甜茶质量标准的研究

刘 刚[1,2]， 周志英[1]， 刘育辰[1,2*]， 张永萍[1,2]， 杨立勇[1,2]， 向兴泉[3]， 林泽武[3]
(1. 贵州中医药大学药学院，贵州 贵阳 550025；2. 国家苗药工程技术研究中心，贵州 贵阳 550025；3. 贵州特色制药有限责任公司，贵州 贵定 551300)

摘要：目的 建立甜茶 *Rubus suavissimus* S. Lee 的质量标准。**方法** TLC 法定性鉴别芦丁、金丝桃苷，HPLC 法测定金丝桃苷含有量，药典法测定水分、醇溶性浸出物含有量。**结果** TLC 斑点清晰，重复性好；金丝桃苷在 0.01～0.2 mg/mL范围内呈良好的线性关系（R^2=0.999 9），平均加样回收率为 100.05%，RSD 为 0.43%。10 批样品中，水分、醇溶性浸出物含有量范围分别为 7.35%～9.19%、26.04%～45.11%。**结论** 该方法稳定可靠，可用于甜茶的质量控制。

关键词：甜茶；芦丁；金丝桃苷；TLC；HPLC
中图分类号：R284.1 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2019)10-2324-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.10.008

Quality standard for *Rubus suavissimus*

LIU Gang[1,2], ZHOU Zhi-ying[1], LIU Yu-chen[1,2*], ZHANG Yong-ping[1,2], YANG Li-yong[1,2], XIANG Xing-quan[3], LIN Ze-wu[3]
(*1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. National Engineering and Technology Research Center for Miao Medicine, Guiyang 550025, China; 3. Guizhou Characteristic Pharmaceutical Co., Ltd., Guiding 551300, China*)

ABSTRACT: AIM To establish the quality standard for *Rubus suavissimus* S. Lee. **METHODS** TLC was used for the qualitative identification of rutin and hyperoside. HPLC was adopted in the content determination of hyperoside and water, and pharmacopeia method was applied to determining water and alcohol-soluble extract contents. **RESULTS** The clear TLC plots were reproducible. Hyperoside showed a good linear relationship within the range of 0.01-0.2 mg/mL (R^2=0.999 9), whose average recovery was 100.05% with the RSD of 0.43%. In ten batches of samples, the content ranges of water and alcohol-soluble extract were 7.35%-9.19% and 26.04%-45.11%, respectively. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the quality control of *R. suavissimus*.

KEY WORDS: *Rubus suavissimus* S. Lee; rutin; hyperoside; TLC; HPLC

甜茶为蔷薇科植物甜叶悬钩子 *Rubus suavissimus* S. Lee 的干燥叶，具有清热、润肺、祛痰、止咳的功效，用于痰多咳嗽，或作为甜味剂[1]，主要含有黄酮[2-3]、二萜[4-5]、鞣花鞣质[6]等多种成分，具有降血糖[7]、降血脂[8]、抗过敏[9]、抗氧化[10]、抗炎[11]等多种药理活性，其中甜茶素热量低，口感佳，无毒，并且具有降脂、降压、降糖等作用，是一种理想的可以取代糖类物质的天然甜味剂，已广泛应用于食品、医药等方面。

在广西，俗称甜茶的植物有 9 种，分布于 7 科 8 属[12]，分别为甜茶、多穗柯、华腺萼木、黄杞、光叶耳草、牛白藤、显齿蛇葡萄、子楝树、甜叶

收稿日期：2018-12-24
基金项目：贵州省中药材、民族药材质量标准项目（DBYC52164）；贵州省中药、民族药饮片标准项目（DBYP52289）
作者简介：刘 刚（1979—），男，硕士，研究方向为中药、民族药质量标准。Tel：（0851）88233089，E-mail：liugang888_2000@163.com
*__通信作者__：刘育辰（1982—），女，博士，教授，研究方向为中药及民族药资源分类鉴定与质量控制。Tel：（0851）88233089，E-mail：lyc8564732@163.com

菊，其中牛白藤具有清热解毒功效[13]，黄杞具有清热解毒、生津止渴、解暑利湿功效[14]，而甜茶最引人关注。目前，相关研究主要集中于化学成分、提取纯化工艺、药理活性等方面[15]，其所含成分的定性和定量鉴别主要集中于甜茶素[16]、根皮苷[17]、槲皮素和山奈酚[18]、齐墩果酸和熊果酸[19]等，而法定标准中《广西壮族自治区壮药质量标准》（第二卷）只有性状鉴别，《贵州省中药材、民族药材质量标准》（2003 版）只有性状、薄层鉴别，尚未涉及金丝桃苷，而现代药理研究表明它能抑制肺炎支原体肺炎模型小鼠损伤[20]，与甜茶润肺功效密切相关。因此，本实验建立甜茶质量标准，对其中金丝桃苷进行定性、定量分析，为控制该药材质量提供研究思路，并为相关产品开发提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 UltiMate-3000 高效液相色谱仪［赛默飞世尔科技（中国）有限公司］；AR2140 电子天平（万分之一）、EX225DZH 电子天平（十万分之一）［奥豪斯仪器（常州）有限公司］；SB-5200DT 超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Q-300B 高速多功能粉碎机（上海冰都电器有限公司）；电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；WFH-203B 三用紫外分析仪（上海沪粤明科学仪器有限公司）；SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵（郑州长城科工贸有限公司）；S1710111 MODEL5000-507 恒温控制箱（天津谱祥科技有限公司）；DK-98-1 电热恒温水浴锅（天津市泰斯特仪器有限公司）。

1.2 试药 金丝桃苷（批号 111521-201708）、芦丁（批号 100080-201610）对照品及甜茶对照药材（批号 121372-200401）均购于中国食品药品检定研究院。甜茶产地广西，经贵州中医药大学药学院王世清教授鉴定为蔷薇科植物甜叶悬钩子 *Rubus suavissimus* S. Lee 的干燥叶，具体见表 1。硅胶 GF_{254}薄层板（100 mm×100 mm，青岛海洋化工厂分厂，批号 20150603）。乙腈为色谱纯（天津市科密欧化学试剂有限公司）；其他试剂均为分析纯；水为娃哈哈纯净水。

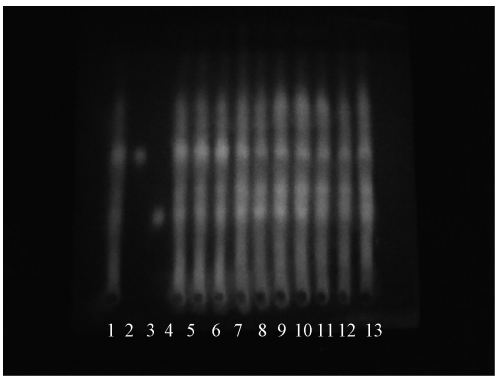
2 方法与结果

2.1 TLC 定性鉴别 取药材粉末 1.0 g，置于具塞锥形瓶中，加 70% 甲醇 25 mL，超声 30 min，滤过，取续滤液，作为供试品溶液；取对照药材粉末 1.0 g，同法制成相应溶液；取金丝桃苷、芦丁对照品适量，70% 甲醇制成每 1 mL 各含 0.1 mg 两者的相应溶液。按照 2015 年版《中国药典》四部通则 0502，吸取上述溶液各 10 μL，点于同一硅胶 GF_{254}薄层板上，以醋酸乙酯-甲酸-水（8∶1∶1）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 3% 三氯化铝乙醇溶液，加热至斑点显色清晰，置于紫外灯（365 nm）下检视，结果见图 1。由图可知，供试品色谱中在与对照药材、对照品色谱相应位置上，显相同颜色荧光斑点。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

批号	来源
170401	贵州特色制药有限责任公司(提供)
170402	贵州特色制药有限责任公司(提供)
170403	贵州特色制药有限责任公司(提供)
170920	广西壮族自治区荔浦东昌镇大瑶村(购买)
170921	广西壮族自治区来宾金秀万达茶庄(购买)
170925	广西壮族自治区桂林市七星区(购买)
170926	广西壮族自治区桂林市七星区(购买)
170927	广西壮族自治区玉林市玉州区中药港(购买)
170928	广西壮族自治区玉林市中药材专业市场(购买)
170929	广西壮族自治区玉林市中药材专业市场(购买)



1. 对照药材 2. 金丝桃苷 3. 芦丁 4~13. 样品

1. reference medicinal material 2. hyperoside 3. rutin 4-13. samples

图 1 各成分 TLC 色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of various constituents

2.2 常规检查

2.2.1 水分 按照 2015 版《中国药典》四部通则 0832 项下第二法（烘干法），测得 10 批药材含水量为 7.35%~9.19%，平均值 8.13%，见表 2。

2.2.2 醇溶性浸出物 按照 2015 版《中国药典》四部通则 2201 醇溶性浸出物项下热浸法测定，以 50% 乙醇为溶剂，测得 10 批药材中醇溶性浸出物含有量为 26.04%~45.11%，平均 40.16%，见表 2。

2.3 含有量测定

表 2 水分、醇溶性浸出物、金丝桃苷含有量测定结果

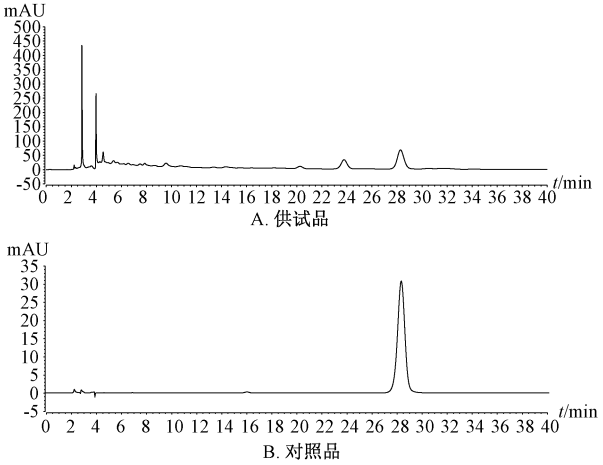
Tab. 2 Results of content determination of water, alcohol-soluble extract and hyperoside

批号	水分/%	醇溶性浸出物/%	金丝桃苷/%
170401	7. 60	44. 71	0. 71
170402	7. 82	45. 11	0. 69
170403	8. 21	43. 79	0. 69
170920	8. 32	33. 43	0. 64
170921	8. 54	39. 77	0. 51
170925	7. 35	43. 18	0. 59
170926	7. 55	43. 22	0. 57
170927	9. 19	26. 04	1. 44
170928	7. 90	38. 23	1. 02
170929	8. 78	44. 14	1. 09

2. 3. 1 对照品溶液制备 精密称取金丝桃苷对照品 10 mg，置于 10 mL 量瓶中，70% 甲醇超声溶解后定容，即得（1 mg/mL）。

2. 3. 2 供试品溶液制备 精密称取药材粉末约 1 g，置于 50 mL 具塞三角瓶中，25 mL 70% 甲醇回流提取 2 次，每次 45 min，合并提取液，置于 100 mL量瓶中，70% 甲醇定容至刻度，摇匀，过 0. 45 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2. 3. 3 色谱条件 Diamonsil C_{18}色谱柱（250 mm×4. 6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0. 2% 磷酸（B） （17∶83）；检测波长 255 nm；体积流量 1. 0 mL/min；柱温 35 ℃；进样量 10 μL，色谱图见图 2，可知金丝桃苷达到基线分离，并与其他组分分离度较好。



1. 金丝桃苷

1. hyperoside

图 2 金丝桃苷 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of hyperoside

2. 3. 4 线性关系考察 精密吸取适量对照品溶液，置于 10 mL 量瓶中，70% 甲醇稀释至刻度，摇匀，制成 0. 01、0. 02、0. 03、0. 05、0. 1、0. 2 mg/mL，在“2. 3. 3”项色谱条件下各进样测定 2 次。以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）进行回归，得方程为 $Y = 436.68X - 0.2396$ 6（$R^2 = 0.999\ 9$），在 0. 01 ~ 0. 2 mg/mL 范围内线性关系良好。

2. 3. 5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL，在“2. 3. 3”项色谱条件下进样测定 6 次，测得金丝桃苷峰面积 RSD 为 0. 37%，表明仪器精密度良好。

2. 3. 6 稳定性试验 精密吸取同一批供试品溶液（批号 170927），于 0、6、9、12、15、24 h 在“2. 3. 3”项色谱条件下进样测定，测得金丝桃苷峰面积 RSD 为 0. 79%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2. 3. 7 重复性试验 精密称取药材 6 份（批号 170927），按“2. 3. 2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2. 3. 3”项色谱条件下进样测定，测得金丝桃苷含有量 RSD 为 0. 24%，表明该方法重复性好。

2. 3. 8 加样回收率试验 精密称取含有量已知的样品 0. 5 g（批号 170927），共 6 份，加入对照品适量，在“2. 3. 3”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 3。

表 3 金丝桃苷加样回收率试验结果（$n=6$）

Tab. 3 Results of recovery tests for hyperoside（$n=6$）

称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0. 500	6. 52	6. 47	12. 984	99. 91	100. 05	0. 43
0. 500	6. 52	6. 47	12. 994	100. 06		
0. 500	6. 52	6. 47	12. 987	99. 95		
0. 500	6. 52	6. 47	12. 957	99. 49		
0. 500	6. 52	6. 47	12. 997	100. 11		
0. 500	6. 52	6. 47	13. 042	100. 80		

2. 3. 9 样品含有量测定 取 10 批药材，按“2. 3. 2”项下方法制备供试品溶液，在“2. 3. 3”项色谱条件下进样测定，每批平行 2 次，计算含有量，结果见表 2。

3 讨论

3. 1 TLC 鉴别方法筛选 本研究考察了醋酸乙酯-甲酸-水（8∶1∶1）、乙醇-甲酸（50∶1）、醋酸乙酯-乙醇-水-冰醋酸（10∶5∶1∶1）展开系统，发现醋酸乙酯-甲酸-水（8∶1∶1）展开时样品分离度最好，斑点清晰。同时，还考察了硅胶 GF_{254} 薄层板、聚酰胺薄膜对展开效果的影响，发现后者拖尾严重，而前者可见清晰斑点，分离效果较好，并

且是实验室常用品。

3.2 供试品溶液制备方法筛选 本实验考察了提取溶剂种类（甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、95% 乙醇、70% 乙醇、50% 乙醇）、提取溶剂用量（15、25、50 倍）、提取方法（回流、超声）、提取时间（30、45、60 min）、提取次数（1、2、3 次）等因素，最终确定供试品溶液制备方法为 25 倍量 70% 甲醇回流提取 2 次，每次 45 min。

3.3 检测波长筛选 由于金丝桃苷在 255 nm 波长处有较强的吸收，而且色谱峰对称，干扰少，故选择其作为检测波长。

3.4 流动相筛选 本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 醋酸、乙腈-0.2% 磷酸、乙腈-0.2% 甲酸，发现乙腈-0.2% 磷酸分离效果最好，故选择其作为流动相。

3.5 柱温筛选 本实验考察了 30、35、38、40 ℃，发现 35 ℃时色谱峰分离度、峰形最优，故选择其作为柱温。

3.6 质量标准确定 按不高于平均量的 20% 制定标准，甜茶中含水量应不得超过 9.76%，但该药材主产于广西，空气湿度大，本实验最终建议不得超过 12.00%；按不低于最低值的 80% 制定标准，甜茶中醇溶性浸出物含有量应不得低于 20.83%，本实验最终建议不得低于 18.00%；10 批样品材中金丝桃苷含有量范围为 0.51% ~ 1.44%，不同产地、批次的差异比较大，其原因可能与采收时间、产地等因素有关，本实验最终建议按干燥品计算不得低于 0.30%。

4 结论

本实验首次以金丝桃苷为指标成分，建立了甜茶质量标准，有利于该药材临床应用的有效性和安全性，也可为其润肺功效的研究提供参考。

参考文献：

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳：贵州科技出版社，2003：341.

[2] 陆 健，邱伟浩，李远志，等. 甜茶的保健成分及其鉴别方法研究[J]. 广东茶业，1998(2)：17-19.

[3] 陈全斌，沈钟苏，张巧云，等. 甜茶中黄酮甙元的分离提纯及其表征[J]. 林业科技，2005，30(1)：46-48.

[4] 王剑霞，吕华冲. 广西甜茶二萜类成分的研究[J]. 时珍国医国药，2008，19(3)：664-665.

[5] 吕华冲，王剑霞. 广西甜茶化学成分的研究Ⅱ[J]. 广东药学院学报，2007，23(5)：489-491.

[6] 莫建光，陈秋虹，徐 慧，等. HPLC 法测定广西甜茶中水解型鞣花鞣质的含量[J]. 安徽农业科学，2010，38(13)：6926-6928.

[7] 柳俊辉，周小雷，翁铭钻，等. 广西甜茶多酚对四氧嘧啶致糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. 中药药理与临床，2014，30(6)：51-54.

[8] 王 硕，侯小利，周小雷，等. 甜茶多酚对高脂血症大鼠的降血脂作用及其机制研究[J]. 中国药学杂志，2015，50(20)：1811-1815.

[9] 韦保耀，高程海，滕建文. 广西甜茶中抗过敏性成分的研究[J]. 食品科技，2006，31(5)：139-142.

[10] 邹青松，李素霞，陈 山，等. DPPH·法评价瑶山甜茶浸膏的抗氧化性能[J]. 食品科技，2010，35(7)：209-212.

[11] 王 辰，尹小萍，陈邦添，等. 广西甜茶提取物的抗炎作用研究[J]. 中国药房，2010，21(31)：2891-2893.

[12] 韦家福，黄燮才. 广西甜茶原植物的鉴定[J]. 中药材，1996，19(1)：16-17.

[13] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草（第 6 册）[M]. 上海：上海科学技术出版社，1999：436-437

[14] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准（第二卷）[S]. 南宁：广西科学技术出版社，2011：178.

[15] 谭冬明，石相莉，罗星晔，等. 广西甜茶化学成分、提取工艺及生物活性研究进展[J]. 中成药，2017，39(6)：1252-1255.

[16] 银胜高，刘君玲，刘莉丽，等. 广西瑶山甜茶质量控制研究[J]. 中药材，2008，31(11)：1734-1737.

[17] 黄 松，罗明琍，陶 艳，等. 甜茶质量标准研究[J]. 中国药房，2010，21(23)：2176-2178.

[18] 吴柳春，黄桂华. HPLC 法测定广西甜茶中槲皮素和山柰酚的含量[J]. 中国药事，2008，22(7)：572-573；602.

[19] 谭冬明，石相莉，罗星晔，等. 甜茶中齐墩果酸及熊果酸的检测方法的建立[J]. 食品研究与开发，2017，38(14)：155-160.

[20] 申冬冬，侯江红，袁 飞. 金丝桃苷抑制肺炎支原体肺炎模型小鼠的损伤[J]. 中国病理生理杂志，2017，33(5)：884-889.