

早花及晚花灰毡毛忍冬中绿原酸含量分析

余正文^{1,2}, 刘方方¹, 何磊磊¹, 玉秋萍¹, 张妮¹, 宋庆发^{1,2}, 乙引^{1,2}

(1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳, 550001)

(2. 贵州师范大学 贵州省植物生理与发育重点实验室, 贵州贵阳 550001)

摘要: 研究早花和晚花灰毡毛忍冬花蕾及叶中绿原酸含量, 筛选适宜贵州北部推广种植优良品种, 采用超声波辅助提取灰毡毛忍冬中的绿原酸, 高效液相色谱法测定其含量, 色谱条件为: Diamonsil 柱 (5 μm , C18(2), 250 mm \times 4.6 mm), 甲醇/乙腈(5:1)-0.1%磷酸=20:80, 流速 1.0 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 325 nm。结果表明早花品种花蕾中绿原酸含量为 2.36%~3.44%, 叶中绿原酸含量为 0.49%~1.11%; 晚花花蕾中绿原酸含量为 2.60%~4.07%, 叶中绿原酸含量为 1.92%~2.83%。因此晚花灰毡毛忍冬是一种富绿原酸育种系。

关键词: 灰毡毛忍冬; 早花; 晚花; 绿原酸; 高效液相色谱

文章编号: 1673-9078(2012)11-1572-1574

Analysis on the Content of Chlorogenic Acid from Early-flowering and Later-flowering *Lonicera Macranthoides*

YU Zheng-wen^{1,2}, LUI Fang-fang¹, HE Lei-lei¹, YU Qiu-ping¹, ZHANG Ni¹, SONG Qing-fa^{1,2}, YI Yin^{1,2}

(1.School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China) (2.Key Laboratory of Plant Physiology and Development Regulation of Guizhou Province, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: To explore suitable planting fine *Lonicera macranthoides* varieties in north Guizhou, the content of chlorogenic acid in flower buds and leaves of early-flowering and later-flowering varieties were researched. Chlorogenic acid were obtained with ultrasonic wave-assisted extraction technique, and analyzed using HPLC methods with operating condition as follows: Diamonsil (5 μm , C18(2), 250 mm \times 4.6 mm), the volume flow 1.0 mL/min, the column temperature 40 $^{\circ}\text{C}$ and the detection wavelength 325 nm. The mobile phase methanol/acetonitrile (5:1)-0.1% phosphoric acid=20:80. The result showed that the content of chlorogenic acid ranged from 2.36% to 3.44% in flower buds and from 0.49% to 1.11% in leaves of early-flowering *Lonicera macranthoides*. In flower buds and leaves of later-flowering one, it as in the range of 2.60%~4.07% and 1.92%~2.83%, respectively. It was concluded that the later-flowering *Lonicera macranthoides* was a rich-chlorogenic acid breeding strain.

Key words: *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz; early-flowering; later-flowering; chlorogenic acid; HPLC

灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz)系忍冬科忍冬属多年生半常绿木质藤本植物, 与其它同属植物黄褐毛忍冬 (*Lonicera fulvomentosa* Hsu et S.C.Cheng)、红腺忍冬 (*Lonicera hypoglauca*)、华南忍冬收录为山银花的来源品种冬 (*Lonicera confuse* DC)一并被 2010 版《中国药典》^[1]。广泛分布于我国贵州、四川、重庆、湖南、广西等地, 在中药临床中应用较广, 是我国重要的传统中药材之一。其主要药用成分

收稿日期: 2012-06-25

基金项目: 国家自然科学基金(31060056); 贵州师范大学博士科研项目(11904-05032110014); 贵州省中药现代化专项(黔科合中药字[2011]5046号); 贵州省科技基金项目(黔科合J字[2011]2368号); 贵州省科技创新人才团队建设项目(黔科合人才团队[2009]4007号)

作者简介: 余正文(1973-), 男, 博士, 教授, 从事天然产物研究与开发

通讯作者: 乙引, 男, 教授, 从事资源植物学研究

绿原酸具有显著的清热解毒、抗菌消炎、抗衰老作用, 对消化道癌症有明显的抑制作用, 同时还有抗生育作用及对免疫系统的调节作用^[2-4], 有“植物黄金”之美誉, 陶湘辉等^[5]利用大孔树脂分离纯化了灰毡毛忍冬中的绿原酸。该植物株型优、易采摘、花蕾大、种植效益好且适应性强、易繁殖、抗病虫害和抗逆性强, 深得青睐^[6-10]。贵州省绥阳县小关乡是贵州灰毡毛忍冬产量最大、质量最好的产地, 目前该地区广泛种植的灰毡毛忍冬主要有早花和晚花两个品种。早花品种植株矮小, 生物量小, 开花早, 晚花品种植株高大, 生物量大, 开花晚; 二者的花期大约相差 15 d。本文分析两个品种的花蕾和叶中绿原酸的含量, 旨在筛选出适合该地区大量推广种植的灰毡毛忍冬优良品种。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

48份灰毡毛忍冬花蕾及叶样品于2011年6月采于绥阳县小关乡银花村,由贵州师范大学方小平教授鉴定为忍冬科植物灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz)的干燥花蕾和叶,样品存放于贵州师范大学生命科学学院天然产物研究室。

绿原酸纯品(含量>98%,长沙上禾生物科技有限公司);甲醇(AR)(重庆江川化工有限公司)、磷酸(AR)(上海广诺化学科技有限公司);乙腈(色谱纯)(天津市科密欧化学试剂有限公司),其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

岛津LC-20AT型高效液相色谱仪、LC-20AT液相色谱仪(日本岛津公司),SPD-M20A二极管阵列检测器、DGU-20A3真空脱气机、CBM-20A系统控制器、LC-20AT溶液传输单元、CTO-20A柱温箱、手动进样器(日本岛津公司),KQ-500DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);MS-S电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil 色谱柱(5 μm , C18(2), 250 mm \times 4.6 mm),流动相:甲醇/乙腈(5:11)-0.1%磷酸水溶液=20:80,流速1.0 mL/min;柱温40 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:325 nm。

2.2 供试品溶液的制备^[1]

精密称定过40目筛的药材粉末0.10 g放于25 mL容量瓶,用50%甲醇定容,浸泡10 h超声提取30 min放冷,用50%甲醇补足减少的体积,用0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液4 $^{\circ}\text{C}$ 保存作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸对照品10.00 mg用50%甲醇定容至10 mL,配制成1.00 mg/mL的对照品储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保持备用。

2.4 线性关系考察

将绿原酸对照品储备液稀释到0.1 mg/mL、0.01 mg/mL,精密吸取0.01 mg/mL绿原酸对照品2.5、5、10、20 μL ,0.1 mg/mL绿原酸对照品5、7.5、10 μL ,1.0 mg/mL绿原酸对照品2.5、7.5、10 μL ,分别按“2.1”项下色谱条件进样,以对照品进样量(μg)为横坐标,对应的峰面积为纵坐标,得到绿原酸的标准曲线,其回归方程为: $Y=3.9E+6X-6.0E+5$, $R^2=0.9995$,线性范围为0.025~10 μg 。

2.5 精密度实验

精密吸取同一灰毡毛忍冬供试品溶液10 μL ,重

复进样6次,结果见表1。

表1 灰毡毛忍冬中绿原酸精密度实验结果

Table 1 Decision of method for the chlorogenic acid content detection

次数	峰面积
1	1199916
2	1180083
3	1205160
4	1198677
5	1242231
6	1200067
平均值	1204355.67
标准差	20468.03
RSD/%	1.70

从上表中得出绿原酸峰面积的RSD为1.70%,表明该方法精密度良好。

2.6 稳定性实验

在同一灰毡毛忍冬供试品溶液制备后0、3、6、9、12、15 h分别精密吸取供试品溶液2.5 μL 进样,结果见表2。

表2 灰毡毛忍冬中绿原酸稳定性实验结果

Table 2 RSD of the results of chlorogenic acid content detection

时间/h	峰面积
0	355226
3	371554
6	371554
9	371592
12	361674
15	350115
平均值	363619.20
标准偏差	9445.43
RSD/%	2.60

表3 灰毡毛忍冬中绿原酸重复性实验结果

Table 3 Repeatability of the method for the chlorogenic acid content detection

次数	面积	含量
1	373541	1.27
2	350162	1.21
3	376886	1.27
4	354016	1.22
5	375145	1.27
6	350827	1.21
平均值	363429.50	1.24
标准偏差	12992.58	0.03
RSD/%	3.57	2.51

从表 2 中得出日内绿原酸峰面积的 RSD 分别为 2.60%，表明该供试品溶液稳定性良好。

2.7 重复性实验

取同一样品，精密称取 6 份，按“2.1”项下色谱条件进样，并计算出绿原酸的含量，其结果如表 3。

由表 3 可知，峰面积 RSD 为 3.57%，百分含量的 RSD 为 2.42%，表明该方法重复性良好。

2.8 回收率实验

取已知质量分数的黄褐毛忍冬样品 9 份，按照样品中绿原酸含量的约 0.8、1.0 和 1.2 倍加入对照品，按 2.2 项下的方法制备供试液，按 2.1 项下色谱条件进样分析，样品的回收率为 94.63%~102.74%，表明样品提取方法可行。

表 4 绿原酸加样回收实验结果

Table 4 The result of standard recovery test of chlorogenic acid content

样品量/mg	加绿原酸量/mg	实测值/mg	加样回收率/%	相对标准误差(RSD)/%
100	0.99	2.11	94.62	
100	0.99	2.18	97.76	4.14
100	0.99	2.29	102.70	
100	1.24	2.42	97.58	
100	1.24	2.52	101.60	4.34
100	1.24	2.31	93.15	
100	1.88	3.01	96.47	
100	1.88	2.97	95.19	1.50
100	1.88	3.06	98.08	

2.9 样品测定

取按 2.2 项下的方法制备供试液 2.5 μL，按“2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图(见图 1)，并将峰面积代入标曲计算绿原酸含量，结果见表 1。

12 株早花品种中，花蕾中绿原酸含量均在 2.00% 以上，其中 5 株含量为 2.00%~3.00%，7 株含量为 3.00%~4.00%，平均含量为 3.00%；叶中绿原酸含量均在 2.00% 以下，其中 3 株含量为 1.00%~2.00%，9 株含量低于 1.00%，平均含量 0.82%。

12 株晚花品种中，花蕾中绿原酸含量也都在 2.00% 以上，其中 6 株含量为 2.00%~3.00%，5 株含量为 3.00%~4.00%，1 株含量大于 4.00% 以上，平均含量 3.11%；叶中绿原酸含量在 2.00% 左右，最低 1.93%，最高 2.83%，其中 10 株含量大于 2.00% 以上，2 株含量低于 2.00%。

3 结论

3.1 由实验样品测定结果分析可知，在 48 个早花及

晚花灰毡毛忍冬样品中，花蕾中绿原酸含量均达到了药典标准中不低于 2.00% 的标准，表明贵州绥阳小关乡灰毡毛忍冬质量较好。

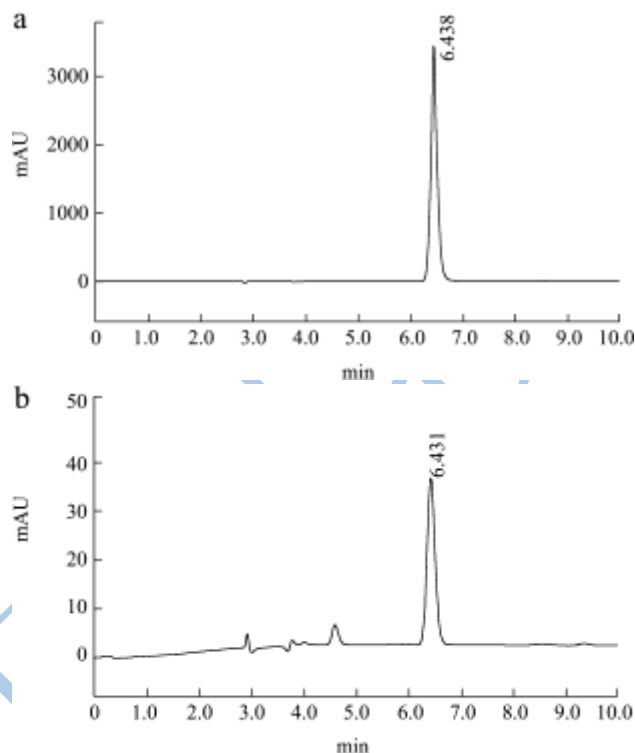


图 1 对照品 (a) 及样品 (b) 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of standards(a) and samples(b)

表 2 早花及晚花品种灰毡毛忍冬花蕾和叶中绿原酸含量

Table 2 The contents of chlorogenic acid in flower buds and leaves of early- and later-flowering *Lonicera macranthoides*

植株	早花品种		晚花品种	
	花蕾/%	叶/%	花蕾/%	叶/%
1	3.44	1.11	4.07	2.31
2	3.44	0.76	3.66	2.32
3	3.25	0.77	3.35	2.18
4	3.24	1.08	3.22	2.83
5	3.16	0.87	3.21	2.41
6	3.12	0.85	3.04	2.67
7	3.09	0.83	2.95	2.17
8	2.85	0.62	2.88	2.04
9	2.77	0.76	2.86	1.92
10	2.76	0.62	2.77	2.12
11	2.55	0.49	2.75	1.93
12	2.36	1.06	2.60	1.96
平均	3.00	0.82	3.11	2.24

3.2 两个品种中，花蕾中绿原酸的含量高于叶；在同一部位，晚花中绿原酸含量总体高于早花的。值得注

意的是,晚花灰毡毛忍冬叶中绿原酸含量普遍较高,均在 1.90%以上,相当于药典上花蕾的含量值,表明该品种的叶也具有较高的工业提取价值。

3.3 晚花品种的株高和冠幅平均为 1.82 m 和 2.34 m,明显优于早花品种的 1.37 m 和 1.74 m,加之其叶和蕾的绿原酸含量均较高,可考虑作为富绿原酸灰毡毛忍冬良种选育的母系。该品种是否可以作为高药用价值的品种进行大规模推广种植,还得结合该药材的其他功效成分,如川续断皂苷乙、灰毡毛忍冬皂苷乙,木犀草苷等化合物的含量以及综合的药理药效实验结果进行综合评价。

3.4 本实验采用超声波辅助提取黄褐毛忍冬中的绿原酸, HPLC 法测定其含量,实验结果表明该方法操作简单,分离效果较好,结果稳定可靠,准确度高。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:第一部[M].中国医药科技出版社,2010
- [2] 苟占平,万德光.金银花品种及其鉴定研究概述[J].中药材,2004,27(3):229-231
- [3] 徐炳声.中药金银花原植物的研究[J].药学学报,1979,14(1):23
- [4] 杜延兵,裘爱泳.绿原酸生物活性、资源及其提取纯化[J].现代食品科技,2006,22(2):250-252
- [5] 陶湘辉,周跃斌,谭文.大孔树脂纯化灰毡毛忍冬中绿原酸的研究[J].现代食品科技,2008,24(6):521-523,531
- [6] 杨福炎,童巧珍.湖南省金银花土流品种绿原酸含量的考察[J].中国药师,2005,8(11):914-915
- [7] 许小方,李会军,李萍,等.灰毡毛忍冬花蕾中的化学成分[J].中国天然药物,2006,4(1):45-48
- [8] 濮祖茂,邢俊波,李萍,等.金银花花部形态学研究[J].中药材,2002,25(12):854-859
- [9] 李会军,张重义,李萍.忍冬不同药用部位挥发油成分的比较研究[J].中药材,2002,25(7):476-477
- [10] 吴卫华,康祯,欧阳冬生,等.绿原酸的药理学研究进展明.天然产物研究与开发[J].2006,18(4):691-94
- [11] 王艳艳,徐晓玉,邓君,等.HPLC法同时测定灰毡毛忍冬中绿原酸与木犀草苷的含量[J].中药材,2009,32(11):1705-1707