

沼生忍冬藤化学成分及3种成分的含量测定

李思远¹, 滕亮¹, 詹羽姣², 徐芳², 赵军^{2*}

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆药物研究所维吾尔药
重点实验室, 乌鲁木齐 830004)

[摘要] **目的:**研究沼生忍冬藤的化学成分并建立 HPLC 同时测定沼生忍冬不同药用部位中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸含量的方法。**方法:**采用硅胶、反相硅胶、大孔树脂和 LH-20 羟丙基葡聚糖凝胶等多种色谱技术进行分离纯化,并通过理化性质及波谱数据鉴定化合物的结构。采用 HPLC-UV 法测定含量,色谱条件:Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~13 min, 12% A; 13~25 min, 12%~22% A; 25~45 min, 22% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 327 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。**结果:**从沼生忍冬藤中分离得到 10 个化合物,分别鉴定为:3,7-二甲基槲皮素(1),3,3'-二甲基槲皮素(2),槲皮素(3),乌苏酸(4),马钱子苷(5),绿原酸(6),槲皮素 5-O-β-D-葡萄糖苷(7),3,4-二咖啡酰奎宁酸(8),3,5-二咖啡酰奎宁酸(9)和 4,5-二咖啡酰奎宁酸(10)。6,9 和 10 三种成分均能达到基线分离,且线性关系良好,平均加样回收率分别为 100.15%,99.68% 和 99.52%。沼生忍冬中 3 种成分的含量为花最高(3.99%,1.77%,2.33%),叶次之(2.62%,1.73%,0.90%),藤最低(0.74%,0.25%,0.15%)。**结论:**化合物 1,2 和 7 为首次从忍冬属植物中分离得到,其余化合物均为首次从该植物中分离得到;含量测定方法准确,简便,分离效果好,可用于沼生忍冬中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸含量的测定。

[关键词] 忍冬属; 沼生忍冬; 3,7-二甲基槲皮素; 3,3'-二甲基槲皮素; 槲皮素 5-O-β-D-葡萄糖苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0094-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190094

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170629.0911.020.html>

[网络出版时间] 2017-06-29 9:11

Chemical Constituents and Simultaneous Determination of Three Compounds from *Lonicera alberti* Caulis

LI Si-yuan¹, TENG Liang¹, ZHAN Yu-jiao², XU Fang², ZHAO Jun^{2*}

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Key Laboratory for Uighur Medicines, Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the chemical constituents from caulis of *Lonicera alberti* and establish an HPLC method for simultaneously determining the contents of chlorogenic acid, 3,5-O-dicaffeoylquinic acid and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid in different pharmaceutical parts of *L. alberti*. **Method:** Chemical constituents were isolated and purified by various chromatographic techniques such as silica gel, reversed-phase silica gel, macroporous resin, and Sephadex LH-20 column chromatography. Their structures were elucidated by physicochemical properties and spectroscopic data. The chromatographic conditions were as follows: Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with acetonitrile (A) and 0.2% phosphoric acid solution (B) as the mobile phase for gradient elution (0-13 min, 12% A; 13-25 min, 12%-22% A; 25-45 min, 22% A). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength at 327 nm, column temperature at 30 ℃, and injection volume at

[收稿日期] 20170405(012)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技人才培养项目(QN2016YX0689)

[第一作者] 李思远,在读硕士,从事天然产物的研究与开发工作,Tel:15160991176,E-mail:15160991176@163.com

[通讯作者] *赵军,博士,研究员,从事中药与天然产物的研究与开发工作,Tel:0991-2320227,E-mail:zhaojun21cn@163.com

10 μL . **Result:** Ten compounds were separated from *L. alberti*, and identified as 3, 7-dimethylquercetin (**1**), 3, 3'-dimethylquercetin (**2**), quercetin (**3**), ursolic acid (**4**), loganin (**5**), chlorogenic acid (**6**), quercetin 5-*O*- β -*D*-glucoside (**7**), 3, 4-*O*-dicafeoylquinic acid (**8**), 3, 5-*O*-dicafeoylquinic acid (**9**) and 4, 5-*O*-dicafeoylquinic acid (**10**). Compounds **6**, **9** and **10** achieved baseline separation and showed good linearity, and the average recoveries were 100.15%, 99.68% and 99.52% respectively. The content of three compounds from *L. alberti* flower (3.99%, 1.77%, 2.33%) was more than that of leaves (2.62%, 1.73%, 0.90%) and caulis (0.74%, 0.25%, 0.15%). **Conclusion:** Compounds **1**, **2** and **7** were isolated from *Lonicera* genus for the first time, and other compounds were found from this plant for the first time. The content determination method was accurate, reliable and convenient, so it could be used for content determination of chlorogenic acid, 3, 5-dicafeoylquinic acid and 4, 5-dicafeoylquinic acid in *L. alberti*.

[**Key words**] *Lonicera* genus; *Lonicera alberti*; 3, 7-dimethylquercetin; 3, 3'-dimethylquercetin; quercetin 5-*O*- β -*D*-glucoside

沼生忍冬又名线叶忍冬,为忍冬科忍冬属落叶矮灌木,主要分布于新疆昭苏、塔城等地区的沼地灌丛中^[1]。该药材的花、叶和藤均可入药,具有清热解毒之功效,用于上呼吸道感染、流行性感等疾病的治疗^[2]。忍冬属植物全世界约有 200 余种,我国有 98 种,有药用记载的有 49 种,其中被《中国药典》收录的有忍冬、灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬和黄褐毛忍冬^[3]。沼生忍冬在新疆伊犁地区分布广泛,然而其化学成分及生物活性研究却未见有文献报道。因此,为了开发这一植物资源,扩大忍冬藤的药用植物来源,发现活性显著的有效成分,本文对沼生忍冬藤进行了系统的化学成分研究,并采用高效液相色谱同时测定沼生忍冬不同药用部位中绿原酸,3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸 3 种成分的含量,以期为这一药用资源的开发利用提供数据参考。

1 材料

INOVA-400 型超导核磁共振仪(美国 Varian 公司),WHF-203B 型暗箱式紫外分析仪(上海精科实业有限公司),1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),AL-204 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),AS10200ADT 型药用超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),RHP-1000A 型高速多功能粉碎机(永康市荣浩工贸有限公司)。TGL-16M 型台式高速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司)。

药材于 2015 年 6 月采自新疆昭苏县,由新疆伊犁州食品药品检验所敬松副主任药师鉴定为忍冬科植物沼生忍冬 *Lonicera alberti* 的干燥藤、叶和花,样品储存于新疆药物研究所。绿原酸对照品(批号 110753-200413,中国食品药品检定研究院),3,5 二

咖啡酰奎宁酸和 4,5 二咖啡酰奎宁酸(批号 MUST-15042518,15081414;成都曼斯特生物科技有限公司),所有对照品纯度均 > 98%。D101 型大孔吸附树脂(天津南开大学),柱色谱及薄层色谱用硅胶(青岛海洋化工厂),LH-20 羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20, Amersham Pharmacia Biotech AB 公司),ODS RP-18(日本 YMC 公司),乙腈为色谱纯,甲醇等所用试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取与分离 取沼生忍冬藤 1.6 kg,加入 8 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,减压浓缩至浸膏。浸膏以适量硅胶拌样后上硅胶柱,分别用石油醚-乙酸乙酯(1:0~0:1)和 60% 乙醇溶液梯度洗脱。其中石油醚-乙酸乙酯 1:1 和 6:4 洗脱部分经反复硅胶柱色谱得到化合物 **1** (6.3 mg),**2** (6.4 mg) 和 **3** (11.1 mg)。石油醚-乙酸乙酯 7:3 洗脱部分经反复硅胶柱色谱,再经 Sephadex LH-20 纯化,分离得到化合物 **4** (76.3 mg)。60% 乙醇洗脱部分以水混悬溶解后,上 D101 型大孔树脂,分别以水,30% 乙醇,50% 乙醇和 95% 乙醇洗脱。其中 30% 乙醇洗脱部分上 ODS RP-18 柱,以不同体积分数甲醇溶液梯度洗脱,再经反复 ODS RP-18 和 Sephadex LH-20 柱色谱得到化合物 **5** (241.3 mg), **6** (12.3 mg), **7** (11.6 mg), **8** (12.5 mg), **9** (32.8 mg) 和 **10** (80.3 mg)。

2.2 结构鉴定 化合物 **1** 淡黄色粉末(甲醇),10% 硫酸乙醇溶液显色呈黄色,1% 三氯化铁乙醇溶液显色呈黄绿色;¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 6.70 (1H, br s, H-6), 6.36 (1H, br s, H-8), 7.59 (1H, br s, H-2'), 6.90 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 7.48 (1H, br d, *J* = 8.0 Hz, H-6'), 3.86 (3H, s, 3-

OCH₃), 3.80(3H, s, 7-OCH₃), 12.70(1H, s, 5-OH);
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 155.4 (C-2),
137.2(C-3), 177.4(C-4), 160.3(C-5), 97.1(C-6),
164.4(C-7), 91.6(C-8), 155.6(C-9), 104.5(C-
10), 120.0(C-1'), 115.1(C-2'), 144.7(C-3'),
148.4(C-4'), 114.8(C-5'), 119.9(C-6'), 59.0(3-
OCH₃), 55.4(7-OCH₃); 以上理化性质与波谱数据
与文献[4]报道基本一致,故推断该化合物为3,7-
二甲基槲皮素 3,7-dimethylquercetin。

化合物2 淡黄色粉末(甲醇),10%硫酸乙醇
溶液显色呈黄色,1%三氯化铁乙醇溶液显色呈黄绿
色;¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 6.45(1H, d,
J = 2.0 Hz, H-6), 6.20(1H, d, J = 2.0 Hz, H-8),
7.68(1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.97(1H, d, J = 8.4
Hz, H-5'), 7.59(1H, dd, J = 8.4, 1.6 Hz, H-6'),
3.88(3H, s, 3'-OCH₃), 3.82(3H, s, 3-OCH₃), 12.70
(1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ:
157.3(C-2), 138.5(C-3), 178.5(C-4), 162.0(C-
5), 99.3(C-6), 165.2(C-7), 94.5(C-8), 156.1(C-
9), 104.6(C-10), 122.9(C-1'), 112.8(C-2'), 150.6
(C-3'), 148.3(C-4'), 116.2(C-5'), 121.7(C-6'),
60.2(3-OCH₃), 56.3(3'-OCH₃); 以上理化性质与
波谱数据与文献[5]报道基本一致,故推断该化合
物为3,3'-二甲基槲皮素 3,3'-dimethylquercetin。

化合物3 淡黄色粉末(甲醇),10%硫酸乙醇
溶液显色呈黄色,1%三氯化铁乙醇溶液显色呈黄绿
色。¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 7.71(1H, br
s, H-2'), 7.57(1H, d, J = 8.4 Hz, H-6'), 6.91(1H,
d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.43(1H, br s, H-8), 6.21
(1H, br s, H-6)。以上波谱数据及理化性质与文献
[6]报道基本一致,并与槲皮素对照品共薄层,Rf值
一致,故推断该化合物为槲皮素 quercetin。

化合物4 白色粉末(甲醇),10%硫酸乙醇溶
液显色呈紫红色;¹H-NMR(C₅D₅N, 400 MHz) δ:
5.22(1H, br s, H-12), 3.48(1H, m, H-3), 2.66(1H,
d, J = 11.2 Hz, H-18), 1.27(3H, s, H-27), 1.24
(3H, s, H-25), 1.09(3H, s, H-26), 1.03(3H, d, J =
6.4 Hz, H-30), 0.98(3H, d, J = 6.4 Hz, H-29), 0.92
(3H, s, H-24), 1.05(3H, s, H-23); ¹³C-NMR
(C₅D₅N, 100 MHz) δ: 39.6(C-1), 29.3(C-2), 78.6
(C-3), 40.5(C-4), 56.3(C-5), 19.3(C-6), 34.0(C-
7), 39.9(C-8), 48.5(C-9), 37.9(C-10), 24.1(C-
11), 126.1(C-12), 139.7(C-13), 43.0(C-14), 28.6
(C-15), 24.4(C-16), 48.5(C-17), 54.0(C-18),

40.0(C-19), 39.9(C-20), 31.6(C-21), 37.8(C-
22), 29.2(C-23), 17.9(C-24), 16.2(C-25), 17.1
(C-26), 24.1(C-27), 180.3(C-28), 18.0(C-29),
21.9(C-30)。以上波谱数据与理化性质与文献
[7]报道基本一致,故推断该化合物为乌苏酸 ursolic
acid。

化合物5 白色粉末(甲醇),10%硫酸乙醇溶
液显色呈紫红色;¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ:
7.42(1H, s, H-3), 5.29(1H, d, J = 4.4 Hz, H-1),
4.67(1H, d, J = 8.0 Hz, Glc-1-H); 4.06(1H, m, H-
7), 3.92(1H, br d, J = 12.4 Hz, Glc-H-6), 3.70(3H,
s, COOCH₃), 3.68(1H, br d, J = 12.0 Hz, Glc-H-6),
3.39(1H, m, Glc-H-3), 3.35(1H, m, Glc-H-5), 3.33
(1H, m, Glc-H-4), 3.29(1H, m, Glc-H-2), 3.13
(1H, m, H-5), 2.25(1H, m, H-6b), 2.05(1H, m, H-
9), 1.89(1H, m, H-8), 1.64(1H, m, H-6a), 1.12
(3H, d, J = 6.8 Hz, H-10); ¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 100
MHz) δ: 170.0(C-11), 152.6(C-3), 114.5(C-4),
100.5(C-1'), 98.2(C-1), 78.9(C-3'), 78.5(C-5'),
75.5(C-2'), 75.2(C-7), 72.1(C-4'), 63.3(C-6'),
52.1(-OCH₃) 48.9(C-9), 43.2(C-6), 42.7(C-8),
32.7(C-5), 13.9(C-10), 以上理化性质及波谱数据
与文献[8]报道基本一致,故推断该化合物为马钱
子苷 loganin。

化合物6 淡黄色粉末,TLC检测并以1%三氯
化铁乙醇溶液显色呈墨绿色,且Rf值与对照品绿原
酸一致;HPLC保留时间也与对照品一致;故推断该
化合物为绿原酸 chlorogenic acid。

化合物7 淡黄色粉末,10%硫酸乙醇溶液显
色呈黄色,¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 7.66
(1H, br s, H-2'), 7.52(1H, br d, J = 8.4 Hz, H-6'),
6.88(1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.76(1H, br s, H-
6), 6.64(1H, br s, H-8), 4.80(1H, d, J = 7.2 Hz, H-
1"), 3.78 ~ 3.16(5H, H-2" ~ H-6"); ¹³C-NMR
(DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 143.8(C-2), 137.5(C-3),
171.2(C-4), 158.6(C-5), 103.4(C-6), 162.6(C-
7), 97.5(C-8), 157.4(C-9), 107.1(C-10), 122.2
(C-1'), 115.0(C-2'), 145.3(C-3'), 147.5(C-4'),
115.8(C-5'), 119.7(C-6'), 104.2(C-1"), 73.9(C-
2"), 75.9(C-3"), 69.9(C-4"), 77.7(C-5"), 61.0
(C-6")。以上波谱数据及理化性质与文献[9]报道
基本一致,故推断该化合物为槲皮素 5-O-β-D-吡喃
葡萄糖苷 quercetin 5-O-β-D-glucopyranoside。

化合物8 淡黄色粉末,1%三氯化铁乙醇溶液

显色呈墨绿色;¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 2.07 ~ 2.36 (4H, m, H-2, 6), 4.35 (1H, m, H-5), 5.04 (1H, dd, J = 3.2, 8.8 Hz, H-4), 5.65 (1H, m, H-3), 6.29 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8'), 6.27 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8''), 6.78 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.74 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5''), 6.93 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6''), 7.04 (1H, br s, H-2''), 7.03 (1H, br s, H-2'), 7.58 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'), 7.56 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'');¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 36.9 (C-6), 41.3 (C-2), 69.8 (C-3), 71.0 (C-5), 75.0 (C-4), 75.9 (C-1), 114.6 (C-8'), 114.7 (C-8''), 114.8 (C-2', 2''), 116.2 (C-5', 5''), 122.9 (C-6', 6''), 127.5 (C-1', 1''), 146.5 (C-3', 3''), 147.0 (C-7', 7''), 149.3 (C-4', 4''), 168.2 (C-9'), 168.3 (C-9''), 178.1 (COOH)。以上数据与文献[10]报道基本一致,故鉴定该化合物为3,4-二咖啡酰奎宁酸3,4-O-dicaffeoylquinic acid。

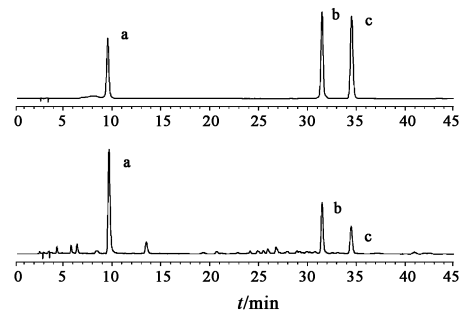
化合物9 淡黄色无定形粉末,1%三氯化铁乙醇溶液显墨绿色;¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 2.18 (2H, m, H-2), 2.29 (2H, m, H-6), 3.96 (1H, dd, J = 3.2, 7.6 Hz, H-4), 3.96 (2H, m, H-3, H-5), 6.25 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8'), 6.33 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8''), 6.76 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-5', 5''), 6.95 (2H, m, H-6', H-6''), 7.05 (2H, br s, H-2', 2''), 7.52 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'), 7.60 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'');¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 35.7 (C-6), 37.4 (C-2), 70.4 (C-4), 71.8 (C-5), 72.3 (C-3), 74.5 (C-1), 114.9 (C-8''), 115.0 (C-2''), 115.3 (C-2'), 116.2 (C-5', 5''), 122.7 (C-6', 6''), 127.7 (C-1', 1''), 146.8 (C-7', 7''), 147.0 (C-3', 3''), 149.3 (C-4', 4''), 168.1 (C-9'), 168.6 (C-9''), 177.1 (COOH)。以上数据与文献[11]报道基本一致,故鉴定该化合物为3,5-二咖啡酰奎宁酸3,5-O-dicaffeoylquinic acid。

化合物10 淡黄色粉末,1%三氯化铁乙醇溶液显墨绿色;¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 2.03 (2H, m, H-2), 2.14 (2H, m, H-6), 4.95 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4), 5.37 (1H, m, H-5), 4.17 (1H, m, H-3), 6.14 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8''), 6.23 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8'), 6.74 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5', 5''), 6.96 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-6''), 6.98 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 7.02 (1H, br s, H-2', 2''), 7.42 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7''), 7.48 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7');

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 37.0 (C-2), 37.2 (C-6), 67.4 (C-3), 67.5 (C-5), 73.1 (C-4), 73.4 (C-1), 113.3 (C-8''), 113.6 (C-8'), 114.7 (C-2', 2''), 115.5 (C-5', 5''), 121.1 (C-6'), 121.2 (C-6''), 125.2 (C-1', 1''), 145.4 (C-3', 3''), 145.3 (C-7', 7''), 148.3 (C-4', 4''), 165.3 (C-9'), 165.8 (C-9''), 174.6 (COOH)。以上数据与文献报道[12]基本一致,故推断该化合物为4,5-二咖啡酰奎宁酸4,5-O-dicaffeoylquinic acid。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 采用Phenomenex C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 13 min, 12% A; 13 ~ 25 min, 12% ~ 22% A; 25 ~ 45 min, 22% A),流速设定1.0 mL·min⁻¹,检测波长327 nm,柱温30 ℃,进样量10 μL。在此条件下,药材中绿原酸,3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸色谱峰与其他成分分离良好,分离度均 > 1.5,理论塔板数均 < 1万。对照品及供试样品色谱图见图1。



a. 绿原酸; b. 3,5-二咖啡酰奎宁酸; c. 4,5-二咖啡酰奎宁酸

图1 混合对照品(A)和药生忍冬藤(B) HPLC

Fig. 1 HPLC of mixed standards (A) and extract of *Lonicera alberti caulis* (B)

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸,3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品适量,以甲醇溶解并定容至25 mL量瓶中,摇匀,分别制得质量浓度为0.200, 0.196, 0.196 g·L⁻¹的对照品混合溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取药生忍冬藤药材粉末0.1 g(过40目筛),置于50 mL的具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,超声提取30 min,放冷,称重,用50%甲醇补足减失的质量,用高速离心机离心,取上清液,以0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.3.4 线性关系考察 精密量取2.3.2项下对照品溶液0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mL,分别置于

10 mL量瓶中,用甲醇定容。制得绿原酸,3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸不同质量浓度的混合对照品溶液。按2.3.1项下色谱条件进行测定,以峰面积(Y)对质量浓度(X, g·L⁻¹)进行线性回归,得到标准曲线,结果见表1。

表1 线性关系考察

Table 1 Results of linear relation test

成分	线性范围/g·L ⁻¹	回归方程	r
绿原酸	0.002 00~0.060 00	Y=23 725.31X-0.768 7	0.999 7
3,5-二咖啡酰奎宁酸	0.001 96~0.058 80	Y=34 702.60X-5.802 4	0.999 8
4,5-二咖啡酰奎宁酸	0.001 96~0.058 80	Y=38 208.38X-9.319 1	0.999 9

2.3.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液10 μL,连续进样测定6次,记录绿原酸,3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸的峰面积,RSD分别为0.3%,1.3%,1.5%,说明仪器精密度良好。

表2 沼生忍冬藤药材中3种成分的加样回收率试验

Table 2 Recoveries test of 3 components in *Lonicera alberti* caulis

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
绿原酸	0.050 0	0.367 5	0.368 0	0.735 1	99.89	100.15	0.9
	0.050 1	0.368 2	0.368 0	0.738 3	100.57		
	0.050 1	0.368 2	0.368 0	0.735 3	99.77		
	0.050 0	0.367 5	0.368 0	0.731 9	99.03		
	0.050 2	0.369 0	0.368 0	0.736 9	99.97		
	0.050 0	0.367 5	0.368 0	0.741 6	101.67		
3,5-二咖啡酰奎宁酸	0.050 0	0.122 3	0.121 5	0.244 9	100.87	99.68	1.8
	0.050 1	0.122 6	0.121 5	0.241 7	98.03		
	0.050 1	0.122 6	0.121 5	0.246 1	101.3		
	0.050 0	0.122 3	0.121 5	0.245 2	101.67		
	0.050 2	0.122 8	0.121 5	0.243 3	99.16		
	0.050 0	0.122 3	0.121 5	0.240 5	97.25		
4,5-二咖啡酰奎宁酸	0.050 0	0.072 8	0.074 5	0.146 0	98.26	99.52	1.5
	0.050 1	0.073 0	0.074 5	0.145 3	97.08		
	0.050 1	0.073 0	0.074 5	0.148 1	100.80		
	0.050 0	0.072 8	0.074 5	0.147 7	100.63		
	0.050 2	0.073 1	0.074 5	0.147 6	100.06		
	0.050 0	0.072 8	0.074 5	0.147 5	100.31		

2.3.9 样品含量测定 精密称取沼生忍冬不同药用部位药材(藤、叶和花)粉末0.1 g(过40目筛),按2.3.3项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下

2.3.6 稳定性试验 取待测供试品溶液1份,分别在0,2,6,10,14,24 h进样测定,记录绿原酸,3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸的峰面积,其RSD分别为0.2%,1.6%和1.6%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3.7 重复性试验 精密称取沼生忍冬藤药材粉末0.1 g(过40目筛),按2.3.3项下方法制备供试品溶液,平行制备6份,按2.3.1项下色谱条件进样分析,求得药材中绿原酸,3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸的平均质量分数分别为7.35,2.45,1.46 mg·g⁻¹,RSD分别为0.3%,0.9%,0.7%。结果表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的沼生忍冬藤药材粉末约0.05 g(过40目筛),共6份,分别加入相同含量的绿原酸,3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品。按2.3.3项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样分析,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

色谱条件测得不同药用部位中绿原酸,3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸的含量,结果见表3。

表 3 沼生忍冬不同部位含量测定

Table 3 Results of quantification of different parts of *Lonicera alberti* %

药用部位	绿原酸	3,5-二咖啡酰奎宁酸	4,5-二咖啡酰奎宁酸
藤	0.74	0.25	0.15
叶	2.62	1.73	0.90
花	3.99	1.77	2.33

3 讨论与结论

本研究从沼生忍冬藤中共分离纯化得到了 10 个化合物,分别鉴定为 3,7-二甲基槲皮素(1),3,3'-二甲基槲皮素(2),槲皮素(3),乌苏酸(4),马钱子苷(5),绿原酸(6),槲皮素 5-O-β-D-葡萄糖苷(7),3,4-二咖啡酰奎宁酸(8),3,5-二咖啡酰奎宁酸(9)和 4,5-二咖啡酰奎宁酸(10)。除化合物 1,2 和 7 为本属首次发现外,其余化合物均为首次从该植物中分离纯化得到。本文进一步对药材中的 3 种咖啡酰奎宁酸类成分(6,9 和 10)进行了含量测定。在含量分析中,考察了不同比例乙腈和 0.2% 磷酸水溶液对目标成分的分离效果,最终选定的比例为(0 ~ 13 min, 12% A; 13 ~ 25 min, 12% ~ 22% A; 25 ~ 45 min, 22% A);该色谱条件可使各成分得到有效分离。本测定方法简便、灵敏、准确,能够同时测定沼生忍冬药材中的 3 种咖啡酰奎宁酸类成分。

试验结果显示沼生忍冬不同药用部位中绿原酸,3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸的含量存在明显的差异。3 种成分的含量均为花中最高,叶次之,藤中含量最低。2015 年版《中国药典》规定金银花中绿原酸的含量不得 <1.5%;忍冬藤中

绿原酸的含量不得 <0.10%。沼生忍冬花和藤中的绿原酸含量分别高于 2015 年版《中国药典》规定值,说明该药材具有较好的开发前景。

[参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 七十二卷[M]. 北京: 科学出版社, 1972: 165.
- [2] 朱国强, 李晓瑾, 贾晓光. 新疆药用植物名录[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 2014: 251.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 193, 221.
- [4] 许云龙, 郑兴, 何以能. 栗柄金粉蕨的黄酮类成分[J]. 云南植物研究, 1999, 21(4): 497-504.
- [5] 梁晶晶, 孙连娜, 陶朝阳, 等. 水烛香蒲叶的化学成分研究[J]. 药学实践杂志, 2007, 25(3): 150-152.
- [6] 肖梅, 曹宁, 樊晶晶, 等. 乌药叶黄酮类化学成分研究[J]. 中药材, 2011, 34(1): 62-64.
- [7] 潘萍, 孙启时. 大叶紫珠的化学成分研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(9): 565-567.
- [8] 杨炳友, 宋丹丹, 韩华, 等. 接骨木根皮的化学成分研究(I)[J]. 中草药, 2014, 45(10): 1367-1372.
- [9] 曹园, 瞿慧, 姚毅, 等. 鬼针草化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(24): 3435-3439.
- [10] 周渊, 周思详, 姜勇, 等. 毛冬青叶的化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1479-1484.
- [11] 张慧晔, 魏孝义, 黄琳. 口炎清中酚酸类成分研究[J]. 中国现代中药, 2012, 14(3): 20-21.
- [12] 倪付勇, 刘露, 宋亚玲, 等. 金银花中抗补体活性酚酸类成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 269-274.

[责任编辑 顾雪竹]