

灰毡毛忍冬不同发育期花蕾中 3 种成分含量的变化研究

丁辉, 邱国玉, 朱仁愿*, 张彩霞, 丁爱华(兰州市食品药品检验所, 兰州 730000)

摘要: 目的 比较灰毡毛忍冬不同发育期花蕾中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量。方法 色谱柱: CAPCELL PAK C₁₈ MG(250 mm×4.60 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.4%醋酸溶液(B), 梯度洗脱; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 紫外检测波长: 330 nm; 蒸发光散射检测器条件: 漂移管温度 110 ℃, 气体流速 3.0 L·min⁻¹, 撞击器关; 柱温: 30 ℃。收集不同发育期(幼蕾期、三青期、大白期、银花期、金花期、凋花期)花蕾样品, 采用 HPLC-UV-ELSD 串联技术, 以外标两点法计算绿原酸的含量, 以外标两点法对数方程计算灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量。结果 灰毡毛忍冬中绿原酸和川续断皂苷乙含量以三青期最高, 分别为 6.934%, 1.800%; 灰毡毛忍冬皂苷乙以幼蕾期最高, 为 9.351%, 较三青期高 0.227%。结论 通过对灰毡毛忍冬花蕾不同发育期的含量比较可见, 最佳采收期为三青期, 此时绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙含量高。

关键词: 灰毡毛忍冬; 花蕾; 绿原酸; 灰毡毛忍冬皂苷乙; 川续断皂苷乙; 高效液相色谱-紫外吸收检测-蒸发光散射检测法; 采收

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)02-0205-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.015

引用本文: 丁辉, 邱国玉, 朱仁愿, 等. 灰毡毛忍冬不同发育期花蕾中 3 种成分含量的变化研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 205-208.

Content Comparison of Three Components in Floral Buds at Different Developmental Stages of *Lonicera Macranthoides* Hand. -Mazz.

DING Hui, QIU Guoyu, ZHU Renyuan*, ZHANG Caixia, DING Aihua(Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the content differences of chlorogenic acid, macranthoidin B and dipsacoside B in floral buds at different developmental stages of *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. **METHODS** The chromatographic column was CAPCELL PAK C₁₈ MG (250 mm×4.60 mm, 5 μm); the mobile phase was acetonitrile (A)-0.4% acetic acid (B) with gradient elution; flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; UV detection wavelength was 330 nm; ELSD testing condition was as follows: tube temperature 110 ℃, gas flow 3.0 L·min⁻¹ and impactor off; column temperature was 30 ℃. Using HPLC-UV-ELSD series technology, the contents of three components in floral buds collected at different developmental stages (Youlei stage, Sanqing stage, Dabai stage, Yinhu stage, Jinhua stage, Diaohua stage) in *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz were measured. The content of chlorogenic acid was calculated by outside the two point method, and the content of macranthoidin B and dipsacoside B was calculated by outside the two point logarithmic equation method. **RESULTS** The contents of chlorogenic acid and dipsacoside B were 6.934% and 1.800%, respectively, were the highest at Sanqing stage in *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. However, the highest content of macranthoidin B was 9.351% at Youlei stage, which was 0.227% higher than that at Sanqing stage. **CONCLUSION** By comparing the contents of chlorogenic acid, macranthoidin B and dipsacoside B in floral buds at different developmental stages in *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz., Sanqing period is the best harvest time with high content.

KEYWORDS: *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.; bud; chlorogenic acid; macranthoidin B; dipsacoside B; HPLC-UV-ELSD; harvest

山银花具有清热解毒, 疏散风热之效, 是常用的中药材, 可用于风热感冒, 温病发热等病症。中国药典 2015 年版一部中收载的山银花为忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.、红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.、华南

忍冬 *Lonicera confuse* DC.或黄褐毛忍冬 *Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S.C. Cheng 的干燥花蕾或带初开的花, 夏初花开放前采收, 干燥^[1]。据文献报道, 山银花分布在南方多省, 其中灰毡毛忍冬栽培量最大, 以湖南隆回为集散地, 并有外销; 红

作者简介: 丁辉, 男, 工程师 Tel: (0931)2315403
(0931)2312648 E-mail: 37028163@qq.com

E-mail: 380886244@qq.com

*通信作者: 朱仁愿, 男, 高级工程师 Tel:

中国现代应用药学 2019 年 1 月第 36 卷第 2 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2019 January, Vol.36 No.2

• 205 •

腺忍冬和黄褐毛忍冬也有栽培，但商品多在产地流通，而华南忍冬来源的山银花药材在市场上已很难发现，基本退出商品主流^[2]。

灰毡毛忍冬作为山银花的主要基原植物，其花蕾簇生，花期短，一般采收期为8~12 d^[3]。研究表明，灰毡毛忍冬花蕾含有有机酸、黄酮类、皂苷类等化学成分^[4]，陈君等^[5]从灰毡毛忍冬花蕾中分离得到灰毡毛忍冬次皂苷甲、灰毡毛忍冬次皂苷乙和山柰酚-3-O-β-D-葡萄糖苷，均为首次从该种植物中分离得到。胡扬帆等^[6]分离得到圣草酚与香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷。

本研究参照中国药典2015年版一部，以绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙为指标，采用HPLC-UV-ELSD串联技术同时测定3种成分，比较不同发育期花蕾中的含量差异，以确定最佳采收时期。

1 材料

1.1 仪器和试剂

Dionex UltiMate 3000 高效液相色谱仪、Chromeleon7 色谱工作站均来自美国戴安公司；2000ES 蒸发光检测器(美国奥泰科技有限公司)；BSA224S-CW 万分之一电子分析天平(德国赛多利斯公司)；MS105DU 十万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)；SBL-10DT 超声清洗仪(功率300 W，频率50 kHz，宁波新芝生物科技公司)；Millipore 超纯水机(美国密理博公司)；绿原酸对照品(批号：110753-201716；纯度：99.3%)、灰毡毛忍冬皂苷乙对照品(批号：111814-201604；纯度：94.4%)、川续断皂苷乙对照品(批号：111813-201202；纯度：93.4%)，均购自中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈均为默克公司色谱纯，醋酸为分析纯，水为超纯水。

1.2 样品

经调查，花农根据花蕾发育阶段不同将其分为幼蕾期、三青期、大白期、银花期、金花期和凋花期^[7]，性状特征见表1。2017年7月，收集到湖南产不同发育期花蕾样品进行实验，经兰州市食品药品检验所中药室张彩霞副主任中药师鉴定均为忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. 的干燥花蕾或带初开的花，各发育阶段的外观形态见图1。

表1 样品信息及性状特征描述

Tab. 1 The data of collection information and macroscopic characteristics of the samples

发育期	性状特征
幼蕾期	呈棒状，长0.5~1 cm，上部稍膨大，似米粒，表面绿色
三青期	呈棒状而稍弯曲，长1.5~2.5 cm，表面绿色至黄绿色，顶部似米粒
大白期	呈棒状而稍弯曲，长2~4 cm，表面黄绿色，顶端稍膨大，微向内弯曲，含苞待放状
银花期	呈棒状而稍弯曲，长2.5~4.5 cm，表面黄色至黄白色，顶部明显膨大，管状花初开，花瓣二唇形
金花期	呈棒状，长2.5~4.5 cm，管状花完全开放，花瓣反转，花柱外露，花金黄色
凋花期	呈棒状，长2.5~4.5 cm，花瓣凋谢，花柱枯萎，棕黄色

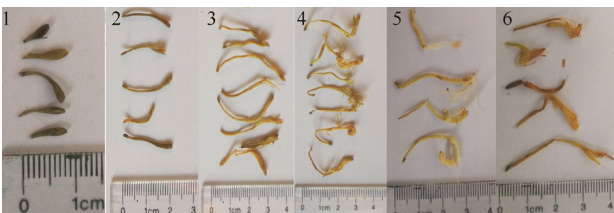


图1 样品性状特征

1-幼蕾期；2-三青期；3-大白期；4-银花期；5-金花期；6-凋花期。

Fig. 1 Macroscopic characteristics of samples

1-Youlei stage; 2-Sanqing stage; 3-Dabai stage; 4-Yinhua stage; 5-Jinhua stage; 6-Diaohua stage.

2 方法与结果

2.1 色谱条件

资生堂 CAPCELL PAK C₁₈ MG 色谱柱(250 mm×4.60 mm，5 μm)；流动相：乙腈(A)-0.4%醋酸溶液(B)，梯度洗脱程序见表2；流速：1.0 mL·min⁻¹；绿原酸用紫外检测器检测，检测波长：330 nm；灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙用蒸发光散射检测器检测，检测条件：漂移管温度为110 ℃，气体流速为3.0 L·min⁻¹，撞击器关；柱温：30 ℃；对照品进样量：2 μL和20 μL；供试品进样量5~10 μL；以外标两点法计算绿原酸的含量，以外标两点法对数方程计算灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量。

表2 梯度洗脱时间

Tab. 2 Gradient elution times

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~10	11.5→15	88.5→85
10~12	15→29	85→71
12~18	29→33	71→67
18~30	33→45	67→55
30.01	11.5	88.5
30.01~40	11.5	88.5

2.2 对照品溶液的制备

取绿原酸对照品、灰毡毛忍冬皂苷乙对照品、川续断皂苷乙对照品适量,精密称定,加 50%甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 0.592 mg、灰毡毛忍冬皂苷乙 0.607 mg、川续断皂苷乙 0.185 mg 的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)40 min,放冷,再称定质量,用 50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适应性试验 精密量取混合对照品溶液 20 μ L,按“2.1”项下色谱条件分析,记录色谱图,考察系统适应性。结果表明,绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的色谱峰均能达到基线分离,其他成分对测定无干扰,色谱图见图 2。

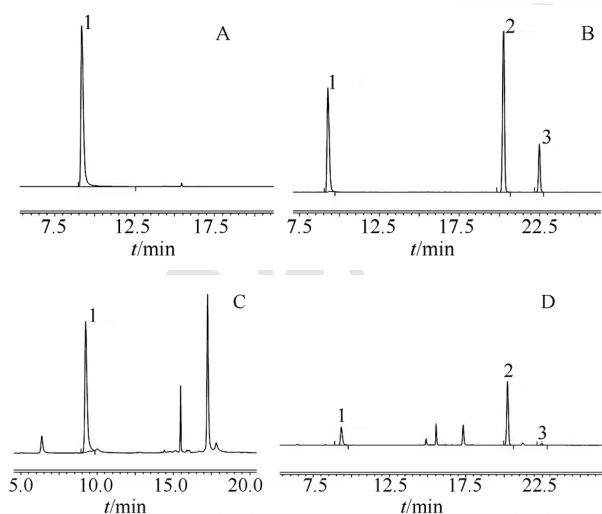


图 2 HPLC 色谱图

A-对照品 UV 色谱图; B-对照品 ELSD 色谱图; C-供试品 UV 色谱图; D-供试品 ELSD 色谱图; 1-绿原酸; 2-灰毡毛忍冬皂苷乙; 3-川续断皂苷乙。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-UV chromatogram of reference substance; B-ELSD chromatogram of reference substance; C-UV chromatogram of sample; D-ELSD chromatogram of sample; 1-chlorogenic acid; 2-macranthoidin B; 3-dipsacoidin B.

2.4.2 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液适量,加 50%甲醇配制成不同浓度的对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件分析,分别进样 20 μ L。紫

外检测器下,按外标两点法,以峰面积为横坐标,进样量(μ g)为纵坐标,绘制标准曲线,得绿原酸线性方程为 $Y=0.0207X+0.0264$, $r^2=1.000$,线性浓度范围为 0.059~0.592 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。蒸发光散射检测器下,按外标两点法对数方程,以峰面积对数为横坐标,进样量(μ g)对数为纵坐标,得灰毡毛忍冬皂苷乙线性方程为 $Y=0.674X-0.5441$, $r^2=1.000$,线性浓度范围为 0.060~0.607 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;川续断皂苷乙线性方程为 $Y=0.6081X-0.5113$, $r^2=1.000$,线性浓度范围为 0.018~0.185 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.4.3 仪器精密度试验 精密量取混合对照品溶液 20 μ L,按“2.1”项下的色谱条件进行分析,连续进样 6 次,计算得绿原酸峰面积的 RSD 为 0.25%($n=6$)、灰毡毛忍冬皂苷乙峰面积的 RSD 为 1.81%($n=6$)、川续断皂苷乙峰面积 RSD 为 0.73%($n=6$),说明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取幼蕾期样品 1 份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 各进样 1 次,测定峰面积,计算得绿原酸峰面积的 RSD 为 1.53%($n=6$)、灰毡毛忍冬皂苷乙峰面积的 RSD 为 0.69%($n=6$)、川续断皂苷乙峰面积 RSD 为 1.17%($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取幼蕾期样品 6 份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进行测定,测得绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的平均含量($n=6$)分别为 5.932%, 9.350%和 1.794%,RSD 分别为 0.55%, 0.63%和 0.72%。说明重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取幼蕾期样品 6 份,加入绿原酸对照品、灰毡毛忍冬皂苷乙对照品和川续断皂苷乙对照品适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液进行测定,记录色谱图,绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的平均回收率($n=6$)分别为 97.60%, 95.60%和 96.33%,RSD 分别为 2.03%, 0.83%和 1.43%。结果见表 3。

2.5 样品测定

取实验样品按“2.3”项下方法制备供试品溶液,进行测定,记录色谱图见图 2,测定结果见表 4。

表 3 3 种成分的回收率试验结果(n=6)

Tab. 3 Results of recovery tests in three constituents(n=6)							
成分	称样量/ g	样品中 含量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
绿原酸	0.250 1	14.83	10.13	24.61	96.56	97.60	2.03
	0.250 9	14.88	10.08	24.65	96.97		
	0.251 3	14.90	10.21	25.07	99.61		
	0.250 5	14.85	10.09	24.38	94.43		
	0.251 1	14.89	10.11	24.91	99.13		
	0.249 8	14.81	10.23	24.93	98.92		
灰毡毛 忍冬皂 苷乙	0.250 1	23.39	16.99	39.78	96.49	95.60	0.83
	0.250 9	23.46	17.08	39.7	95.07		
	0.251 3	23.50	17.15	40.09	96.74		
	0.250 5	23.42	16.83	39.41	94.98		
	0.251 1	23.48	17.25	39.89	95.13		
	0.249 8	23.36	17.33	39.85	95.16		
川续断 皂苷乙	0.250 1	4.48	5.05	9.35	96.45	96.33	1.43
	0.250 9	4.49	5.01	9.29	95.74		
	0.251 3	4.50	5.08	9.48	98.02		
	0.250 5	4.49	5.07	9.26	94.15		
	0.251 1	4.50	5.03	9.33	96.08		
	0.249 8	4.47	5.06	9.41	97.55		

表 4 样品测定结果(n=3)

Tab. 4 Determination result of samples(n=3)			
发育期	绿原酸 含量/%	灰毡毛忍冬 皂苷乙含量/%	川续断皂苷 乙含量/%
幼蕾期	5.929	9.351	1.791
三青期	6.934	9.124	1.800
大白期	5.239	8.317	0.867
银花期	4.579	6.870	0.643
金花期	2.806	4.718	0.424
凋花期	2.036	3.919	0.371

3 讨论

灰毡毛忍冬收载于中国药典 2015 年版一部山银花项下, 为干燥花蕾或带初开的花, 并规定含绿原酸不得少于 2.0%, 含灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的总量不得少于 5.0%。由表 1 可知, 三青期、大白期及银花期花蕾就外观性状而言, 入药符合质量要求, 而幼蕾期、金花期和凋花期性状与药典描述不符。

本实验测定了不同发育期的灰毡忍冬花蕾中多成分的含量, 由表 4 可知, 样品中含量均符合药典规定的限值, 但是含量差异显著, 绿原酸在 2.036%~6.934% 之间, 灰毡毛忍冬皂苷乙在

3.919%~9.351% 之间, 川续断皂苷乙在 0.371%~1.800% 之间, 其中绿原酸、川续断皂苷乙在三青期含量最高, 灰毡毛忍冬皂苷乙在幼蕾期含量最高, 比三青期高 0.227%, 由此表明, 灰毡毛忍冬药材采收应以三青期为最佳采收期^[8]。

灰毡毛忍冬花期短, 植株生长发育较快, 不同采收期的外部形态和质量有着明显的变化, 因此对不同采收标准进行深入研究, 对于药材合理采收、提高药材质量具有深远意义^[9-11]。

本研究比较了不同发育期的灰毡毛忍冬花蕾中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙及川续断皂苷乙含量的高低, 对于含量与产量之间的关系以及产地加工方式(晒干、烘干、杀青烘干等)对含量的影响未做考察, 下一步将继续探讨研究。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 30-31.
- [2] KANG S, ZHANG J, WANG Y D, et al. Pharmacognostic authentication study for *Lonicerae Japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2014, 34(11): 1913-1921.
- [3] GAO L x. Determination of total triterpenoid saponin in different buds stages of *Lonicerae* flos [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2013, 30(10): 1110-1113.
- [4] 李锦荣, 吴洪文. 山银花化学成分与药理活性研究进展[J]. *北方药学*, 2014, 11(2): 71-73.
- [5] CHEN J, XU X F, CHAI X Y, et al. Chemical constituents in the buds of *Lonicera macranthoides* [J]. *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2006, 4(5): 347-351.
- [6] HU Y F, WU C C. Chemical constituents from stems of *Lonicera macranthoides* [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2012, 35(1): 66-69.
- [7] YANG X X, BAO Y R, WANG S, et al. Study on the quality evaluation of honeysuckle in different harvest time [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2015, 26(6): 1466-1468.
- [8] GAO L X. Determination of total triterpenoid saponin in different buds stages of *Lonicerae* Flos [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2013, 30(10): 1110-1113.
- [9] GUO G Y, LIU L, HU Q, et al. Compare study on the content of chemical components and quality of different period's spring xinyangmaojian tea [J]. *Food Sci Technol*(食品科技), 2007(9): 141-144.
- [10] XU X Y, ZHENG Y M, FU S Q, et al. Determination of content of capsaicin in *Capsicum annuum* by HPLC [J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2007, 28(11): 229-233.
- [11] 容穗华, 林海, 高妮. 不同产地当归中主要有效成分的含量测定[J]. *当代医学*, 2011, 17(22): 140-141.

收稿日期: 2018-02-19

(本文责编: 曹粤锋)