

# 地蜂子中儿茶素含量测定及其醇浸物对软组织损伤的影响<sup>\*</sup>

梁语嫣<sup>1\*\*</sup>, 杨娟<sup>2\*\*\*</sup>, 杨小生<sup>2</sup>, 彭梅<sup>2</sup>

(1. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014)

**[摘要]** 目的: 建立地蜂子中儿茶素含量测定方法, 观察地蜂子醇浸物对软组织损伤小鼠的治疗效果。方法: 采用薄层色谱法(TLC)对药材进行定性鉴别, 用高效液相色谱法(HPLC)测定地蜂子中儿茶素的含量; 采用砷码法制作30只小鼠软组织损伤模型, 将模型小鼠均分为空白组(涂抹生理盐水)、阳性对照组(涂抹云南白药)及地蜂子组(涂抹地蜂子液), 连续给药3 d, 记录小鼠损伤症候指数、观察治疗效果。结果: TLC斑点清晰, 重复性好; 地蜂子中儿茶素线性范围为0.017~0.086 g/L,  $r=0.999\ 4$ , 回收率( $n=6$ )为100.13% ( $RSD=2.18$ ); 与空白组比较, 给药后第3天地蜂子组小鼠的损伤症候指数显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 损伤局部消肿效果较好。结论: 本研究建立的高效液相色谱(HPLC)测定方法简单、准确, 可用于地蜂子中儿茶素含量的测定; 地蜂子醇浸物对小鼠软组织损伤具有改善作用。

**[关键词]** 地蜂子; 儿茶素; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 含量测定; 软组织损伤

**[中图分类号]** R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)06-0670-05

**DOI:**10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.06.010

## Determination of Catechins in *Potentilla Freyniana* and the Effect of Alcohol Extracts on Soft Tissue Damage

LIANG Yuyan<sup>1</sup>, YANG Juan<sup>2</sup>, YANG Xiaosheng<sup>2</sup>, PENG Mei<sup>2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish stable determination method of catechin in *Potentilla freyniana*, and to observe the therapeutic effect of *Potentilla freyniana* on acute soft tissue injury. **Method:** TLC was adopted for qualitative identification of samples, and HPLC method was used to determine the content of catechin. The mice model of acute soft tissue injury were established by weight blow method, mouse were randomized into three groups and given different drugs. The mice were treated for 3 consecutive days, and the injury symptom score was observed and using SPSS17.0 software to compare the differences between groups for analysis of variance. **Results:** TLC spots of samples were clear and well repeatability. The linear range of catechin of *Potentilla freyniana* was 0.017~0.086 mg/mL, the correlation coefficient was 0.999 4, and the recovery rate was 100.13% ( $n=6$ ,  $RSD=2.18$ ). Compared with the blank group, the score of soft tissue injury in mice decreased significantly on the third day after treatment. **Conclusion:** The HPLC method established in this experiment is simple and accurate, and can be used for the determination of catechin in *Potentilla freyniana* and extract of *Potentilla freyni-*

<sup>\*</sup>[基金项目] 贵州省科技计划项目[黔科合(2016)支撑 2824]

<sup>\*\*</sup> 贵州医科大学 2016 级硕士研究生

<sup>\*\*\*</sup> 通信作者 E-mail: yangxz2002@126.com

网络出版时间: 2019-06-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190622.0723.010.html>

ana can diminish the soft tissue injury in mice.

[ **Key words** ] *Potentilla freyniana*; catechin; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; content determination; soft tissue injury

地蜂子又称狼牙委陵菜、铁枕头,为蔷薇科委陵菜属植物三叶委陵菜和中华三叶委陵菜(*Potentilla freyniana*)的干燥根茎或全草<sup>[1]</sup>,分布于湖北、四川、重庆、贵州等地。《全国中草药汇编》中记载该药性味苦、涩、微寒<sup>[2]</sup>,有清热解毒,镇痛止痒功效<sup>[3]</sup>。近年来,对地蜂子的研究集中在化学成分及抗病毒作用,刘梁等<sup>[4]</sup>对地蜂子中三萜化合物抗病毒作用进行研究,许正刚等<sup>[5]</sup>测定了地蜂子中的黄酮含量;陈会玲等<sup>[6]</sup>从地蜂子中分离出儿茶素、 $\beta$ -谷甾醇、胡萝卜苷等化学成分,儿茶素具有抗菌<sup>[7]</sup>、抗氧化<sup>[8]</sup>、预防糖尿病和心血管疾病等作用<sup>[9]</sup>。地蜂子在土家族、苗族医药中应用广泛,属常用民间中草药,但目前作为中药材尚未被中国药典(2004 年)或地方标准收录,亦少见对其消肿止痛活性的研究报道。本研究参考其他药材中儿茶素含量测定的方法,采用高效液相色谱法对贵州白云、龙里、贵定 3 个地区采集的地蜂子药材进行含量测定,并观察地蜂子醇浸物对小鼠软组织损伤的影响,初步确定其药效基础和质量标准,为后期研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器及试剂

1.1.1 材料 地蜂子采于贵州贵阳市白云区、黔南州龙里县和黔南州贵定县,经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为蔷薇科委陵菜属植物(*Potentilla freyniana*)。实验动物系昆明种小鼠,雌雄各半,中国人民解放军第三军医大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK-(军)2012-0011,体质量(20 $\pm$ 2) g。

1.1.2 仪器与试剂 XFB-200 高速中药粉碎机(长沙市雨花区中诚制药机械厂),N-1200B 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);SHZ-CD 循环水式多用真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),JA2003 电子天平(上海浦春计量仪器有限公司),101-2A 电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器公司),SB25-12DTD 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),安捷伦 1260 高效液相色谱仪

(美国安捷伦科技公司),HY-CM5 马弗炉(郑州恒亚仪器仪表有限公司)。试剂:儿茶素(中国食品药品检定研究院,批号 110877-201604)。三氯甲烷(重庆江川化工集团有限公司),硅胶板(青岛海洋化工有限公司),乙腈(色谱纯,上海星可高纯溶剂有限公司),其他试剂均为分析纯,云南白药气雾剂(国字标准 Z53021107)。

1.2 方法

1.2.1 TLC 鉴定 (1)供试品、对照品溶液制备:精密称取地蜂子粉末 5.00 g(过 2 号筛),加 30 倍量的甲醇超声 40 min,过滤,取续滤液,作为供试品溶液;另取儿茶素对照品适量,加甲醇制成 1 mL 含 0.5 mg 该成分的溶液。(2)鉴定方法:参照薄层色谱法根据 2015 年版《中国药典》四部通则 0502<sup>[10-11]</sup>,吸取“1.2.1(1)”项供试品、对照品溶液各 5  $\mu$ L,点于普通型 GF254 硅胶薄层板上,以三氯甲烷:丙酮:甲醇(15:7.5:2.2)为展开剂展开,取出,晾干,喷以 5% 硫酸溶液,在 110  $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。

1.2.2 儿茶素的含量测定 (1)供试品溶液的制备:精密称定药材样品粉末 5.00 g,加入 50 mL 甲醇,超声 40 min,过滤,精密补足,定容 50 mL,即得;以甲醇溶液作空白对照。(2)对照品溶液制备:精密称取儿茶素对照品 0.86 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶液稀释至刻度,配制为对照品溶液,即得。(3)色谱条件<sup>[12-13]</sup>: Gemini-Nx 色谱柱(5  $\mu$ m,250 mm $\times$ 4.6 mm),以 0.1% 磷酸溶液:乙腈(85:15)为流动相,柱温 30  $^{\circ}$ C,流速 1.0 mL/min,检测波长 280 nm,进样量 10  $\mu$ L,理论塔板数按儿茶素计不低于 3 000。(4)专属性考察:分别精密吸取上述“1.2.2(1)、1.2.2(2)”项供试品、对照品和空白对照溶液各 10  $\mu$ L,注入液相色谱仪,照“1.2.2(3)”的色谱条件测定,记录色谱图。(5)线性关系考察:按“1.2.2(3)”的色谱条件,精密吸取儿茶素对照品溶液 2、4、6、8、10  $\mu$ L 进样,测定峰面积,以进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,用绘图软件(Origin 7.5)绘制工作曲线获得线性浓度范围及相关系数( $r$ )。(6)方法学考察:精密度的实验,按“1.2.2(3)”项的色谱条件,吸取同一供试

品溶液 10  $\mu$ L, 注入高效液相色谱仪, 重复进样 6 次, 计算儿茶素的峰面积  $RSD$  为 0.24%, 表明该仪器精密良好; 稳定性试验, 按“1.2.2(3)”的色谱条件, 分别 0、2、4、8 及 12 h 吸取同一供试品溶液 10  $\mu$ L 进样, 测得 5 份供试品溶液中的儿茶素平均含量为 0.21%,  $RSD$  均值为 1.2%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定; 重复性试验, 精密称取与上述实验同一批地蜂子药材粉末 5 份, 按“1.2.2(1)”项下方法制备供试品溶液, 分别按“1.2.2(3)”的色谱条件测定峰面积, 平行测定 6 份样品儿茶素平均含量为 0.2%,  $RSD$  均值为 0.11%, 表明重复性稳定; 加样回收试验, 按“1.2.2(1)”项下方法制备供试品溶液, 精密称取儿茶素含有量已知的干燥药材粉末 6 份, 每份约 0.5 g, 精密加入对照品溶液(0.86 g/L) 1 mL, 按“1.2.2(3)”的色谱条件, 进样测定并计算加样回收率。(7) 样品含量测定: 精密称取 3 个产地样品粉末约 5 g, 共 3 份, 按“1.2.2(1)”项下方法制备供试品溶液, 在“1.2.2(3)”的色谱条件下测定, 计算含量。

### 1.2.3 地蜂子醇浸物对小鼠软组织损伤影响

(1) 试药制备: 取与上述实验同一批地蜂子药材粉碎过 10 目筛, 称取 10 g 于广口瓶内, 加入浓度 80% 食用级乙醇 50 mL, 超声 30 min 后浸泡 7 d, 过滤, 取 25 mL 滤液用纯净水定容至 50 mL, 备用。(2) 造模: 取体质量  $(20 \pm 2)$  g 昆明种小鼠 30 只, 雌、雄各半; 于实验前 1 天以 5% 的硫化钠后肢脱毛, 将小鼠固定在自制解剖板上, 过与 50 g 砝码直径相当的 3 cm 塑料管, 用 50 g 重的砝码自管中 15 cm 处垂直自由落体冲击小鼠左后大腿外侧肌肉丰厚处, 连续打击 30 下, 造成局部软组织损伤瘀肿模型<sup>[14]</sup>。(3) 分组: 造模后, 将动物随机分成空白组、阳性对照组、地蜂子组, 每组 10 只; 空白组于患处涂抹生理盐水, 阳性对照组涂抹云南白药喷雾剂, 地蜂子组涂抹上述“1.2.3(1)”制备液; 每天早中晚定时给药, 每天 3 次, 连续给药 3 d。

### 1.3 观察指标

损伤症候指数, 参照文献[15-16]在治疗第 1、3 天, 观察小鼠局部软组织损伤症候情况, 对瘀斑颜色、皮下淤血与肿胀程度 3 个项目评分、每个项目分为 3 等级; 瘀斑紫暗色计 1 分、红色计 0.5 分、色泽正常计 0 分; 皮下瘀血多且呈块状计 1 分、少量点状计 0.5 分、无瘀血者计 0 分; 肿胀程度, 皮肤明显肿胀计 1 分、皮肤稍有肿胀计 0.5 分、同正常组织计 0 分; 将 3 个项目的分值合计并进行

统计。

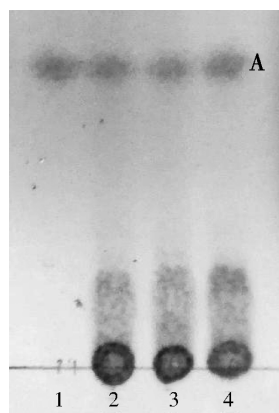
### 1.4 统计学方法

利用 Excel 2018 软件对回收率及相对标准偏差值( $RSD$ )进行计算分析, 损伤症候指数所得数据均以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 用 SPSS 17.0 统计软件对组间差异进行方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TLC 鉴别

在日光下, 地蜂子供试品色谱中均检出和对照品色谱相对应的橙色斑点 A, 提示分离效果与重复性良好, 见图 1。



注: 1 为儿茶素对照品, 2~3 为地蜂子供试品,  
4 为地蜂子对照药材

图 1 地蜂子 TLC 色谱结果

Fig. 1 TLC chromatogram of *Potentilla freyniana*

### 2.2 含量测定方法考察及样品测定

2.2.1 专属性考察结果 供试品溶液色谱图与儿茶素对照品溶液色谱图在相同保留时间具有吸收峰, 空白对照液在相同时间无吸收峰, 提示本方法无阴性干扰。结果见图 2。

2.2.2 线性关系测定 儿茶素对照品进样量在 0.017~0.086 g/L 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程为  $\hat{y} = 610.513 1x + 7.180 2$  ( $r = 0.999 4$ )。

2.2.3 方法学考察 儿茶素含量的平均回收率为 100.13%,  $RSD$  值为 2.18%, 提示该方法准确度良好, 见表 1。

2.2.4 样品含量测定 3 个产地样品以药材干燥品计算, 其中儿茶素平均含量分别为白云样品 0.17%、龙里样品 0.16%、贵定样品 0.20%。

表 1 地蜂子中儿茶素成分加样回收率实验结果

Tab. 1 The recovery rate of catechin

地蜂子	理论含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	相对标准 偏差(%)
1	1.006 0	0.860 0	1.865 0	99.88		
2	0.996 0	0.860 0	1.862 0	100.80		
3	0.980 0	0.860 0	1.860 0	102.30	100.13	2.18
4	1.020 0	0.860 0	1.868 0	96.80		
5	1.038 0	0.860 0	1.871 0	96.80		
6	0.984 0	0.860 0	1.861 0	102.40		

2.3 急性软组织损伤模型小鼠的治疗效果

造模后,空白组、阳性对照组、地蜂子组小鼠很快出现伤肢皮下瘀血、肌肉肿胀及肌肉颜色加深,治疗第 1 天各组间小鼠的损伤症候指数比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。第 3 天给药后,空白组损伤部位肌肉肿胀明显,有块状淤青;阳性对照组基本完全恢复;地蜂子组损伤部位肌肉颜色浅红色,无红肿,有少量淤青。地蜂子组、阳性对照组小鼠损伤症候指数均较空白对照组显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。见图 3 及表 2。

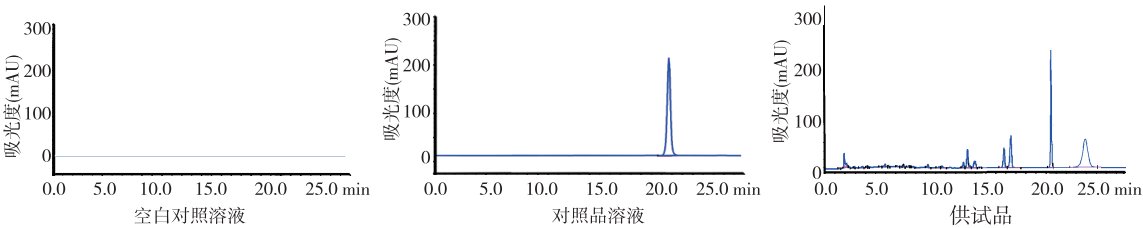


图 2 空白对照品、儿茶素对照品和供试品溶液 HPLC 色谱结果

Fig. 2 HPLC chromatograms of blank control, catechin standard and *Potentilla freyniana* sample

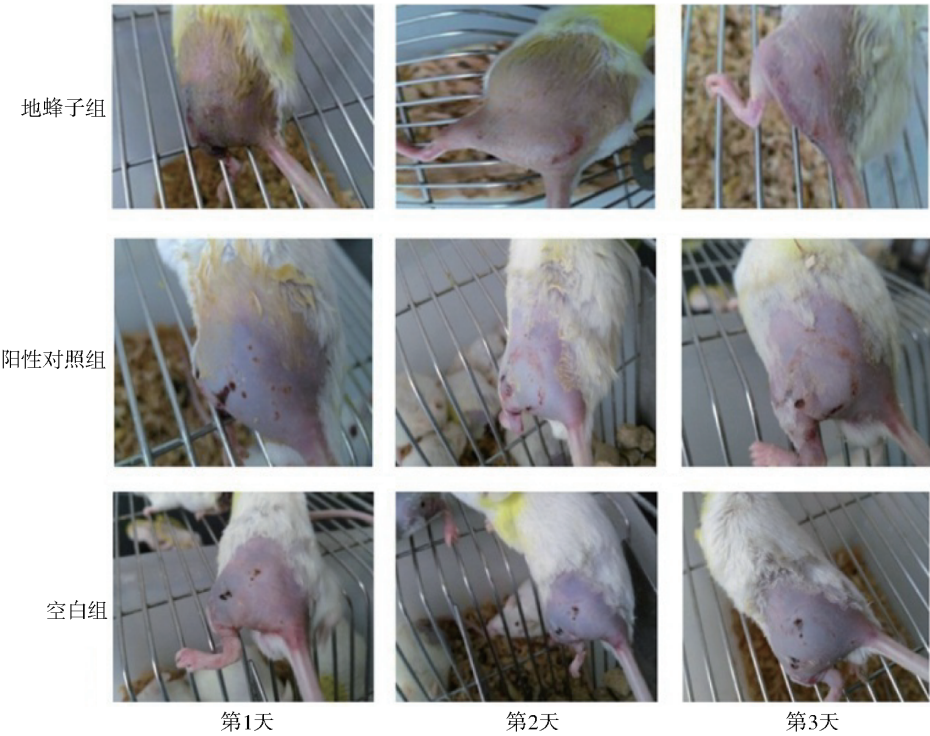


图 3 各组小鼠不同治疗时间软组织损伤恢复情况

Fig. 3 Recovery of soft tissue injury in different treatment groups



表 2 各组小鼠不同治疗时间损伤症候指数的比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab.2 Comparison of injury symptom index of different treatment time in each group

组别	损伤症候指数(分)	
	给药第 1 天	给药第 3 天
空白组	2.92 ± 0.83	1.18 ± 0.21
阳性对照组	2.98 ± 0.74	0.56 ± 0.15 <sup>(2)</sup>
地蜂子组	2.95 ± 0.65	0.58 ± 0.11 <sup>(1)</sup>

与空白组比较, <sup>(1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>(2)</sup>  $P < 0.01$

### 3 讨论

中药化学成分多且复杂,对其进行分离鉴定的方法很多,其中薄层色谱法因其便捷、快速及微量的特点,是应用最为广泛的方法。薄层色谱鉴别研究考察了乙醇、甲醇两种提取溶剂,考察了 30、40、50 min 超声提取时间;考察了三氯甲烷:丙酮:甲醇(15:7.5:2.2)、甲苯:丙酮:甲酸(4.0:3.0:2.0)、氯仿:甲醇:甲酸(5:3:2)3 种展开系统;考察了根皮苷、胡萝卜素、儿茶素<sup>[17]</sup>3 个对照品。结果显示,以甲醇为提取溶剂,超声时间为 40 min,三氯甲烷:丙酮:甲醇(15:7.5:2.2)作为展开剂,选择有紫外吸收,斑点清晰的儿茶素为对照品,对地蜂子提取物进行薄层色谱检视效果最佳。

通过参考文献[18]以及通过二极管阵列检测器 200~800 nm 全波长扫描,确定儿茶素最大吸收波长为 280 nm,作为本研究的检测波长。进行预实验时采用乙腈:水(50:50)作为流动相,发现儿茶素峰与相邻峰无法分离,将流动相改为 0.1% 磷酸溶液:乙腈(85:15),柱温 30℃,流速 1.0 mL/min 时,儿茶素峰出峰快,且与相邻峰分离良好。这可能是因酸性条件下抑制了儿茶素中多羟基结构的解离,从而改善了分离度<sup>[19]</sup>。本实验 3 个产地的地蜂子药材中儿茶素含量相近,可能的原因是 3 个产地所在的地区距离近,光照、湿度、土壤结构差异不大。

软组织损伤是指全身肌肉、韧带和肌腱的损伤,疼痛、肿胀、瘀伤和功能丧失如垂挂为其主要临床表现,是生活和运动中的常见疾病<sup>[20-21]</sup>。地蜂子作为一种民间草药,其镇痛、抗病毒和提升免疫作用确切<sup>[22-23]</sup>。为了模拟人体软组织损伤时组织破裂或细胞破损等病理变化,实验动物造模尤为重要,因为不同的造模方式造成的损伤程度和持续时间不同,结果也不同。目前软组织损伤模型有砵码

法、注射法、压迫法、撞击法等<sup>[24]</sup>,本研究采用砵码法复制急性软组织损伤,是因与其他方法相比,该法操作简单,不需要借助特定的仪器,有良好的重复性,但研究时必须保持打击的高度和重量一致,才能保证等同条件下造成软组织损伤的强度一致。本研究采用小鼠作为软组织损伤实验对象,较为经济实用,在造模过程中也容易控制。目前对地蜂子的体外研究中,均采取灌胃的给药方式,暂无外用报道。因此,本研究遵循民间外敷用法。软组织损伤实验中,各组不同治疗时间损伤症候指数的比较可以看出,与空白组相比,地蜂子组可以降低损伤症候指数( $P < 0.05$ ),提示地蜂子醇浸物对小鼠的淤青及红肿有治疗效果,初步分析该药材有活血化瘀及消肿的活性,从而为地蜂子的进一步开发利用提供依据。

综上所述,本研究建立的 HPLC 测定方法简单、准确,可用于地蜂子中儿茶素含量的测定;地蜂子醇浸物对小鼠软组织损伤具有改善作用。

### 4 参考文献

[1] 湖北省食品药品监督管理局. 湖北省中药材质量标准[S]. 湖北:湖北科学技术出版社, 2009:50.

[2] 谢宗万. 全国中草药汇编(上册)[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2000:352-353.

[3] 朱敏英. 地蜂子在土家族医药中的使用及其镇痛作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2005, (8):748-749.

[4] 刘梁, 韩定猷, 周军, 等. 三叶委陵菜根中三萜类化合物抗病毒作用研究[J]. 时珍国医国药, 2006, (8):1484-1485.

[5] 许正刚, 闵运江. 安徽产委陵菜属 7 种药用种类的黄酮提取与分析[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(6):2929-2933.

[6] 陈会玲, 闫斌, 覃祝, 等. 地蜂子化学成分的研究[J]. 中成药, 2015, 37(12):2674-2677.

[7] 曾亮, 黄建安, 李赤翎, 等. 儿茶素的抑菌效果及机理研究[J]. 食品工业科技, 2009(5):89-92.

[8] 周露露, 高原, 牛智慧, 等. 茶叶中儿茶素的药理作用及其研究进展[J]. 辽宁化工, 2018, 47(4):316-318.

[9] TANG L, LI L, YANG J, et al. Potential benefit of (-)-epigallocatechin-3-gallate for macrovascular complications in diabetes[J]. Brazilian Journal of Medical & Biological Research, 2017, 50(10):121-124.

[10] 王丽丽, 王坤波, 黄建安, 等. 茶叶中儿茶素薄层色谱分离所用展开剂的优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2012, 38(1):102-105.

(下转第 679 页)