

春季和秋季莓叶委陵菜叶片和地下部分 芦丁及儿茶素含量的 HPLC 分析

周 栋, 马蓓蓓, 刘汉柱, 辛 华^①

(青岛农业大学, 山东 青岛 266109)

Analyses on contents of rutin and catechin in leaves and under-ground part of *Potentilla fragarioides* in spring and autumn by HPLC ZHOU Dong, MA Bei-bei, LIU Han-zhu, XIN Hua^① (Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2011, 20(1): 91-93

Abstract: Contents of rutin and catechin in leaves and under-ground part of *Potentilla fragarioides* L. in spring and autumn were determined by HPLC technology. The results show that in spring, rutin content in leaves and under-ground part of *P. fragarioides* is 1.670 3 and 0.054 4 mg · g⁻¹, and catechin content is 0.263 5 and 0.723 5 mg · g⁻¹, respectively. In autumn, rutin content is 0.586 9 and 0.010 7 mg · g⁻¹, and catechin content is 0.784 3 and 0.366 4 mg · g⁻¹, respectively. The rutin content in leaves is the highest in spring, and catechin content in leaves is the highest in autumn. Therefore, collecting leaves in spring is suitable for taking rutin as a purpose, while collecting leaves in autumn is suitable for taking catechin as a purpose.

关键词: 莓叶委陵菜; 芦丁; 儿茶素; HPLC

Key words: *Potentilla fragarioides* L.; rutin; catechin; HPLC

中图分类号: Q946.8; R284 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2011)01-0091-03

莓叶委陵菜(*Potentilla fragarioides* L.)又名雉子筴,为蔷薇科(Rosaceae)委陵菜属(*Potentilla* L.)多年生草本植物,具有补阴虚、止血、抗病毒等作用,由其制成的莓叶委陵菜胶囊在临床上用于治疗月经过多、功能性子宫出血及子宫肌瘤出血等症^[1-2]。迄今为止,对莓叶委陵菜其他方面的研究鲜有报道,仅对其染色体数进行了研究^[3]。委陵菜属植物普遍含有多种活性成分^[4-5],如黄酮类、鞣质类、萜类等;该属植物委陵菜(*P. chinensis* Ser.)可用于治疗赤痢腹痛、久痢不止、痔疮出血、臃肿疮毒等症^[6]。

植物所含的黄酮类成分能有效保护植物抵抗紫外线照射和病菌侵染^[7],已作为主要药用成分广泛用于临床医疗。芦丁和儿茶素均属于黄酮类成分,其中,芦丁具有抗癌、消炎、抗氧化等多种生物活性,已广泛应用于临床,近年来还用于治疗老年性脑部疾病、抑制神经胶质瘤增生等^[8-9];儿茶素则具有抗细菌、抗病毒、抗真菌、抗毒素等作用^[10],还具有抑制血压及血糖、降低血液中的胆固醇含量、预防癌症和心血管疾病等作用^[11]。

作者分别对采自春季和秋季的莓叶委陵菜叶片和地下部分的芦丁和儿茶素含量进行测定和比较,以期对莓叶委陵菜的合理开发和药用资源的有效利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试莓叶委陵菜分别于2009年11月5日和2010年5月7日采自山东省烟台市昆崙山。将叶片与地下部分分开,洗净阴干后粉碎并过60目筛,备用。

所用仪器有Agilent 1100型高效液相色谱仪(美国Agilent科技有限公司生产)、FZ 102型微型植物粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司生产)和KQ 3200 DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司生产)。

芦丁标准品(批号:100080-200707)和儿茶素标准品(批号:877-200001)均购自中国药品生物制品检定所;甲醇为色谱纯,乙酸为分析纯,水为超纯水(电阻率为18 MΩ · cm)。

1.2 方法

1.2.1 HPLC色谱条件 Eclipse XDB C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为体积分数1%乙酸和甲醇。芦丁采用梯度洗脱法,洗脱程序:0~40 min, V(1%乙酸):V(甲醇)=95:5; 40~50 min, V(1%乙酸):V(甲醇)=70:30; 50~52 min, V(1%乙酸):V(甲醇)=55:45; 52~57 min, V(1%乙酸):V(甲醇)=

收稿日期: 2010-09-29

作者简介: 周 栋(1984—),男,山东诸城人,硕士研究生,主要从事资源植物学的研究。

^①通信作者 E-mail: hxin@qau.edu.cn

0:100;57~62 min, $V(1\% \text{乙酸}):V(\text{甲醇})=95:5$ 。儿茶素采用非梯度洗脱法,流动相为 $V(1\% \text{乙酸}):V(\text{甲醇})=55:45$ 。柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。光电二极管阵列检测器,芦丁和儿茶素的检测波长分别为 254 和 280 nm ,出峰时间分别为 43.767 和 12.557 min 。

1.2.2 标准品溶液制备和标准曲线绘制 精确称取芦丁标准品 4.10 mg ,用甲醇溶解并定容至 10 mL (质量浓度为 $0.41\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),摇匀后吸取 1 mL 并用甲醇定容至 50 mL ,得到质量浓度 $8.20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准品溶液。精确称取儿茶素标准品 3.30 mg ,用甲醇溶解并定容至 10 mL ,得到质量浓度 $0.33\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的儿茶素标准品溶液。

根据预实验结果,莓叶委陵菜叶片中的芦丁含量分别比地下部分高 30 和 50 倍,为降低误差,绘制 2 条芦丁标准曲线(方程 1 和方程 2),分别用于叶片和地下部分芦丁含量的测定。将 $0.41\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芦丁标准品溶液分别稀释 15 、 12 、 8 、 4 和 2 倍,将 $8.20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芦丁标准品溶液分别稀释 25 、 16 、 8 、 4 和 2 倍,按上述 HPLC 色谱条件分别依次进样测定,并以芦丁质量浓度为自变量 x 、峰面积为因变量 y 分别对方程 1 和方程 2 进行拟合。线性回归方程 1 为: $y=16.3830x+66.2580$, $R^2=0.9971$,线性范围 $27.33\sim210.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;线性回归方程 2 为: $y=14.1420x-0.8945$, $R^2=0.9957$,线性范围 $0.34\sim4.10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

将 $0.33\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 儿茶素标准品溶液分别稀释 25 、 20 、 15 、 10 和 4 倍,按上述 HPLC 色谱条件依次进样测定,并以儿茶素质量浓度为自变量 x 、峰面积为因变量 y 对儿茶素标准曲线方程进行拟合,线性回归方程为: $y=4.6244x+10.9020$, $R^2=0.9967$,线性范围 $13.20\sim82.50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.3 样品溶液制备和 HPLC 分析 分别称取各样品粉末 1.50 g ,加入 25 mL 甲醇和水的等体积混合溶液,称取质量后浸泡 1 h ,然后超声处理($30\text{ }^\circ\text{C}$, 40 kHz) 1 h ,冷却至室温后用甲醇和水的等体积混合溶液补足至浸泡前质量,用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,滤液即为样品溶液,按上述 HPLC 色谱条件进样分析,并根据各标准品曲线计算样品中芦丁和儿茶素含量。

1.2.4 方法学考察 取 $8.20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芦丁标准品溶液按上述 HPLC 色谱条件重复进样测定 6 次,检测仪器的精密度。芦丁峰面积的 RSD 为 0.81% ,表明仪器精密度良好。

取莓叶委陵菜春季叶片和秋季地下部分样品溶液,按照上述 HPLC 色谱条件分别于 0 、 2 、 4 、 6 和 8 h 进样分析,检测样品溶液的稳定性。样品溶液中芦丁与儿茶素峰面积的 RSD 分别为 1.30% 和 1.45% ,表明样品溶液在 8 h 内稳定。

取已知芦丁含量的莓叶委陵菜春季叶片样品 6 份,每份 1 g ,分别精密加入 $0.41\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芦丁标准品溶液 $150\text{ }\mu\text{L}$;取已知儿茶素含量的莓叶委陵菜秋季地下部分样品 6 份,每份 1 g ,分别精密加入 $0.33\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 儿茶素标准品溶液 1.0 mL ;按上述样品溶液制备方法和 HPLC 色谱条件分别提取测定,每份样品重复进样 3 次,检测该方法的加样回收率。样品溶液中

芦丁的平均回收率为 97.10% 、 RSD 为 1.96% ;儿茶素的平均回收率为 96.4% 、 RSD 为 1.83% 。

1.3 数据处理

利用 DPS V7.05 软件对实验数据进行 LSD 检验。

2 结果和分析

春季和秋季莓叶委陵菜叶片和地下部分的芦丁与儿茶素的平均含量见表 1,所有测定值的 RSD 均小于 3.0% 。由表 1 可见,春季莓叶委陵菜叶片和地下部分的芦丁含量均显著高于秋季($P<0.05$),春季叶片和地下部分的芦丁含量分别是秋季的 2.85 和 5.08 倍。秋季叶片中儿茶素的含量显著高于春季($P<0.05$),达到 2.98 倍;而秋季地下部分的儿茶素含量则显著低于春季($P<0.05$),仅为春季的 50.64% 。

由表 1 还可见,不论是春季还是秋季,莓叶委陵菜叶片中的芦丁含量均显著高于地下部分($P<0.05$),春季和秋季叶片中的芦丁含量分别是地下部分的 30.70 和 54.85 倍。莓叶委陵菜各部位儿茶素含量的季节变化则与芦丁不同,春季地下部分的儿茶素含量显著高于叶片($P<0.05$),是叶片的 2.75 倍;而秋季地下部分的儿茶素含量则显著低于叶片($P<0.05$),仅为叶片的 46.72% 。

表 1 春季和秋季莓叶委陵菜叶片和地下部分芦丁和儿茶素的含量¹⁾
Table 1 Contents of rutin and catechin in leaves and under-ground part of *Potentilla fragarioides* L. in spring and autumn¹⁾

季节 Season	芦丁含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Rutin content		儿茶素含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Catechin content	
	叶 Leaf	地下部分 Under-ground part	叶 Leaf	地下部分 Under-ground part
春季 Spring	1.670 3aA	0.054 4aB	0.263 5bB	0.723 5aA
秋季 Autumn	0.586 9bA	0.010 7bB	0.784 3aA	0.366 4bB

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示不同季节间差异显著($P<0.05$)。Different small letters in the same column indicate the significant difference between different seasons($P<0.05$); 同行中不同的大写字母表示同一成分含量在不同部位间差异显著($P<0.05$)。Different capitals in the same row indicate the significant difference of same compound content between different parts($P<0.05$)。

3 讨论和结论

近年来,在黄酮类成分含量的测定方法中 HPLC 方法^[12]是比较先进的测定方法之一。因此,作者利用该方法测定了莓叶委陵菜叶片及地下部分芦丁和儿茶素 2 种黄酮类成分的含量,并对这 2 种成分在春季和秋季的季节差异进行了比较。该方法简便易行,重现性和线性关系良好,回收率较高,结果可靠。

测定结果显示,莓叶委陵菜叶片中的芦丁含量较地下部分高,尤其是春季叶片的芦丁含量最高,因此,若以获取芦丁单体为目的,从充分利用资源的角度考虑,应采集莓叶委陵菜

的叶片,特别是春季的叶片。莓叶委陵菜秋季叶片的儿茶素含量最高,因此,若以提取儿茶素单体为目的,从资源利用的角度考虑,应采集莓叶委陵菜秋季叶片为宜。通过本实验可以看出,莓叶委陵菜叶片和地下部分芦丁与儿茶素含量都比较丰富,其同属植物委陵菜和翻白草(*Potentilla discolor* Bunge)的药用功效已很明确^[4,13],因此,推测莓叶委陵菜也应具有相似的药用价值。

参考文献:

[1] Kombal R, Glasl H. Flavan-3-ols and flavonoids from *Potentilla anserina* [J]. *Planta Medica*, 1995, 61(5): 484-485.
 [2] 张明辉,徐瑞平,邵忙收,等.莓叶委陵菜胶囊含量测定研究[J]. *现代中医药*, 2010, 30(1): 59-60.
 [3] Měšíček J, Soják J. Annotated chromosome numbers of selected asiatic *Potentilla* species [J]. *Folia Geobotanica and Phytotaxonomica*, 1993, 28(4): 437-446.
 [4] 赵川,乔卫,张彦文,等.委陵菜抗糖尿病有效部位及有效成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(6): 680-682.
 [5] 张莉,杨杰,陈筱清,等.翻白草的化学成分[J]. *植物资源与环境学报*, 2010, 19(2): 94-96.
 [6] 国家药典委员会. *中华人民共和国药典: 2005年版(一部)* [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 149.
 [7] Havsteen B H. The biochemistry and medical significance of the

flavonoids [J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 96(2/3): 67-202.
 [8] Silva A R, Pinheiro A M, Souza C S, et al. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures [J]. *Cell Biology and Life Toxicology*, 2008, 24(1): 75-86.
 [9] Youdim K A, Dobbie M S, Kuhnle G, et al. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: *in vitro* studies [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2003, 85(1): 180-192.
 [10] Hisano M, Yamaguchi K, Inoue Y, et al. Inhibitory effect of catechin against the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) [J]. *Archives of Dermatological Research*, 2003, 295(5): 183-189.
 [11] Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, et al. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study [J]. *The Journal of the American Medical Association*, 2006, 296(10): 1255-1265.
 [12] Yu Q T, Qi L W, Li P, et al. Determination of seventeen main flavonoids and saponins in the medicinal plant Huang-qi (*Radix astragali*) by HPLC-DAD-ELSD [J]. *Journal of Separation Science*, 2007, 30(9): 1292-1299.
 [13] 孟令云,朱黎霞,郑海洪,等.翻白草对高血糖动物模型的作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(5): 588-590.

(责任编辑:佟金凤)

(上接第82页 Continued from page 82)

[53] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling [J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(12): e422.
 [54] Will K W, Rubinoff D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification [J]. *Cladistics*, 2004, 20(1): 47-55.
 [55] Ebach M C, Holdrege C. DNA barcoding is no substitute for taxonomy [J]. *Nature*, 2005, 434: 697.
 [56] Hajibabaei M, Singer G A C, Clare E L, et al. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring [J]. *BMC Biology*, 2007, 5: 1-7.
 [57] Gregory T R. DNA barcoding does not compete with taxonomy [J]. *Nature*, 2005, 434: 1067.
 [58] Schindel D E, Miller S E. DNA barcoding, a useful tool for taxonomists [J]. *Nature*, 2005, 435: 17.
 [59] Mallet J, Willmott K. Taxonomy: renaissance or tower of babel? [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, 18: 57-59.
 [60] Will K W, Mishler B D, Wheeler Q D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy [J]. *Systematic Biology*, 2005, 54(5): 844-851.
 [61] Zhang J M, Wang J X, Xia T, et al. DNA barcoding: species delimitation in tree peonies [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2009, 52(6): 568-578.
 [62] Kane N C, Cronk Q. Botany without borders: barcoding in focus [J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17(24): 5175-5176.
 [63] Cowan R S, Chase M W, Kress W J, et al. 300,000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants [J]. *Taxon*, 2006, 55: 611-616.
 [64] Miller S E. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(12): 4775-4776.
 [65] Seberg O, Petersen G. How many loci does it take to DNA barcode a crocus [J]. *PLoS One*, 2009, 4(2): e4598.

(责任编辑:佟金凤)