槲寄生饮片断面异常绿色的成因分析及与质量相关性的探究

车苏容[1]　陈金佩[2]　郑文伟[1]　王阿四[1]

（1 福建中医药大学药学院，福州，350122；2 福建承创堂中药有限公司，福州，350008）

摘要　目的：通过实验方法分析槲寄生断面异常绿色的成因并探讨该绿色与质量的相关性。方法：用溶剂提取该绿色成分，采用紫外灯下观察荧光，紫外-可见光吸收波长扫描、薄层色谱等方法判断性质，并用高效液相色谱法测有效成分紫丁香苷的含量。结果：该绿色成分可被 95% 或无水乙醇冷提，提取液在 365 nm 紫外光下显红色荧光，在波长 665 nm 有最大吸收峰。该提取液薄层下相应斑点 Rf 值及颜色与叶绿素相符合，紫丁香苷含量测定达到药典标准。结论：槲寄生的断面绿色是由于叶绿素大量保留形成的。饮片的紫丁香苷含量不因绿色多少而减少。叶绿素被完好保存并颜色特异可能与加工方法、栽培条件、采收时间和贮藏条件等因素相关，具体原因有待进一步探讨，但药典的有关描述是否需要修订值得商榷。

关键词　槲寄生；断面；异常绿色；叶绿素；紫丁香苷

Investigation on the Reason and Quality of Decoction Pieces of Colored Mistletoe Herb with Green Cross Section

Che Surong[1], Chen Jinpei[2], Zheng Wenwei[1], Wang Asi[1]

(1 *Fujian University of Traditional Chinese Medicine*, *Fuzhou* 350122, *China*; 2 *Fujian Chengchuangtang Traditional Chinese Medicine Co. Ltd.*, *Fuzhou* 350008, *China*)

Abstract　**Objective**: To investigate the reasons why the cross section of colored mistletoe herb can be green. **Methods**: The green components were extracted by solvent, and the property of the components were determined by ultraviolet light, fluorescent light-visible lights' wavelength scanning and thin layer chromatography, and the content of active components was determined by HPLC. **Results**: The 95% ethanol extract of green colored mistletoe herb pieces contained the green components. The ethanol extract had red fluorescence under 365 nm UV light and the wavelength of the maximum absorption peak was 665 nm. The Rf value and color of spot on extract correspond with chlorophyll. The syringin in the green decoction pieces of colored mistletoe herb reached Chinese Pharmacopoeia standards. **Conclusion**: The green color in the cross-section of colored mistletoe herb was caused by chlorophyll, and there was no declination of syringin. There should be more studies on the reasons why the chlorophyll was saved so well with the special green color. Whether the related description on China's pharmacopoeia should be revised should be further discussed.

Key Words　Colored mistletoe herb; Cross section; Special green color; Chlorophyll; Syringin

中图分类号：R284.1　　**文献标识码**：A　　**doi**：10.3969/j.issn.1673－7202.2015.12.031

槲寄生为桑寄生科植物槲寄生 *Viscum coloratum* (Komar.) Nakai 的干燥带叶茎枝[1]。2010 版药典规定："槲寄生表面黄绿色，金黄色或黄棕色，皮部黄色，木部色较浅"[1]；2015 版药典对这一描述未做任何修订。而近几年来我们在商品饮片中经常发现槲寄生饮片的断面皮部为绿色；甚至皮部和髓部都为绿色，木部也微带绿色，即药材横断面整体为绿色，并且绿色异常偏蓝，这与常见的叶绿素的绿色有一定偏差。该饮片断面为绿色不符合药典的描述，是否属于正常现象？市场人士的解释为"新货多为绿色，放置时间久了则绿色消失"。根据经验，我们认为叶绿素被完好保留的可能性最大。是需要修订标准中有关描述，还是应当用陈货？取决于该绿色成分是什么及该颜色与质量优劣是否有相关性。为了证明猜想，我们拟通过溶剂来提取该饮片中的绿色成分。考虑到叶绿素较易溶于有机溶剂[2]，使用乙醇、石油醚可获得槲寄生的主要叶绿素成分。叶绿素有特定的紫外-可见光吸收波长[7]和荧光现象[8]，并可以通过与叶绿素的薄层层析对比[2-3]，证实叶绿素的存在。

1　仪器与试药

L5 型紫外可见分光光度计（上海仪电分析仪器有限公司）；FW100 型高速万能粉碎机（天津泰斯特仪器有限公司）；KQ-500E 型超声波清洗器（昆山市

基金项目：福建省大学生创新创业训练计划项目（编号：201410393064）；福建中医药大学重点学科平台资助项目（编号：X2014105）

超声仪器有限公司);ZF-2 型三用紫外仪(上海安亭电子仪器厂);安捷伦 1260 高效液相色谱仪(安捷伦科技北京有限公司);BSA224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);硅胶 G 板(100 mm × 200 mm,青岛海洋化工工厂分厂)。

槲寄生 a(断面黄色)、槲寄生 b(断面绿色),槲寄生 c(断面黄绿混合),均为市售饮片,经鉴别为桑寄生科植物槲寄生 *Viscum coloratum*(Komar.)Nakai 的干燥带叶茎枝。紫丁香苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111574-200201,供含量测定用)。新鲜菠菜(自购于市场)。甲醇为色谱纯,无水乙醇、95% 乙醇、磷酸、石油醚、乙酸乙酯、碳酸钙均为分析纯。

2 实验方法

2.1 断面绿色饮片提取液的强光照射和荧光观察

2.1.1 槲寄生提取液的制备 将槲寄生 b 的饮片取适量粉碎,称取 3.0 g;量取 15 mL 无水乙醇,超声 5 min。过滤,收集到试管中,备用。

2.1.2 强光照射实验 将提取液均分成两份编号 1、2。1 号提取液放在日光灯管近距离强光下照射,2 号放在暗处保存,经过 3 ~ 4 h 后在白背景下观察两者的颜色差异。

2.1.3 荧光观察 将 1 号提取液放在 365 nm 紫外灯下照射,观察是否有荧光。

2.2 断面绿色饮片的光照试验

取一定量的槲寄生 b 分成两份编号 1、2。1 号放置在阳光下光照,2 号放置在无阳光照射的地方,各放置一段时间后观察对比两者颜色变化。

2.3 两种饮片提取液的紫外-可见光吸收波长扫描

2.3.1 槲寄生提取液的制备 将槲寄生 a、槲寄生 b 饮片取适量粉碎,分别称取 2 份 1.0 g 的粉末,编号 1、2、3、4。将粉末分别倒入已编号的烧杯中,加入 10 mL 的 95% 乙醇,超声处理 5 min。取滤纸 1 张,置漏斗中,用 95% 乙醇湿润,沿玻棒把提取液倒入漏斗中,过滤到已编号的试管中。

2.3.2 波长扫描 将提取液分别放入比色皿中,在波长 200 ~ 780 nm 进行全波长扫描。

2.3.3 紫外光照射 在阴暗条件下,将已编号的试管中的提取液放置于波长为 365 nm 的紫外光下,观察提取液是否有红色荧光。

2.4 针对叶绿素相关成分的薄层层析对比实验

2.4.1 叶绿素对照品的制备 取新鲜菠菜剪去大叶脉,称取 5.0 g,剪成小于 2 mm 宽的细丝。将材料加入已编号的 250 mL 的锥形瓶,各加入 0.1 g 的碳酸钙、石油醚和无水乙醇混合液(3∶2) 15 mL,然后在室温条件下超声处理 20 min;取滤纸放入漏斗,用石油醚和无水乙醇混合液(3∶2)湿润,沿玻棒把提取液倒入漏斗中,过滤到已编号的试管中,备用。

2.4.2 槲寄生提取液的制备 分别称取槲寄生 a 和槲寄生 b 的粉末各 5.0 g。同上方法制备,获得槲寄生提取液作为样品,备用。

展开:在层析缸中加入 20 mL 石油醚和乙酸乙酯的混合液(3∶2)[2-3],作为展开剂,盖好玻璃盖,摇动使层析缸中的蒸气达到饱和。展开,计算 Rf 值。

2.5 三种饮片中紫丁香苷的含量测定

本实验参照 2010 版药典规定的方法[1],采用高效液相色谱法。

2.5.1 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-0.1% 磷酸溶液(15∶85)为流动相;检测波长为 264 nm。理论板数按紫丁香苷峰计算应不低于 5 000。

2.5.2 对照品溶液的制备 取紫丁香苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 50 μg 的溶液,即得。

2.5.3 供试品溶液的制备 取槲寄生 a、b、c 细粉各约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理 30 min,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减失重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.5.4 测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。

3 结果

3.1 断面绿色饮片提取液的强光照射和荧光观察 见图 1、图 2。

3.2 断面绿色饮片的光照试验 见图 3。

3.3 两种饮片提取液的紫外-可见光吸收波长扫描 见图 4。

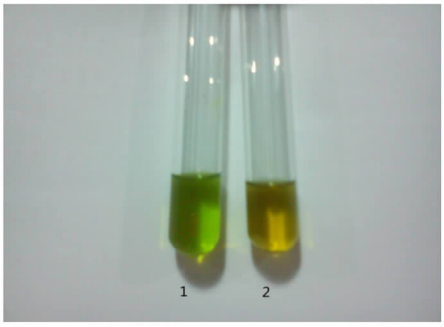

图 1 断面绿色饮片提取液光照前后比较

注:1. 光照前 2. 光照后

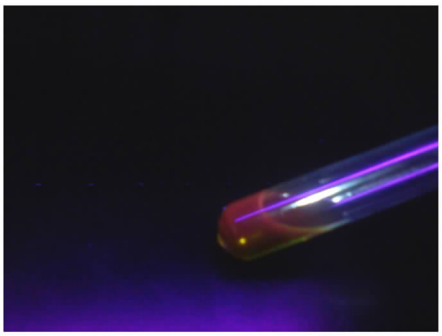

图 2　断面绿色饮片提取液荧光观察

图 3　饮片光照前后照片

注:左:光照前　右:光照后

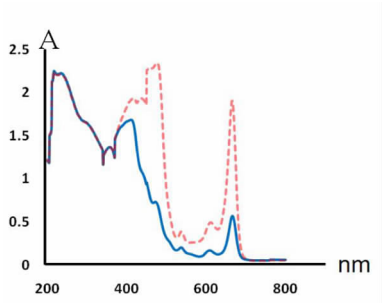

图 4　95% 乙醇提取液吸收光谱扫描图

注:实线为槲寄生 a(断面黄色)　虚线为槲寄生 b(断面绿色)

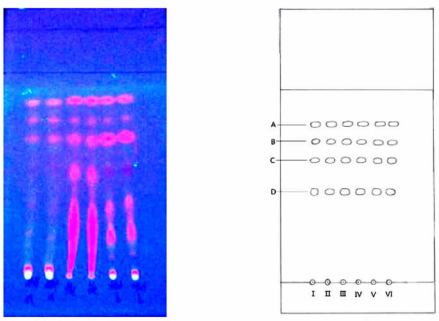

图 5　槲寄生饮片针对叶绿素相关成分的薄层展开图

注:Ⅰ、Ⅱ为槲寄生 a 提取液,Ⅲ、Ⅳ为菠菜提取液,Ⅴ、Ⅵ为槲寄生 b 提取液　A. 脱镁叶绿素(Rf = 0.82)B. 叶绿素 a(Rf = 0.73)C. 叶绿素 b(Rf = 0.64)D. 叶黄素(Rf = 0.47)

表 1　两种槲寄生饮片吸收峰对应吸光度值

槲寄生 a(断面黄色)	波长(nm)	211	216	357	410	666	
	峰值	2.126	2.243	1.363	1.679	0.563	
槲寄生 b(断面绿色)	波长(nm)	211	216	357	417	463	611	665
	峰值	2.086	2.202	1.335	1.913	2.280	0.549	2.113

表 1 可以看出,槲寄生 a(断面黄色)和槲寄生 b(断面绿色)在波长 211 nm、216 nm、357 nm、665 nm 处均有吸收峰。

3.4　针对叶绿素相关成分的薄层层析对比实验　见图 5。

3.5　三种饮片中紫丁香苷的含量测定　见图 6、表 2。

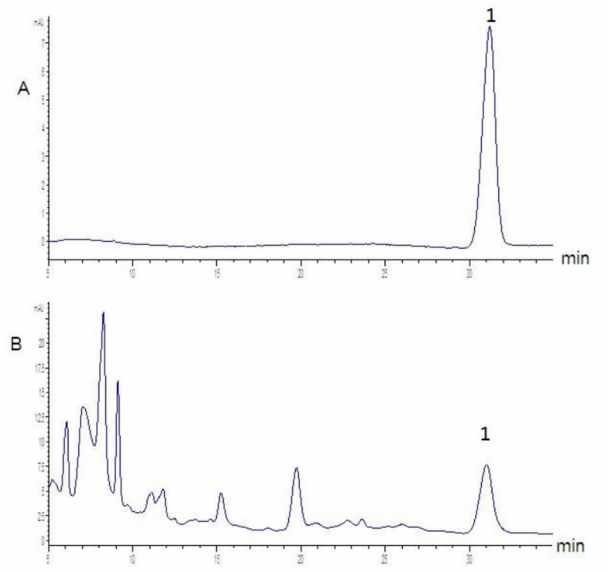

图 6　HPLC 色谱图

注:A. 对照品　B. 供试品　1. 紫丁香苷

表 2　三种槲寄生饮片中的紫丁香苷的含量

编号	产地	性状	含量(%)	合格情况
a	吉林	断面黄色	0.06	合格
b	吉林	断面绿色	0.12	合格
c	吉林	混杂饮片	0.13	合格

注:2010 版药典规定,槲寄生饮片中紫丁香苷含量不少于 0.025%。

4　讨论

通过图 4 和表 1 可以看出,槲寄生饮片的 95% 的乙醇提取液,经过紫外-可见光吸收波长扫描,在 665 nm 处均有吸收峰,但断面绿色的槲寄生饮片(槲寄生 b)样品的吸光度远大于断面黄色槲寄生饮片(槲寄生 a)样品的吸光度。根据文献,叶绿素提取液在 665 nm 有最大吸收峰[7],所以推断槲寄生 b 断面为绿色可能是叶绿素造成的结果。

图 1、图 2 表明,断面绿色饮片的无水乙醇提取

液经过强光照射绿色变浅消失。两种槲寄生饮片的无水乙醇提取液放在紫外光 365 nm 和 254 nm 均显红色荧光,但 365 nm 下的红色荧光更为明显。同时发现槲寄生 b 提取液的红色荧光颜色比槲寄生 a 的提取液更深。可以推断槲寄生 b 中含有叶绿素而且含量高于槲寄生 a。根据文献叶绿素提取液可以在紫外光线下显红色荧光[8],与我们的实验结果相符。在本次实验结束后,尝试过将槲寄生 b 提取液放置在阳光下照射,发现隔了 4 h 后,槲寄生 b 的乙醇提取液颜色由深绿色变为黄色。而后尝试将槲寄生 b 的部分饮片放置在阳光下晾晒(结果如图 1),放置一段时间后与避光保存的同一批槲寄生 b 的饮片对比,发现经过阳光照射的槲寄生 b 的饮片颜色较避光保存的饮片浅,但比溶液状态明显颜色变化时间较长。

为了进一步确定,用薄层层析的方法来验证槲寄生 b 中是否含有叶绿素。参考李凯的方法[3]提取菠菜的叶绿素,作为叶绿素对照品。薄层展开后(结果见图 4)发现在菠菜的叶绿素中含有的脱镁叶绿素、叶绿素 a、叶绿素 b 和叶黄素的斑点与槲寄生的提取液展开的斑点一一对应而且 Rf 值相同。证明了槲寄生 a、b 中确实含有叶绿素,且槲寄生 b 中叶绿素 b 的含量明显高于槲寄生 a。

如表 2 所示,一批断面绿色饮片,一批断面黄色饮片及一批混杂饮片按药典规定测其有效成分紫丁香苷含量均达到药典的标准(不少于 0.025%),准确地说,断面绿色或混杂绿色的饮片含量不比断面黄色的饮片含量低,是否断面绿色的含量更高,有待更多的批次样品来证明。

根据文献[6]提到有发现槲寄生断面绿色的饮片,认为可能类似于黄芩受潮发绿的现象,并通过挑选金黄色断面的槲寄生饮片 25 ℃的室温下浸泡 72 h,捞出放置 24 h,结果未出现发绿的现象,所以排除受潮引起发绿的推论,我们进行了复验,结果是一致的。

考虑到槲寄生的市场价格低廉且槲寄生传统质量评价中,不存在断面绿色为佳的说法,因此没有必要进行染色处理,这种行为的动机显然不成立。

5 结论与展望

断面为绿色的槲寄生饮片中的绿色是由于含有叶绿素大量保留形成的。而叶绿素为一种天然色素,安全无毒[6];不影响槲寄生的质量。以药典规定的紫丁香苷作为指标成分考察饮片断面绿色与质量的相关性,未发现可导致辞含量变低的证据。

为何此种饮片的绿色保存完好,是采收过早叶绿素含量过高还是加工方法变了?(经调查产地仍然以阳光下晾晒为主)还是生长过程中受到土壤、水质或环境的影响?(叶绿素的生成与某些金属元素相关)为什么有的饮片是黄绿色有的是偏蓝绿色,这种蓝绿色是否正常?可否受到加工辅料或增重物质的影响?笔者在此抛砖引玉,希望同行有更多思路,为提高槲寄生质量作出研究贡献。

参考文献

[1]国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版第一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:350.

[2]李芬芳,郭军峰. 菠菜中色素提取方法的改进[J]. 渭南师范学院学报:综合版,2011,26(10):80-82,92.

[3]李凯. 薄层色谱方法的改进[J]. 实验室科学,2008(1):163-166.

[4]张秀君,孙钱钱,乔双,等. 菠菜叶绿素提取方法的比较研究[J]. 作物杂志,2011(3):57-59.

[5]黄持都,胡小松,廖小军,等. 叶绿素研究进展[J]. 中国食品添加剂,2007(3):114-118.

[6]黄剑林,周秦,马润梅. 薄层法对比两种颜色槲寄生的成分[J]. 陕西中医,2006,27(10):1286.

[7]孔祥生,易现峰. 植物生理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2008:77-78.

[8]徐惠,朱鹏飞. "探秘生活中常见荧光物质与荧光现象"活动案例[J]. 化学教学,2014,36(2):31-33,36.

[9]陈小全,田坤新,邵辉莹,等. 菠菜叶绿素的提取及叶绿素铜钠盐的制备[J]. 泰山医学院学报,2010,31(4):259-261.

[10]贾淑梅,王君玲. 菠菜中色素的提取及其性质的研究[J]. 喀什师范学院学报,2002,23(3):51-53.

(2015 - 11 - 03 收稿 责任编辑:洪志强)