

文章编号: 1000-5471(2011)01-0173-05

# “雷雨一号”山银花及其培育亲本 绿原酸含量测定<sup>①</sup>

刘豫东, 张桂伟, 刘世尧

西南大学 园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400716

**摘要:** 以普通山银花作对照, 采用紫外分光光度法, 测定“雷雨一号”山银花及其培育亲本叶片和花蕾提取物中绿原酸的吸光值, 并根据标准溶液回归曲线计算样品中绿原酸含量. 结果表明, 绿原酸浓度在 0.02~0.10 mg/mL 范围内与吸光度线性关系良好( $R^2=0.999\ 1$ ); 加样回收率平均值为 99.98% ( $n=9$ ),  $RSD=1.48\%$ ; “雷雨一号”、砧木亲本、接穗亲本干燥花蕾绿原酸含量分别为 7.69%, 4.75%, 12.58%, 均高于对照药材绿原酸含量 4.43%.

**关键词:** 山银花; 雷雨一号; 紫外分光光度法; 绿原酸

**中图分类号:** Q949.781.2

**文献标志码:** A

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.)或华南忍冬(*Lonicera confuse* DC.)的干燥花蕾或带初开的花, 味甘、寒, 归肺、心、胃经, 具有清热解毒, 凉散风热之功效, 用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温热发病等症, 药品市场需求量大, 山银花中含有挥发油、黄酮类、有机酸、醇、酯类、三萜皂苷类、裂环环烯醚萜苷类等多种化学成分<sup>[1]</sup>, 绿原酸( $C_{16}H_{18}O_9$ )是山银花药材的主要有效成分<sup>[2]</sup>. 绿原酸是由咖啡酸与奎尼酸组成缩酚酸, 又名 3-咖啡酰奎尼酸, 化学名 3-O-咖啡酰奎尼酸, 是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素类化合物<sup>[3]</sup>. 现代药理学研究表明, 绿原酸具有广泛的抗菌、抗炎、抗病毒、保肝利胆作用<sup>[4]</sup>. 近年来山银花药用量逐年增加, 2005 年版《中国药典(一部)》增列山银花项, 将灰毡毛忍冬、红腺忍冬和华南忍冬的干燥花蕾或带初开的花作为山银花的法定来源并规定其主要成分绿原酸含量不得少于 1.5%<sup>[2]</sup>. 药材质量优劣取决于有效成分含量的高低, 有研究报道, 山银花花蕾中绿原酸含量远高于正品金银花, 更宜作为绿原酸的提取原料<sup>[4]</sup>, 但是不同山银花的有效成分含量也有很大差别, 山银花“雷雨一号”是贵州省道真县千山药业有限公司以灰毡毛忍冬为砧木, 以鸡笼山特产山银花为接穗培育而成, 集接穗叶大、花针长、花蕾整齐与砧木直立、高产等优良性状, 解决了原品种低产难题.

本研究以产区普通山银花品种红腺忍冬为对照, 以绿原酸含量为指标, 利用紫外分光光度法对“雷雨一号”及其砧木和接穗叶片和花蕾中的绿原酸含量进行了测定, 旨在为山银花“雷雨一号”药材品质的优劣提供鉴定和科学依据.

## 1 仪器、试剂与材料

### 1.1 仪器

XS-02A 型小型多功能粉碎机(东莞市隆鑫机电设备有限公司); KQ5100 型超声清洗器(上海正慧工

① 收稿日期: 2010-08-12

作者简介: 刘豫东(1992-), 男, 河南太康人, 主要从事植物资源化学研究.

通讯作者: 刘世尧, 讲师.

贸有限公司), TDL-5A 型非恰尔台式高速离心机(上海非恰尔分析仪器有限公司), DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司), RE-52 型旋转蒸发仪(上海亚荣系列化仪器厂), FC104 型万分之一电子分析天平(杭州汇尔分析仪器有限公司), U-1800 型紫外/可见分光光度计(日本 HITACHI 公司).

## 1.2 试剂

甲醇、石油醚、95%乙醇, 均为分析纯;

绿原酸标准品(中国药品生物制品检定所, 规格: 每瓶 20 mg, 批号: 110753-200413), 其结构式见图 1.

## 1.3 药材样品

山银花药材样品由道真仡佬族苗族自治县千山药业有限公司提供, 经西南大学园林园艺学院植物学教研室王海洋教授鉴定, “雷雨一号”山银花的砧木为灰毡毛忍冬, 接穗为红腺忍冬, 对照药材也为一红腺忍冬, 供试样品分别于 2009 年 6 月下旬山银花盛花前期采摘叶片和花蕾, 每个样品重复 3 次采样. 采样资料详见表 1.

表 1 样品采集信息表

采样序号	花蕾样品采集说明	采样序号	叶片样品采集说明
样 1	山银花“雷雨一号”花蕾阴干	样 6	山银花“雷雨一号”叶片阴干
样 2	山银花“雷雨一号”花蕾烘干	样 7	道真县普通山银花叶片阴干
样 3	道真县普通山银花花蕾阴干	样 8	“雷雨一号”砧木亲本叶片阴干
样 4	“雷雨一号”砧木亲本花蕾阴干	样 9	“雷雨一号”接穗亲本叶片阴干
样 5	“雷雨一号”接穗亲本花蕾阴干		

## 2 方法与结果

### 2.1 供试溶液的制备

供试样品在电热恒温鼓风干燥箱内 60 °C 恒温干燥 48 h, 干燥器冷至室温, 小型多功能粉碎机粉碎, 过 80 目筛, 装袋备用. 分别精确称取供试样品干粉约 250 mg 置入具塞三角瓶内, 20 mL 甲醇超声提取 30 min, 重复提取 3 次, 合并滤液, 减压浓缩, 95%乙醇定容到 50 mL 容量瓶, 摇匀. 再精密称取 1 mL 样品提取液, 置 25 mL 容量瓶甲醇定容, 获得供试样品提取液, 备用.

### 2.2 标准品溶液的制备

精密称取 10 mg 绿原酸标准品于 100 mL 容量瓶, 100%甲醇定容, 摇匀, 制成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的绿原酸标准品溶液, 备用.

### 2.3 检测波长的选择

将绿原酸的甲醇溶液在紫外光光谱范围内(200~400 nm)作全波长扫描, 扫描结果表明, 绿原酸甲醇溶液在 219 nm 和 327 nm 波长处有两个特征性吸收峰, 其中 327 nm 波长处的吸收峰灵敏度较高, 故选择 327 nm 作为检测波长(图 2).

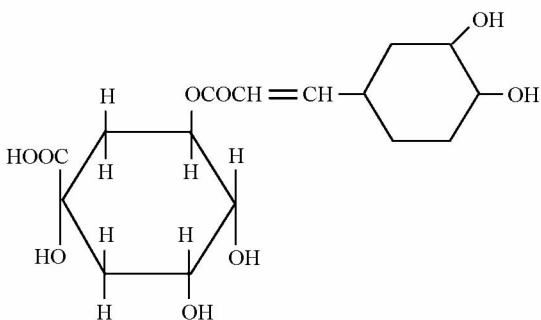


图 1 绿原酸结构式

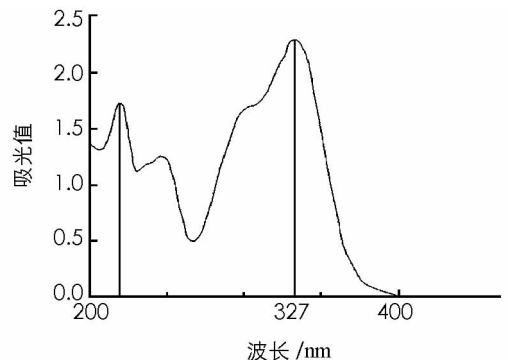


图 2 绿原酸标准品溶液全波长吸收曲线

## 2.4 精密度试验

精密称取绿原酸对照品储备液 1 mL, 100% 甲醇 10 mL 容量瓶定容至刻度, 用石英比色杯在 327 nm 波长处以甲醇空白作对照比色测定吸光值. 供试液连续比色测定 6 次, 每个样品读数 3 次, 记录吸光度, 取其平均值计算样品绿原酸含量, 各样品绿原酸含量的 RSD=0.68%, 表明仪器精密度良好.

## 2.5 稳定性试验

取同一批山银花“雷雨一号”花蕾烘干样, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 分别放置 1, 2, 4, 8, 16 h 后在紫外分光光度计 327 nm 比色法测定吸光值, 每个样品测定 3 次, 记录吸光度, 并取其平均值计算样品中绿原酸含量. 结果, RSD=2.03%, 表明供试品溶液在 16 h 内稳定性良好.

## 2.6 重现性试验

取同一批山银花“雷雨一号”花蕾烘干样, 分别称量 6 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 通过平行操作提取、制备供试品溶液, 分别在紫外分光光度计 327 nm 比色法测定吸光值, 每个样品测定 3 次, 记录吸光度, 并取其平均值计算样品中绿原酸含量. 结果, RSD=1.86%, 表明方法重现性良好.

## 2.7 加样回收率试验<sup>[5-6]</sup>

取已知含量的山银花“雷雨一号”花蕾烘干样(绿原酸含量为 7.69%)9 份, 每个样品精密称取 0.125 g, 分高、中、低 3 组分别加入 0.1 mg/mL 的绿原酸对照液 10, 15, 20 mL, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 紫外分光光度计 327 nm 比色法测定供试液吸光值, 计算样品中绿原酸含量, 并按公式: 加样回收率(%)=(加标样品测定值-样品测定值+加标量)/加标量×100%), 计算加样回收率, 结果详见表 2.

表 2 加样回收率试验结果(n=9)

取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
0.124	9.536	10.0	11.541	100.51	
0.125	9.613	10.0	11.608	99.59	
0.125	9.613	10.0	11.597	98.46	
0.124	9.536	15.0	12.522	99.06	
0.127	9.766	15.0	12.759	99.52	1.48
0.123	9.459	15.0	12.459	100.05	
0.125	9.613	20.0	13.605	99.60	
0.125	9.613	20.0	13.602	99.45	
0.126	9.689	20.0	13.762	103.62	

由表 2 可知, 平均回收率为 99.98%(n=9), RSD=1.48%. 说明方法的回收率稳定可靠.

## 2.8 标准曲线的绘制

取洁净的 10 mL 容量瓶 6 个, 分别精密量取绿原酸储备液 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mL, 并以 100% 甲醇 10 mL 容量瓶定容至刻度, 在 327 nm 波长处以甲醇空白作对照, U-1800 型紫外/可见分光光度计用石英比色杯比色测定吸光值, 根据质量浓度与吸光值的对应关系绘制标准曲线, 得到回归方程, 其回归方程为:  $y=0.158x-0.1258$  (x: 标准品质量浓度; y: 327 nm 吸光值), 绿原酸质量浓度在 5~25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  线性关系良好,  $R^2=0.9991$  (表 3, 图 3).

表 3 标准品质量浓度与吸光值记录表

质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	吸光度 1	吸光度 2	吸光度 3	平均吸光度
5	0.122	0.124	0.120	0.122
10	0.401	0.403	0.402	0.402
15	0.671	0.667	0.663	0.667
20	0.898	0.898	0.897	0.898
25	1.170	1.168	1.171	1.170

## 2.9 样品含量测定

分别精密称取供试山银花样品 250 mg, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 以空白样品为对照, 在 U-

1800 型紫外/可见分光光度计上进行比色测定,记录各样品吸光度值,分别计划各样品中绿原酸含量,计算公式为:样品绿原酸含量(100%)=(样品 OD 值+0.1258)/0.158×稀释倍数 2×稀释倍数 1÷取样量(mg)×100%,结果详见表 4.

表 4 样品含量测定结果(n=3)

样号	取样量/mg	吸光度 1	吸光度 2	吸光度 3	平均吸光度	提取液稀释倍数	提取液绿原酸质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	样品绿原酸含量/%
样 1	254	0.563	0.529	0.530	0.541	1 250	12.87	6.33
样 2	250	0.695	0.658	0.659	0.671	1 250	15.38	7.69
样 3	253	0.344	0.337	0.335	0.339	1 250	8.97	4.43
样 4	251	0.369	0.369	0.368	0.369	1 250	9.55	4.75
样 5	251	1.183	1.182	1.183	1.183	1 250	25.26	12.58
样 6	268	0.094	0.093	0.093	0.093	1 250	4.23	1.97
样 7	256	0.110	0.110	0.114	0.111	1 250	4.58	2.24
样 8	258	0.280	0.277	0.280	0.279	1 250	7.81	3.79
样 9	250	0.180	0.183	0.183	0.182	1 250	5.94	2.97

由表 4 可知,“雷雨一号”山银花、砧木亲本、接穗亲本的干燥花蕾绿原酸含量分别为 7.01% (为阴干样和烘干样品绿原酸含量平均值)、4.75%,12.58%,均高于对照药材的 4.43%;叶片样品绿原酸含量分别为 1.97%,3.79%,2.97%,与对照药材叶片的绿原酸含量(2.24%)相近。“雷雨一号”山银花继承了接穗亲本高绿原酸含量,但改变了接穗亲本藤本性状为木本,产量也明显增加。“雷雨一号”山银花药材新品种烘干花蕾绿原酸含量要比阴干样品高 1.36%,说明快速烘干比常规阴干更有利于减少山银花药材有效成分的损失,快速烘干适合于山银花药材的规模化加工.

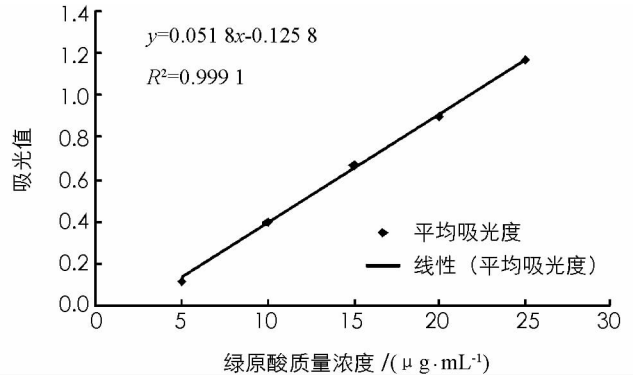


图 3 绿原酸标准曲线

### 3 讨 论

山银花中绿原酸含量的检测方法主要有分光光度法和高效液相色谱法<sup>[6-8]</sup>,其中高效液相色谱法精密度高、重现性好,可准确测定样品中有效成分含量,但是其样品制备过程复杂,检测成本较高,不适用于生产流通领域的药材样品快速检测.基于朗伯-比尔(Lambert-Beer)定律的分光光度法具有供试样品制备简单、使用范围广、灵敏度高的特点,被广泛应用于山银花药材绿原酸的定量分析<sup>[9]</sup>.本文以普通山银花样品作对照,利用紫外可见分光光度法对贵州省道真县山银花药材新品种“雷雨一号”及其培育亲本叶片和花蕾中绿原酸含量进行测定,测定结果可以为山银花类药材绿原酸含量快速检测奠定基础.

有效成分含量是药材和中成药制剂的内在质量的重要指标,中国药典规定山银花药材绿原酸含量不得少于 1.5%<sup>[1]</sup>.研究表明,“雷雨一号”、砧木亲本、接穗亲本及当地普通山银花干燥花蕾绿原酸含量分别为 7.69%,4.75%,12.58%,4.43%,均高于药典规定;“雷雨一号”山银花产量在超过其选育接穗亲本 3 倍的基础上,干燥花蕾绿原酸含量高达 7.69%,充分表明该药材品种选育的成功性;阴干样品较烘干样品绿原酸含量低 1.66%,说明加工方法对山银花药材的有效成分有一定的影响,烘干法有利于减少山银花药材有效成分的损失;“雷雨一号”山银花干燥叶片绿原酸含量约为 1.97%,高于药典规定标准,可以加以开发利用.

研究表明,“雷雨一号”山银花药材绿原酸含量低于其培育接穗,但明显高于其培育砧木及对照药材有效成分含量,因此“雷雨一号”是一种高产、优质的山银花药材新品种,可以在适生区域大面积推广.

## 参考文献:

- [1] 辛宁, 黄陆良, 丰杰, 等. 广西产山银花 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2009, 32(2): 185—187.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典, I 部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 21—22.
- [3] 高锦明, 张鞅灵, 张康健, 等. 绿原酸分布、提取与生物活性研究综述 [J]. 西北林学院学报, 1999, 14(2): 73—82.
- [4] 孙健, 吴国娟. 绿原酸的研究进展 [J]. 中兽医学杂志, 2009(1): 47—50.
- [5] 周日宝, 童巧珍. 灰毡毛忍冬与正品金银花的绿原酸含量比较 [J]. 中药材, 2003, 26(6): 399—400.
- [6] 王柏强. 差示分光光度法测定杜仲叶提取液中绿原酸含量 [J]. 川北医学院学报. 2008, 23(5): 461—463.
- [7] 李春红, 何兵, 田吉. 川渝产山银花中绿原酸和总绿原酸的测定 [J]. 华西药学杂志, 2009, 24(1): 95—96.
- [8] 郑敏, 彭敬东, 王丽峰. 金银花和金银花露中绿原酸和 4 种黄酮含量的测定 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(1): 45—48.
- [9] 苟占平, 万德光. 分光光度法测定 5 种 1 变种金银花中绿原酸含量 [J]. 时珍国医国药. 2005, 16(4): 282—283.

## Determination of Chlorogenic Acid Content in Flos Ionicerae “Lei-Yu No1” and Its Parents

LIU Yu-dong, ZHANG Gui-wei, LIU Shi-yao

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University / Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400716, China

**Abstract:** Spectrophotometry was used to measure the OD value of the extracts from the dryflower buds and leaves of Flos Ionicerae variety “Lei-Yu No1” and its parents, with ordinary medicinal *F. Ionicerae* as the control, and chlorogenic acid content of the samples (detecting wavelength: 327nm) was calculated according to the standard curve regression equation. The results showed that within a range of 0.02~0.10 mg/mL, chlorogenic acid concentration was in a significantly linear relationship with OD value ( $R^2=0.9991$ ), and the average recovery was 99.98% (RSD=1.48%,  $n=9$ ). Chlorogenic acid content of “Lei-Yu No1” and its rootstock and scion parents was 7.69%, 4.75% and 12.58%, respectively, all being higher than the control (4.43%).

**Key words:** Flos Ionicerae; Lei-Yu No1; UV-spectrophotometry; chlorogenic acid

责任编辑 欧 宾