

长白山区野生金银忍冬茎和叶提取液中绿原酸的检测及体外抑菌研究

胡彦武¹, 李敏玲², 王 娇¹, 王 迪¹

(1. 通化师范学院 制药与食品科学系 吉林 通化 134002; 2. 吉林省通化振国药业有限公司 吉林 通化 134110)

摘要:采用 HPLC 法对长白山区野生金银忍冬茎和叶中绿原酸含量进行测定, 最小抑菌浓度(MIC)测定法对其抑菌效果进行考察。结果表明:长白山区野生金银忍冬茎木质部、韧皮部和叶中均含有绿原酸, 含量分别为 0.42%、0.44%、1.54%, 其含量和抑菌效果因部位不同而有差异。该结果为野生金银忍冬资源的开发利用奠定了科学的理论依据。

关键词:长白山; 金银忍冬; 茎和叶; 绿原酸; 抑菌

中图分类号: S 567.23⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)09-0172-02

忍冬属是忍冬科中较大的属之一, 现知全世界约有 200 种, 我国约 100 种, 该属植物多为直立或攀援状灌木, 许多忍冬可供药用^[1]。其中金银忍冬 *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. 是其中一种, 又名金银木、鸡骨头、狗集谷, 为忍冬科忍冬属植物, 在我国大部分省区均有分布。在湖南作金银花用药, 东北长白山区作民间药用。国内外大部分研究主要集中在其花和果实上, 而对其茎和叶的研究尚未见报道。该试验采用准确可靠、专属性强的 HPLC 法对金银忍冬茎及叶中绿原酸的含量进行测定, 并对其提取液的抑菌效果进行了研究, 以期评价金银忍冬不同部位的药用价值, 为其资源合理开发利用提供一定参考依据。

1 材料与方法

美国 Agilent 1100 型高效液相色谱仪(包括 1100 四元泵、柱温箱、二极管阵列检测器、Agilent 化学工作站), KQ-200KDB 超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司), AL104 1/10 万电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110753200413), 金银忍冬茎、叶采自通化师范学院校园周边, 经通化师范学院于俊林教授鉴定。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等均由通化师范学院制药与食品科学系微生物实验室提供。水(娃哈哈纯净水), 乙腈、甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯。

第一作者简介: 胡彦武(1980-), 男, 吉林四平人, 硕士, 讲师, 现主要从事生药有效成分的分离鉴定及生物活性研究工作。E-mail: hywcz@163.com。

基金项目: 通化师范学院自然科学基金资助项目(200941)。

收稿日期: 2010-01-26

2 结果与分析

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomil C18(5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm) 柱; 流动相: 乙腈-0.4%磷酸溶液(13 : 87); 检测波长 327 nm; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 流速 0.8 mL/min; 理论塔板数按绿原酸峰计算应不低于 1 000。

2.2 对照品溶液配制

精密称取绿原酸对照品 10 mg, 加体积分数 50%甲醇定容到 10 mL 棕色容量瓶中, 制成每浓度为 1 mg/mL 的溶液, 从中精密量取 1 mL 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 加体积分数 50%甲醇定容, 即得浓度为 0.04 mg/mL 对照品溶液, 备用。

2.3 供试品溶液制备

取金银忍冬茎木质部、茎韧皮部和叶粉末各约 1 g, 精密称定, 加体积分数 50%甲醇 50 mL, 精密称定重量, 超声处理 30 min, 补足减轻的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加 50%甲醇至刻度, 摇匀。0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 弃初滤液, 取续滤液作为样品溶液。

2.4 线性关系的考察

精密吸取绿原酸对照品溶液 5、10、15、20、25 μ L 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以对照品进样量 X 为横坐标, 峰面积值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为 $Y=416.0745X+0.6715$, $r=0.9998$ ($n=5$), 结果表明绿原酸在 0.20~1.00 μ g 范围内, 具有良好的线性关系。

2.5 含量测定方法考察

精密度试验结果显示, $RSD=1.30\%$ ($n=3$), 表明仪器的精密度良好; 稳定性试验结果显示, $RSD=1.15\%$ ($n=5$), 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定; 重复性试验结果显示, $RSD=1.14\%$ ($n=5$), 表明方法的重现性良

好;加样回收率试验结果显示,平均回收率为 98. 52%, RSD= 1.35%(n= 5),表明测定方法稳定可靠^[3]。

2.6 样品中绿原酸的测定

取供试品溶液制备方法制备^[3]的金银忍冬茎和叶提取液 10 μL,按上述色谱条件,平行进样 3 次,测得金银忍冬茎和叶中绿原酸含量(见表 1)。

表 1 金银忍冬茎和叶中绿原酸含量测定结果(n= 3)

编号	部位	绿原酸平均含量 %	RSD/ %
1	茎韧皮部	0.44	0.65
2	茎木质部	0.42	0.78
3	叶	1.54	0.96

2.7 抑菌试验

2.7.1 金银忍冬茎和叶提取液的制备 取金银忍冬茎木质部、茎韧皮部和叶粉末各约 2 g,精密称定,各加体积分数 50%甲醇 50 mL,进行超声波提取,所得滤液进行旋转蒸发浓缩后,装入锥形瓶中,制成浓度为 0.1 g/mL 的药液,高压蒸汽(121℃, 10 min)灭菌后,置 4℃冰箱中冷藏备用^[4]。

2.7.2 种菌液的制备 选取常用于绿原酸抑菌试验的几种菌种:大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌,分别在肉汤培养基 37℃下培养 24 h 后,经振荡、搅匀,采用灭菌水稀释菌悬液后备用。

2.7.3 金银忍冬茎和叶提取液对供试菌的抑菌作用 取直径 6 mm 的滤纸片分别放入金银忍冬茎木质部、茎韧皮部和叶提取液中,并将各部位提取液置于 30℃水浴锅中浸泡 4 h。取出滤纸片,自然风干。将各种供试菌悬液分别用无菌棉均涂抹于含琼脂的无菌平板中,然后用无菌镊子夹取含浸出液的滤纸片平整贴于含菌平板上,每皿贴 2~ 4 片,细菌培养箱中 36℃培养下 24 h,测量滤纸片周围抑菌圈直径大小,比较抑菌效果(见表 2)。

2.7.4 最低抑菌浓度(MIC)的测定 用琼脂培养基稀

释金银忍冬茎和叶提取液为一系列连续倍比稀释液,将其分装于试管中并加入种菌液 0.05 mL, 37℃下培养 48 h,以含药量低而肉眼看不见细菌生长的一管含药量为药物对该菌种的 MIC。结果显示,金银忍冬茎木质部、茎韧皮部和叶片提取液对大肠杆菌的 MIC 分别为 0.025、0.05、0.025 g/mL,对金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 0.025、0.05、0.025 g/mL,对枯草芽孢杆菌的 MIC 分别为 0.05、0.05、0.05 g/mL,说明对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用较强。

表 2 金银忍冬不同部位提取液的抑菌效果

菌种	部位		
	茎木质部	茎韧皮部	叶
大肠杆菌	9.20	9.00	9.50
金黄色葡萄球菌	9.30	7.20	9.00
枯草芽孢杆菌	5.00	5.10	5.50

3 讨论

金银忍冬叶、茎木质部及茎韧皮部中均含有绿原酸,且叶(1.54%)> 茎韧皮部(0.44%)> 茎木质部(0.42%)。表明金银忍冬具有药用开发利用价值。

金银忍冬叶、茎木质部及茎韧皮部的提取液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌均有较强的抑制作用,其抑菌强度与各部位所含绿原酸量的高低无线性关系,表明金银忍冬各部位提取液中除含有绿原酸外,还含有其它的抑菌成分,其抗菌效果亦是所有抑菌物质发挥的协同作用。

参考文献

[1] 于加平,王夕宇,马中宇.黄花忍冬果实中绿原酸的提取及含量测定[J].安徽农业科学,2008,36(6):2199-2200.
[2] 中国药典委员会.中国药典.一部[M].北京:化学工业出版社,2005:152.
[3] 胡彦武,于俊林,孙仁爽等.金银忍冬茎和叶中绿原酸的提取及含量测定[J].安徽农业科学,2008,36(5):10940-10941.
[4] 梅林.秀山金银花、叶、茎中绿原酸的检测及其抑菌作用研究[J].中国药业,2007,16(3):5-7.

Determination of Chlorogenic Acid in the Stems or Leaves of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. in Changbai Mountain and its Antibacterial Activities

HU Yan-wu¹, LI Min-ling², WANG Jiao¹, WANG Di¹
(1. Department of Pharmaceutics and Food Science, Tonghua Narmal College, Tonghua, Jilin 134002; 2. Jilin Province Tonghua Zhenguo Pharmaceutical Limited Company, Tonghua, Jilin 134002)

Abstract: The content of chlorogenic acid in the stems and leaves of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. in Changbai Mountain were determined by HPLC, and the antibacterial effects were expressed by its minimal inhibitory concentration (MIC). The results showed that the content of chlorogenic acid in the stems and leaves of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. were 0.34%, 0.27%, 0.11%, and the extraction of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. showed highly antibacterial activities. The contents of chlorogenic acid and the antibacterial effects were different with different parts of *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim. It provided theoretical basis for the further research on wild *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim in Changbai Mountain.

Key words: Changbai mountain; *Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim.; stems and leaves; chlorogenic acid; antibacterial activities