

不同海拔高度五脉绿绒蒿中槲皮素和木犀草素含量变化

张长现^{1,2,3}, 叶润蓉^{1,3}, 卢学峰^{1,3}, 岳鹏鹏^{1,2,3}, 杨仕兵^{1,2,3}, 刘文惠^{1,2,3}, 彭敏^{1,3*}¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ²中国科学院研究生院, 北京 100049;³青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 西宁 810001

摘要:采用 HPLC 法测定了青海达里加山和拉鸡山地区不同海拔五脉绿绒蒿的槲皮素和木犀草素含量。达里加山样品中槲皮素和木犀草素平均含量分别为 0.1040 和 0.1299 mg/g, 拉鸡山样品中分别为 0.0719 和 0.2018 mg/g。结果表明, 五脉绿绒蒿中槲皮素和木犀草素含量在青海达里加山地区呈现出随海拔升高而趋于增高的明显变化趋势, 但在拉鸡山地区则呈现出先降后升的变化趋势, 其内在变化规律尚待深入探究。

关键词:海拔; 五脉绿绒蒿; 槲皮素; 木犀草素; HPLC

中图分类号: R284.2 Q946.91

文献标识码: A

Variations on the Contents of Quercetin and Luteolin of *Meconopsis quintuplinervia* Regel from Different Altitudes

ZHANG Chang-xian^{1,2,3}, YE Run-rong^{1,3}, LU Xue-feng^{1,3},YUE Peng-peng^{1,2,3}, YANG Shì-bīng^{1,2,3}, LIU W en-huì^{1,2,3}, PENG M in^{1,3*}¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences Xining 810001, China²Graduate University of Chinese Academy of Sciences Beijing 100049, China³Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Biological Resources Xining 810001, China

Abstract The contents of quercetin and luteolin in *Meconopsis quintuplinervia* Regel from Mt Dalijia and Mt Laji area of Qinghai province were determined by HPLC method with the separation on a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ Column and ran the mobile phase with a mixture of methanol and acetic acid water solution at a flow rate of 1.0 mL/min while the ultraviolet wavelength was 320 nm. In Mt Dalijia area the mean contents of them are 0.1040 mg/g and 0.1299 mg/g. In Mt Laji area they are 0.0719 mg/g and 0.2018 mg/g. Variation rules of these contents influenced by altitudes were studied and discussed in this paper. According to analytical result, the contents of quercetin and luteolin contents have evident increased trends with the rise of altitudes in Qinghai Mt Dalijia area, but it showed rise after the first lower trends in Mt Laji area. It is necessary to study and discover the internal relation of the content changes.

Key words altitude; *Meconopsis quintuplinervia* Regel; quercetin; luteolin; HPLC

罂粟科绿绒蒿属植物五脉绿绒蒿 (*Meconopsis quintuplinervia* Regel) 分布于我国西藏、陕西、甘肃、青海、四川等地。为使用广泛且地位重要的藏药材, 以五脉绿绒蒿为主的藏成药近 30 种, 其干燥全草即传统的藏药吾巴拉, 具有清热解毒、利尿、消炎、止痛的功效^[1]。以往研究已初步证实五脉绿绒蒿中含有生物碱类、黄酮类、挥发油类以及其它多种化学成分^[2-7]。

黄酮类化合物槲皮素和木犀草素是五脉绿绒蒿

的重要活性成分, 槲皮素具有明显的降血压、降血脂、抗肿瘤等作用^[8]。木犀草素是一种很具有代表性的天然黄酮^[9], 属弱酸性四羟基黄酮类化合物, 在植物界分布较广, 具有很强的抗氧化活性, 有关药理及临床实验的结果还表明木犀草素在体内具有抗菌、抗病毒及降低血脂和胆固醇的作用^[10,11]。

近年来, 对五脉绿绒蒿的研究报道主要集中在化学成分的提取和分离方面, 对不同海拔五脉绿绒蒿黄酮含量的变化研究未见报道。曾有学者对一些植物的次生代谢产物与海拔高度的关系进行过研究, 结果表明次生代谢产物含量与海拔存在着显著或者极显著的相关性^[12,13]。

本研究采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定达里

收稿日期: 2008-10-09 接受日期: 2009-01-08

基金项目: 中国科学院西北高原生物研究所知识创新工程领域前沿项目 (CXLY-2002-7)

* 通讯作者 Tel: 86-971-6143898 E-mail: pengm@mwipb.ac.cn

加山和拉鸡山地区不同海拔五脉绿绒蒿中槲皮素和木犀草素的含量,探讨海拔与槲皮素和木犀草素含量的关系,为五脉绿绒蒿的药材品质分析及进一步合理开发利用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和材料

Agilent1200高效液相色谱仪(带G1329A自动进样器);Agilent G1325D紫外检测器;Zorbax Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);HP Chem stations 色谱工作站;XW-80A涡旋混合器(上海精科实业有限公司);MOLELEMENT元素型超纯水机(上海摩勒生物科技有限公司);梅特勒万分之一天平。

标准品:槲皮素(querletin)、木犀草素(luteolin)均购于中国药品生物制品鉴定所,批号分别为100081-200406和111520-200504。甲醇(色谱纯),25%盐酸(分析纯),超纯水。

测定样品于2008年8月上旬采于青海省循化县达里加山和湟中县拉鸡山,经中国科学院西北高原生物研究所卢学峰副研究员鉴定为五脉绿绒蒿(*Meconopsis quintuplinervia* Regel)。

1.2 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱温:25℃;紫外检测波长:320 nm;以甲醇和0.05%乙酸水溶液作为流动相,按非线性洗脱条件:0~30 min,甲醇35%~50%;30~47 min,甲醇50%~90%;47~50 min,甲醇90%~100%,进样量:10 μL,流速:1.0 mL/min,进行梯度洗脱。

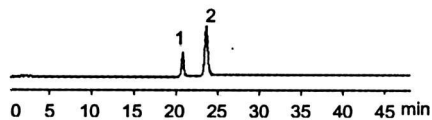


图1 标准品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of stand

1. 木犀草素 Luteolin; 2. 槲皮素 Quercetin

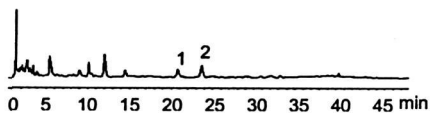


图2 样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of sample

1. 木犀草素 Luteolin; 2. 槲皮素 Quercetin

在该色谱条件下槲皮素和木犀草素均能被洗脱并达到基线分离(图1、2)。

1.3 标准溶液的配制

槲皮素标准储备液:准确称取槲皮素标准品0.94 mg用甲醇定容至10 mL,摇匀。木犀草素标准储备液:准确称取木犀草素标准品1.36 mg用甲醇定容至10 mL,摇匀。

1.4 混合标准溶液的配制

取槲皮素、木犀草素标准储备液各1 mL,用甲醇定容到5 mL,摇匀。

1.5 样品溶液的配制

取已经干燥的五脉绿绒蒿全草,粉碎。准确称取该样品粉末2 g加入甲醇:25%盐酸=4:2(V:V)的混合液50 mL,80℃水浴回流2 h酸解,过滤蒸干,用甲醇定容到50 mL容量瓶中,经0.45 μm的微孔滤膜过滤即得。

2 结果及分析

2.1 线性关系

将混合标准溶液按“1.2”项下的色谱条件分别进样2、4、6、8、10 μL,以相应组分的色谱峰面积(Y)对其浓度(X, mg/L)进行线性回归,得到线性回归方程: $Y = 1954.8X - 15.02$, $r^2 = 0.9999$; $Y = 6965.3X - 27.01$, $r^2 = 0.9999$ 。槲皮素在0.0376~0.188 μg/mL范围内呈良好的线性关系,木犀草素在0.0544~0.272 μg/mL范围内呈良好的线性关系。

2.2 重复性实验

准确称取1号样品粉末2 g共6份,按照1.5的方法制备样品溶液,按照1.2的色谱条件分别进样10 μL,以槲皮素和木犀草素峰面积得到的RSD分别为1.57%和1.83%。

2.3 精密度实验

将槲皮素和木犀草素的混合标准品溶液按照上述色谱方法,连续进样6次,每次10 μL,槲皮素和木犀草素峰面积的RSD分别为0.65%和0.54%。

2.4 加样回收率实验

取已知含量样品,精密对照品储备液槲皮素、木犀草素,同“1.5”方法制备溶液,按“1.2”项下的色谱条件对加标前后溶液进行液相色谱分析,样品中槲皮素、木犀草素平均回收率($n=6$)为100.15%、100.63%。结果表明该方法的回收率良好,见表1、2。

表 1 槲皮素回收率 (n = 6)
Table 1 Recovery of quercetin (n = 6)

样品含量 Amounts in sample (mg)	加入量 Added (mg)	测得值 Detected (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
0.3012	0.188	0.4925	101.76		
0.3028	0.188	0.4892	99.15		
0.3006	0.144	0.4459	100.90		
0.3010	0.144	0.4417	97.71	100.15	1.62
0.3018	0.094	0.3975	101.81		
0.3020	0.094	0.3956	99.57		

表 2 木犀草素回收率 (n = 6)
Table 2 Recovery of luteolin (n = 6)

样品含量 Amounts in sample (mg)	加入量 Added (mg)	测得值 Detected (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
0.1634	0.272	0.4325	98.93		
0.1649	0.272	0.4409	101.47		
0.1598	0.206	0.3613	97.82		
0.1588	0.206	0.3703	102.67	100.63	1.85
0.1615	0.136	0.3001	101.91		
0.1654	0.136	0.3027	100.96		

2.5 样品测定

根据 1.3.2 样品溶液的制备方法, 按照本文色谱条件重复测定达里加山和拉鸡山不同海拔五脉绿

绒蒿样品的槲皮素和木犀草素的含量, 取平均值, 结果见表 3。

表 3 五脉绿绒蒿中槲皮素和木犀草素的含量 (n = 3)

Table 3 Contents of quercetin and luteolin of *Meconopsis quinquepartita* Regel (n = 3)

区域 Area	拉鸡山 Mt Laji			达里加山 Mt Dalijia		
	海拔 Altitude (m)	槲皮素含量 Quercetin content(mg/g)	木犀草素含量 Luteolin content (mg/g)	海拔 Altitude (m)	槲皮素含量 Quercetin content(mg/g)	木犀草素含量 Luteolin content(mg/g)
	3349	0.1014	0.2410	3460	0.0464	0.0767
	3395	0.0715	0.4043	3517	0.0684	0.0777
	3445	0.0658	0.2421	3558	0.0851	0.0779
	3489	0.0418	0.0882	3595	0.0550	0.0722
	3525	0.0694	0.0884	3611	0.2301	0.1196
	3562	0.0816	0.1467	3660	0.1737	0.1358
				3694	0.2503	0.1679
	平均含量 Average content	0.0719	0.2018	平均含量 Average content	0.1040	0.1299

由表 3 可以看出, 在两个地区不同海拔的五脉绿绒蒿样品之间槲皮素和木犀草素含量都有较大差异。在达里加山地区槲皮素平均含量为 0.1299

mg/g 变化范围为 0.0464~0.2503 mg/g 最高为最低的 5.39 倍; 木犀草素平均含量为 0.104 mg/g 变化范围为 0.0767~0.1679 mg/g 最高为最低的

2.19倍。在拉鸡山地区槲皮素平均含量为 0.0719 mg/g 变化范围为 0.0418~0.1014 mg/g 最高为最低的 2.43倍;木犀草素平均含量为 0.2018 mg/g 变化范围为 0.0882~0.4043 mg/g 最高为最低的 4.58倍。

通过图 3和图 4可以看出,在达里加山地区槲皮素和木犀草素的含量都有随着海拔升高而增大的趋势,海拔 3600 m 以下两者的含量增加缓慢,从 3600 m 开始两者含量增加幅度加快。采用 SPSS15.0 软件进行相关分析表明槲皮素和木犀草素与海拔高度间有着显著的相关性,相关系数分别为 0.813 ($P \leq 0.05$)和 0.841 ($P \leq 0.05$)。

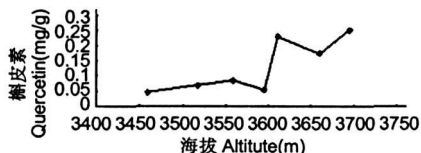


图 3 槲皮素随海拔的变化规律(达里加山)

Fig. 3 Variation rules of quercetin by altitudes(Mt. Dalijia)

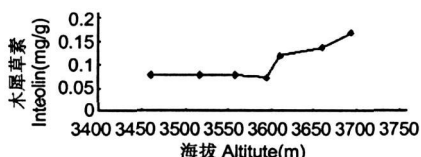


图 4 木犀草素随海拔的变化规律(达里加山)

Fig. 4 Variation rules of luteolin by altitudes(Mt. Dalijia)

通过图 5和图 6可以看出,在拉鸡山地区槲皮素和木犀草素含量随着海拔的变化趋势为:海拔 3500 m 以下两者的含量随海拔升高而降低,从 3500 m 开始两者含量随海拔升高而增加。

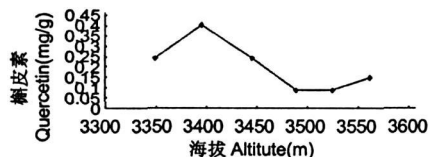


图 5 槲皮素随海拔的变化规律(拉鸡山)

Fig. 5 Variation rules of quercetin by altitudes(Mt. Laji)

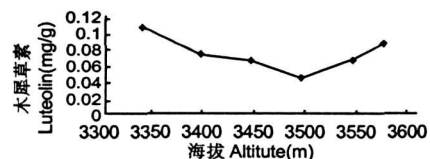


图 6 木犀草素随海拔的变化规律(拉鸡山)

Fig. 6 Variation rules of luteolin by altitudes(Mt. Laji)

3 讨论

3.1 在达里加山地区五脉绿绒蒿中槲皮素与木犀草素的含量随着海拔增高而增大,这一规律可能与光照有关。有学者对银杏的研究表明,随海拔的升高,大气密度减小,太阳光光谱成分发生变化,紫外线等短波光强度增大,这些短波光抑制了银杏叶细胞的伸长生长,银杏体内活性氧浓度也因此大大提高,进而促进细胞壁的加厚和老化^[14]。另一方面,光照强度的增大、紫外光质的增强以及日照时间的延长也同时诱导和促进了机体细胞苯丙氨酸氨基裂解酶(PAL)和查尔酮合成酶(CHS)活性的提高,而PAL和CHS是植物细胞内黄酮类化合物的生物合成、代谢过程中关键的限速酶^[15,16],其活性的提高将直接导致活性氧清除剂黄酮类化合物的大量合成^[17,19],从而相对应地形成一整套生理适应机制,以抵御逆境胁迫下强辐射所造成的氧化损伤。这也可能是该地区五脉绿绒蒿中槲皮素和木犀草素含量随海拔升高的生理机制之一。

3.2 根据拉鸡山地区所采样品的测定结果分析,却没有表现出明显随海拔升高而含量增加的变化趋势。以往研究表明,不同生长期的植物体内黄酮含量会有所变化^[20]。在达里加山和拉鸡山两个地区,槲皮素和木犀草素的含量随海拔表现出不一致的规律,这可能与所采集样品的生长年限和生育期有关。五脉绿绒蒿为多年生植物,黄酮含量随着生长年限增加而逐渐积累,但是目前尚不能区别采集样品的生长年限,而本实验采用混合样品进行测定,这可能对实验结果造成一定影响。其次,不同海拔高度的五脉绿绒蒿处于不同的生育期,植物体内黄酮的含量也会受到影响。因此,对于五脉绿绒蒿中是否存在黄酮成分含量随海拔而升高的规律,尚有待于进一步的深入验证。

3.3 由于影响五脉绿绒蒿的生长发育以及体内黄酮积累的因素比较复杂,可能是多种生态因子如降雨量、土壤、温度、紫外线辐射强度等协同作用的结果,从而影响到植物体内黄酮含量。对于影响五脉绿绒蒿次生代谢产物积累的关键生态环境因子,还有待于今后进一步深入研究。

参考文献

- 1 North west Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences Tibetan Medicine Glossary (藏药志). Xinjing Qinghai People's Publishing House, 1991. 465

(下转第 691 页)

- 学), 2008 11: 2004-2006
- 2 Han J(韩坚), Lin HQ(林煌权), *et al*. Effect of extracts from *Saussurea lappa* on the experimental gastric ulcer *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 11: 1017-1019.
 - 3 Xu H(旭红), Yang CX(杨宠欣). Protective effect of *Saussurea lappa* against the experimental gastric ulcer *Nei Mongol J Trad Chin Med* (内蒙古中医药), 1999, 2: 45.
 - 4 Zhang MF(张明发), Shen YQ(沈雅琴), *et al*. Antidiarrheal and antiinflammatory effects of *Saussurea lappa*. *China Pharm* (中国药业), 1999 8(6): 16-17.
 - 5 Shao Y(邵芸), Huang F(黄芳), *et al*. Antinflammatory and cholegogic effects of *Aucklandia Jingsu Pharm Clin Res* (江苏药学与临床研究), 2005, 13(4): 5-6
 - 6 Hu JB(胡敬宝), Yang DG(杨大国). *Muxiang danshenyin* treats coronary heart disease and angina *Henan Tradit Chin Med* (河南中医), 2000 20(4): 45.
 - 7 Zhang Y(张芝), Xiao XD(肖小东). Review of the pharmacological and formulation studies on *Aucklandia China Pharmaceuticals* (中国药业), 2003 12(4): 75-76
 - 8 Lee M, Lee K, Chi S, *et al*. Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome C release *Biol Pharm Bull* 2001 24: 303-306
 - 9 Wang L(王璐), Zhao F(赵烽), He EQ(何恩其), *et al*. Effects of eighteen sesquiterpenes from *Saussurea lappa* on the proliferation of six human cancer cell lines *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008 20: 808-812

(上接第 646 页)

- 2 Wang MA(王明安), Chen SN(陈绍农), Zhang HD(张惠迪), *et al*. Studies on the chemical constituents of *Meconopsis quintuplinervia* Regel—a Tibetan medicinal herb *J Lanzhou Univ Sci Tech* (兰州大学学报, 自科版), 1991, 27: 80-82
- 3 Shang XY(尚小雅), *et al*. Noralkaloid constituents from a Tibetan medicine *Meconopsis quintuplinervia*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006 31: 468-471.
- 4 Shang XY(尚小雅), Zhang CZ(张承忠), *et al*. Studies on chemical constituents of *Meconopsis quintuplinervia* Regel *J Chin Med Mater* (中药材), 2002 25: 250-252
- 5 Shang XY(尚小雅), Shi JG(石建功), *et al*. Alkaloids from a Tibetan medicine *Meconopsis quintuplinervia* Regel *Acta Pharm Sin* (药学报), 2003, 38: 276-278
- 6 Wu HF(吴海峰), Pan L(潘莉), *et al*. Analysis on volatile oils from three species of *Meconopsis* by GC-MS *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2006 41: 1298-1300
- 7 Wu HF(吴海峰), Pan L(潘莉), Ding LS(丁立生), Zhang XF(张晓峰), *et al*. Chemical constituents of a Tibetan medicine *Meconopsis quintuplinervia* Regel *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 811-813
- 8 Wang YF(王艳芳), Wang XH(王新华), Zhu YT(朱宇同). Advancement of researches in quercetin *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15: 171-173
- 9 Yao XS(姚新生). Natural Medicinal Chemistry, 3rd Ed (天然药物化学, 第三版). Beijing People's Sanitation Publishing House, 2001. 89.
- 10 Wang LY(汪丽燕), *et al*. Experiment research on luteolin affecting coronary circulation dynamics *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 1992 8: 388-390
- 11 He LN(何丽娜), He SB(何素冰). *In vitro* anti-coxsackie B₃ virus effect of luteolin *Chin JMAP* (中国现代药理学), 2000, 17: 362-365.
- 12 Xue CK(薛存宽), Jiang P(蒋鹏), *et al*. Analysis of volatile oil of *Valeriana officinalis* and influence factors of its oil content *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34: 779.
- 13 Zhu RB(朱仁斌), Wan ZH(宛志沪), *et al*. Correlation between content of effective compositions and altitudes of cultivating field for *Panax quinque folius* from west Anhui province *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33: 163
- 14 Prasad TK, Erson MD, Martin BA, *et al*. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide *Plant Cell* 1994 (6): 65-74
- 15 Carolyn EL, Jane EL, John RLW. Developmental changes in enzymes of flavonoids biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars *J Sci Food Agric* 1996 71: 313-320
- 16 Yu DQ(余迪求), Li BJ(李宝健). Genetic and developmental regulation of anthocyanin biosynthesis *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1996 33: 71-77
- 17 Fuglev G, Jack j A, Jenkins G I UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* *Plant Cell* 1996 (8): 2347-2357
- 18 Ensminger PA, Schaefer E. Blue and ultraviolet B light photoreceptors in parsley cells *Photochem Photobiol* 1992, 55: 437-447.
- 19 Matsumoto T, Nishida K, Noguchi M. Some factors affecting the anthocyanin by *Populus* cells in suspension culture *Agric Biol Chem*, 1973, 37: 561-567
- 20 Liu RJ(刘仁杰), *et al*. Research on the change of total flavonoids content in different growing period of buckwheat seedling *J Jilin Agric Sci* (吉林农业科学), 2007, 32: 58-60