

## 不同类型枇杷叶三萜酸类成分含量及降糖活性的比较

吴月娴, 吕 寒, 简瞰昱, 陈 剑, 马 丽, 任冰如, 李维林<sup>①</sup>

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省抗糖尿病药物筛选技术服务中心, 江苏 南京 210014]

**Comparisons on contents of triterpenoid acid components and hypoglycemic activity in different types of *Eriobotrya japonica* leaves** WU Yuexian, LYU Han, JIAN Tunyu, CHEN Jian, MA Li, REN Bingru, LI Weilin<sup>①</sup> (Jiangsu Provincial Service Center for Anti-diabetic Drugs Screening, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2017, 26(4): 101-103

**Abstract:** To select Chinese medicine *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaves with high hypoglycemic activity, contents of total ashes, extracts and triterpenoid acid components in crude and processed products of mature leaves and fallen leaves of *E. japonica* from Xishan Island in Suzhou of Jiangsu in November were compared, and their ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity was also compared. The results show that contents of total ashes and extracts in different types of *E. japonica* leaves are in accord with related criteria. Contents of each triterpenoid acid component in fallen leaves are significantly higher than those in mature leaves in general, and total contents of triterpenoid acid components in crude and processed products of mature leaves, and crude and processed products of fallen leaves are 1.671 0%, 1.690 0%, 3.774 1%, and 2.717 5%, respectively.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of different types of *E. japonica* leaves is significantly higher than that of acarbose, in which, half-inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of crude product of fallen leaves is the lowest with only 64.170  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . In conclusion, fallen leaves are the optimum choice for taking *E. japonica* leaves as hypoglycemic Chinese medicine.

**关键词:** 枇杷叶; 成熟叶; 落叶; HPLC-ELSD; 三萜酸类成分;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶

**Key words:** *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaf; mature leaf; fallen leaf; HPLC-ELSD; triterpenoid acid component;  $\alpha$ -glucosidase

中图分类号: Q946.8; R284.2; S567.1<sup>+9</sup> 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2017)04-0101-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2017.04.13

枇杷叶又名巴叶、芦桔叶,为蔷薇科(Rosaceae)枇杷属(*Eriobotrya* Lindl.)常绿小乔木枇杷[*E. japonica* (Thunb.) Lindl.]的干燥叶,主产于江苏、浙江、安徽、江西、福建等地,为中国传统民间中草药,味苦,性微寒,具有清肺止咳、降逆止呕的作用<sup>[1]204</sup>,主要用于治疗呼吸系统疾病<sup>[2]</sup>和糖尿病<sup>[3-5]</sup>等疾病。枇杷叶含有三萜酸类<sup>[6-7]</sup>、黄酮类<sup>[8]</sup>及倍半萜类<sup>[9]</sup>等成分,其中,三萜酸类为主要活性成分。

在实际生产中,枇杷的成熟叶和落叶均可炮制为枇杷叶中药材。吕寒等<sup>[10]</sup>认为,枇杷叶的三萜酸类成分总含量在11月份最高。鉴于此,以11月份采自江苏苏州西山岛的枇杷成熟叶和落叶为实验材料,分别对2种枇杷叶生品和炮制品的总灰分和浸出物含量进行比较,并采用HPLC-ELSD法对其三萜酸类成分含量进行比较,同时,还比较了枇杷成熟叶和落叶生品和炮制品对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性,以期为采收优质枇杷叶提供实验依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

供试的枇杷成熟叶和落叶均于2015年11月采自江苏苏州西山岛,经江苏省中国科学院植物研究所李维林研究员鉴定。将叶片洗净,晒干,切丝,备用。分别取成熟叶和落叶500g,加入125g蜂蜜,拌匀,文火炒制10min后,置于60℃烘箱中烘干至恒质量,备用。

主要仪器包括EL204万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]、UltiMate-3000液相色谱仪(戴安中国有限公司)、3300蒸发光散射检测器(美国Alltech公司)、5810R多功能台式离心机(德国Eppendorf公司)和SpectraMax Plus384光吸收酶标仪(美国Molecular Devices公司)。使用的蜂蜜购自南京老山药业股份有限公司; $\alpha$ -葡萄糖苷酶(批

收稿日期: 2017-04-14

基金项目: 江苏省重点研发计划-社会发展面上项目(BE2015690); 江苏省科技基础设施建设计划-科技公共服务平台项目(BM2011117)

作者简介: 吴月娴(1993—),女,江苏扬州人,硕士研究生,主要从事植物天然产物化学方面的研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: lwlcnb@cnbg.net

号 050M7415) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 对硝基苯- $\alpha$ -D-葡萄糖吡喃苷 (pNPG, 批号 H1425007) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 阿卡波糖 (批号 BJ13634) 购自德国 Bayer 公司; 乙醇和乙酸铵为分析纯; 乙腈和甲醇为色谱纯; 齐墩果酸 (批号 0809-9803) 和熊果酸 (批号 110742-200516) 购自中国食品药品检定研究院; 蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸和科罗素酸为实验室自制 (纯度高于 98.0%)。

## 1.2 方法

1.2.1 总灰分和浸出物含量测定 将供试叶片粉碎, 过 60 目筛, 采用文献 [11] 204 中的方法测定总灰分含量, 采用热浸法<sup>[11]202</sup>测定浸出物含量, 各指标重复取样测定 3 次。

1.2.2 HPLC-ELSD 分析条件 色谱柱: Acclaim 120 C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5.0  $\mu$ m); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 25  $^{\circ}$ C; 进样量 10  $\mu$ L。流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为体积分数 0.5% 乙酸铵, 梯度洗脱流程: 0~5 min, 50% A; 5~23 min, 50%~54% A; 23~48 min, 54%~90% A; 48~50 min, 90%~100% A。漂移管温度 70  $^{\circ}$ C, 载气为 N<sub>2</sub>, 体积流量 1.5 L·min<sup>-1</sup>。

1.2.3 对照品溶液配制及标准曲线绘制 精密称取蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗素酸、齐墩果酸和熊果酸对照品, 用甲醇分别配制成质量浓度为 0.533 3、0.516 7、0.550 0、0.633 3、0.633 3 和 0.666 7 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液; 取各对照品溶液 0.1 mL, 混匀, 配成对照品混合溶液。

精密吸取对照品混合溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL, 用甲醇补足至 1.0 mL, 按照上述分析条件进样 20  $\mu$ L, 以峰面积为纵坐标  $y$ 、对照品质量为横坐标  $x$  绘制标准曲线。其中, 蔷薇酸质量与峰面积的线性回归方程为  $y = 3.6 \times 10^6 x - 350 853$  ( $r = 0.999 9$ ), 线性范围为 1.06~10.60  $\mu$ g; 委陵菜酸质量与峰面积的线性回归方程为  $y = 3.7 \times 10^6 x - 292 805$  ( $r = 0.999 9$ ), 线性范围为 1.03~10.30  $\mu$ g; 科罗素酸质量与峰面积的线性回归方程为  $y = 6.9 \times 10^6 x - 1 028 520$  ( $r = 0.999 3$ ), 线性范围为 1.10~11.00  $\mu$ g; 马斯里酸质量与峰面积的线性回归方程为  $y = 5.9 \times 10^6 x - 696 036$  ( $r = 0.999 5$ ), 线性范围为 1.27~12.70  $\mu$ g; 齐墩果酸质量与峰面积的线性回归方程为  $y = 3.3 \times 10^6 x - 146 324$  ( $r = 0.999 1$ ), 线性范围为 0.63~6.30  $\mu$ g; 熊果酸质量与峰面积的线性回归方程为  $y = 4.4 \times 10^6 x - 866 373$  ( $r = 0.999 7$ ), 线性范围为 1.33~13.33  $\mu$ g。

1.2.4 供试品溶液提取及测定 取样品粉末约 2.0 g, 精密称量后, 加入体积分数 80% 乙醇 100.0 mL; 称量后, 加热回流提取 2 h; 冷却, 用体积分数 80% 乙醇补足质量; 过滤, 量取滤液 50.0 mL, 减压浓缩后用甲醇定容至 20.0 mL; 用微孔滤膜 (孔径 0.45  $\mu$ m) 过滤, 滤液即供试品溶液。按照上述分析条件进行检测, 进样量 10  $\mu$ L。每种样品 3 份, 每份样品测定 3 次。

1.2.5 方法学考察 精密吸取对照品混合溶液 10  $\mu$ L, 按照上述分析条件重复进样 6 次, 峰面积 RSD 值分别为 1.34%、0.96%、1.53%、1.64%、0.65% 和 1.01%, 表明仪器精密度良好。

取落叶生品的供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 按照上述分析条件进样, 24 h 内蔷薇酸、委陵菜酸、科罗素酸、马斯里酸、齐墩果酸和熊果酸的峰面积 RSD 值分别为 1.04%、1.68%、0.69%、0.64%、0.91% 和 0.21%, 表明这 6 种三萜酸类成分在 24 h 内稳定性较好。

分别称取落叶生品 6 份, 采用前述方法制备供试品溶液, 并按照上述分析条件进样, 蔷薇酸、委陵菜酸、科罗素酸、马斯里酸、齐墩果酸和熊果酸的峰面积 RSD 值分别为 0.54%、1.21%、1.76%、0.91%、1.04% 和 1.43%, 表明该方法重复性较好。

称取约 1.0 g 已知三萜酸类成分含量的样品粉末 9 份, 平均分成 3 组, 每组视为 1 个重复。精密称量后, 分别加入蔷薇酸对照品溶液 2.4、3.0 和 3.6 mL, 委陵菜酸对照品溶液 3.7、4.7 和 5.6 mL, 科罗素酸对照品溶液 1.6、2.0 和 2.4 mL, 马斯里酸对照品溶液 4.4、5.5 和 6.6 mL, 齐墩果酸对照品溶液 0.7、0.9 和 1.1 mL, 熊果酸对照品溶液 9.0、11.2 和 13.4 mL, 采用前述方法制备供试品溶液, 并按照上述分析条件进样, 蔷薇酸、委陵菜酸、科罗素酸、马斯里酸、齐墩果酸和熊果酸的加样回收率分别为 98.83%、99.07%、98.95%、99.44%、98.20% 和 100.28%, 加样回收率 RSD 值分别为 0.27%、0.67%、1.54%、0.45%、1.14% 和 1.04%。

1.2.6  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制实验 在 96 孔板中依次加入  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 2  $\mu$ L、磷酸盐缓冲液 (67 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 6.8) 78  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 保温 10 min; 加入 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> pNPG 20  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 保温 10 min; 测定波长 405 nm 处吸光度 ( $A_0$ )。用等体积磷酸盐缓冲液代替  $\alpha$ -葡萄糖苷酶, 测定波长 405 nm 处吸光度 ( $A_0'$ )。

在反应孔中依次加入  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 2  $\mu$ L、磷酸盐缓冲液 77  $\mu$ L、供试品溶液或阿卡波糖 1  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 保温 10 min; 加入 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> pNPG 20  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 保温 10 min; 测定波长 405 nm 处吸光度 ( $A_1$ )。用等体积磷酸盐缓冲液代替供试品溶液, 测定波长 405 nm 处吸光度 ( $A_1'$ )。每个供试品溶液重复检测 3 次。

根据公式“抑制率 =  $[1 - (A_1 - A_1') / (A_0 - A_0')] \times 100\%$ ”计算供试品溶液对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制率, 并计算其半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值。

## 1.3 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 6 软件对数据进行差异显著性分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同类型枇杷叶总灰分和浸出物含量的比较

检测结果表明: 枇杷成熟叶和落叶生品的总灰分含量分别为 (6.840±0.195)% 和 (7.963±0.261)%, 炮制品的总灰分含量分别为 (6.330±0.154)% 和 (6.887±0.156)%; 并且, 炮制品的总灰分含量显著 ( $P < 0.05$ ) 低于生品, 落叶的总灰分含量显著高于成熟叶。枇杷成熟叶和落叶生品的浸出物含量分别为 (22.37±0.50)% 和 (19.83±0.31)%, 炮制品的浸出物含量

分别为(28.57±0.87)%和(25.40±0.60)%;并且,炮制品的浸出物含量显著高于生品,落叶的浸出物含量显著低于成熟叶。

## 2.2 不同类型枇杷叶三萜酸类成分含量的比较

检测结果(表1)表明:4个类型枇杷叶的三萜酸类成分含量均以熊果酸最高,齐墩果酸最低。落叶的6种三萜酸类成分含量总体显著( $P<0.05$ )高于成熟叶;成熟叶炮制品的委陵菜酸、科罗索酸和马斯里酸含量以及落叶炮制品的6种三萜

酸类成分含量低于或显著低于各自生品,而成熟叶炮制品的蔷薇酸、齐墩果酸和熊果酸含量则高于或显著高于其生品。

由表1还可见:三萜酸类成分总含量在落叶生品中最高,在落叶炮制品中较高,在成熟叶炮制品中较低,在成熟叶生品中最低;并且,落叶的三萜酸类成分总含量显著高于成熟叶,成熟叶炮制品的三萜酸类成分总含量略高于其生品,而落叶炮制品的三萜酸类成分总含量却显著低于其生品。

表1 不同类型枇杷叶三萜酸类成分含量的比较( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>

Table 1 Comparison on contents of triterpenoid acid components in different types of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaves ( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>

材料 <sup>2)</sup> Sample <sup>2)</sup>	三萜酸类成分含量/% Content of triterpenoid acid components						总计 Total
	蔷薇酸 Euscaphic acid	委陵菜酸 Tormentic acid	科罗索酸 Corosolic acid	马斯里酸 Maslinic acid	齐墩果酸 Oleanolic acid	熊果酸 Ursolic acid	
L1	0.162 9±0.009 8a	0.241 7±0.010 6a	0.113 8±0.003 6a	0.348 2±0.010 2b	0.055 4±0.001 2a	0.747 2±0.011 9a	1.671 0±0.009 6a
L2	0.203 2±0.004 9b	0.222 2±0.012 2a	0.102 6±0.011 7a	0.265 5±0.009 3a	0.059 2±0.001 9a	0.816 5±0.015 2b	1.690 0±0.026 4a
L3	0.645 0±0.004 8d	1.064 6±0.034 8c	0.363 5±0.013 9c	0.463 0±0.005 9d	0.094 2±0.004 6c	1.143 6±0.008 6c	3.774 1±0.034 3c
L4	0.483 0±0.012 1c	0.754 4±0.001 8b	0.254 3±0.010 7b	0.386 7±0.002 0c	0.074 7±0.001 1b	0.804 2±0.013 2b	2.717 5±0.013 0b

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ) Different lowercases in the same column indicate the significant difference ( $P<0.05$ ).

<sup>2)</sup> L1: 成熟叶生品 Crude product of mature leaves; L2: 成熟叶炮制品 Processed product of mature leaves; L3: 落叶生品 Crude product of fallen leaves; L4: 落叶炮制品 Processed product of fallen leaves.

## 2.3 不同类型枇杷叶对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制作用的比较

检测结果表明:阿卡波糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的半抑制浓度( $IC_{50}$ )为(560.000±0.021)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;4个类型枇杷叶对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用显著( $P<0.05$ )优于阿卡波糖,且彼此间的抑制作用差异显著。其中,落叶生品对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用最强,其 $IC_{50}$ 值为(64.170±0.021)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;然后依次为成熟叶生品、落叶炮制品和成熟叶炮制品,其 $IC_{50}$ 值分别为(86.160±0.026)、(106.200±0.025)和(122.600±0.023)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

## 3 讨 论

本研究结果显示:枇杷成熟叶和落叶生品及炮制品的总灰分和浸出物含量均符合《中华人民共和国药典》<sup>[1]204</sup>中关于枇杷叶中药材的有关标准;不同类型枇杷叶的三萜酸类成分含量存在一定差异,并且,落叶的三萜酸类成分含量总体上显著高于成熟叶,这可能与枇杷叶三萜酸类成分的积累随叶片发育进程不断增大有关。齐墩果酸和熊果酸总含量是《中华人民共和国药典》<sup>[1]205</sup>中规定的枇杷叶有效成分的质控指标,根据本研究结果落叶的有效成分优于成熟叶。另外,落叶的三萜酸类成分含量高于成熟叶,且对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制效果优于成熟叶,表明枇杷叶的药理活性与三萜酸类成分含量有关。综上所述,落叶是枇杷叶作为降血糖中药材的首选。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015版(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 王立为, 刘新民, 余世春, 等. 枇杷叶抗炎和止咳作用研究[J]. 中草药, 2004, 35(2): 174-176.
- [3] LÜ H, CHEN J, LI W L, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of the total triterpene acid fraction from Folium Eriobotryae [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 122: 486-491.
- [4] 谢筱琳, 钟 颖. 枇杷叶乙醇提取物降血糖的实验研究[J]. 中医药导报, 2009, 15(5): 93-94.
- [5] CHEN J, LI W L, WU J L, et al. Hypoglycemic effects of a sesquiterpene glycoside isolated from leaves of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) [J]. Phytomedicine, 2008, 15: 98-102.
- [6] 任冰如, 陈智坤, 陈 剑, 等. 苏州西山岛产枇杷叶的药材品质分析[J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(2): 119-120.
- [7] 吕 寒, 陈 剑, 李维林, 等. 枇杷叶中三萜酸类成分的提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2791-2792.
- [8] 吕 寒, 于 盱, 陈 剑, 等. 枇杷叶黄酮类化学成分研究[J]. 中成药, 2014, 36(2): 329-332.
- [9] 赵 磊, 陈 剑, 印 敏, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析枇杷叶的倍半萜苷类化合物[J]. 中成药, 2015, 37(7): 1498-1502.
- [10] 吕 寒, 习超鹏, 陈 剑, 等. 不同生长季节枇杷叶中三萜酸类成分的含量变化[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18): 2353-2355.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015版(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

(责任编辑: 佟金凤)