

金银忍冬茎和叶中绿原酸的提取及含量测定

胡彦武, 于俊林, 孙仁爽, 王迪 (通化师范学院制药与食品科学系, 吉林通化 134002)

摘要 [目的] 为寻找绿原酸新药源、综合利用金银忍冬提供科学依据。[方法] 采用超声技术提取金银忍冬茎、叶中的绿原酸, 高效液相色谱法对绿原酸含量进行测定。[结果] 检测波长选择为327 nm。绿原酸进样量与峰面积在0.20~1.00 μg 范围内具有良好的线性关系。精密度试验的RSD为1.30%, 说明仪器较精密。稳定性试验的RSD为1.15%。加样回收率试验的RSD为1.35%, 平均回收率为98.52%。金银忍冬叶和茎中均含有绿原酸, 经外标法测定其含量依次为: 叶(1.54%) > 茎韧皮部(0.44%) > 茎木质部(0.42%)。[结论] 超声提取法简单、快速, 检测方法可行, 测定误差较小, 结果较准确, 重现性好, 可用于金银忍冬茎和叶中绿原酸的定量分析。

关键词 金银忍冬; 绿原酸; 高效液相色谱; 含量

中图分类号 S567.1⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)25-10940-02

Extraction and Content Determination of Chlorogenic Acid in the Stems and Leaves of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim

HU Yanwu et al (Department of Pharmaceutics and Food Science, Tonghua Normal College, Tonghua, Jilin 134002)

Abstract [Objective] The objective was to provide a scientific basis for the search of new resource of chlorogenic acid and the multiple utilization for *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. [Method] Chlorogenic acid was extracted from the stems and leaves by ultrasonic technology and its content was determined by HPLC. [Result] The detecting wavelength was selected as 327 nm, the sample volume of chlorogenic acid had good linear correlation with the peak area within 0.20-1.00 μg. RSD value of precision experiment was 1.30%, and it indicated that the instrument was precise. RSD value of stability test was 1.15% and that of spiking recovery test was 1.35%, with the average recovery rate of 98.52%. The stems and leaves of L.M. Maxim had chlorogenic acid with the content from big to small being leaves (1.54%) > stem phloem (0.44%) > stem xylem (0.42%), which was determined by external standard method. [Conclusion] Ultrasonic technology was a simple, rapid and feasible method with small determinate error, accurate result and good reproducibility, and could be applied to the quantitative analysis of chlorogenic acid in the stems and leaves of L.M. Maxim.

Key words *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim; Chlorogenic acid; HPLC; Content

忍冬属是忍冬科中较大的属之一, 全世界约有200种, 我国约100种, 广布于各省区, 以西南、华中地区种类最多^[1]。其中金银忍冬 [*Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim.] 是其中一种, 又名金银木、鸡骨头、狗集谷, 为忍冬科忍冬属植物, 在我国大部分省区均有分布。在湖南作金银花用药, 东北长白山区作民间药用。国内外大部分研究主要集中在其花和果实上, 而对其茎和叶的研究尚未见报道。笔者从开发利用资源的角度, 对金银忍冬茎和叶中绿原酸进行提取, 高效液相色谱法(HPLC)对绿原酸含量进行精确测定, 结果表明, 在金银忍冬茎及叶中均含有绿原酸, 且含量较高, 为寻找绿原酸新药源、综合利用金银忍冬提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器及试剂 美国Agilent 1100型高效液相色谱仪(包括1100四元泵、柱温箱、二极管阵列检测器、Agilent化学工作站), KQ200KDB超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司), AL104 1/10万电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号:110753-200413), 超纯水, 乙腈、甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯。

金银忍冬茎、叶采自通化师范学院校园周边, 经通化师范学院于俊林教授通过原植物分类学鉴定。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品及样品溶液的配制^[2]。精密称取绿原酸对照品约10 ng, 加体积分数50%甲醇定容到10 mL棕色容量瓶中, 制成每1 mL含1 ng的溶液, 从中精密量取1 mL置25 mL棕色容量瓶中, 加体积分数50%甲醇定容, 即得浓度为0.04 ng/mL对照品溶液, 备用。精密称定金银忍冬茎和叶粉末各1 g, 加体积分数50%甲醇50 mL, 精密称重, 超声处理30 min,

放冷, 再称重, 用体积分数50%甲醇补足重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液5 mL, 置25 mL棕色容量瓶中, 加50%甲醇至刻度, 摇匀。0.45 μm微孔滤膜滤过, 弃初滤液, 取续滤液作为样品溶液。

1.2.2 色谱条件。C₁₈柱(4.6 mm×150.0 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.4%磷酸溶液(13:87), 临用前以0.45 μm微孔滤膜过滤并经超声脱气处理; 流速0.8 mL/min; 柱温25℃; 检测波长327 nm; 定量方法: 外标法峰面积定量。

1.2.3 线性关系的考察。精密吸取绿原酸对照品溶液5、10、15、20、25 μL, 依次进样, 测定峰面积, 以绿原酸量(μg)为横坐标, 峰面积(mAU·s)为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为 $Y=416.0745X+0.6715$, $r=0.9998$ ($n=5$), 说明绿原酸进样量与峰面积在0.20~1.00 μg具有良好的线性关系。

2 结果与分析

2.1 测定波长的选择 将绿原酸对照品和供试品溶液在200~400 nm扫描, 其均在327 nm波长处有最大吸收, 所以检测波长选择327 nm。

2.2 精密度实验 取对照品溶液按“1.2.3”色谱条件进行HPLC分析, 重复进样5次, 进样体积10 μL, 绿原酸峰面积的RSD值为1.30%, 说明仪器较精密。

2.3 稳定性实验 精密吸取同一份供试品溶液, 于0、2、4、8、12、24 h各进样10 μL, 结果样品溶液在24 h内基本稳定, 测得RSD值为1.15%。

2.4 加样回收率实验 精密称定已测定含量的金银忍冬叶粉末0.15 g, 5份, 按“1.2.1”方法提取后分别精密加入绿原酸对照品溶液10 mL(经0.45 μm滤膜过滤), 进样10 μL, 测定峰面积, 计算回收率, 平均回收率为98.52%, RSD值为1.35%。

2.5 样品的测定 取“1.2.1”方法制备的金银忍冬茎和叶提取液10 μL, 平行进样3次, 得色谱图, 以外标法计算出样品中绿原酸的含量, 结果见表1。绿原酸对照品和样品HPLC色谱图见图1。

作者简介 胡彦武(1980-), 男, 吉林四平人, 讲师, 从事生药有效成分的分离鉴定及生物活性研究。

收稿日期 2008-06-26

表1 金银忍冬茎和叶中绿原酸含量测定结果 (n=3)

Table 1 The content of chlorogenic acid in the samples (n=3) %

部位 Position	绿原酸平均含量 Average content of chlorogenic acid	RSD
茎韧皮部 Stem phloem	0.44	0.65
茎木质部 Stem xylem	0.42	0.78
叶 Leaf	1.54	0.96

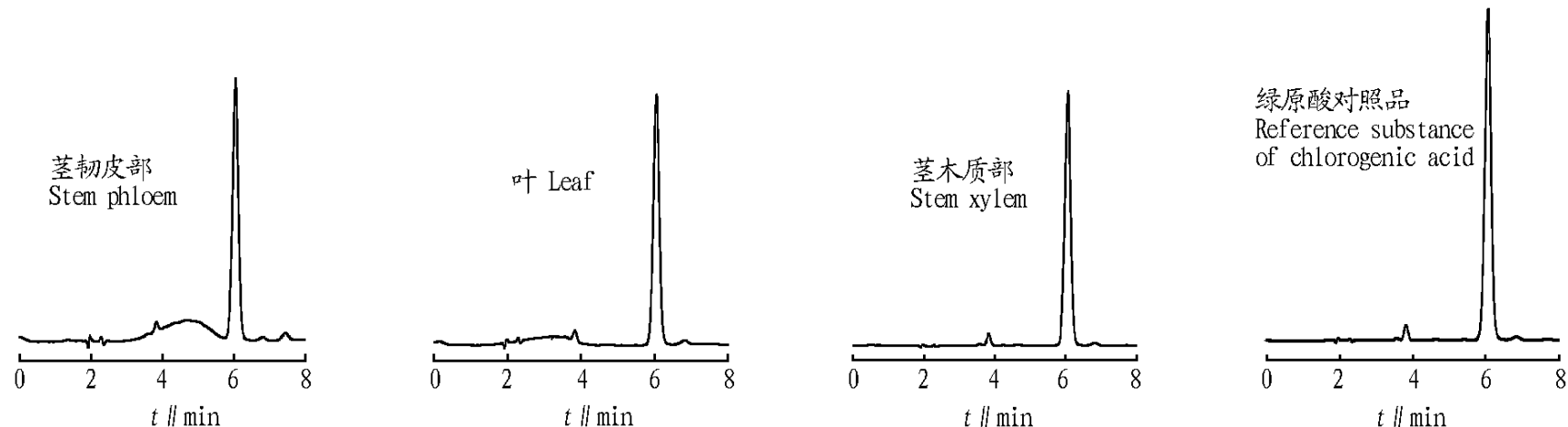


图1 绿原酸对照品和金银忍冬茎和叶样品 HPLC 色谱

Fig.1 HPLC chromatogram of chlorogenic acid reference substance and the samples from the stem and leaf of *Wigelia florida*

茎和叶中均含有绿原酸,尤以叶中含量为高,这为金银忍冬茎及叶的综合开发利用奠定了基础。

(3) 该实验对样品直接以甲醇溶解并经超声处理及微孔滤膜过滤,即可进样测定,由于未经提取等操作,所以测定误差较小,结果较准确,重现性好,可用于金银忍冬茎和叶中绿

3 结论与讨论

(1) 采用超声提取法对金银忍冬叶、茎皮及茎木中绿原酸进行提取,经 HPLC 检测,证实金银忍冬叶和茎中均含有绿原酸,经外标法测定其含量为叶(1.54%) > 茎韧皮部(0.44%) > 茎木质部(0.42%)。

(2) 金银忍冬具有较高的观赏、绿化价值,其茎、叶资源广泛,但药用价值一直未被开发利用。实验证实,金银忍冬

原酸的定量分析。

参考文献

(上接第10939页)

[7] 刘腾飞,吴移谋,余敏君,等.中草药体外抗淋球菌的实验研究[J].中国现代医学杂志,1998,8(6):38-39.

[8] 李仲兴,王秀华,岳云升,等.诃子对335株临床菌株的体外抑菌活性的研究[J].中国中医药科技,2000,7(6):393-394.

[9] 杜平华,朱世真,吕品,等.20种中药材对幽门螺杆菌体外抗菌活性的研究[J].中药材,2001,24(3):188-189.

[10] 傅永红,李红玉,张春江.藏药十八味诃子利尿丸抗菌性研究[J].时珍国医国药,2007,18(2):406-408.

[11] 张燕明,刘妮,朱宇同,等.诃子醇提物抗HBV的体外实验研究[J].中医药学刊,2003,21(3):384-385.

[12] 姚婕,郑江,蒋栋能,等.诃子抗内毒素活性组分的分离及活性评价[J].第三军医大学学报,2005,27(23):2345-2347.

[13] 姚婕,郑江,蒋栋能,等.诃子抗CPG ODN组分的分离及活性评价[J].中国临床药理学与治疗学,2006,11(1):59-61.

[14] 吴庆四,朱长太,徐东芳,等.中药对解脲支原体临床分离株的体外抑制试验研究[J].安徽医药,2006,10(5):332-333.

[15] 张速禹,白喜翠,李春汇,等.诃子醇提取物对实验动物肝功的影响[J].中国民族医药杂志,1997,3(4):41-42.

[16] 魏安池,周瑞宝,瞿水忠.诃子抗氧化性能的研究[J].郑州粮食学院学报,1998,19(1):8-12.

[17] 胡博路,孟洁,胡迎芬,等.30种中草药清除自由基的研究[J].青岛大学学报,2000,13(2):38-40.

[18] 杨怀霞,马庆一,杨林莎,等.茶叶及诃子等植物提取物的抗氧化作用[J].郑州大学学报:医学版,2003,38(3):413-415.

[19] 魏安池,周瑞宝.诃子抗氧化剂的研究[J].中国油脂,1998,23(3):43-45.

[20] 孟洁,杭瑚.诃子抗氧化作用的研究[J].食品科学,2000,21(2):9-12.

[21] 孟洁,杭瑚.诃子对食用油脂抗氧化作用的研究[J].食品科技,2000(2):36-38.

[1] 于加平,王夕宇,马中宇.黄花忍冬果实中绿原酸的提取及含量测定[J].安徽农业科学,2008,36(6):2199-2200.

[2] 中华人民共和国药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:化学工业出版社,2005:152.

[22] 孔琪,李葵,吴春,等.鞣质对动植物油脂的抗氧化活性研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2004,20(1):95-97.

[23] 马丽杰,马渊,张述禹,等.诃子醇提物对离体豚鼠心房肌电生理特性的影响[J].中国民族医药杂志,2006(5):55-56.

[24] 王梦德,张述禹,包存刚,等.诃子对草乌水煎液双酯型二萜类生物碱溶出率的影响[J].中国民族医药杂志,2001,7(3):29-30.

[25] 潘燕,张连禹,侯金凤.诃子对乌头碱致心肌细胞损伤的影响[J].中国民族医药杂志,2002,8(1):32-33.

[26] 王梦德,张述禹,翟海燕.诃子对草乌煎剂毒动力学影响的研究[J].内蒙古医学院学报,2002,2(4):219-222.

[27] 潘燕,张述禹,侯金凤,等.诃子对大鼠心肌酶的影响[J].中国中药杂志,2004,29(4):382-383.

[28] TASDUQ S A, SINGH K, SATHI N K, et al. Terminalia chebula (fruit) prevents liver toxicity caused by sub-chronic administration of ampicillin, isoniazid and pyrazinamide in combination[J]. Hunan & Experimental Toxicology, 2006, 25: 111-118.

[29] 白桦,包狄,刘法.蒙药阿如拉对S180荷瘤小鼠肿瘤生长及血清IL-2、IL-6的影响[J].中国民族医药杂志,2001,7(1):36-37.

[30] 陈翠花,刘爱学.中药在肿瘤治疗中的应用[J].河南中医,2004,24(3):74-75.

[31] SALEEM A, HUSHEEM M, HARKONEN P, et al. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of Terminalia chebula Retz. fruit[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 81: 327-336.

[32] 吕维柏.中药治疗艾滋病研究探讨[J].中国中西医结合杂志,2003,23(7):533-535.

[33] 庞锦江,郑天珍,张小郁,等.生、炙诃子对气管平滑肌收缩活动的影响[J].中药材,2001,24(2):120-122.

[34] 李志恒,那生桑,赫向峰,等.诃子在蒙药中的应用[J].中医药信息,1994,11(4):34.

[35] 王虹,陈凯.溃结宁汤治疗溃疡性结肠炎65例[J].陕西中医,2005,26(9):914-915.