

· 中药农业 ·

阴坡、阳坡连翘及连翘叶中不同成分含量的比较[△]

王芳, 白吉庆, 黎丹, 王小平*, 王金, 胡锦涛

(陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的:** 比较阴坡、阳坡对连翘及连翘叶中不同成分含量的影响。**方法:** 采用 HPLC 法测定连翘及连翘叶中芦丁、连翘酯苷 A 及连翘苷的含量, 采用水蒸汽蒸馏法提取并测定连翘中挥发油的含量。**结果:** 阴坡、阳坡连翘中挥发油、连翘苷和连翘酯苷 A 的含量差异均不明显; 阴坡、阳坡连翘叶中芦丁、连翘苷的含量差异不明显, 但连翘叶中连翘酯苷 A 的含量差异显著, 阴坡含量高达 10.0% 以上, 阳坡含量仅 2.65%; 连翘叶中主要成分的含量阴坡均高于阳坡; 在同一坡向, 连翘叶中连翘苷和连翘酯苷 A 的含量均高于连翘中含量, 特别是连翘酯苷 A 的含量在连翘叶中几乎是连翘中 9 倍。**结论:** 阴坡、阳坡对连翘中的主要成分的含量没有显著影响, 而连翘叶中主要成分的含量阴坡高于阳坡, 并且连翘叶中连翘酯苷 A 的含量阴坡、阳坡影响较大, 有统计学意义。

[关键词] 阴坡; 阳坡; 连翘; 连翘叶; 连翘酯苷 A

Comparative Study on Content of Constituents in Fruits and Leaves of *Forsythia suspensa* Growing on Shade and Sunny Slope

WANG Fang, BAI Jiqing, LI Dan, WANG Xiaoping*, WANG Jin, HU Jinping

(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the content of different constituents in fruits and leaves of *Forsythia suspensa* growing on shady and sunny slope. **Methods:** HPLC was used to determine the content of rutin, forsythiaside A and phillyrin. The steam distillation was applied in the determination of volatile oil. **Results:** In *F. suspensa*, the content of volatile oil, forsythiaside A and phillyrin was not significant difference growing on shady and sunny slope; In *F. Suspensa* Leaves, the difference was insignificant of the content of rutin and forsythiaside A in shady and sunny slope. While a significant difference was existed in the content of forsythiaside A, the content of shady slope was as high as 9.0%, the content of sunny slope was only 6.3%; The content of main components in *F. Suspensa* leaves in shady slope were higher than in sunny slope; In the same slope direction, the content of forsythiaside A and phillyrin in *F. Suspensa* leaves were higher than *F. suspensa* fruits, especially the content of forsythiaside A in *F. Suspensa* leaves was almost nine times in *F. suspensa* fruits. **Conclusions:** Shady sunny slope has no significant effect on the content of the main ingredient in *F. suspensa* fruits, while the content of main components in *F. Suspensa* leaves of shady slope was higher than that of the sunny slope, especially the content of forsythiaside A, with statistical significance.

[Keywords] Shady slope; sunny slope; *Forsythia suspensa*; *Forsythia suspensa* leaves; forsythiaside A

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2016.2.014

连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 具有清热解毒, 消肿散结, 疏散风热之功效^[1]。其叶夏、秋季采集, 鲜用或晒干, 具有清热解毒之功效^[2]。二者具有基本相同的化学成分^[3]。现代药理研究表明, 连翘及其叶具

有抑菌、降血糖、抗病毒、抗氧化、抗肝损伤、抗衰老、抑制癌细胞增殖等多种生物活性^[4-9]。有研究表明, 由于阴坡、阳坡植物土壤含水量、含氮、磷及有机物量的差异, 植物生长和产量等均有所不同^[10], 本实验取以阴坡、阳坡的连翘及连翘叶为研究对象,

[△][基金项目] 科技部项目(11C26216103652); 工业和信息化部项目([2012] 369号); 陕西省科技厅项目(2014K14-01-01); 陕西省教育厅(2013JK0834)

*[通信作者] 王小平, 教授, 研究方向: 中药质量评价及新药开发; Tel: (029)38185165, E-mail: wangxiaoping323@126.com

以挥发油、芦丁、连翘酯苷 A 和连翘苷的含量为评价指标,对阴坡、阳坡连翘及连翘叶进行比较分析,为连翘及其叶的进一步开发利用提供科学参考。

1 仪器与试剂

101-2 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器设备有限公司),赛多利斯 BT125D 型双量程电子分析天平(赛多利斯股份有限公司),戴安 UitiMate 3000 全自动高效液相色谱仪(二极管阵列检测器)。

连翘苷对照品(批号:110821-200711);芦丁对照品(批号:080-9705);

连翘酯苷 A 对照品(批号:111810-201103);上述对照品均购自中国药品生物制品检定研究院。乙腈为色谱纯;水为纯化水;冰醋酸等为分析纯。

连翘及连翘叶于 2013 年 7 月、8 月间采于陕西省铜川市耀州区小丘镇,每个样本数不低于 3 批,经陕西中医学院白吉庆副教授鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspense*(Thunb.) Vahl 的果实及其叶。

2 方法与结果

2.1 药材处理

将采摘下的连翘及连翘叶 60 ℃ 干燥至水分低于 10.0%,取出,即得。

2.2 连翘中挥发油的测定^[1]

取连翘粉末约 30 g(过五号筛),置圆底烧瓶中,加水 300 ml 与玻璃珠数粒,连接挥发油测定器与回流冷凝管。自冷凝管上端加水使充满挥发油测定器的刻度部分,以溢流入烧瓶为止,置电热套中缓缓加热至微沸,并保持 5 小时至油量不再增加,停止加热,放置 1 小时,再开启活塞使油层下降至其上端恰与刻度 0 平齐,读取挥发油量,并计算供试品中所含挥发油的含量(%)。

2.3 连翘中连翘苷与连翘酯苷 A 的含量测定^[1] 连翘苷

色谱条件与系统适用性试验 采用 HPLC 法,色谱柱为 Hypersil GOLD C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),乙腈-水(25:75)为流动相,体积流量 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 277 nm,柱温为 25 ℃。理论塔板数按连翘苷峰计算应不低于 3000。

对照品溶液的制备 精密量取连翘苷对照品 3.96 mg,置 25 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀。

供试品溶液的制备 取各样品粉末(过五号筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 15 mL,称定重量,浸渍过夜,超声 25 分钟,放冷,补足重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 mL,蒸至近干,加中性氧化铝 0.5 g 拌匀,加在中性氧化铝柱上,用 70% 乙醇 80 mL 洗脱,收集洗脱液,浓缩至干,残渣用 50% 甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

分别精密吸取上述对照品溶液 1、2、3、4、5、6、8、10 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件分析测定,每个体积进样 2 次,记录各对照品的峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),对照品质量为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程: $Y_{\text{连翘苷}} = 7.861X + 0.09$, $r = 1$;结果表明连翘苷在 0.16 ~ 1.90 μg 线性关系良好。

测定法 精密吸取供试品溶液适量,注入液相色谱仪测定,代入上述回归方程计算,即得。

连翘酯苷 A

色谱条件与系统适用性试验 采用 HPLC 法,色谱柱为 Hypersil GOLD C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),乙腈-0.4% 冰醋酸溶液(15:85)为流动相,体积流量 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 330 nm,柱温为 25 ℃。理论塔板数按连翘酯苷 A 峰计算应不低于 3000。

对照品溶液的制备 精密量取连翘酯苷 A 对照品 4.76 mg,置 50 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀。

供试品溶液的制备 取各样品粉末(过五号筛)约 0.01 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 15 mL,称定重量,超声 30 min,取出,放冷至室温,再称定重量,用 70% 甲醇补足重量,过滤,取续滤液,即为供试品溶液。

分别精密吸取上述对照品溶液 1、2、3、4、5 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件分析测定,每个体积进样 2 次,记录各对照品的峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),对照品质量为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程:

$Y_{\text{连翘酯苷A}} = 17.98X + 0.0887$, $r = 0.9998$;结果表明连翘苷在 1.77 ~ 8.58 μg 线性关系良好。

测定法 精密吸取上述对照品溶液和供试品溶液各适量,注入液相色谱仪测定,代入上述回归方程计算,即得。

2.4 连翘叶中芦丁、连翘酯苷 A 与连翘苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Hypersil GOLD C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 (A)-0.4% 冰醋酸溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0~8 min, 10%~15% A; 8~18 min, 15%~22% A; 18~25 min, 22%~40% A; 25~30 min, 40%~95% A; 30~35 min, 95%~95% A); 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 277 nm, 柱温为 30 ℃。理论塔板数按连翘苷峰计算应不低于 3000。

2.4.2 对照品溶液的制备 分别称取连翘苷对照品、芦丁对照品和连翘酯苷 A 对照品适量, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇制成每 1 mL 中含连翘苷 0.08 mg、含芦丁 0.108 mg、含连翘酯苷 A 0.19 mg 的溶液, 即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 取各样品粉末 (过五号

筛) 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 15 mL, 称定重量, 超声提取 40 min, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4.4 测定法 分别精密吸取上述对照品溶液 1、2、4、5、7、8、10 μL, 注入液相色谱仪, 按 2.4.1 项下色谱条件进行测定, 每个体积进样 2 次, 以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程: $Y_{\text{芦丁}} = 11.462X - 0.1962$, $r = 0.9999$; $Y_{\text{连翘酯苷A}} = 8.1992X - 0.0189$, $r = 0.9999$; $Y_{\text{连翘苷}} = 6.9143X + 0.037$, $r = 0.9999$; 结果表明芦丁在 0.108~1.08 μg, 连翘酯苷 A 在 0.19~1.90 μg, 连翘苷在 0.08~0.80 μg 线性关系良好。

分别精密吸取上述供试品溶液适量, 在上述色谱条件下进样, 记录峰面积, 代入上述回归方程计算, 即得。见图 1。

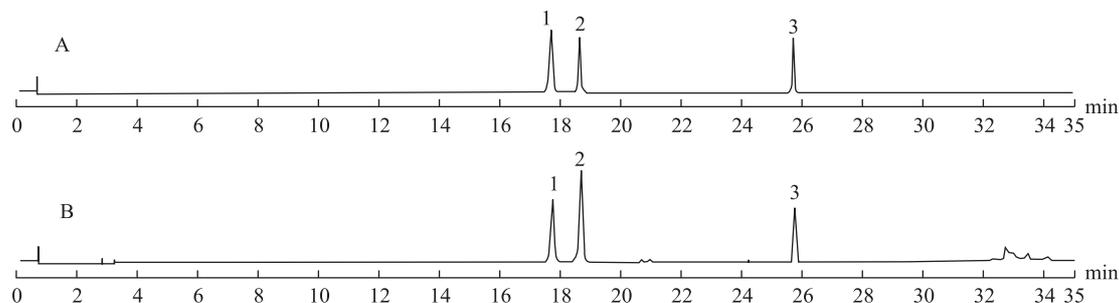


图 1 标准品和连翘叶样品的 HPLC 图

2.4.5 方法学考察 精密度试验 精密吸取 2.4.2 项下对照品溶液 5 μL, 连续进样 6 次, 各记录芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷峰面积, 结果各峰面积的 RSD 分别为 1.08%、1.13%、1.09%, 表明仪器精密度良好。

稳定性试验 精密吸取 2.4.3 项下同一供试品溶液, 于 0、5、10、15、20 h 分别进样 5 μL, 记录芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷峰面积, 结果各色谱峰面积的 RSD 分别为 0.99%、0.82%、0.56%, 表明供试品溶液在 20 h 内稳定性良好。

重复性试验 称取同一连翘叶粉末 (过四号筛) 5 份, 每份 0.3 g, 精密称定, 按 2.4.3 项下方法制备供试品溶液, 分别进样 5 μL, 结果芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷百分含量的 RSD 分别为 1.04%、1.27%、1.51%, 表明重复性良好。

加样回收率试验 称取已知含量的同一连翘叶粉末 (过四号筛) 6 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 然后分别精密加入适量的芦丁对照品、连翘酯苷 A 对照品、连翘苷对照品。按 2.4.3 项下方法制备供试品

溶液, 分别进样 5 μL, 结果见表 1。

表 1 连翘叶中芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷加样回收试验

成分	样品取 样量/g	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
芦丁	0.100 10	1.10	1.04	2.10	96.15	99.68	1.99
	0.100 23	1.06	1.04	2.12	101.92		
	0.099 98	1.04	1.04	2.09	100.96		
	0.100 20	1.09	1.04	2.13	100.00		
	0.100 05	1.12	1.04	2.15	99.04		
	0.099 94	1.07	1.04	2.11	100.00		
连翘酯 苷 A	0.10010	6.30	6.35	12.6	99.21	99.13	0.59
	0.100 23	6.37	6.35	12.62	98.42		
	0.099 98	6.39	6.35	12.71	99.53		
	0.100 20	6.29	6.35	12.55	98.58		
	0.100 05	6.38	6.35	12.67	99.05		
	0.099 94	6.31	6.35	12.66	100.00		
连翘苷	0.100 10	3.13	3.19	6.27	98.43	98.75	1.46
	0.100 23	3.15	3.19	6.26	97.49		
	0.099 98	3.15	3.19	6.30	98.75		
	0.100 20	3.21	3.19	6.33	97.81		
	0.100 05	3.24	3.19	6.38	98.43		
	0.099 94	3.16	3.19	6.40	101.57		

2.5 结果

量。结果如表2。

按上述方法检测连翘及连翘叶中相关成分的含

表2 测定结果

产地	采集时间 (年-月-日)	阴阳坡	采收部位	芦丁(%)	连翘酯苷 A(%)	连翘苷(%)	挥发油(%)
陕西省铜川市耀州区小丘镇	2013-7-30	阳坡	果实	—	7.39 ± 0.09	0.43 ± 0.03	2.06 ± 0.03
	2013-7-30	阴坡	果实	—	7.71 ± 0.13	0.48 ± 0.05	2.47 ± 0.09
	2013-8-10	阳坡	果实	—	6.85 ± 0.10	0.34 ± 0.03	2.65 ± 0.08
	2013-8-10	阴坡	果实	—	6.90 ± 0.06	0.39 ± 0.06	2.30 ± 0.05
	2013-8-20	阳坡	果实	—	5.79 ± 0.06	0.37 ± 0.02	2.41 ± 0.07
	2013-8-20	阴坡	果实	—	7.20 ± 0.11	0.34 ± 0.06	2.93 ± 0.03
	2013-7-30	阳坡	叶	1.04 ± 0.03	6.35 ± 0.10	3.19 ± 0.09	—
	2013-7-30	阴坡	叶	1.22 ± 0.05	9.31 ± 0.03	3.68 ± 0.03	—
	2013-8-10	阳坡	叶	1.55 ± 0.02	2.70 ± 0.05	1.78 ± 0.05	—
	2013-8-10	阴坡	叶	1.32 ± 0.05	4.27 ± 0.06	1.98 ± 0.03	—
	2013-8-20	阳坡	叶	1.21 ± 0.01	7.08 ± 0.12	3.23 ± 0.04	—
	2013-8-20	阴坡	叶	1.17 ± 0.02	10.05 ± 0.13	3.25 ± 0.04	—

注：—表示未检测

由表2可知, 阴坡、阳坡连翘中挥发油、连翘酯苷A和连翘苷的含量差异较小, 分别在2.03%~2.96%、5.73%~7.84%和0.28%~0.53%之间; 阴坡、阳坡连翘叶中芦丁和连翘苷的含量差异较小, 分别在1.01%~1.57%和1.73%~3.71%之间, 连翘酯苷A的含量含量差异较大, 在2.65%~10.18%之间; 阴坡连翘叶中主要成分的含量均高于阳坡; 连翘叶中连翘酯苷A的含量几乎是连翘中9倍。

3 讨论

本实验通过对流动相、检测波长、柱温等条件的筛选, 建立了同时测定连翘叶中芦丁、连翘苷和连翘酯苷A的含量的方法, 比较了甲醇-水、甲醇-0.4%冰醋酸溶液、乙腈-0.4%冰醋酸和乙腈-水体系的等度和梯度洗脱, 结果乙腈-0.4%冰醋酸溶液梯度洗脱时, 所得色谱图基线平直, 各待测成分的色谱峰分离度良好, 且各待测成分在30 min内均已出峰, 此方法实用、可靠。

本实验中连翘与连翘叶均同时采用2010版药典中连翘项下的含量测定方法(2.3项下方法)和2.4.1项下方法进行含量测定, 结果采用2.4.1项下方法时连翘中芦丁分离度较差, 影响其含量测定结果准确性, 故连翘含量测定方法采用2.3项下方

法; 连翘叶采用2.4.1项下方法时, 各待测成分分离度良好, 色谱图基线平直, 故连翘叶采用2.4.1项下方法对芦丁、连翘苷、连翘酯苷A进行了含量测定。

通过上述两种方法的比较, 连翘叶中连翘苷与连翘酯苷A含量无显著性差异, 而药典中连翘苷和连翘酯苷A分别建立了不同的检测方法, 大大增加了检测成本和检测周期, 本文建立的含量测定方法可同时测定连翘叶中芦丁、连翘苷和连翘酯苷A的含量, 既降低了检测成本, 又缩短了检测周期, 该方法准确可靠、简单易行, 可为下一步药典含量方法的制定提供借鉴依据。

通过比较, 发现阴坡连翘叶中黄酮类成分和木质素类成分的含量较高于阳坡, 这可能与阴坡、阳坡的土壤厚度、土壤pH值、含水率、有效磷、有效氮和有机质含量等差异^[10]有关, 而连翘酯苷A在阴坡、阳坡中的差距也可能与连翘酯苷A的稳定性^[11]有关; 在同一坡向, 连翘叶中连翘苷和连翘酯苷A的含量均高于连翘中含量, 特别是连翘酯苷A的含量在连翘叶中几乎是连翘中的9倍。这可能与有效成分在植物体不同部位的分布相关。

通过比较, 发现不同生长期连翘叶中主要成分如连翘酯苷A含量差异较大, 这可能与气候、阳光等多种生态因子有关, 有待进一步考察分析。

(下转第202页)

3 讨论

本试验以4组提取液中绿原酸、栀子苷、总酚酸含量和干浸膏收率为指标进行考察,将结果进行标准化处理,采用设定的加权系数进行综合评价,得出综合评价值 Y 。根据 Y 值大小评价金茵清热口服液4种提取方法的提取效果。结果各综合评价值 Y 值由大到小的顺序为 $Y(\text{SBE}) > Y(\text{WE}) > Y(\text{SBAE}) > Y(\text{WAE})$,说明SBE法提取效果最好,其次是WE法。在金茵清热口服液制备工艺中将提取液进行醇沉以除去杂质,但在除杂的过程中,可能会带走部分有效成分,所以醇沉后综合评价值降低,但SBAE法效果较好。

由于金茵清热口服液原药材金银花、茵陈、丹参中均含有绿原酸等水溶性酚酸类成分,栀子中也含有少量绿原酸^[7],根据吸收值的加和性特点,以绿原酸为对照品测定总酚酸的吸光度可以作为总酚酸的含量测定方法,以此考察不同影响因素对制剂中药效成分整体提取效果具有代表意义。

为防止大黄药材中结合蒽醌成分受热过久、温度过高分解而影响制剂的泻下效果,在金茵清热口

服液处方制备工艺中采用沸水温浸提取大黄药材饮片中有有效成分,而在样品溶液制备时未加入中药大黄。

参考文献

- [1] 郑江萍,虞芹,杜士明.金茵清热口服液的制备及质量标准研究[J].儿科药学杂志,2013,19(4):41-45.
- [2] 杨光义,叶方,郝新才.半仿生提取法在中药新药研究中的应用[J].中国药师,2010,13(8):1188-1190.
- [3] 张兆旺,孙秀梅.“半仿生提取法”的特点与应用[J].世界科学技术-中药现代化,2000,2(1):35-37.
- [4] 黄良永,郑江萍,雷震.HPLC法同时测定利胆排毒口服液中绿原酸、栀子苷和丹酚酸B的含量[J].中国药师,2012,15(11):1562-1564.
- [5] 邓安刚,蔡霏,詹雪晶,等.基于闪时提取的藏药藏麻中总酚酸含量测定方法研究[J].中南药学,2010,8(3):187-189.
- [6] 叶方,杨光义,黄良永,等.均匀设计法优选房陵丹参水溶性成分提取工艺[J].医药导报,2010,11(29):1469-1472.
- [7] 王允,刘毅,姚干,等.中药栀子炮制与提取时主要活性成分含量变化研究[J].广州化工,2014,40(23):14-16.

(收稿日期 2015-09-07)

(上接第188页)

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:159-160.
- [2] 国家中医药管理局中华本草编委会.中华本草:第十六卷[M].上海:上海科技出版社,1999:157-159.
- [3] 陈玲,李晓,李倩,等.连翘属植物化学成分的研究进展[J].现代药物与临床,2013,28(3):441-445.
- [4] 秦臻,徐军,张立伟.连翘及连翘叶体外抑菌作用研究[J].食品工程,2013,6(2):49-52.
- [5] LIU J, YANG JX. Hypoglycemic Effect of Forsythia suspensa Leaves on Diabetic Mice [J]. Agricultural Science & Technology, 2013, 14(1): 98-99, 175.
- [6] 雷秋香,赵连梅,颜晰,等.连翘叶乙醇提取物对人食管癌细胞增殖抑制作用的研究[J].肿瘤防治研究,2012,39(4):394-399.
- [7] 张淑蓉,裴香萍,闫艳,等.不同采收期青翘和连翘叶中活性成分的含量比较[J].中国药房,2011,22(31):2940-2942.
- [8] 李虹.中药连翘研究概况[J].中国民间疗法,2014,22(5):92.
- [9] 侯改霞,习雪峰,杨建雄.连翘叶提取物对力竭及恢复小鼠肝脏、骨骼肌的保护作用[J].现代预防医学,2011,38(2):316-318.
- [10] 张建军.生态因子及抚育对野生连翘生长和产量的影响[J].山西农业大学学报(自然科学版),2013,33(1):10-14.
- [11] 王曙宾,郑亚杰.连翘提取物和连翘酯苷A原料中连翘酯苷A的稳定性研究[J].中草药,2010,41(6):909-911.

(收稿日期 2015-06-10)