

# 红凤菜不同器官中黄酮类和奎宁酸类成分的 HPLC 法测定

鲜新, 吕寒, 孟秀花, 马丽, 刘艳, 任冰如<sup>①</sup>, 陈剑

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省抗糖尿病药物筛选技术服务中心, 江苏 南京 210014]

## Determination of components of flavonoids and quinic acids in different organs of *Gynura bicolor* by HPLC method

XIAN Xin, LYU Han, MENG Xiuhua, MA Li, LIU Yan, REN Bingru<sup>①</sup>, CHEN Jian (Jiangsu Provincial Service Center for Anti-diabetic Drugs Screening, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(6): 66-68

**Abstract:** Contents of rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid in root, stem and leaf of *Gynura bicolor* (Willd.) DC. were determined by using HPLC method. The results show that all 7 components can be detected in leaf of *G. bicolor*, and their contents are 0.279-4.804 mg · g<sup>-1</sup>, in which, contents of chlorogenic acid and isoquercitrin are relatively high, while contents of rutin and neochlorogenic acid are relatively low; only chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid are detected in its root and stem, and their contents are all significantly lower than those in leaf. It is recommended that leaf of *G. bicolor* can be used as the medicinal part based on the measured result.

**关键词:** 红凤菜; 黄酮类; 奎宁酸类; HPLC 法; 药用部位

**Key words:** *Gynura bicolor* (Willd.) DC.; flavonoids; quinic acids; HPLC method; medicinal part

中图分类号: Q946.8; R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)06-0066-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.06.08

红凤菜 [*Gynura bicolor* (Willd.) DC.] 隶属于菊科 (Asteraceae) 菊三七属 (*Gynura* Cass.), 为多年生草本植物, 可作为药食两用植物被人们利用。红凤菜全草均可入药<sup>[1]</sup>, 含有丰富的黄酮类、奎宁酸类和萜类等次生代谢产物, 具有良好的止血、降血糖和抗氧化等药理活性<sup>[2-6]</sup>。目前, 从红凤菜地上部分已经分离鉴定出多种酚酸类<sup>[2,7]</sup> 和黄酮类成分<sup>[8-9]</sup>, 并对其总黄酮含量进行了分析<sup>[10]</sup>, 但对红凤菜不同器官中黄酮类和酚酸类成分的差异尚缺乏深入了解。

作者采用 HPLC 法对红凤菜根、茎和叶片中 7 个黄酮类和奎宁酸类成分的含量进行了比较和分析, 以期明确红凤菜的最佳药用部位, 为红凤菜资源的合理利用提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试红凤菜于 2014 年引种自海南, 现栽种于江苏省中国科学院植物研究所苗圃地, 由江苏省中国科学院植物研究所

任冰如研究员鉴定。于 2019 年 8 月 16 日采集红凤菜全株 1 kg, 将根、茎和叶片分开; 分别自然阴干, 粉碎后过 20 目筛, 备用。

主要仪器和试剂: 戴安 Ultimate 3000 高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公司), GL Science-Inert Sustain C<sub>18</sub> 色谱柱 (日本岛津公司), Mili-Q™ Advantage A10™ 超纯水系统 (美国 Millipore 公司), FG-24 固相萃取仪 (天津市富城达科技有限公司), Welchrom® C<sub>18</sub>E 固相萃取柱 [月旭科技 (上海) 股份有限公司]。新绿原酸 (纯度 99%, 批号 MUST-17011001) 对照品购自成都曼斯特生物科技有限公司; 绿原酸 (纯度大于 98%, 批号 L-007-160504)、异槲皮苷 (纯度大于 98%, 批号 Y-076-180517)、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷 (纯度大于 98%, 批号 S-065-180314)、3,5-二咖啡酰奎宁酸 (纯度大于 98%, 批号 Y-068-160726) 和 4,5-二咖啡酰奎宁酸 (纯度大于 98%, 批号 Y-070-161102) 对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 芦丁 (纯度大于 98%, 批号 C2/H30016) 对照品购自南京春秋生物工程有限公司; 其他试剂均为分析纯或色谱纯。

收稿日期: 2020-06-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31770366)

作者简介: 鲜新 (1996—), 女, 重庆丰都人, 硕士研究生, 主要从事植物天然产物化学方面的研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: bingruen@126.com

## 1.2 方法

1.2.1 色谱条件 GL Science-Inert Sustain C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。流动相为乙腈(A)和磷酸缓冲盐(B),梯度洗脱:0~20 min,体积分数90%B;20~25 min,体积分数90%~82%B;25~65 min,体积分数82%B;65~70 min,体积分数82%~75%B;70~75 min,体积分数75%B;75~80 min,体积分数75%~10%B;80~85 min,体积分数10%B;85~90 min,体积分数10%~90%B;90~95 min,体积分数90%B。流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,进样量10 μL,芦丁、异槲皮苷和山奈酚-3-*O*-芸香糖苷的检测波长为254 nm,新绿原酸、绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸的检测波长为325 nm。

1.2.2 对照品溶液制备和标准曲线绘制 精密称取芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、新绿原酸、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,用甲醇溶解,分别配制成质量浓度为1.990、1.155、1.840、0.752、1.930、1.980和2.590 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液。芦丁、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、新绿原酸、绿原酸和3,5-二咖啡酰奎宁酸按1、10、25、50和100倍进行梯度稀释,异槲皮苷按2、20、50和100倍进行梯度稀释,4,5-二咖啡酰奎宁酸按1、25、250、500和1000倍进行梯度稀释。按照上述色谱条件进样测定,以峰面积为纵坐标(Y)、各对照品质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线。

芦丁回归方程为 $Y=195.940X-0.218$ ( $r=0.9987$ ),线性范围0.020~1.990 mg·mL<sup>-1</sup>;异槲皮苷回归方程为 $Y=43.126X+1.062$ ( $r=0.9993$ ),线性范围0.016~2.310 mg·mL<sup>-1</sup>;山奈酚-3-*O*-芸香糖苷回归方程为 $Y=160.560X+3.332$ ( $r=0.9994$ ),线性范围0.018~1.840 mg·mL<sup>-1</sup>;新绿原酸回归方程为 $Y=155.930X-0.212$ ( $r=0.9973$ ),线性范围0.007~0.752 mg·mL<sup>-1</sup>;绿原酸回归方程为 $Y=346.460X+0.169$ ( $r=0.9995$ ),线性范围0.019~1.930 mg·mL<sup>-1</sup>;3,5-二咖啡酰奎宁酸回归方程为 $Y=458.480X-8.604$ ( $r=0.9995$ ),线性范围0.020~1.980 mg·mL<sup>-1</sup>;4,5-二咖啡酰奎宁酸回归方程为 $Y=337.230X+23.133$ ( $r=0.9951$ ),线性范围0.002~2.590 mg·mL<sup>-1</sup>。

1.2.3 样品提取和测定 分别精密称取根、茎和叶片粉末各

3份,每份约2.0 g,各加入体积分数85%乙醇70 mL,回流提取1 h,过滤;将滤液蒸至无醇味,用体积分数50%乙醇超声溶解,蒸干;用体积分数50%甲醇复溶样品,离心,取上清液进Welchrom<sup>®</sup>-C<sub>18</sub>E固相萃取柱,用体积分数50%甲醇洗脱;合并洗脱液,用体积分数50%甲醇洗脱,蒸干,用甲醇(色谱纯)溶解,0.45 μm滤膜过滤,定容至5 mL,即为样品溶液。按上述色谱条件进样测定,并根据峰面积和标准曲线计算根、茎、叶样品中7种成分的质量浓度。根据公式“某器官某成分含量=(该器官该成分质量浓度×稀释体积)/该器官质量”计算红凤菜不同器官中各成分含量。

1.2.4 方法学考察 精密度考察:精密吸取7个对照品溶液并混匀,按上述色谱条件重复进样测定5次。各对照品峰面积的RSD值为0.34%~0.81%,表明仪器精密度良好。

稳定性考察:取叶片样品溶液,分别于0、2、4、6、8、12和24 h按上述色谱条件进样测定。各成分峰面积的RSD值为0.67%~1.62%,表明样品溶液在24 h内稳定。

重复性考察:称取叶片粉末5份,按照上述方法制备样品溶液,并按上述色谱条件进样测定。各成分峰面积的RSD值为0.84%~1.87%,表明本方法重复性良好。

加样回收率考察:精密称取叶片粉末1.0 g,分别加入质量浓度0.199 mg·mL<sup>-1</sup>芦丁、0.231 mg·mL<sup>-1</sup>异槲皮苷、0.184 mg·mL<sup>-1</sup>山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、0.075 mg·mL<sup>-1</sup>新绿原酸、0.193 mg·mL<sup>-1</sup>绿原酸、0.396 mg·mL<sup>-1</sup>3,5-二咖啡酰奎宁酸和0.259 mg·mL<sup>-1</sup>4,5-二咖啡酰奎宁酸各1 mL,按照上述方法平行制备6份样品溶液,并按上述色谱条件进样测定。计算各成分的加样回收率和RSD值,加样回收率为96.57%~103.60%,RSD值为0.62%~2.24%。

## 1.3 数据处理和统计分析

采用EXCEL 2016和GraphPad Prism 7软件对实验数据进行处理和方差分析(two-way ANOVA)。

## 2 结果和分析

红凤菜根、茎和叶片中7个黄酮类和奎宁酸类成分的含量见表1。红凤菜叶片中能检出7个黄酮类和奎宁酸类成分,

表1 红凤菜不同器官中7个黄酮类和奎宁酸类成分含量的比较( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>

Table 1 Comparison on contents of 7 components of flavonoids and quinic acids in different organs of *Gynura bicolor* (Willd.) DC. ( $\bar{X}\pm SD$ )<sup>1)</sup>

器官 Organ	各成分的含量/(mg·g <sup>-1</sup> ) Content of each component						
	芦丁 Rutin	异槲皮苷 Isoquercitrin	山奈酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷 Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	新绿原酸 Neochlorogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	3,5-二咖啡酰奎宁酸 3,5-dicaffeoylquinic acid	4,5-二咖啡酰奎宁酸 4,5-dicaffeoylquinic acid
根 Root	—	—	—	—	0.066±0.007b	0.160±0.030b	0.032±0.000b
茎 Stem	—	—	—	—	0.258±0.044b	0.193±0.028b	0.038±0.009b
叶 Leaf	0.618±0.113	4.804±0.003	2.753±0.166	0.279±0.024	4.041±0.389a	3.185±0.169a	1.326±0.108a

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ) Different lowercases in the same column indicate the significant ( $P<0.05$ ) difference. —: 未检出 Not detected.

其中异槲皮苷和绿原酸的含量较高,分别达到 4.804 和 4.041  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,芦丁和新绿原酸含量较低;根和茎中仅能检出绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸,新绿原酸和黄酮类成分均未检出。叶片中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸的含量显著( $P < 0.05$ )高于根和茎,茎中这 3 种成分的含量也高于根,但差异不显著。叶片中绿原酸含量分别为茎和根中的 15.7 和 61.2 倍,3,5-二咖啡酰奎宁酸含量分别为茎和根中的 16.5 和 19.9 倍,4,5-二咖啡酰奎宁酸含量分别为茎和根的 34.9 和 41.4 倍。

### 3 讨论和结论

植物次生代谢产物对植物的生理活动有重要作用,但同种植物不同器官中次生代谢产物的类型和含量存在差异,如:在长叶榧(*Torreya jackii* Chun)不同器官中,鞣质和黄酮等次生代谢产物的总含量在叶片中最高,为茎中的 7.2 倍<sup>[11]</sup>;在七子花(*Heptacodium miconioides* Rehd.)不同器官中,次生代谢产物总含量在老根中最高,且主要为木质素,而叶片中则以黄酮和总生物碱等为主<sup>[12]</sup>;同样,在红凤菜不同器官中,叶片中黄酮类和奎宁酸类成分的含量最高,显著高于根和茎。由于植物的次生代谢产物合成与其代谢途径、基因表达和调控及生长环境有关<sup>[13]</sup>,因而,植物次生代谢产物的合成和分布通常在种属、器官、组织以及生长发育期间存在差异。

由于植物不同器官中药用活性成分的类型和含量不同,导致其不同入药部位的药效存在差异。本研究结果表明:在红凤菜叶片中能检出 7 个黄酮类和奎宁酸类成分,而在根和茎中只能检出 3 个奎宁酸类成分,且叶片中黄酮类和奎宁酸类成分含量均较高,因此,从药用成分角度考虑,建议选择红凤菜叶片作为药用部位。

本研究仅以产自南京的红凤菜为研究材料,由于药用植物的药效还与其生境、物候期及栽培管理措施等因子密切相关,因而,后续将以不同产地、不同季节的红凤菜为研究对象,进一步明确红凤菜次生代谢产物合成和积累的影响因子,为其药用资源的有效利用提供基础研究数据。

### 参考文献:

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典:上册[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社, 2006: 1373.
- [2] CHEN J, MANGELINCKX S, LÜ H, et al. Profiling and elucidation of the phenolic compounds in the aerial parts of *Gynura bicolor* and *G. divaricata* collected from different Chinese origins[J]. *Chemistry and Biodiversity*, 2015, 12: 96-115.
- [3] QIU X-L, GUO Y-X, ZHANG Q-F. Chemical profile and antioxidant activity of *Gynura bicolor* DC. ethanolic extract [J]. *International Journal of Food Properties*, 2018, 21(1): 407-415.
- [4] CHAO C-Y, LIU W-H, WU J-J, et al. Phytochemical profile, antioxidative and anti-inflammatory potentials of *Gynura bicolor* DC [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95: 1088-1093.
- [5] PAI P-Y, MONG M-C, YANG Y-C, et al. Anti-diabetic effects of *Gynura bicolor* aqueous extract in mice[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(6): 1631-1637.
- [6] 余小平. 紫背菜提取物降血糖作用的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(7): 1652-1654.
- [7] 陈 剑, MANGELINCKX S, 李维林, 等. 红凤菜地上部分的化学成分[J]. *植物资源与环境学报*, 2014, 23(2): 114-116.
- [8] 任冰如, 吕 寒, 陈 剑, 等. 红凤菜新鲜茎叶中总黄酮提取物的 LC-MS 分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2014, 23(3): 108-110.
- [9] 吕 寒, 裴咏萍, 李维林, 等. 红凤菜总黄酮清除自由基的活性[J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(6): 528-529.
- [10] 任冰如, 陈 剑, 吕 寒, 等. HPLC 测定红凤菜总黄酮含量[J]. *中国野生植物资源*, 2016, 35(1): 28-30, 34.
- [11] 李钧敏, 金则新, 周 杨. 长叶榧不同营养器官次生代谢产物含量分析[J]. *福建林业科技*, 2007, 34(1): 29-32.
- [12] 杨蓓芬, 金则新, 邵 红, 等. 七子花不同器官次生代谢产物含量的分析[J]. *植物研究*, 2007, 27(2): 229-232.
- [13] 王玉明, 李 锦, 张丽媛, 等. 药用植物次生代谢产物积累规律的研究概况[J]. *中南药学*, 2012, 10(2): 136-139.

(责任编辑:郭严冬)