



RSLC 快速测定多穗柯甜茶中 5 种甜味成分

何春年^{1,2}, 彭勇^{1,2}, 肖伟^{1,2}, 胡玉丽³, 肖培根^{1,2*}

- (1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;
2. 国家教育部 中草药物物质基础与资源利用重点实验室, 北京 100193;
3. 包头医学院, 内蒙古 包头 014060)

[摘要] 多穗柯甜茶中含有多种二氢查尔酮类甜味成分,也是其主要活性成分,为了全面评价多穗柯甜茶的质量,该文选择根皮苷、三叶苷、3'-O-乙酰基根皮苷、2'-O-乙酰基根皮苷、根皮素 5 种甜味成分为指标进行测定。采用超快速液相色谱法(RSLC), Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 乙腈-水(25:75)等度洗脱, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 检测波长 285 nm, 柱温 40 °C。结果表明 5 种甜味成分的线性关系良好(>0.9991), 线性范围(g · L⁻¹)和加样回收率分别为 0.022 2~0.444(98.37%), 0.102 8~4.112(97.32%), 0.003 39~0.067 68(96.77%), 0.005 1~0.204(98.85%)和 0.000 538~0.010 76(100.91%)。多穗柯甜茶中这 5 种成分的质量分数范围(mg · g⁻¹)分别为 7.83~62.37, 114.24~272.35, 0~1.02, 0~5.11, 0.10~1.19, 并且它们的含量变化与样品规格、采收时间呈一定的规律性。该实验方法的灵敏度和准确度均较好,采用等度洗脱能够在 6 min 内完成 1 份样品的快速测定,适合多穗柯甜茶中 5 种成分的快速分析。

[关键词] 多穗柯甜茶;木姜叶柯;超快速液相;根皮苷;三叶苷;根皮素

木姜叶柯 *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun^[1], 别名甜茶(通称)、甜叶子树(云南)、胖稠(广东)、甜味菜、大叶稠子、甘茶(贵州)、多穗石柯等,系壳斗科石柯属常绿乔木。木姜叶柯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^[2]。多穗柯甜茶为木姜叶柯的叶经加工而成的代茶饮料和保健食品,民间常采集其嫩叶食用,其茶甘甜清爽,香气浓郁,色泽鲜艳,回味持久,风味独特,据称有生津止渴,消除疲劳之功效^[3]。

需要指出的是,木姜叶柯,过去植物学及茶学工作者长期误用 *L. polystachyus* (Wall. ex DC.) Rehd, 经陈焕镛教授鉴定应是 *Quercus litseifolia* Hance 植物,但应归属于 *Lithocarpus* 属,因而在 1928 年将其重新组合为 *L. litseifolius* (Hance) Chun, 最新版的中国植物志和 Flora of China 均正确地采用了此名称^[4],过去我国文献上名为 *L. polystachyus* 的植物实质上均为 *L. litseifolius*, 谨此订正。

多穗柯甜茶具有悠久的应用历史,现代化学研究表明主要为黄酮类和三萜类,其中根皮苷等二氢查尔酮类是其主要的甜味成分,药理活性研究表明具有降糖^[5]、抗过敏^[6]、抗氧化^[7]、抗菌^[8]、改善记忆^[9]等多种作用,并安全无毒。目前对多穗柯甜茶的质量控制并无统一的标准,文献报道多是对根皮苷单一成分^[10-11]或总黄酮^[12]进行含量测定来评价质量,为了全面反映多穗柯甜茶的质量,对从多穗柯甜茶中分离得到的 5 个主要甜味成分进行含量测定,为该甜茶的质量评价提供依据。

1 仪器与试剂

戴安 Ultimate 3000 超快速液相色谱仪 RSLC, 包括 HPG3400RS 高压泵, SRD-3400 在线脱气系统, WPS-3000TRS 自动进样器, TCC-3000RS 柱温箱, DAD-3000RS 检测器, 变色龙色谱数据处理软件。

根皮苷(phloridzin, **1**), 三叶苷(phloretin-4'-β-D-glucopyranoside, **2**), 3'-O-乙酰基根皮苷(3'-O-acetylphloridzin, **3**), 2'-O-乙酰基根皮苷(2'-O-acetylphloridzin, **4**)和根皮素(phloretin, **5**) 5 种对照品均为作者从多穗柯甜茶中分离得到,¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 等方法进行结构鉴定, HPLC 归一化法测定含量均大于 98%。多穗柯甜茶样品分别购自相应的产区(表 1), 由中国医学科学院药用植物研究所肖培根研究员鉴定。乙腈为色谱纯(Fisher Scientific

[稿件编号] 20110829007

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30530860)

[通信作者] *肖培根, Tel: (010) 62894462, E-mail: xiaopg@public.bta.net.cn

[作者简介] 何春年, 副研究员, 从事天然产物化学和药用植物亲缘学研究, E-mail: cnhe@implad.ac.cn

ic),纯净水(杭州娃哈哈集团),其余试剂均为分析纯。

表1 多穗柯甜茶样品来源

Table 1 The source of Duosuike Tiancha

No.	产地	采集时间	加工
Dsk-001 ¹⁾	福建泉州	2010 清明	炒干
Dsk-002 ¹⁾	福建泉州	2010 清明	炒干
Dsk-003-1 ¹⁾	福建泉州	2010 清明	炒干
Dsk-003-2 ¹⁾	福建泉州	2010 清明	炒干
Dsk-004 ¹⁾	福建泉州	2010 清明	炒干
Dsk-005 ¹⁾	福建泉州	2010 清明	炒干
Dsk-006	湖南怀化	2010. 4	鲜叶-杀青-切碎-干燥
Dsk-007	湖南辰溪	2010. 4	晒干
Dsk-008	四川成都	2010. 5	炒干
Dsk-009	四川成都	2010. 9	炒干
Dsk-010	四川成都	2010. 9	炒干
Dsk-011	四川成都	2009. 6	晒干-粉碎
Dsk-012	四川成都	2010. 11	炒干
Dsk-013	四川成都	2011. 4	炒干
Dsk-014	重庆	-	-
Dsk-015	湖南雪峰山	2011. 3	-
Dsk-016	湖南雪峰山	2011. 3	-

注: ¹⁾不同规格的商品,即叶片有芽、细叶到中叶之分。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈-水(25 : 75)等度洗脱,流速 0.5 mL · min⁻¹,检测波长 285 nm,进样量 1 μL,柱温 40 °C(图1)。

2.2 对照品溶液的制备

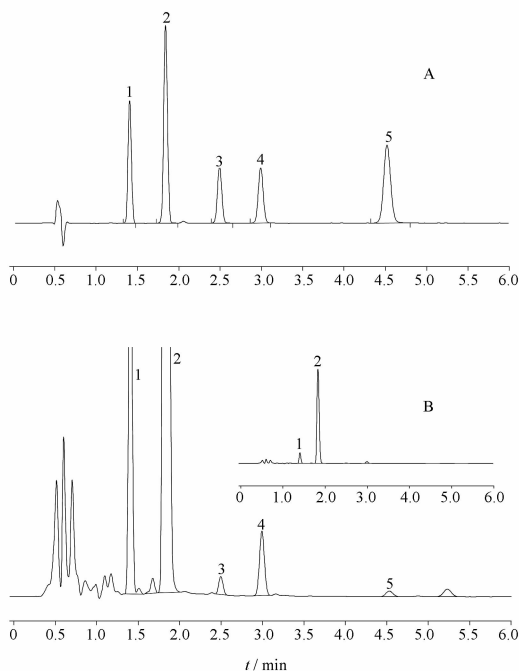
分别精密称取上述5种对照品适量,置10 mL 量瓶中,加70%甲醇溶解并定容至刻度,混匀即得。

2.3 供试品溶液制备

精密称取约0.1 g已干燥的多穗柯样品粉末(过40目筛),加入70%的甲醇10 mL,超声提取(600 W,40 kHz)30 min,取出,放置至室温,精密称定,用70%甲醇补足失重,过0.22 μm 滤膜,取续滤液,进样1 μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密量取各对照品溶液适量,置10 mL量瓶中,加70%甲醇稀释成一系列不同浓度的对照品溶液,取1 μL进样分析。以峰面积值和进样对照品浓度进行线性回归(表2)



A. 对照品;B. 样品;1. 根皮苷;2. 三叶苷;3. 3''-O-乙酰基根皮苷;4. 2''-O-乙酰基根皮苷;5. 根皮素。

图1 对照品与样品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances and the samples

结果表明各对照品在线性范围内线性关系良好。

2.4.2 定量限和检测限 分别将各对照品溶液多次稀释,进行分析,得到各对照品的最小检测限(LOD)和最小定量限(LOQ)。最小检测限和最小定量限定义为信噪比分别等于3(S/N = 3)和10(S/N = 10)时对应的进样浓度(表2)。

2.4.3 精密度试验 精密吸取5种对照品的混合溶液1 μL,重复进样6次,测定峰面积值,RSD分别为0.68%,0.73%,0.37%,0.68%,0.85%。结果表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一对照品溶液,分别在配置后的0,6,12,18,24,48 h测定,5种对照品的峰面积RSD分别为0.57%,0.63%,1.27%,1.75%,0.36%。结果表明对照品溶液在48 h内稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一批次(dsk-007)的多穗柯甜茶样品6份,按供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件测定各对照品的含量,5个对照品含量和RSD分别为19.25(0.84%),259.80(1.1%),1.02(1.5%),5.11(1.9%),0.18(2.9%)。表明此方法的重复性良好。



表2 5种对照品的线性关系

Table 2 Linearities of 5 reference substances

化合物	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	LOD/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	LOQ/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
1	$y = 57.456x + 0.1742$	0.9999	0.0222 ~ 0.444	0.0854	0.2859
2	$y = 45.859x + 2.1473$	0.9991	0.1028 ~ 4.112	0.0923	0.2866
3	$y = 58.169x + 0.0204$	0.9999	0.00339 ~ 0.06768	0.1025	0.3364
4	$y = 50.373x + 0.0098$	0.9999	0.0051 ~ 0.204	0.1255	0.4365
5	$y = 174.830x + 0.0088$	0.9996	0.000538 ~ 0.01076	0.0504	0.1838

2.4.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的多穗柯甜茶样品6份,每份约0.1g。分别加入一定量

的5种对照品溶液。按供试品溶液制备方法进行,依上述条件测定,计算回收率(表3)。

表3 多穗柯甜茶加样回收率($n=6$)

Table 3 Recoveries of Duosuike Tiancha($n=6$)

化合物	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	2.056	1.985	4.012	98.54	98.37	0.97
	2.168	1.985	4.138	99.24		
	1.892	1.985	3.830	97.63		
	2.083	1.985	4.005	96.83		
	1.919	1.985	3.880	98.79		
	2.275	1.985	4.244	99.19		
2	27.747	25.247	52.645	98.62	97.32	1.8
	29.253	25.247	53.912	97.67		
	25.538	25.247	49.692	95.67		
	28.11	25.247	53.251	99.58		
	25.902	25.247	49.902	95.06		
	30.708	25.247	55.276	97.31		
3	0.109	0.134	0.242	99.25	96.77	1.9
	0.115	0.134	0.247	98.51		
	0.100	0.134	0.227	94.78		
	0.110	0.134	0.240	97.01		
	0.102	0.134	0.229	94.78		
	0.121	0.134	0.250	96.27		
4	0.546	0.563	1.094	97.34	98.85	1.9
	0.576	0.563	1.136	99.47		
	0.502	0.563	1.046	96.63		
	0.553	0.563	1.119	100.5		
	0.509	0.563	1.060	97.87		
	0.604	0.563	1.174	101.2		
5	0.019	0.025	0.0429	95.61	100.9	2.6
	0.020	0.025	0.0453	101.2		
	0.018	0.025	0.0436	102.4		
	0.019	0.025	0.0443	101.3		
	0.018	0.025	0.0436	102.5		
	0.021	0.025	0.0466	102.4		

2.5 样品测定

按上述建立好的方法对17份多穗柯甜茶进行含量测定(表4)。

3 讨论

测定了17份不同产地、不同采收时间和加工方式的多穗柯甜茶中5种主要甜味成分的含量。发现



表4 多穗柯甜茶样品中5种甜味成分的质量分数

Table 4 The content of 5 sweet dihydrochalcones in Duosuike Tiancha $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	化合物					总含量
	1	2	3	4	5	
Dsk-001	8.19	244.56	-	0.34	1.19	254.28
Dsk-002	7.83	236.71	-	0.21	1.10	245.85
Dsk-003-1	8.83	202.45	-	0.35	0.48	212.11
Dsk-003-2	8.91	190.85	-	0.32	0.48	200.56
Dsk-004	18.47	197.82	-	0.82	0.28	217.39
Dsk-005	19.24	185.47	0.26	0.89	0.76	206.62
Dsk-006	21.16	210.05	-	0.95	0.30	232.46
Dsk-007	19.25	259.80	1.02	5.11	0.18	285.36
Dsk-008	24.49	246.79	-	-	0.39	271.67
Dsk-009	35.64	215.24	-	1.25	0.30	252.43
Dsk-010	43.45	199.83	-	1.63	0.20	245.11
Dsk-011	14.61	134.93	0.42	1.71	0.08	151.75
Dsk-012	62.37	114.24	-	0.75	0.11	177.47
Dsk-013	19.11	212.27	0.88	4.87	0.12	237.25
Dsk-014	14.90	133.98	0.42	1.60	0.10	151.00
Dsk-015	8.35	272.35	0.29	1.68	0.12	282.79
Dsk-016	10.33	171.95	0.28	1.68	0.17	184.41

注：-，未检测到。

三叶苷在多穗柯甜茶中含量最高，在 $114.24 \sim 272.35 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，为多穗柯甜茶中主要的黄酮类成分；根皮苷含量次之，在 $7.83 \sim 62.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，是被研究较多的一类成分，也是被认为主要的活性成分；3'-O-乙酰基根皮苷和2'-O-乙酰基根皮苷是根皮苷的糖基上乙酰化产物，含量较低，分别低于1.02, 5.11 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ；根皮素是上述4种成分的苷元，质量分数也较低，在 $0.10 \sim 1.19 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。5种成分的总质量分数在 $151.00 \sim 285.36 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

多穗柯甜茶的黄酮含量变化有一定的规律性。从规格上来看，产于福建泉州的6份样品(dsk-001~005)为不同规格的商品，即叶片由芽、细叶到中叶之分，发现根皮苷的含量在逐渐增高，而三叶苷的含量却在逐渐下降；从不同采收季节来看，产于四川成都的5份样品(除dsk-011外，因加工方式不同)为4—11月份(虽然不是同一年)，根皮苷含量一直在增加，而三叶苷含量是先增加后下降，最高值出现在5月份，另外根皮素的变化规律与三叶苷也相似；三叶苷与根皮苷的含量变化基本呈相反的方向，除了从上述规格和季节变化可以看出，同一产地

和采收季节的不同批次的样品也反映出这一规律，如dsk-015和dsk-016。

样品提取方法考察了水、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、乙醇作为提取溶剂，结果表明，70%甲醇的综合提取率最高；超声提取和热回流方法比较表明，两者提取率无明显差别，故选择了方便、快捷的超声提取方法。

色谱条件的考察表明5种甜味成分的最大紫外吸收均在285 nm附近，故本实验采用此波长作为吸收波长；为了降低系统压力，选择柱温为40℃，洗脱溶剂系统为乙腈-水系统。

本实验采用超快速液相色谱对多穗柯甜茶分析结果表明，方法的灵敏度和准确度均较好，采用等度洗脱能够在6 min内完成1份样品的快速测定，适合大批量样品的快速分析。

[参考文献]

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第22卷[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 201.

[2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴. 第1册[M]. 北京: 科学出版社, 1972: 434.

[3] 廖晓峰, 姚惠源. 天然甜味植物资源——多穗柯[J]. 农牧产品开发, 1997(12): 29.

[4] Flora of China[EB/OL]. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=3&taxon_id=210001106.

[5] 董华强, 宁正祥, 于立静, 等. 多穗柯黄酮根皮苷对糖尿病小鼠的降血糖血脂效果[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 714.

[6] 李晚谊, 李瑞英. 云南甜茶抗过敏有效成分初步研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2001, 23(6): 461.

[7] Yang W M, Liu J K, Qin X D, et al. Antioxidant activities of three dihydrochalcone glucosides from leaves of *Lithocarpus pachyphyllus*[J]. Z Naturforsch, 2004, 59c: 481.

[8] 李胜华, 伍贤进, 向晓军. 多穗柯有效成分的提取及抑菌效果研究[J]. 食品科技, 2010, 35(3): 211.

[9] Briski K, Marshall E. Induction of ependymal, glial, and neuronal transactivation by intraventricular administration of the SGLT1 Na^+ -D-glucose cotransporter inhibitor phlorizin[J]. Neurochem Res, 2001, 26(7): 783.

[10] 邱宏聪, 李茂, 蒋珍藕. RP-HPLC法测定多穗柯药材中根皮苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 900.

[11] 李胜华, 伍贤进, 牛友芽, 等. HPLC法测定多穗柯叶中的根皮苷含量[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 327.

[12] 肖坤福. 三波长分光光度法测定多穗柯叶中黄酮的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 980.



Quick determination of five sweet constituents in Duosuike Tiancha by RSLC

HE Chunnian^{1,2}, PENG Yong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}, HU Yuli³, XIAO Peigen^{1,2*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science,

Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine,

Ministry of Education, Beijing 100193, China;

3. Baotou Medical College, Baotou 014060, China)

[Abstract] Duosuike Tiancha contain multiple dihydrochalcone sweet constituents, which are mainly active constituents. For the purpose of overall assessment on quality Duosuike Tiancha, 5 sweet dihydrochalcones in Duosuike Tiancha, phloridzin, phloretin-4'- β -D-glucopyranoside, 3'-O-acetylphloridzin, 2'-O-acetylphloridzin and phloretin are determined as indicators. The separation was carried out through a isocratic elution using a Waters Acquity UPLC[®] BRH C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m) column and a mobile phase consisting of water (75%) and acetonitrile (25%) at a flow rate of 0.5 mL \cdot min⁻¹. The detection wavelength was set at 285 nm. The column temperature was 40 $^{\circ}$ C. Under the optimized conditions, all the 5 sweet constituents were successfully separated within 6 min, and good linearity ($r^2 > 0.999$) was achieved. The linear range ($g \cdot L^{-1}$) and recoveries were tested with results of 0.022 2-0.444 (98.37%), 0.102 8-4.112 (97.32%), 0.003 39-0.067 68 (96.77%), 0.005 1-0.204 (98.85%) and 0.000 538-0.010 76 (100.91%) respectively. The results indicate that the content of the 5 dihydrochalcones were 7.83-62.37, 114.24-272.35, 0-1.02, 0-5.11 and 0.10-1.19 mg \cdot g⁻¹, respectively. Furthermore, with certain regularity between their content and the sample size, harvest time. The separation and analysis method are fast and simple, as evidenced by the fact that the gradient elution is adopted to rapidly determine one sample within six minutes. Therefore, it can be used for determine 5 sweet dihydrochalcones Duosuike Tiancha.

[Key words] Duosuike Tiancha; *Lithocarpus litseifolius*; RSLC; phloridzin; phloretin-4'- β -D-glucopyranoside; phloretin

doi:10.4268/cjcm20120720

[责任编辑 孔晶晶]