

· 基础研究 ·

海南裸花紫珠中毛蕊花糖苷和木犀草苷含量分析

于福来¹, 吴丽芬¹, 庞玉新^{1*}, 黄梅¹, 张影波¹, 孙懂华¹, 李伟²

(1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737;

2. 海南九芝堂药业有限公司, 海南 海口 570311)

[摘要] 目的: 分析不同来源海南裸花紫珠中毛蕊花糖苷和木犀草苷含量变化, 为裸花紫珠药材质量控制提供参考。方法: 采用 HPLC 法同时测定毛蕊花糖苷和木犀草苷含量, 通过方差分析等方法比较不同产地、采收时间和储存时间的裸花紫珠成分含量差异。结果: 29 份不同来源海南裸花紫珠中毛蕊花糖苷和木犀草苷含量差异较大, 其中毛蕊花糖苷变异系数为 69.78%, 木犀草苷变异系数为 50.38%。毛蕊花糖苷含量受产地和储存时间影响显著 ($P < 0.05$), 而木犀草苷则受产地因素影响显著 ($P < 0.05$)。9 月到翌年 1 月, 儋州裸花紫珠毛蕊花糖苷含量呈增加趋势, 而木犀草苷变化较小。此外, 本研究所建立的 HPLC 测定方法简便、快速、准确。结论: 海南裸花紫珠药材成分含量变化较大, 产地、采收时间和储存时间是影响药材质量的重要因素。

[关键词] 裸花紫珠; 毛蕊花糖苷; 木犀草苷; 产地; 采收时间; 储存时间

Simultaneous Determination of Acteoside and Luteoloside in *Callicarpa nudiflora* from Hainan ProvinceYU Fulai¹, WU Lifen¹, PANG Yuxin^{1*}, HUANG Mei¹, ZHANG Yingbo¹, SUN Donghua¹, LI Wei²

(1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China;

2. Hainan Jiuzhitang Pharmaceutical Co., Ltd., Haikou 570311, China)

[Abstract] **Objective:** This study aims at analysing content variation of acteoside and luteoloside in *Callicarpa nudiflora* from Hainan province, which provides a reference for the *C. nudiflora* quantity control. **Method:** The content of acteoside and luteoloside were simultaneously determined by HPLC, and the ANOVA was used to analyze the content variance of 29 samples *C. nudiflora* from Hainan province in different origins, harvest time and storage time. **Result:** There were large differences between acteoside and luteoloside among the total 29 samples. The coefficients of variation (CVs) of acteoside and luteoloside content were 69.78% and 50.38%, respectively. The acteoside content was affected significantly by origin and storage time, and the luteoloside content was affected by origin significantly. The acteoside content presented a trend of increase from September to the following January in Danzhou, whereas the luteoloside content showed minor change. Moreover, the HPLC simultaneous determination method was simple, rapid and accurate. **Conclusion:** There were great variations of acteoside and luteoloside content in *C. nudiflora* from Hainan province, and origin. The harvest time and storage time were important factors for the *C. nudiflora* quantity.

[Keywords] *Callicarpa nudiflora*; acteoside; luteoloside; origin; harvest time; storage time

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2016.8.012

裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. 为马鞭草科紫珠属植物, 以其干燥叶片入药, 收载于《中华人民共和国药典》1977 年版^[1]。具有止血散瘀、抗菌消炎之功效, 是“裸花紫珠片、裸花紫珠分散片、裸花紫珠胶囊、裸花紫珠颗粒、裸花紫珠栓”等近 20 余种中成药的主要原料。裸花紫珠是海

南省的道地药材之一, 传统以野生来源为主, 近 5 年开始进行野生驯化栽培, 药材种植、采收以及储存等缺乏统一标准。前期研究表明^[2-7], 不同来源裸花紫珠药材在化学成分含量上变化较大, 同时缺少简便、有效的测定方法, 这使得裸花紫珠药材质量难于控制。

[△] [基金项目] 海南省科技合作专项资金项目 (KJHZ2015-15); 企业合作项目 (PZS-JZT01)

* [通信作者] 庞玉新, 副研究员, 研究方向: 中药资源; Tel: (0898) 23300268, E-mail: pyxmarx@126.com

基于此,本研究在参考以往研究结果基础上^[3-7],选择并建立同时测定能够代表裸花紫珠化学成分毛蕊花糖苷和木犀草苷含量的方法,以此分析两种成分在海南29份不同来源裸花紫珠中的变化,探讨产地、采收时间以及储存时间等因素对裸花紫珠化学成分影响,以期今后裸花紫珠药材质量控制提供参考。

1 材料

1.1 植物材料

试验材料包括2013—2014年海南九芝堂药业有限公司在海南省5个产地不同时期收集的19份样品以及2014年9月后在海南儋州试验基地动态采收样品10份(详见表1)。以上材料经中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所庞玉新副研究员鉴定为裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.。

表1 不同来源裸花紫珠样品

序号	产地	采收时间 (年·月·日)	序号	产地	采收时间 (年·月·日)
1	五指山	2013-04-12	16	海口	2014-05-15
2	五指山	2013-05-27	17	陵水	2014-05-16
3	白沙	2013-06-23	18	白沙	2014-05-16
4	白沙	2013-07-05	19	五指山	2014-05-16
5	五指山	2013-07-12	20	儋州	2014-09-02
6	白沙	2013-08-12	21	儋州	2014-09-19
7	五指山	2013-09-17	22	儋州	2014-10-02
8	白沙	2013-10-10	23	儋州	2014-10-17
9	五指山	2013-11-15	24	儋州	2014-11-03
10	白沙	2013-12-20	25	儋州	2014-11-17
11	海口	2014-01-17	26	儋州	2014-12-08
12	海口	2014-02-23	27	儋州	2014-12-20
13	海口	2014-03-25	28	儋州	2015-01-06
14	五指山	2014-04-17	29	儋州	2015-01-22
15	海口	2014-04-24			

注:1~19号为九芝堂公司收集的样品,20~29为儋州试验基地同一地块采收样品

1.2 仪器与试剂

Waters1525液相色谱仪,Waters2487紫外检测器,SartoriusCPA225D电子分析天平,KQ-500DB型超声仪,毛蕊花糖苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,纯度>98%),木犀草苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,纯度>98%),甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯、水为娃哈哈纯净水。

2 方法

2.1 色谱条件及系统适用性

Waters HPLC,色谱柱 XTerra RP18 (3.9 m × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.3%磷酸水溶液(B),梯度洗脱0~10 min,25% A,10~30 min,37% A,30~40 min,37~50% A,40~50 min,50~60% A,流速0.4 mL·min⁻¹,检测波长350 nm,柱温30℃。毛蕊花糖苷、木犀草苷对照品和裸花紫珠供试品色谱图见图1。

2.2 对照品储备液的制备

精密称取对照品毛蕊花糖苷、木犀草苷适量,置10 mL容量瓶中,加甲醇至刻度定容,制成1.245 mg·mL⁻¹毛蕊花糖苷和0.157 3 mg·mL⁻¹木犀草苷的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

将裸花紫珠叶置电热恒温鼓风干燥箱中55~60℃干燥至恒重,粉碎过60目筛,称取约2 g,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,精密加入50 mL 70%甲醇,密塞,称定重量,超声(频率40 kHz、功率400 W)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量。过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系的考察

精密量取混合对照品储备液0.5、1、2、2.5、3 mL,分别置5 mL容量瓶中,加甲醇至刻度定容,以各对照品的峰面积为纵坐标(Y),各对照品的质量浓度为横坐标(X)进行线性回归。回归方程分别为:(1)毛蕊花糖苷:Y=37 000 000X-370 000, r=0.999 8,线性范围0.12~0.73 mg·mL⁻¹; (2)木犀草苷:Y=98 000 000X-190 000, r=0.999 9,线性范围0.015~0.093 mg·mL⁻¹。

2.5 精密度试验

精密量取混合对照品储备液1 mL,置5 mL容量瓶中,加甲醇至刻度定容,连续测定6次,计算毛蕊花糖苷、木犀草苷峰面积RSD分别为1.31%和1.28%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批裸花紫珠6份,精密称定,按2.3项下方法制备溶液,在2.1色谱条件下分别进样测定,计算毛蕊花糖苷、木犀草苷含量RSD分别为0.70%和1.96%,表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一裸花紫珠样品,精密称定,按 2.3 项下方法制备溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行测定,计算毛蕊花糖苷、木犀草苷峰面积 RSD 分别为 2.39% 和 0.17%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的裸花紫珠样品 0.5 g,6 份,精密称定,分别加入毛蕊花糖苷、木犀草苷,按 2.3 项下方法制备溶液,依法测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果($n=6$)

成分	样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率 (%)	RSD (%)
毛蕊花糖苷	16.07	16.00	31.84	98.58	0.65
	16.03		31.72	98.08	
	15.99		31.75	98.46	
	16.11		32.05	99.61	
	16.08		31.91	98.97	
	15.99		31.94	99.66	
木犀草苷	0.954	0.95	1.903	99.89	1.65
	0.952		1.892	99.03	
	0.950		1.888	98.73	
	0.957		1.917	101.10	
	0.955		1.913	100.86	
	0.950		1.930	103.25	

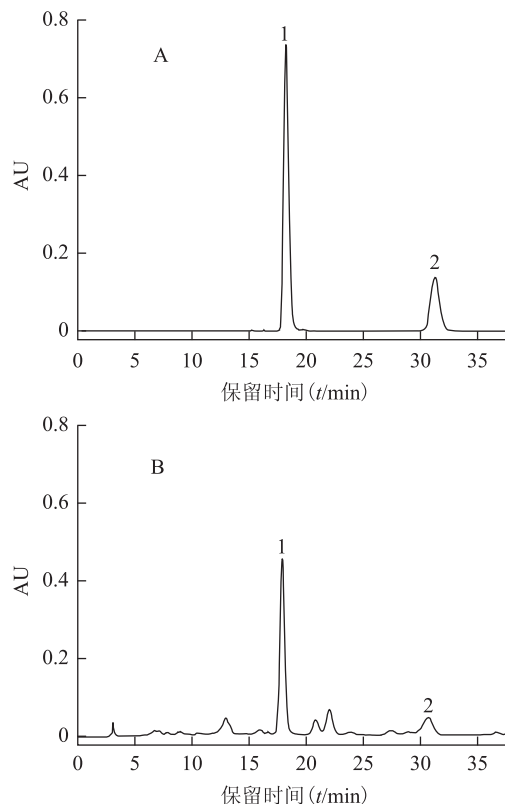
2.9 样品含量测定

取裸花紫珠样品 1 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备溶液,依法进样测定。

3 结果与分析

3.1 不同来源裸花紫珠中毛蕊花糖苷和木犀草苷含量基本统计量

通过对 2013—2015 年在海南收集的 29 份裸花紫珠样品毛蕊花糖苷和木犀草苷含量测定统计结果如下(表 3)。毛蕊花糖苷含量变化范围在 0.28% ~ 5.57%,平均值 2.293%,变异系数为 69.78%。而木犀草苷含量变化范围在 0.03% ~ 0.27%,平均值 0.133%,变异系数为 50.38%。说明海南裸花紫珠样品主要成分含量变化较大,而 29 份样品包含不同产地和不同采收时间等因素对其成分含量均可能产生影响。



注: 1. 毛蕊花糖苷; 2. 木犀草苷。A. 对照品; B. 裸花紫珠供试品

图 1 对照品及供试品色谱图

表 3 不同来源裸花紫珠主要成分含量基本统计量

(%)		
基本统计量	毛蕊花糖苷含量	木犀草苷含量
样本量 n	29	29
均值	2.293	0.133
中值	2.490	0.150
众数	0.310	0.070
标准差	1.600	0.067
方差	2.558	0.004
偏度	0.240	0.290
峰度	-1.118	-0.895
全距	5.290	0.240
极小值	0.280	0.030
极大值	5.570	0.270
变异系数 CV%	69.78	50.38

3.2 不同产地、采收时间和储存时间对毛蕊花糖苷和木犀草苷含量影响

产地和采收时间对药材化学成分积累影响较大。通过比较不同产地、采收时间和储存时间裸花紫珠中毛蕊花糖苷和木犀草苷含量可知(图 2),不同产

地间(4产地28份样品),毛蕊花糖苷和木犀草苷含量差异显著($P < 0.05$),其中对于毛蕊花糖苷含量,产地海口最高,白沙最低。对于木犀草苷含量,产地儋州最高,海口最低;不同储存时间(2年27份样品),2014年采收样品成分含量均高于2013年样品,其中毛蕊花糖苷含量在两个年份间差异极显著($P < 0.01$),说明毛蕊花糖苷量会随着储存时间的增加而降低;不同采收月份间(12个月29份样品),毛蕊花糖苷和木犀草苷含量变化相近,呈“降低-升

高-降低-平缓”的趋势,但月份间差异不显著(2、3、6、7、8五个月份缺少重复)。其中,6~9四个月份两种成分含量均较低,可能与这段时间裸花紫珠处于花期有关。

由于产地儋州是对同一地块的材料进行动态取样(每半月一次),所以单独对儋州样品月份间变化分析可知(图3),毛蕊花糖苷含量从9月到翌年1月间呈增加趋势,而木犀草苷变化不大。从两类成分含量的角度分析,在儋州裸花紫珠1月份采收较适宜。

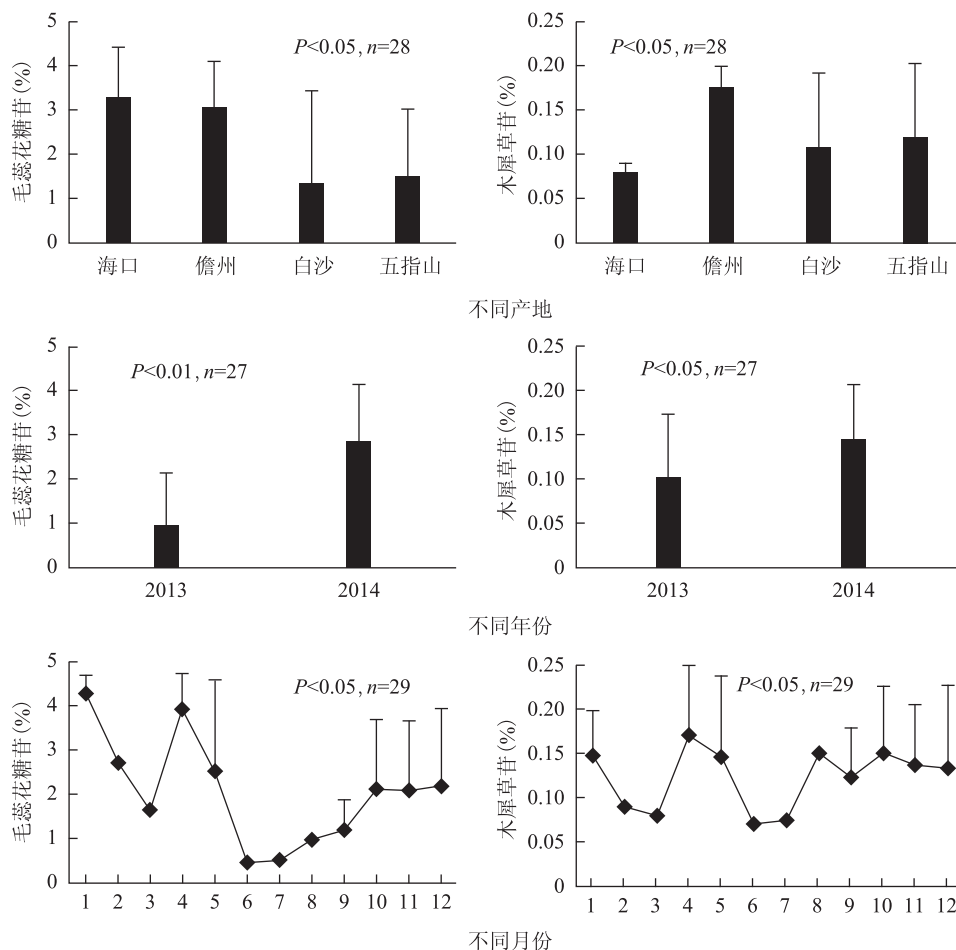


图2 不同产地、采收时间和储存时间裸花紫珠主要成分对比

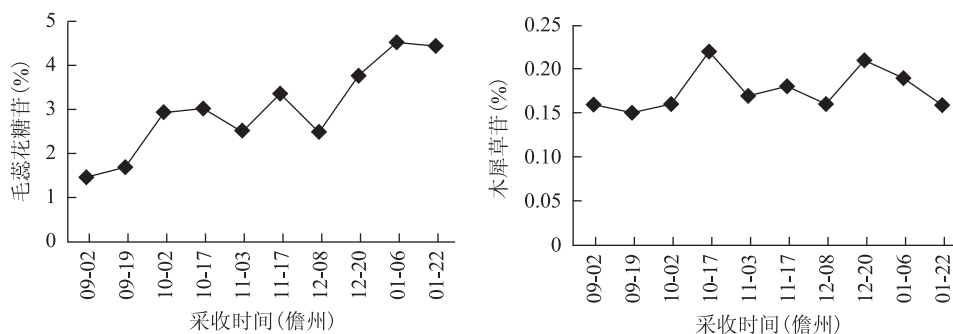


图3 不同采收时间裸花紫珠主要成分含量变化(儋州)

4 讨论

4.1 裸花紫珠药材质量控制指标的选择

裸花紫珠化学成分主要包括黄酮类、萜类、挥发油类及酚类等。近几年关于裸花紫珠药材或制剂质控中常以总黄酮、毛蕊花糖苷、木犀草素、木犀草苷、连翘酯苷、熊果酸等一个或多个成分为指标或是 HPLC 指纹图谱^[1-7]。但对于裸花紫珠药材(入药部位叶片),其毛蕊花糖苷和木犀草苷的含量相对较高^[4-5],且能代表药材中类黄酮类有效成分,所以同时测定这两个成分对裸花紫珠药材质量方便有效控制十分必要。因此,本研究通过 HPLC 方法同时测定毛蕊花糖苷和木犀草苷两个成分,所建立的方法简便、快速、准确。

4.2 海南裸花紫珠中毛蕊花糖苷和木犀草苷差异分析

本研究发现不同产地间裸花紫珠毛蕊花糖苷和木犀草苷差异显著,同时样品储存时间对毛蕊花糖苷影响显著。不同月份间裸花紫珠成分变化较大,但由于部分月份的样品缺少重复且变异较大,使得月份间差异不显著。但从各月份平均值看,上半年(1~5月)成分含量平均高于下半年(6~12月),这与刘幼娴等^[6]研究结果相似,分析可能由于上半年采收样品为至少2年生植株,而下半年为1年生植株所致。所以研究采收期的同时,深入研究植株年龄与化学成分积累关系十分必要。

中药化学成分积累受产地、采收时间等多种因素影响^[8-9]。本研究仅对海南29份裸花紫珠不同采收时间和产地间的毛蕊花糖苷和木犀草苷进行了初步比较分析,样品包含储存时间、月份和产地等多个影响因素,而重复数量较少,致使某些平均值差

异较大的组间差异不显著(如不同月份间)。因此,如要全面了解采收时间和产地等因素对裸花紫珠药材的影响,应通过多年多地点栽培对比试验,系统分析裸花紫珠化学成分和生物量积累规律,以便为裸花紫珠资源合理利用提供更全面的依据。

参考文献

- [1] 刘小芬,李顺祥.裸花紫珠研究进展[J].中南药学,2015,13(4):396-402.
- [2] Tu Y H, Sun L N, Guo M Li, et al. The medicinal uses of *Callicarpa L.* in traditional Chinese medicine: An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013 (146): 465-481.
- [3] 颜小捷,谷陟欣,卢凤来,等.裸花紫珠中总酚、总黄酮和总皂苷的含量测定[J].时珍国医国药,2013,24(12):2852-2854.
- [4] 邵军,陈伟康,马双成,等. UPLC 法同时测定裸花紫珠中5种类黄酮类成分[J].中草药,2014,45(10):1473-1476.
- [5] 郑东昆,陈伟康,马双成,等.裸花紫珠指纹图谱研究及10种成分的含量测定[J].中国中药杂志,2015,40(9):1776-1782.
- [6] 刘幼娴,谷陟欣,卢凤来,等.不同采收期裸花紫珠的 HPLC 指纹图谱研究[J].广西植物,2014,34(2):174-178.
- [7] 马思遥,盛琳,关薇薇,等.海南裸花紫珠高效液相色谱法指纹图谱研究[J].中药材,2014,37(3):404-408.
- [8] 葛月兰,钱大玮,段金廛,等.不同产地不同采收期当归挥发性成分动态积累规律与适宜采收期分析[J].药物分析杂志,2009,29(4):517-523.
- [9] 吴启南,钱大玮,段金廛.中药材贮藏过程中的质量变化机制探讨[J].中国中药杂志,2010,35(14):1904-1908.

(收稿日期 2015-08-01)