

不同采收期金莲花茎叶中总黄酮和茛菪苷的动态变化研究

苏连杰¹, 张卫平², 赵波¹, 刘秀梅¹, 黄永鑫¹, 南洋¹, 樊锐锋¹, 李鞠¹, 张水利^{3*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 江苏康缘药业股份有限公司 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

3. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要:目的 研究不同采收期金莲花茎叶中总黄酮和茛菪苷量的变化规律, 为合理开发利用金莲花药用资源提供实验依据。方法 采用UV法和HPLC法, 分别以芦丁和茛菪苷为对照品, 测定不同采收期金莲花茎叶中总黄酮和茛菪苷量, 并绘制动态曲线。结果 从5月下旬至6月下旬, 总黄酮量呈现不断升高的趋势, 从4.597%上升到5.125%; 从7月上旬至8月中旬, 总黄酮量持续下降, 从4.264%下降至1.181%。而茛菪苷量从5月下旬至7月中旬一直呈上升趋势(0.095~0.332 mg/g); 从7月下旬至8月中旬, 呈下降趋势(0.306~0.092 mg/g)。结论 结合花的产量, 并综合总黄酮和茛菪苷量的动态变化, 采收期以7月上旬至中旬为佳。本实验方法稳定、可行, 结果可靠, 为合理采收金莲花茎叶提供了理论依据。

关键词: 金莲花茎叶; UV; HPLC; 总黄酮; 茛菪苷; 芦丁

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-2058-04

Dynamic changes of total flavonoids and orientin from stems and leaves of *Trollius chinensis* at different collecting periods

SU Lian-jie¹, ZHANG Wei-ping², ZHAO Bo¹, LIU Xiu-mei¹, HUANG Yong-xin¹, NAN Yang¹, FAN Rui-feng¹, LI Ju¹, ZHANG Shui-li³

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Key words: stems and leaves of *Trollius chinensis* Bunge; UV; HPLC; total flavonoids; orientin; rutin

金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 为毛茛科金莲花属多年生草本植物, 主要分布于河北、陕西、内蒙古、东北等地。其花民间用开水沏当茶喝, 用来治疗扁桃体炎、上呼吸道感染、咽炎等。目前, 临床上用于治疗急性化脓性扁桃体炎、上呼吸道感染、咽炎、急性肠炎、急性支气管炎、尿路感染、急性阑尾炎等。因此金莲花被认为是一种抗菌谱广、疗效显著、不良反应小的植物抗菌药^[1-6]。目前研究认为金莲花有效成分是总黄酮, 以茛菪苷和牡荆苷量较高, 具有抑菌、抗病毒等活性, 且茛菪苷具有明显的抗缺氧-复氧损伤和保护心肌细胞的作用^[7-10]。

金莲花传统药用部位是花, 其茎叶弃之不用。

随着金莲花制剂品种的不断增多, 金莲花药材的需求量急剧上升。目前, 金莲花无成熟人工栽培技术, 开展大规模规范化种植和产业化生产仍处在研究阶段^[11]。本课题前期研究表明, 金莲花茎叶化学成分与花基本相同, 只是总黄酮量稍低, 但茎叶产量大; 若将其地上部位全部入药, 其药源将明显扩大。在黑龙江省, 金莲花野生资源丰富, 主要分布于大、小兴安岭和塔河地区。笔者曾对大兴安岭地区不同采收期金莲花茎叶中总黄酮量进行了测定^[12]; 本实验在前期研究工作的基础上, 对塔河地区不同采收期金莲花茎叶中总黄酮和茛菪苷量进行了动态变化研究, 为确定黑龙江地区金莲花茎叶药材的适宜采

收稿日期: 2012-03-15

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521492)

作者简介: 苏连杰(1963—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础研究及中药资源的开发和利用。

Tel: 15804611048 E-mail: sulianjie1981@163.com

*通讯作者 张水利 Tel: (0571)86613576 Fax: (0571)86613606 E-mail: zhang_shuili@163.com

收期提供参考依据。

1 仪器与试剂

美国戴安 Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪 (VWD3000 紫外检测器, LPG—3x00 低压四元梯度泵, WPS—3000 自动进样器); 250DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 电子分析天平 (Mettler Toledo AB204—L)。日本岛津 UV—260 自动扫描可见-紫外分光光度计。

乙腈和甲醇均为色谱纯, 水为纯净水 (经 0.45 μm 微孔滤膜滤过)。亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝均为分析纯; 芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 100080-200803); 荭草苷自制, 质量分数为 98.98%; 不同采收期样品于 2010 年 5 月至 8 月采自黑龙江省塔河地区, 由浙江中医药大学张水利副教授鉴定为金莲花 *Trollius chinensis* Bunge, 见表 1。

表 1 金莲花茎叶样品来源

Table 1 Sample sources of stems and leaves of *T. chinensis*

编号	采收时间	生长状态	编号	采收时间	生长状态
1	2010-05-26	幼株	6	2010-07-16	花明显减少
2	2010-06-08	幼株	7	2010-07-24	根茎处叶片枯萎
3	2010-06-18	花期	8	2010-08-03	果实成熟
4	2010-06-28	花期	9	2010-08-13	果实成熟
5	2010-07-08	花与果实并存			

2 方法与结果

2.1 不同采收期茎叶中总黄酮的测定^[12]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒定质量的芦丁对照品 50.0 mg 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇 20.0 mL, 水浴微热使之溶解, 放冷, 加甲醇定容, 摇匀。精密吸取 10 mL 于 100 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.2 mg/mL 芦丁对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取茎叶粉碎, 过 20 目筛, 放置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥箱中干燥 2 h, 于干燥器中放凉, 精密称定 3.0 g, 置索氏提取器中, 加入石油醚浸泡 1 h, 回流至无色。取出, 挥干石油醚后置 100 mL 锥形瓶中, 加入甲醇 50 mL, 称定质量, 静置 24 h, 密封超声提取 40 min, 冷却, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 静置 0.5 h, 滤过, 滤液用甲醇定容于 50 mL 量瓶中。

2.1.3 测定波长的确定 精密量取对照品溶液 3.0 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加 5.0 mL 水、1.0 mL 0.7

mol/L 亚硝酸钠溶液, 摇匀, 放置 6 min, 加 0.5 mol/L 硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min, 再加 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 10.0 mL, 加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 按分光光度法, 进行全波长扫描, 测定吸光度, 绘制吸收曲线, 结果在波长 500 nm 处有最大吸收。

2.1.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 分别置于 25 mL 量瓶中, 按“2.1.3”项方法, 在波长 500 nm 处测吸光度。以吸光度为横坐标 (X), 质量浓度为纵坐标 (Y), 得回归方程 $Y=0.1104X-0.0033$, $r=0.9990$, 结果表明芦丁在 0.008~0.048 mg/mL 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 1.0 mL, 按“2.1.3”项方法测定 6 次, 按回归方程计算总黄酮质量分数, 结果总黄酮质量分数的 RSD 为 0.48%。

2.1.6 稳定性试验 吸取同一供试品溶液, 分别在 0、10、20、30、60、120 min 测其吸光度, 结果总黄酮吸光度的 RSD 为 1.06%。

2.1.7 重复性试验 取 1 号样品 5 份, 制备供试品溶液, 测定吸光度, 结果总黄酮质量分数的 RSD 为 2.44%, 表明本方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密吸取已测定的供试品 5 份, 加入不同量的芦丁对照品, 制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下方法测定, 计算质量分数, 结果平均回收率为 98.46%, RSD 为 1.49%。

2.1.9 样品测定 精密吸取供试品溶液 5.0 mL, 用甲醇定容于 50 mL 量瓶中, 再精密吸取 3.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 按照“2.1.3”项方法操作, 在波长 500 nm 处测定吸光度, 依标准曲线计算茎叶中总黄酮的质量分数, 平行样品测定 3 次。结果见表 2。结果表明, 从 5 月下旬至 6 月末, 金莲花茎叶总黄酮量呈现不断升高的趋势, 从 4.597% 上升到 5.125%; 从七月上旬至采收期结束, 总黄酮量持续下降, 从

表 2 不同采收期金莲花茎叶中总黄酮量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Content of total flavonoids in *T. chinensis*

at different collecting periods ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

采收时间	总黄酮 / %	采收时间	总黄酮 / %
05-26	4.597 $\pm$ 0.003	07-16	2.889 $\pm$ 0.004
06-08	4.125 $\pm$ 0.005	07-24	1.472 $\pm$ 0.003
06-18	5.139 $\pm$ 0.007	08-03	1.333 $\pm$ 0.006
06-28	5.125 $\pm$ 0.003	08-13	1.181 $\pm$ 0.009
07-08	4.264 $\pm$ 0.008		

4.264%至1.181%。

2.2 不同采收期茎叶中荇草苷的测定^[13]

2.2.1 供试品溶液的制备 按照“2.1.2”项方法制备供试品溶液，过0.45 μm滤膜，即得供试品溶液。

2.2.2 荇草苷对照品溶液的制备 精密称取荇草苷对照品2.50 mg，加甲醇溶解并定容于50 mL量瓶中，得质量浓度为0.05 mg/mL对照品溶液。取对照品溶液2.5 mL定容于100 mL量瓶中，得质量浓度为2.5 μg/mL对照品溶液。

2.2.3 色谱条件及系统适用性 色谱柱为Welch Materials Ultimate TMXB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，柱温30 ℃；流动相：乙腈-0.35%磷酸(15:85)，等度洗脱，体积流量1 mL/min，检测波长为340 nm，外标法定量。进样量为8 μL。在此条件下所得对照品和供试品溶液的色谱图见图1。各色谱峰完全分离，峰形好，按荇草苷峰计算理论塔板数不低于5 000。

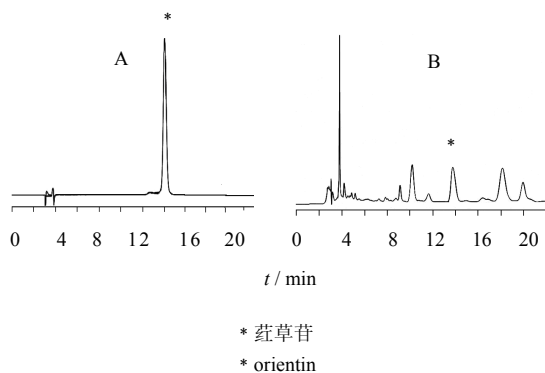


图1 对照品(A)和样品(B)的HPLC色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of orientin reference substance (A) and sample (B)

2.2.4 线性关系考察 取质量浓度为2.5 μg/mL荇草苷对照品溶液2、4、6、8、12、16、20 μL，依次进样，测定其峰面积。以荇草苷质量浓度(X)为横坐标，峰面积(Y)为纵坐标，绘制标准曲线，得回归方程为 $Y=193.61X-0.0109$ ($r=0.9990$)，荇草苷在0.005~0.05 μg线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 取荇草苷对照品溶液，连续进样5次，每次8 μL，计算荇草苷峰面积积分值的RSD为0.1283%。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液，分别在0、1、3、6、12、24 h进样8 μL，记录峰面积，计算荇草苷峰面积的RSD为0.1375%，表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一批样品5份，制备供试品溶液，进样，每次8 μL，测定荇草苷质量分数，结果其RSD为2.9357%。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已测定荇草苷的样品5份，适量，分别准确加入荇草苷对照品0.05 mg，制备供试品溶液，进样8 μL，测定荇草苷的峰面积，计算平均回收率为100.6%，RSD为1.587%。

2.2.9 样品测定 分别取不同采收期茎叶样品，精密称定，制备供试品溶液，按上述方法测定荇草苷量，平行样测定3次，见表3。结果表明，荇草苷量，从5月下旬至7月中旬一直呈直线上升趋势，在7月中旬达到最高，以后呈线性下降，到8月中旬降到最低。

表3 不同采收期金莲花茎叶中荇草苷量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Content of orientin in *T. chinensis* at different collecting peroids ($\bar{x} \pm s, n=3$)

采收时间	荇草苷 / %	采收时间	荇草苷 / %
05-26	0.095 ± 0.002	07-16	0.332 ± 0.005
06-08	0.149 ± 0.003	07-24	0.306 ± 0.003
06-18	0.197 ± 0.005	08-03	0.182 ± 0.004
06-28	0.231 ± 0.001	08-13	0.092 ± 0.004
07-28	0.276 ± 0.003		

3 讨论

金莲花传统药用部位是花，在黑龙江省大兴安岭及塔河等地区资源丰富，民间用开水沏茶喝，用以治疗扁桃体炎、急性中耳炎等。药理研究表明，金莲花具有明显的抑菌、抗病毒等作用，有效成分为总黄酮，以荇草苷和牡荆苷量较高^[8-9]。本研究在确定了其茎叶也具有明显抑菌作用^[14]的基础上，考察黑龙江塔河地区不同采收期茎叶中总黄酮及荇草苷量的变化规律，为综合应用金莲花提供依据。

总黄酮量与荇草苷量变化不一致，荇草苷是一个动态累积的曲线；而总黄酮量，在开花前，呈现不断升高的趋势，开花后逐渐减少，应该与花中总黄酮积累或转移有密切关系。需要今后进行进一步的深入分析和研究。

结合总黄酮和荇草苷量，参考其生物学产量，提示金莲花茎叶6月中旬至7月上旬采收最佳。但6月中旬至下旬正是盛花期，此时采集茎叶，会对花的生长和产量产生严重影响。因此，兼顾花和茎叶的产量，并结合总黄酮、荇草苷量的动态变化，建议7月上旬至中旬采收为佳。

通过严力群等^[15]、苏连杰等^[12]和本实验研究表明,金莲花茎叶中总黄酮量较高,动态积累趋势随生长时间的不同而呈现出一定的变化规律。塔河地区茎叶总黄酮于5月中旬达到最大值5.139%,此后逐渐降低。本研究结果与坝上围场县广字基地相似,总黄酮都是在5月中旬至6月初较高,而在6月中旬最高。

比较茎叶与花中总黄酮及荳蔻苷量,坝上地区9个金莲花样品的总黄酮量平均值为6.939%,与茎叶总黄酮量的最大值十分接近;而承德地区所产金莲花总黄酮量最高达10.9%^[13,15]。至于荳蔻苷的量,经笔者研究表明,花最高达1.956%;而茎叶中最高是0.332%。虽然茎叶中总黄酮及荳蔻苷量与花中有差距,但茎叶产量大,而且抑菌抗病毒效果明显,如加以综合利用,应用前景十分广阔。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1977.
- [2] 国家中医药管理局中华本草编辑委员会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1999.
- [3] 王 平. 金莲花冲剂治疗泌尿系统感染疗效观察 [J]. 中成药, 1995, 17(8): 51.
- [4] 张水利, 苏连杰. 金莲花茎叶的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1199-1202.
- [5] 王昌荣. 金莲花颗粒剂治疗急性呼吸道感染 60 例疗效观察 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2003, 13(3): 179-180.
- [6] 刘召阳, 罗都强. 金莲花的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 370-373.
- [7] Li Y L, Ma S C, Yang Y T, et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge [J]. *J Ethnobiol*, 2002, 79(3): 365-368.
- [8] 李占林, 李丹毅, 吴 瑛, 等. 金莲花抗菌有效成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(8): 627-629.
- [9] 苏连杰, 田 鹤, 马英丽. 金莲花醇提物体内抗病毒作用的实验研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1062-1064.
- [10] 唐津忠, 鲁晓翔, 陈瑞芳, 等. 金莲花中黄酮类化合物的提取与抗氧化性研究 [J]. 食品科学, 2003, 24(6): 88-91.
- [11] 严力群, 丁万隆, 朱殿龙. 金莲花人工栽培与野生抚育研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 286-288.
- [12] 苏连杰, 杨书彬, 苏志伟, 等. 金莲花茎叶不同采收期总黄酮的测定 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 767-768.
- [13] 白云娥, 漆小梅, 高运玲. 金莲花总黄酮成分的含量测定 [J]. 山西医科大学学报, 2000, 31(6): 502-504.
- [14] 刘丽娟, 王秀坤, 徐 光, 等. 金莲花茎叶的抑菌作用研究 [J]. 中医药学报, 1992, 20(3): 33-34.
- [15] 严力群, 丁万隆, 朱殿龙, 等. 坝上地区金莲花及其茎叶总黄酮的测定 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2009, 11(3): 407-409.