

河南和山西连翘叶中总木脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷的含量比较

原江锋^{1*}, 邱智军¹, 刘建利², 张志琪³

¹河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471003; ²陕西省环境监测中心站, 西安 710054; ³陕西师范大学化学化工学院, 西安 710062

摘要: 测定河南和山西连翘叶中总木脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷含量。采用分光光度法测定连翘叶中总木脂素含量, 结果显示山西连翘叶高于河南连翘叶总木脂素含量。采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定连翘叶中连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷的含量。连翘酯苷 A 平均回收率为 99.6%, RSD 为 1.23%; 连翘酯苷 B 平均回收率为 101.3%, RSD 为 1.74%; 连翘苷平均回收率为 102.3%, RSD 为 2.58%; 连翘叶中连翘酯苷 A 和连翘苷的含量较高, 并且不同产地连翘叶中连翘苷含量差异较大; 另外对于富含连翘酯苷和连翘苷的连翘叶能否代替果实或者与果实合并用药有待于进一步研究。

关键词: 连翘叶; 总木脂素; 连翘酯苷 A; 连翘酯苷 B; 连翘苷

中图分类号: Q946.91

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.018

Determination of Total Lignans, Forsythiaside A, Forsythiaside B and Phillyrin in *Forsythia suspensa* Leaves from Henan and Shanxi

YUAN Jiang-feng^{1*}, QIU Zhi-jun¹, LIU Jian-li², ZHANG Zhi-qi³

¹College of Food & Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

²Shanxi Environmental Center Monitoring Station, Xi'an 710054, China; ³School of Chemistry & Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: The objective of this study was to determine the content of total lignans, forsythiaside A, forsythiaside B and phillyrin in *Forsythia suspensa* leaves from Henan province and Shanxi province. The total lignans of *F. suspensa* leaves from Shanxi province were higher than Henan province by spectrophotometry method. The contents of forsythiaside A, forsythiaside B and phillyrin were determined by HPLC. The average recoveries of forsythiaside A, forsythiaside B and phillyrin were 99.6% (RSD = 1.23%), 101.3% (RSD = 1.74%) and 102.3% (RSD = 2.58%), respectively. The experimental results showed that the content of forsythiaside A and phillyrin in *F. suspensa* leaves from Shanxi and Henan was relatively high. In addition, the content of phillyrin in *F. suspensa* leaves from different habitats were of large difference. *F. suspensa* leaves are rich in forsythiaside and lignans, more researches on *F. suspensa* leaves are still needed to confirm whether it can be used as substitute or cooperate with *F. suspensa* fruit for medicinal application.

Key words: *Forsythia suspensa* leaves; total lignans; forsythiaside A; forsythiaside B; phillyrin

连翘叶为木犀科 (Oleaceae) 植物连翘 [*Forsythia Suspensa* (Thunb.) Vahl] 的干燥叶^[1]。传统主要以野生果实入药。《中药大辞典》、《中华本草》等现代典籍记载“连翘茎叶, 味苦, 性寒, 功能主治清热解毒, 主治心肺积热”^[2]。我国 50% 的连翘资源靠山西供给, 30% 的连翘资源靠河南供给。民间常用连

翘嫩叶作为保健茶饮用, 认为有较好的保健价值。

现代研究表明, 连翘叶中含有连翘苷、连翘酯苷、芦丁、右旋松脂酚等化学成分, 与连翘果实十分类似, 连翘叶还具有降血糖、保肝、抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤等作用^[3-7]。目前陕西关中连翘叶中连翘苷和连翘酯苷的含量高于相应地区连翘果实的含量^[8], 而对连翘主产区山西和河南两地的连翘叶主要化学成分则无人报道。本实验采用分光光度法对河南和山西连翘叶中的总木脂素含量进行测定; 采用 HPLC 法对山西和河南两地的连翘叶中连翘酯苷

收稿日期: 2014-01-08 接受日期: 2014-07-03

基金项目: 国家自然科学基金 (21275098); 洛阳市科技攻关项目 (1201029A, 1401076A)

* 通讯作者 E-mail: jiangfengyuan@163.com

A、连翘酯苷 B 和连翘苷等主要活性成分的含量进行分析。该方法简单快速,为有效控制连翘叶中有效成分的含量,并为连翘主产区连翘叶作为新资源食品的深入开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

连翘叶(2012年9月采自河南豫西伏牛山地区和山西左权县连翘种植基地)经河南科技大学农学院候小改教授鉴定。

对照品五味子甲素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 B、连翘苷购自中国药品生物制品鉴定所。甲醇和乙腈为色谱纯;水为三蒸水;浓硫酸、变色酸、冰醋酸、磷酸为分析纯。

1.2 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪;四元泵,在线脱气,柱温箱,自动进样器,紫外可变波长检测器,三维液相色谱工作站;BS 124S 型万分之一天平(赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 连翘叶中总木脂素含量的测定

1.3.1.1 五味子甲素标准曲线的绘制

精密称取五味子甲素 2.5 mg,溶于少量 80% 甲醇中,移至 10 mL 容量瓶,得浓度为 0.25 mg/mL 的五味子甲素对照品溶液。

精密吸取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 对照品溶液分别置六支离心管中,置水浴上挥去甲醇,再分别加入 10% 变色酸澄清水溶液 0.5 mL,浓硫酸 3.0 mL,蒸馏水 1.5 mL,摇匀后沸水浴中加热 30 min,迅速冷却。以上述甲醇管为空白,按分光光度计法,分别在 570 nm 的波长处测定吸光度(A)值,以 A 为纵坐标,以所加的对照品量为横坐标。

1.3.1.2 供试品溶液的制备及木脂素测定

分别精密称取河南伏牛山和山西左权县连翘叶 5 g,以 10 倍的 80% 甲醇为提取溶媒,超声处理(250 W,40 kHz)30 min,滤过,4000 rpm 离心 5 min。取其中 2 mL 沸水蒸干后按照对照品溶液制备方法加入相应试剂,以不添加连翘叶提取溶液作为空白对照,在 570 nm 处测定吸光度。

1.3.2 色谱条件及检测方法

1.3.2.1 连翘酯苷 A 的色谱测定条件

色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm ×

250 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.4% 冰醋酸溶液(15:85);检测波长 330 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 25 °C。

1.3.2.2 连翘酯苷 B 的色谱测定条件

色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.5% 磷酸(19:81);检测波长 332 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 25 °C。

1.3.2.3 连翘苷的色谱测定条件

色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相乙腈-水(25:75);检测波长 277 nm,流速 1.0 mL/min;柱温 25 °C。

1.3.3 对照品溶液的制备

1.3.3.1 连翘酯苷 A 对照品溶液的制备

精密称取连翘酯苷 A 对照品 1.8 mg,溶于少量甲醇,移至 10 mL 容量瓶中,用甲醇精密定容至刻度线,摇匀,制成 0.18 mg/mL 的连翘酯苷 A 对照品溶液,备用。

1.3.3.2 连翘酯苷 B 对照品溶液的制备

精密称取连翘酯苷 B 对照品 1.1 mg,溶于少量甲醇,移至 10 mL 容量瓶中,用甲醇精密定容至刻度线,摇匀,制成 0.11 mg/mL 的连翘酯苷 B 对照品溶液,备用。

1.3.3.3 连翘苷对照品溶液的制备

精密称取连翘苷对照品 2.0 mg,溶于少量甲醇,移至 10 mL 容量瓶中,用甲醇精密定容至刻度线,摇匀,制成 0.2 mg/mL 的连翘苷对照品溶液,备用。

1.3.4 供试品溶液的制备

1.3.4.1 连翘酯苷 A 供试品溶液的制备

分别将河南和山西连翘叶自然晾干后,粉碎,各精密称取 0.500 g 置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 15 mL,密塞,称定,浸渍过夜,超声处理(250 W,40 kHz)30 min,放冷,再称定,用 70% 甲醇补足失重,摇匀,滤过,稀释 10 倍后经 0.45 μm 滤膜滤过,滤液作为供试品溶液。

1.3.4.2 连翘酯苷 B 供试品溶液的制备

分别将河南和山西连翘叶自然晾干后,粉碎,各称取 3.000 g 置具塞锥形瓶中,精密加 50% 甲醇 50 mL,称定重量,称定,浸渍过夜,超声处理(250 W,40 kHz)30 min,放冷,再称重,用 50% 甲醇补足减失的重量,过滤,经 0.45 μm 滤膜滤过,滤液作为供试品溶液。

1.3.4.3 连翘苷供试品溶液的制备

分别将河南和山西连翘叶自然晾干后,粉碎,各

称取 1.000 g 置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 15 mL,称定,浸渍过夜,超声处理(250 W,40 kHz)30 min,放冷,再称定,用甲醇补足失重,摇匀,滤过,经 0.45 μm 滤膜滤过,滤液作为供试品溶液。

1.3.5 方法学考察

1.3.5.1 线性关系考察

分别精密吸取上述连翘酯苷 A 对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、5.0 μL ;连翘酯苷 B 对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μL ;连翘苷对照品溶液 0.2、0.6、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 μL ,以峰面积 Y 为纵坐标,对照品进样量 X 为横坐标,计算回归方程。连翘酯苷 A: $Y_1 = 17617X + 105.71$, $r = 0.9803$,线性范围为 0.018 ~ 0.900 μg ;连翘酯苷 B: $Y_2 = 11745X + 8.1220$, $r = 0.9989$,线性范围为 0.0074 ~ 0.1480 μg ;连翘苷: $Y_3 = 2130.5X + 7.8527$, $r = 0.9982$,线性范围为 0.040 ~ 0.800 μg 。

1.3.5.2 精密度的试验

分别吸取连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷对照品溶液 2.0 μL ,按照“1.3.2”项下方法进样测定,分别连续进样 6 次,记录峰面积,经计算连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷峰面积的 RSD 分别为 1.94%、1.33%、1.86%,表明该方法仪器精密密度良好。

1.3.5.3 稳定性试验

取供试品溶液,分别在 0、1、2、5、10 h 进行检测,记录相应保留时间的峰面积,结果连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷峰面积的 RSD 分别为 1.83% ($n=6$)、1.76% ($n=6$)、2.13% ($n=6$),表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

1.3.5.4 重复性试验

分别精密吸取连翘酯苷 A、连翘酯苷 B、连翘苷供试品溶液 2.0 μL ,按“1.3.2”项下色谱条件分别重复进样 6 次,记录相应保留时间的峰面积,结果连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷含量的 RSD 分别为 0.88% ($n=6$)、1.23% ($n=6$)、1.78% ($n=6$),表明此方法重复性良好。

1.3.5.5 回收率试验

采用加样回收率试验方法,精密称取已知含量的同一连翘叶样品 0.25 g,平行 6 份,分别精密加入一定量的对照品溶液,按“1.3.4”项下方法,分别进行超声提取,过滤,注入液相色谱仪测定,计算回收率。连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷的回收率分别为 99.6%, RSD = 1.23% ($n=6$);101.3%, RSD = 1.74% ($n=6$);102.3%, RSD = 2.58% ($n=6$),说

明该方法有较好的准确度。

2 结果与分析

2.1 样品中总木脂素的测定

分别称取河南和山西连翘叶粉末,按照按“1.3.1”项下方法制备供试品溶液,并测定连翘叶中总木脂素含量,测定结果见表 1。

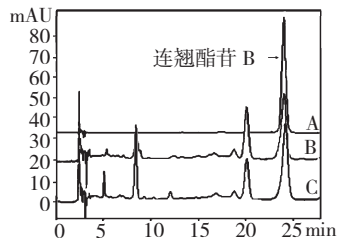


图 1 连翘酯苷 A(A)、河南伏牛山连翘叶(B)及山西左权县连翘叶(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of forsythiaside A standard (A), *F. suspensa* leaves from Henan Funiu mountain (B) and *F. suspensa* leaves from Shanxi Zuoquan county (C)

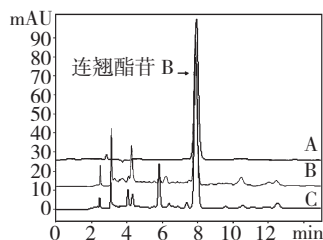


图 2 连翘酯苷 B(A)、河南伏牛山连翘叶(B)及山西左权县连翘叶(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of forsythiaside B standard (A), *F. suspensa* leaves from Henan Funiu mountain (B) and *F. suspensa* leaves from Shanxi Zuoquan county (C)

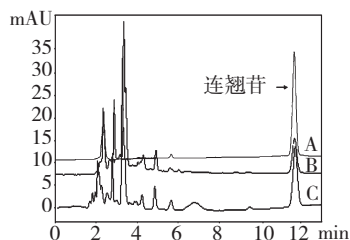


图 3 连翘苷(A)、河南伏牛山连翘叶(B)及山西左权县连翘叶(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of phillyrin standard (A), *F. suspensa* leaves from Henan Funiu mountain (B) and *F. suspensa* leaves from Shanxi Zuoquan county (C)

表 1 河南伏牛山和山西左权县连翘叶中总木脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷的含量 ($n=3$)Table 1 Contents of total lignans, forsythiaside A, forsythiaside B and phillyrin in *F. suspensa* leaves from Henan Funiu mountain and Shanxi Zuoquan county ($n=3$)

组分 Component	总木脂素 Total lignan (mg/g)	连翘酯苷 A Forsythiaside A (mg/g)	连翘酯苷 B Forsythiaside B (mg/g)	连翘苷 Phillyrin (mg/g)
河南伏牛山 Henan Funiu mountain	39.540	27.624	0.138	6.177
山西左权县 Shanxi Zuoquan county	59.310	25.572	0.180	27.427

2.2 连翘酯苷 A、连翘酯苷 B、连翘苷的测定

按“1.3.4”项下方法制备供试品溶液,分别对河南伏牛山和山西左权县地区样品中的连翘酯苷 A (图 1)、连翘酯苷 B (图 2)、连翘苷 (图 3) 记录指纹图谱,并精密吸取供试品溶液 10 μ L,在上述色谱条件下进样分析,测定峰面积,用外标法计算出连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷的含量,测定结果见表 1

3 讨论

木脂素类化合物是自然界中普遍存在的一类物质,木脂素存在于超过 70 种植物中,富含木脂素类化合物的植物在民间有着相当长的医用历史,具有抗肿瘤,抗炎,抗病毒,保肝及抑制血小板活化因子 (PAF) 等生理功能。通过实验结果可见,连翘中的总木脂素含量较高,并与五味子中总木脂素含量较为接近^[9,10]。

本实验采用反相高效液相色谱法,建立测定连翘叶中连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷的分析方法,分别对连翘主产区河南、山西两地连翘叶进行色谱分析。结果表明:由于产地的不同,河南和山西两地连翘叶中连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷的含量与其他产地的存在一定差异^[11];连翘叶中的主要活性成分与连翘果实类似,其中山西连翘叶中连翘苷的含量高于山西、陕西、河南、山东等地连翘果实含量;河南连翘叶中连翘苷与山西、陕西、河南、山东等地连翘果实含量较为接近^[12];山西和河南连翘叶中连翘酯苷 A 含量较高,并且连翘叶中连翘酯苷 A 的含量高于山西、陕西、河南、山东等地连翘果实 5~10 倍^[13,14]。连翘酯苷和连翘苷的含量在连翘叶中高于连翘果实的结果也在陕西连翘叶^[8,15]的文献中有报道。山西和河南连翘叶中连翘酯苷 B 的含量均较低,相关连翘酯苷 B 的文献也鲜有报道,可能与连翘酯苷 B 含量低造成的难分离,活性难以检测有关。

我国的连翘以野生为主,为国家 3 级药用保护

植物,为大宗、常用中药材,果实为著名中药。由于大面积的人工造林,造成连翘的面积骤减;当地农民对野生连翘乱采乱伐,使野生资源受到严重的破坏,再加上“抢青”采摘,导致连翘资源浪费和产品质量下降,面临着连翘资源种质资源濒临枯竭。根据 2010 年《中华人民共和国药典》规定,对连翘干燥果实的质量控制是连翘苷的含量不得少于 0.15%,连翘酯苷的含量不得少于 0.25%;根据本项研究发现,占全国连翘供给量达到 80% 的山西和河南两地,连翘叶中的连翘苷和连翘酯苷的含量达到了国家对连翘果实的含量要求,并且还要比同一地区连翘果实含量要高,但是由于连翘叶没有进入国家药典,造成了连翘叶资源的浪费。本项研究为进一步对连翘叶资源的利用和开发,为把连翘叶开发成新资源食品或者食品添加剂提供理论依据,另外连翘叶能否代替果实或者与果实合并用药有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I.
- 2 State Administration of Traditional Chinese Medicine "the Chinese Materia Medica" Editorial Board (国家中医药管理局《中华本草》编委会). Chinese Materia Medica (中华本草). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999:157-159.
- 3 Jiao J, Gai QY, Luo M, *et al.* Comparison of main bioactive compounds in tea infusions with different seasonal *Forsythia suspensa* leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of antioxidant activity. *Food Res Int*, 2013, 53:857-863.
- 4 Yang JX (杨建雄), Liu J (刘静), Li FR (李发荣), *et al.* Study on anti-senile and anti-oxidative activities of *Forsythia suspensa* leaves tea. *Acta Nutri Sin* (营养学报), 2004, 26: 65-67.

(下转第 864 页)