

# HPLC 法比较不同产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量的差异

李佳伟, 吕 寒, 刘 艳, 鲜 新, 丁晓琴, 简曦昱, 任冰如<sup>①</sup>, 陈 剑

[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]

**Comparison on difference in sesquiterpene glycoside A content in *Eriobotrya japonica* leaves from different localities by HPLC method** LI Jiawei, LYU Han, LIU Yan, XIAN Xin, DING Xiaoqin, JIAN Tunyu, REN Bingru<sup>①</sup>, CHEN Jian (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.*, 2020, 29(1): 69-71

**Abstract:** Taking *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaves from 12 localities in 10 provinces (autonomous regions) as research materials, HPLC method for determination of sesquiterpene glycoside A content in *E. japonica* leaves was established, and sesquiterpene glycoside A contents in *E. japonica* leaves from different localities were determined and compared. The results show that sesquiterpene glycoside A contents in *E. japonica* leaves from different localities are 0.613–1.412 mg · g<sup>-1</sup>, and there are obvious differences among different localities. In which, sesquiterpene glycoside A content in *E. japonica* leaves from Wuzhou of Guangxi locality is the highest, that in *E. japonica* leaves from Kaifeng of He'nan locality is the lowest, and there is a significant difference between these two localities. It is suggested that Wuzhou of Guangxi is superior locality of *E. japonica* leaves.

**关键词:** 枇杷叶; 倍半萜苷 A; 高效液相色谱(HPLC); 产地

**Key words:** *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaf; sesquiterpene glycoside A; high performance liquid chromatography (HPLC); locality

中图分类号: Q946.8; R284.2; S567.1<sup>+</sup>9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)01-0069-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.01.09

枇杷叶为蔷薇科(Rosaceae)植物枇杷[*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]的干燥叶,为中国常用的传统中药材,味苦,性微寒,具有清肺止咳、降逆止呕、抗氧化、抗炎、降血糖和保肝护肝的功效<sup>[1-3]</sup>。枇杷叶的主要成分包括黄酮类<sup>[4]</sup>、三萜酸类<sup>[5-7]</sup>、倍半萜苷类<sup>[8]</sup>、多酚<sup>[9]</sup>和多糖<sup>[10]</sup>等。现代药理学研究表明:枇杷叶中倍半萜苷类成分可缓解高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝<sup>[11]</sup>,枇杷叶中的倍半萜苷 A 具有显著的降血糖作用<sup>[12]</sup>。

本研究以采自 10 个省(自治区)12 个产地的枇杷叶为研究对象,建立高效液相色谱(HPLC)测定枇杷叶中倍半萜苷 A 含量的方法,并比较不同产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量的差异,以期对不同产地枇杷叶的采收和开发提供研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试枇杷叶于 2019 年 6 月采自广西玉林和梧州、浙江兰

溪、广东清远和肇庆、江苏南京、四川绵阳、重庆沙坪坝、安徽亳州、河南开封、湖北恩施以及湖南湘西 10 个省(自治区)的 12 个产地,经江苏省中国科学院植物研究所任冰如研究员鉴定为枇杷的叶。每个产地采集新鲜成熟枇杷叶 1 kg,40 °C 烘干,粉碎后过 50 目筛,备用。

主要仪器:EL204 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),DHG-9146A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),Milli-Q<sup>TM</sup> Advantage A10<sup>TM</sup> 超纯水系统(美国 Millipore 公司),Dione Ultimate-3000 液相色谱仪(配有四元泵、在线真空脱气、自动进样器、紫外检测系统和 Chromeleon 工作站,美国 DIONEX 公司)。

主要试剂:倍半萜苷 A 对照品(自制,纯度 95%以上),甲醇为色谱纯农残级(美国 Tedia 公司),超纯水,无水乙醇为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Nucleosil 100 C<sub>18</sub>(150

收稿日期: 2019-08-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81773885; 81703224)

作者简介: 李佳伟(1994—),女,河南新乡人,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: bingruen@126.com

mm×4.6 mm, 3.0 μm); 流动相为甲醇-水溶液(体积比 65:35), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 210 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

1.2.2 标准曲线绘制 精密称取倍半萜苷 A 对照品适量, 用甲醇溶解并配制成质量浓度 4.110 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品母液, 然后用甲醇将对照品母液梯度稀释成质量浓度 2.055、1.028、0.514、0.257、0.128 和 0.064 2 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。按照上述色谱条件测定倍半萜苷 A 的峰面积, 以峰面积(Y)为纵坐标, 倍半萜 A 质量(X)为横坐标绘制标准曲线, 得到峰面积与倍半萜苷 A 质量的回归方程为  $Y=3.0068X-0.0938$  ( $r=0.9997$ ), 线性范围为 0.000 6~0.041 1 mg。

1.2.3 样品中倍半萜苷 A 的提取及含量测定 分别精密称取各样品粉末 5.00 g, 精密加入体积分数 80% 乙醇 100.0 mL, 超声(300 W, 30 ℃)提取 60 min, 冷却后过滤, 滤液用旋转蒸发器蒸干后, 用甲醇复溶转移至 5.0 mL 容量瓶中定容, 即为供试液。根据峰面积及标准曲线计算样品中倍半萜苷 A 质量。然后根据公式“枇杷叶中倍半萜 A 含量=(枇杷叶中倍半萜 A 质量/枇杷叶质量)×100%”计算枇杷叶中倍半萜 A 含量。每份样品重复测定 3 次。

#### 1.2.4 方法学考察

1.2.4.1 精密度考察 取倍半萜苷 A 对照品溶液, 重复进样 6 次, 记录倍半萜苷 A 对照品的峰面积和保留时间, RSD 值分别为 0.42% 和 0.10%, 表明仪器精密度良好。

1.2.4.2 稳定性考察 取江苏南京产地样品粉末, 按照上述方法制备供试液, 分别于配制后 0、2、4、8、16 和 24 h 进行测定, RSD 值为 2.04%, 表明供试液在 24 h 内稳定。

1.2.4.3 重复性考察 取江苏南京产地样品粉末 6 份, 按照上述方法制备供试液, 按照上述色谱条件测定倍半萜苷 A 峰面积, 并根据标准曲线计算样品中倍半萜苷 A 质量, RSD 值为 0.82%, 表明该方法重复性好。

1.2.4.4 加样回收率考察 取广西梧州产地样品粉末(倍半萜苷 A 含量已知)6 份, 每份 5.00 g, 分别加入质量浓度 4.110 mg·mL<sup>-1</sup> 倍半萜苷 A 对照品母液 7.5 mL, 再加入体积分数 80% 乙醇 100.0 mL, 按照上述样品中倍半萜苷 A 的提取方法和色谱条件测定峰面积, 根据标准曲线计算倍半萜 A 质量, 并计算回收率, 平均回收率为 98.86%, RSD 值为 1.80%。

### 1.3 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行差异显著性分析。

## 2 结果和分析

不同产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量见表 1。结果表明: 不同产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量由高到低依次为广西梧州、四川绵阳、广东肇庆、安徽亳州、浙江兰溪、重庆沙坪坝、湖南湘西、江苏南京、湖北恩施、广东清远、广西玉林、河南开封。

广西梧州产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量最高, 为 1.412 mg·g<sup>-1</sup>, 河南开封产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量最低, 为 0.613 mg·g<sup>-1</sup>, 2 个产地间存在显著差异; 四川绵阳、广东肇庆、安徽亳州、浙江兰溪和重庆沙坪坝产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量也较高, 均高于 1.000 mg·g<sup>-1</sup>。总体上看, 与华中地区的河南开封、湖南湘西和湖北恩施产地相比, 华南、西南和华东地区的广西梧州、四川绵阳、广东肇庆、安徽亳州、浙江兰溪和重庆沙坪坝产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量较高。此外, 来自同一省(自治区)不同城市的枇杷叶中倍半萜苷 A 含量也存在显著差异, 如广西梧州与玉林产地以及广东肇庆与清远产地。

表 1 不同产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量的比较( $\bar{X}\pm SD$ )

Table 1 Comparison on sesquiterpene glycoside A content in *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaves from different localities ( $\bar{X}\pm SD$ )

产地 Locality	SGA/(mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	RSD/%
广西玉林 Yulin of Guangxi	0.678±0.008d	1.24
广西梧州 Wuzhou of Guangxi	1.412±0.009a	0.62
浙江兰溪 Lanxi of Zhejiang	1.092±0.007b	0.67
广东清远 Qingyuan of Guangdong	0.682±0.015d	2.14
广东肇庆 Zhaoqing of Guangdong	1.137±0.012b	1.07
江苏南京 Nanjing of Jiangsu	0.921±0.020c	2.16
四川绵阳 Mianyang of Sichuan	1.249±0.036a	2.85
重庆沙坪坝 Shapingba of Chongqing	1.036±0.009c	0.91
安徽亳州 Bozhou of Anhui	1.093±0.025b	2.25
河南开封 Kaifeng of He'nan	0.613±0.037d	6.00
湖北恩施 Enshi of Hubei	0.848±0.038c	4.45
湖南湘西 Xiangxi of Hu'nan	0.934±0.062c	6.59

<sup>1)</sup> SGA: 倍半萜苷 A 含量 Sesquiterpene glycoside A content. 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 ( $P<0.05$ ) difference.

## 3 讨论

本研究建立了 HPLC 测定枇杷叶中倍半萜苷 A 含量的方法, 并比较了不同产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量的差异。结果表明: 该方法适于测定枇杷叶中倍半萜苷 A 含量, 操作简便, 测定结果线性关系良好, 重复性好。

植物次生代谢产物的合成受光照、土壤和大气等因子的调控<sup>[13]</sup>。倍半萜苷是一类重要的植物次生代谢产物, 不同产地的生态环境对其合成和积累有一定影响。与中国南部地区相比, 北部地区降水量少, 不利于土壤中有机的输入与积累<sup>[14]</sup>, 这可能是影响植物次生代谢产物合成的一个重要因子。本研究结果显示: 不同产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量差异较大, 广西梧州产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量最高, 河南开封产地枇杷叶中倍半萜苷 A 含量最低, 前者为后者的 2.3 倍, 广西梧州可作为枇杷叶优选产地。马哲龙等<sup>[15]</sup>的研究结果表明: 同一产地不同品种和不同采收时期枇杷叶中齐墩果酸、

熊果酸和总黄酮的含量存在差异。本研究中,来自同一省(自治区)不同城市的枇杷叶中倍半萜苷 A 含量存在显著差异,这说明植物次生代谢产物除受到生态环境等外在因子影响外,种内遗传差异以及采收时期也可能对其有较大影响。本研究仅根据产地对枇杷叶中倍半萜苷 A 含量进行了分析,而枇杷叶中倍半萜苷 A 的合成受多种因子影响,有待进一步的深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 204-205.
- [2] 鞠建华, 周 亮, 林 耕, 等. 枇杷叶中三萜酸类成分及其抗炎、镇咳活性研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(10): 752-757.
- [3] 宋 星, 王婷婷, 杨晓丹, 等. 枇杷叶中含科罗素酸提取物的分离纯化及降血糖活性研究[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(2): 214-219.
- [4] 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.
- [5] 尹 莉, 尹 霞. 枇杷叶中五环三萜酸类有效成分的提取研究[J]. 北方药学, 2015, 12(1): 4-5.
- [6] 吕 寒, 陈 剑, 李维林, 等. 枇杷叶中三萜类化学成分的研究[J]. 中药材, 2008, 31(9): 1351-1354.
- [7] 吴月娟, 吕 寒, 简噉显, 等. 不同类型枇杷叶三萜酸类成分含量及降糖活性的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2017, 26(4): 101-103.
- [8] 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.
- [9] ITO H, KOBAYASHI E, TAKAMATSU Y, et al. Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2000, 48(5): 687-693.
- [10] 秦春青, 阮家耀, 王瑞宇, 等. 枇杷叶多糖分离纯化及其单糖组成研究[J]. 中草药, 2018, 49(14): 3240-3244.
- [11] JIAN T, AO X, WU Y, et al. Total sesquiterpene glycosides from Loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf alleviate high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease through cytochrome P450 2E1 inhibition [J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2017, 91: 229-237.
- [12] 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.
- [13] 李 彦, 周晓东, 楼浙辉, 等. 植物次生代谢产物及影响其积累的因素研究综述[J]. 江西省林业科技, 2012(3): 54-60.
- [14] 潘 俊, 费 燕. 不同产地款冬花中 4 种有机酸的含量比较[J]. 中药材, 2016, 39(11): 2569-2571.
- [15] 马哲龙, 吴增艳, 蒋福升, 等. 浙江塘栖产不同品种枇杷叶的最佳采收期研究[J]. 中药材, 2018, 41(12): 2788-2791.

(责任编辑: 张明霞)

## 《植物资源与环境学报》2019 年审稿专家名单

《植物资源与环境学报》2019 年审稿专家名单如下(按姓氏的汉语拼音排序):

曹建国 陈云明 程金花 崔大方 戴传超 邓衍明 段成国 方炎明 冯守千 高德民 耿文娟 郭海林  
 郭 伟 郭晓思 郝成元 胡茂龙 胡绵好 贾晓东 金 华 鞠秀云 李建宏 李 伟 李先琨 李新华  
 梁呈元 梁天刚 刘金福 刘启新 刘晓宏 刘 旭 龙春林 隆小华 陆长梅 吕复兵 马永鹏 聂永心  
 彭明春 彭 涛 蒲高忠 濮社班 钱士辉 仇 硕 阮成江 邵剑文 石 莎 宋春风 宋希强 宋玉霞  
 孙 翊 唐晓清 田 敏 王长庭 王桂清 王金彦 王奇志 王贤荣 王智慧 王 忠 韦继光 吴承祯  
 谢寅峰 徐炳成 徐迎春 徐增莱 许明辉 许岳飞 闫淑珍 杨 扬 杨志玲 易绮斐 余坤勇 原海燕  
 张春红 张大勇 张国防 张 救 张 楠 张重义 赵世伟 郑 健

本刊对各位审稿专家的支持表示诚挚的感谢!