lab of Green Packaging and Biological Nanotechnology, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412007, China)

Abstract: 5% vanillin acetum and perchloric acid were used as the color developer, and the pure ursolic acid was used as the reference, the contents of total triterpenoid in adult leaves of 6 Kudingcha species in *Aquifoliaceae* and 4 kind marketed shoots products of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng were determined by spectrophotometry at 548 nm. The results showed that the adult leaves of *I. latifolia* Thunb. had the highest total triterpenoid, and the marketed shoots products of *I. kudingcha* C. J. Tseng had the lowest total triterpenoid on average. The contents of total triterpenoid in 6 Kudingcha species in *Aquifoliaceae* for test samples were sorted as follows: *I. latifolia* Thunb. (4.209%) > *I. cornuta* Lindl. (3.866%) > *I. huoshanensis* Y. H. He (3.064) > *I. centrochinesis* X. Y. Hu (2.775%) > *I. kudingcha* C. J. Tseng (2.74%) > *I. pentagona* S. K. Chen, Y. X. Feng et C. F. Liang (2.648%).

Key words: Kudingcha; total triterpenoid; ursolic Acid