

桂花种子环烯醚萜苷的提取工艺与抗血栓活性研究

李桂华, 王苗苗, 贺 魏, 刘 洁, 张 蝶, 刘嘉琪, 唐伟卓*

长沙学院生物与环境工程学院, 湖南 长沙 410022

摘 要: 目的 优选桂花 4 大品种种子中 2 种主要环烯醚萜苷类成分(特女贞苷和女贞苷 G13)的提取工艺并对桂花种子进行抗血栓活性评价。方法 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 从乙醇体积分数、料液比和提取时间 3 个方面考察超声、回流、微波不同提取方法对桂花种子中 2 种成分的提取效果。以提取率、成分质量及总峰面积为指标进行综合加权分析, 确定最佳的提取方法和提取工艺。建立斑马鱼抗血栓模型评价桂花种子的抗血栓活性。结果 3 种提取方法中, 微波提取效果最好, 最佳提取工艺为乙醇体积分数 55%、料液比 1:10、提取时间 15 min。HPLC 分析表明桂花 4 大品种种子的化学成分组成基本一致。斑马鱼抗血栓活性结果显示, 桂花种子提取物的血栓抑制作用不明显, 在高浓度剂量下易导致心包水肿。结论 考察了桂花 4 大品种种子中 2 种环烯醚萜苷的提取工艺, 同时初步研究了银桂品种种子水提物的抗血栓活性, 为桂花子这种废弃资源的二次开发和利用提供了参考。

关键词: 桂花种子; 特女贞苷; 女贞苷 G13; 提取工艺; 抗血栓活性; 正交设计; 斑马鱼; 抗血栓模型

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)13-3033-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.012

Iridoid glycoside extraction technology and anti-thrombotic activity of *Osmanthus fragrans* seeds

LI Gui-hua, WANG Miao-miao, HE Wei, LIU Jie, ZHANG Die, LIU Jia-qi, TANG Wei-zhuo

College of Biological and Environmental Engineering, Changsha University, Changsha 410022, China

Abstract: Objective To optimize the extraction technology of two major iridoid glucosides (specnuezhenide and nuezhenoside G13) from four kinds of *Osmanthus fragrans* (OF) seeds, and to evaluate the anti-thrombotic activity of OF seeds. **Methods** The orthogonal-test experiment was employed to optimize the parameters including ethanol concentration, liquid-material ratio, and extraction time for three extraction methods (ultrasonic extraction, reflux extraction, and microwave extraction). The extraction yield, content, and total peak area of iridoid glucosides were selected for weighted analysis to determine the best extraction method and technology. Additionally, an anti-thrombotic zebra fish model was established for biological evaluation of OF seeds. **Results** Microwave extraction was the best method for iridoid glucosides extraction with the optimal conditions of ethanol concentration 55%, material-liquid ratio 1:10, and microwave time 15 min. HPLC analysis showed that there was no significant difference in chemical composition among the four kinds of OF seeds. In zebra fish biological screening model, OF seeds displayed a weak inhibitory effect on the growth of thrombus and exhibited a pericardial edema effect in high dose-treated group. **Conclusion** In this paper, extraction technology of two iridoid glucosides from four different kinds of OF seeds and preliminary anti-thrombotic activity evaluation of OF seeds were investigated. These results can provide the reference for further development and utilization of the agricultural waste of OF seeds.

Key words: seeds of *Osmanthus fragrans* Lour.; specnuezhenide; nuezhenide G13; extraction technology; anti-thrombotic activity; orthogonal-test design; zebra fish; anti-thrombotic model

桂花 *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour. 又名木犀, 系木犀科 (Oleaceae) 木犀属 *Osmanthus* Lour. 植物, 在我国南方地区广泛种植与分布^[1]。桂花种内性状多样、品种丰富。据统计, 我国现有桂花品

收稿日期: 2018-01-19

基金项目: 2017 年湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目 (775); 国家自然科学基金资助项目 (41506149); 长沙市科技计划项目 (k1705046)

作者简介: 李桂华 (1995—), 男, 本科在读。Tel: 15273122961 E-mail: 1023558746@qq.com

*通信作者 唐伟卓 (1985—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为天然产物的结构与功能。Tel: 18521055135 E-mail: tweizhuo@126.com

种 157 种^[2], 分类学上目前主要以 2 大类 4 大品种学说为主, 即金桂 *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii* (OFT)、银桂 *Osmanthus fragrans* var. *latifolius* (OFL)、丹桂 *Osmanthus fragrans* var. *auranticaus* (OFA) 和四季桂 *Osmanthus fragrans* var. *semperflorens* (OFS) 4 大品种群^[3-4]。桂花种子为桂花的干燥成熟果实。《江苏药材志》和《植物名实图考长编》载“桂花子, 味甘、辛, 性温, 能暖胃、益胃, 散寒”, 民间用作止痛剂, 治疗心痹疼痛。

目前对桂花的研究主要集中在桂花的品种繁育和桂花精油成分分析等方面^[5-8], 涉及桂花种子部位化学成分的研究不多。已有文献主要报道桂花种子中总黄酮提取工艺优化^[9]、油脂成分分析^[10]、色素类成分分离制备^[11-12]等内容。此外, 尹伟等^[13]和李佳川等^[14]分别对桂花种子的化学成分和生物活性进行了初步研究。然而, 对于桂花种子中大量存在的环烯醚萜苷相关研究报道较少。

环烯醚萜作为木犀属植物的代表性成分, 具有广泛的生理活性^[15-20]。课题组前期从桂花种子中获得了系列环烯醚萜苷类成分, 发现其中 2 种环烯醚萜苷单体特女贞苷 (specnuezhenide, Spe) 和女贞苷 G13 (nuezhenide G13, G13) 含量丰富, 并显示一定的抗血小板凝集活性, 推测其可能为桂花种子发挥抗心痹作用的物质基础^[21]。因此, 为了更好地开发利用桂花种子这种废弃资源, 高效获取桂花种子中活性环烯醚萜苷类成分。基于正交设计原理, 本实验选取超声、回流、微波 3 种提取方法对桂花 4 大品种种子中 2 种特征性环烯醚萜成分进行提取工艺优化; 结合指纹图谱技术, 建立二者的 HPLC 定量方法, 对比分析桂花 4 大品种中环烯醚萜苷类成分差异; 采用斑马鱼抗血栓模型初步评价桂花种子的抗血栓活性, 以期对桂花种子这种废弃资源的综合利用和二次开发提供参考和依据。

1 仪器与材料

Waters 2965 高效液相色谱系统及 2998 PDA 检测器, 美国 Waters 公司; Christ Alpha 1-2 LD plus 冷冻干燥机, 德国 Martin Christ 公司; ZWM-u72-05 超纯水机, 湖南中沃水务环保科技有限公司; TMT-3 电子天平, 湖南湘仪天平仪器设备有限公司; SZX16 荧光显微镜、DP2-BSW 图像采集系统、IX51 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; Forma 3111 水套式 CO₂ 培养箱, 美国 Forma 公司; 斑马鱼养殖饲养设备, 北京爱生科技公司。

分析级无水乙醇、石油醚 (沸程 60~90 °C)、甲醇、磷酸, 色谱级乙腈均购自于国药集团化学试剂有限公司。斑马鱼来自美国 AB 品系, 由山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。肝素钠购自阿拉丁公司。Spe (质量分数 ≥ 98%, 批号 16021904) 和 G13 (质量分数 ≥ 98%, 批号 17022211) 对照品购自于北京中科质检生物技术有限公司。

桂花 4 大品种金桂、银桂、丹桂和四季桂种子 2017 年 7 月购自江苏省宿迁市, 经长沙学院陈建荣副教授鉴定为木犀属植物桂花 *Osmanthus fragrans* 的成熟种子, 标本现保存于长沙学院生物与环境工程学院天然产物研究室 (编号 No. OFS001、OFS002、OFS003、OFS004)。

2 方法与结果

2.1 材料预处理

取粉碎后的 4 大品种桂花种子各 400 g, 分别置于 1 000 mL 的锥形瓶中, 按 1:2 的比例加入石油醚进行超声 (50 °C) 脱脂处理, 共脱脂 3 次, 每次 45 min, 直至石油醚澄清。最后合并石油醚提取液, 回收, 晾干后得脱脂桂花种子材料, 备用。

2.2 Spe 和 G13 的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters WAT054275 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~30 min, 10%~35% 乙腈; 30~31 min, 35%~100% 乙腈; 32~40 min, 100% 乙腈; 40~42 min, 100%~10% 乙腈; 42~45 min, 10% 乙腈; 平衡时间 15 min; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; PDA 检测器检测范围 200~400 nm; 检测波长 232 nm; 进样量 10 μL。理论塔板数以各成分计均大于 20 000。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取脱脂后的 4 个品种桂花种子各 27 份, 每份 10 g。按正交表进行实验, 每个样品提取 3 次。合并提取液滤过, 回收溶剂得提取物浸膏。进一步冷冻干燥后得固体粉末, 置于真空干燥器中备用。精密称取各提取物粉末 40 mg 于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容, 于 2~8 °C 冰箱保存。0.45 μm 滤膜滤过, 待测。

2.2.3 对照品溶液的制备 称取对照品 Spe 约 6.1 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇配制成质量浓度为 0.61 mg/mL 的 Spe 对照品母液; 称取 G13 对照品约 4.3 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解定容, 制得 0.43 mg/mL 的 G13 对照品母液; 用移液管精密吸取各对照品母液 1 mL

混合,制成含 Spe 和 G13 分别为 0.305、0.215 mg/mL 的混合对照品溶液,置于 2~8 ℃ 冰箱保存,备用。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取 Spe 和 G13 对照品溶液 2、4、8、16、24 μ L,按上述色谱条件进行测定。以对照品的进样质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,计算回归方程。结果显示,二者分别在 0.61~7.32、0.43~5.61 μ g 范围内进样量与峰面积呈较好的线性关系。Spe 的回归方程为 $Y=185\,028\,X+13\,841$, $r^2=0.999\,4$; G13 的回归方程为 $Y=214\,122\,X+54\,056$, $r^2=0.999\,9$ 。

2.2.5 精密度试验 精密吸取 Spe 和 G13 混合对照品溶液 10 μ L,在上述色谱条件下,分别连续 5 次进样,以峰面积计算,Spe 和 G13 的精密度 RSD 分别为 0.46%、0.34%,说明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密称取干浸膏样品 40 mg,按上述方法制得供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 吸取 10 μ L 依次进样测定,以峰面积计算,Spe 和 G13 峰面积的 RSD 分别为 2.48%、2.60%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取干浸膏样品 40 mg,共 6 份,按上述方法平行制备供试品溶液,进样 10 μ L,记录 Spe 和 G13 的峰面积。计算得 Spe 和 G13 质量分数的 RSD 值分别为 1.77%和 1.80%,说明本方法具有良好的重复性。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取桂花种子浸膏粉末 40 mg,共 9 份,分别按 50%、100%、150%的含量加入对照品 Spe 和 G13。按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液,精密吸取 10 μ L 进样,记录色谱峰面积,计算回收率。结果显示,Spe 的平均回收率为 96.8%,G13 的平均回收率为 98.2%,二者的 RSD 值分别为 1.08%和 0.94%,说明该方法准确度较高。

2.2.9 最低检测限与最低定量限 将 Spe 和 G13 对照品母液以 10 倍不断稀释,在上述色谱条件下进样检测。当信噪比为 3 ($S/N=3$) 时,测得 Spe 和 G13 最低检测限分别为 56.6 ng/mL 和 9.37 ng/mL,当 $S/N=10$ 时,测得 Spe 和 G13 最低定量限分别为 246.1 ng/mL 和 42.2 ng/mL。

2.3 桂花不同品种种子中 Spe 和 G13 的提取工艺优选

2.3.1 正交试验设计 为了全面分析多因素实验的交互作用、寻找最优的水平组合。在单因素实验的

基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计考察提取时间 (A)、乙醇体积分数 (B) 和料液比 (C) 对桂花 4 大品种种子环烯醚萜苷类成分提取率的影响。各提取方法的因素水平见表 1。

2.3.2 特征指纹图谱测定 按照“2.2.2”和“2.2.3”项下方法制备供试品溶液和对照品溶液,在“2.2.1”项下色谱条件依次进样检测,记录色谱图。混合对照品和供试品溶液的色谱图见图 1。

表 1 不同提取方法正交试验因素水平

Table 1 Orthogonal-test factors and levels for different extraction methods

提取方法	A/min			B/%			C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
超声提取	30	50	70	55	75	95	10	15	20
回流提取	60	90	120	55	75	95	10	15	20
微波提取	15	20	25	55	65	75	5	10	15

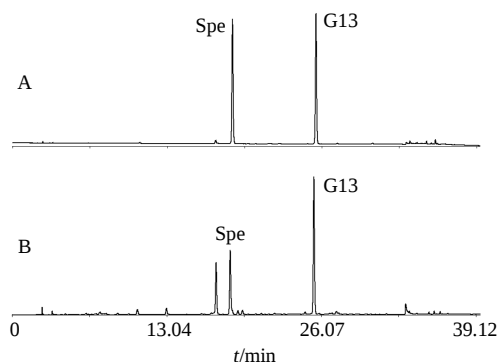


图 1 对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC of reference standard solution (A) and sample solution (B)

2.3.3 综合权重分析 以 Spe 质量、G13 质量、总浸膏提取率 (ER) 和 HPLC 特征峰总面积 (即 Spe 与 G13 总峰面积, TPA) 为指标,采用加权法进行综合评分,优选桂花种子中环烯醚萜类成分的最佳提取工艺^[22]。各项指标参数的最高值设为 100 分,最低值为 0 分,以 4 个指标因素为横坐标,得分为纵坐标,将各项指标下最高、最低两点值代入,分别求得 Spe 质量、G13 质量、ER 和 TPA 4 个指标的直线方程为 $Y=0.310\,7\,X-9.318$, $Y=0.235\,8\,X-10.834$, $Y=5.503\,6\,X-9.466\,2$ 和 $Y=0.000\,014\,640\,7\,X-73.797$ 。

进一步将正交试验分析表中各指标数值代入直线方程,计算得 4 个指标各自得分。然后根据 4 个指标对总提取工艺的贡献率给予综合权重分配。本

实验主要考察桂花种子中 2 种特征性环烯醚萜苷类成分的提取,故二者的权重系数较高,各为 0.3。不同提取方法下,提取率高低也会直接影响 2 种成分的含量测定结果,所以赋予同样的权重系数 0.3。由于每次样品进样质量浓度均相同,故 HPLC TPA 主要反映的是桂花种子不同品种间的含量差异,对同

一品种下不同工艺的影响贡献率不大,故权重系数分配为 0.1。即综合评分(CE)=0.3×Spe 得分+0.3×G13 得分+0.3×ER 得分+0.1×TPA 得分。采用 IBM SPSS Statistics 20 软件对正交试验结果进行分析。不同提取方法下的实验设计、直观分析和方差分析结果见表 2~10。

表 2 桂花 4 大品种种子超声提取工艺正交试验分析

Table 2 Orthogonal design-direct analysis of ultrasonic extraction for four kinds of OF seeds

试验号	A	B	C	D	OFT					OFL				
					Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE	Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE
1	1	1	1	1	45.41	56.70	4.05	5 834 310	7.21	82.36	119.72	6.06	9 710 500	24.10
2	1	2	2	2	41.25	58.97	3.27	7 588 340	8.26	73.44	112.62	5.20	9 514 310	21.06
3	1	3	3	3	37.04	54.77	2.91	7 527 610	6.89	43.17	67.07	2.52	11 627 190	13.69
4	2	1	2	3	68.97	97.06	5.70	6 904 820	16.56	101.71	148.57	7.22	8 264 250	27.75
5	2	2	3	1	69.99	99.27	5.23	6 323 980	15.18	89.31	145.17	6.31	8 641 560	25.40
6	2	3	1	2	29.99	49.79	2.61	8 652 360	7.03	57.40	97.92	2.83	11 870 830	18.06
7	3	1	3	2	102.69	132.99	7.89	6 499 550	25.26	77.94	106.90	6.13	7 770 080	20.06
8	3	2	1	3	59.08	83.05	4.58	7 628 370	13.85	48.75	79.22	3.56	8 453 220	12.14
9	3	3	2	1	45.81	73.54	3.54	8 061 160	10.85	45.70	78.04	3.23	8 674 230	11.55

试验号	A	B	C	D	OFA					OFS				
					Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE	Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE
1	1	1	1	1	88.58	114.01	8.44	6 036 650	22.83	83.64	119.15	6.13	7 605 320	21.22
2	1	2	2	2	66.74	88.07	6.20	6 210 550	15.52	81.42	118.38	5.96	7 475 450	20.48
3	1	3	3	3	80.86	136.37	6.17	7 972 490	22.78	31.89	49.46	1.72	10 611 550	8.58
4	2	1	2	3	110.30	145.46	7.54	8 205 770	28.77	107.54	146.75	7.24	8 045 830	27.87
5	2	2	3	1	64.67	108.75	6.12	7 042 110	17.87	86.13	130.08	6.25	8 521 520	23.76
6	2	3	1	2	60.11	96.40	3.92	8 959 140	15.75	30.13	45.95	2.03	8 507 850	5.60
7	3	1	3	2	114.55	145.14	8.37	7 250 950	29.12	91.35	132.76	6.57	7 580 750	23.59
8	3	2	1	3	63.95	94.41	5.78	6 595 240	15.57	71.75	109.31	5.30	8 017 410	18.64
9	3	3	2	1	59.26	72.21	5.66	5 040 550	11.09	62.90	99.50	4.10	9 054 310	16.66

表 3 超声提取工艺直观分析

Table 3 Direct analysis of ultrasonic extraction

水平	OFT				OFL				OFA				OFS			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
K ₁	22.36	49.03	28.09	33.24	58.85	71.91	54.30	61.05	61.13	80.72	54.15	51.79	50.28	72.68	45.46	61.64
K ₂	38.77	37.29	35.67	40.55	71.21	58.60	60.36	59.18	62.39	48.96	55.38	60.39	57.23	62.88	65.01	49.67
K ₃	49.96	24.77	47.33	37.30	43.75	43.30	59.15	53.58	55.78	49.62	69.77	67.12	58.89	30.84	55.93	55.09
R	27.60	24.26	19.24	7.31	27.46	28.61	6.06	7.47	6.61	31.76	15.62	15.33	8.61	41.84	19.55	11.97

2.3.4 验证试验 称取同批桂花种子各 10 g,按照优选的最佳工艺组合进行提取,并利用建立的 HPLC 方法进行 2 种环烯醚萜苷的成分测定,结果见表 11。

2.3.5 指纹图谱分析 采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012.130723 版本》软件,选择 HPLC 图中峰形较好的 21 个色谱峰进行多点校正。对桂花种子不同品种、不同工艺

表 4 超声提取方差分析

Table 4 Variance analysis of ultrasonic extraction

方差来源	OFT					OFL				
	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	128.473 8	2	64.236 9	14.366 7		126.092 4	2	63.046 2	12.517 7	
B	98.125 1	2	49.062 5	10.972 9		136.642 0	2	68.321 0	13.565 0	
C	62.621 1	2	31.310 5	7.002 7		6.856 7	2	3.428 3	0.680 7	
D (误差)	8.942 5	2	4.471 2			10.073 1	2	5.036 5		

方差来源	OFA					OFS				
	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	8.211 4	2	4.105 7	0.208 6		13.910 0	2	6.955 0	0.580 8	
B	219.593 7	2	109.796 8	5.578 8		319.243 0	2	159.621 5	13.328 9	
C	50.285 5	2	25.142 7	1.277 5		63.807 8	2	31.903 9	2.664 1	
D (误差)	39.362 4	2	19.681 2			23.951 1	2	11.975 5		

 $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

表 5 桂花 4 大品种种子回流提取工艺正交试验分析

Table 5 Orthogonal design-direct analysis of reflux extraction for four kinds of OF seeds

试验号	A	B	C	D	OFT					OFL				
					Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE	Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE
1	1	1	1	1	140.34	192.28	9.13	8 214 960	37.52	140.93	211.77	9.60	8 799 750	40.59
2	1	2	2	2	124.83	155.91	8.47	7 911 840	31.97	136.92	208.88	10.76	7 640 290	40.23
3	1	3	3	3	73.93	110.72	5.15	8 499 850	19.41	55.17	87.76	4.04	8 535 330	14.25
4	2	1	2	3	209.94	267.63	12.82	8 410 070	55.72	213.95	291.17	12.93	8 546 220	58.14
5	2	2	3	1	141.95	197.88	9.55	8 094 460	38.58	188.53	279.53	12.92	7 920 360	54.01
6	2	3	1	2	67.74	95.92	4.79	8 142 170	16.66	89.53	141.59	5.34	9 438 120	24.73
7	3	1	3	2	262.79	344.77	14.76	8 993 560	70.16	201.67	285.11	13.97	7 957 090	57.42
8	3	2	1	3	182.37	261.09	11.09	9 115 000	50.86	194.16	276.87	12.41	8 634 500	54.55
9	3	3	2	1	126.05	181.58	8.00	8 877 110	34.53	59.82	93.78	4.40	8 542 250	15.72

试验号	A	B	C	D	OFA					OFS				
					Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE	Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE
1	1	1	1	1	216.40	307.47	13.69	8 861 150	61.23	190.17	250.51	12.44	8 571 900	52.27
2	1	2	2	2	192.47	279.31	12.81	8 448 370	54.95	176.53	222.78	10.64	8 909 620	46.56
3	1	3	3	3	114.07	151.98	7.33	8 565 190	29.76	93.39	131.92	5.45	8 731 330	23.55
4	2	1	2	3	211.52	268.20	13.14	8 453 500	56.50	208.76	258.94	12.28	8 323 200	53.97
5	2	2	3	1	155.70	204.74	9.16	8 965 380	40.98	194.32	258.81	13.35	8 193 400	54.19
6	2	3	1	2	98.25	153.85	6.24	9 443 490	27.91	72.44	105.23	5.20	8 309 950	18.68
7	3	1	3	2	206.87	282.14	11.85	9 274 000	56.12	185.45	221.91	11.46	8 099 770	47.50
8	3	2	1	3	136.39	179.69	7.83	9 214 040	35.58	209.73	264.73	12.24	8 753 750	55.04
9	3	3	2	1	123.61	160.50	7.89	8 107 560	31.51	81.84	119.26	5.46	8 798 330	21.70

条件下制备的样品图中峰面积大于总峰面积 0.05% 的 70 个特征峰进行匹配分析 (图 2)。结果表明, 各峰形匹配良好, 其中 Spe 和 G13 峰的峰面积占总峰面积的 60% 以上, 提示其为桂花种子中的主要成

分。超声、回流和微波 3 种提取方法下制备的样品色谱图基本一致, 说明对于量大的主要成分, 不同的提取方法对其影响并不显著。值得注意的是, 对于一些微量成分, 3 种提取方法的提取效果存在一

表 6 回流提取工艺直观分析

Table 6 Direct analysis of reflux extraction

水平	OFT				OFL				OFA				OFS			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
K_1	88.90	163.40	105.04	110.63	95.07	156.15	119.87	110.32	145.94	173.85	124.72	133.72	122.38	153.74	125.99	128.16
K_2	110.96	121.41	122.22	118.79	136.88	148.79	114.09	122.38	125.39	131.51	142.96	138.98	126.84	155.79	122.23	112.74
K_3	155.55	70.60	128.15	125.99	127.69	54.70	125.68	126.94	123.21	89.18	126.86	121.84	124.24	63.93	125.24	132.56
R	66.65	92.80	23.11	15.36	41.81	101.45	11.59	16.62	22.73	84.67	18.24	17.14	4.46	91.86	3.76	19.82

表 7 回流提取方差分析

Table 7 Variance analysis of reflux extraction

方差来源	OFT					OFL				
	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	768.570 5	2	384.285 2	19.520 3	$P<0.05$	321.844 1	2	160.922 0	6.546 5	
B	1 439.628 5	2	719.814 2	36.564 0	$P<0.05$	2 133.244 5	2	1 066.622 2	43.391 8	$P<0.05$
C	96.043 3	2	48.021 6	2.439 3		22.388 1	2	11.194 0	0.455 4	
D(误差)	39.372 8	2	19.686 4			49.162 4	2	24.581 2		

方差来源	OFA					OFS				
	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	104.856 4	2	52.428 2	2.040 1		3.345 7	2	1.672 8	0.046 3	
B	1 194.834 8	2	597.417 4	23.246 7	$P<0.05$	1 834.255 4	2	917.127 7	25.398 6	$P<0.05$
C	66.276 4	2	33.138 2	1.289 5		2.640 0	2	1.320 0	0.036 6	
D(误差)	51.398 0	2	25.699 0			72.218 8	2	36.109 4		

表 8 桂花 4 大品种种子微波提取工艺正交试验分析

Table 8 Orthogonal design-direct analysis of microwave extraction for four kinds of OF seeds

试验号	A	B	C	D	OFT					OFL				
					Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE	Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE
1	1	1	1	1	313.21	440.78	19.74	7 073 040	87.06	285.09	378.53	19.81	8 526 520	82.28
2	1	2	2	2	300.76	380.55	19.67	9 070 100	84.45	287.99	371.30	18.23	8 712 120	79.10
3	1	3	3	3	263.66	341.01	17.14	8 369 220	72.99	244.46	313.21	17.18	8 312 930	69.21
4	2	1	2	3	313.27	405.47	19.63	9 168 910	87.45	286.83	397.17	19.80	9 641 180	85.37
5	2	2	3	1	311.55	397.53	17.03	8 171 140	80.98	281.10	356.26	16.67	7 745 100	74.00
6	2	3	1	2	213.51	289.61	16.59	8 054 420	63.31	240.31	312.76	15.70	9 185 210	67.63
7	3	1	3	2	351.84	470.07	18.83	7 436 550	91.76	300.77	393.36	17.96	7 966 170	80.91
8	3	2	1	3	294.79	387.15	18.54	7 380 990	80.02	275.46	350.06	16.54	8 371 710	73.74
9	3	3	2	1	288.37	366.43	17.41	9 429 250	79.09	277.07	352.46	16.44	8 129 310	73.54

试验号	A	B	C	D	OFA					OFS				
					Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE	Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE
1	1	1	1	1	262.95	358.62	18.70	9 118 500	77.84	324.47	393.13	17.63	8 474 010	83.30
2	1	2	2	2	299.30	425.38	17.87	9 016 350	84.43	295.95	382.90	16.86	9 036 920	79.47
3	1	3	3	3	266.55	330.72	15.74	9 264 690	71.53	262.23	337.48	15.61	8 252 260	69.91
4	2	1	2	3	317.00	456.79	18.32	9 451 190	89.68	336.97	463.57	17.30	8 967 340	89.63
5	2	2	3	1	263.67	321.17	17.74	8 995 630	73.49	261.29	295.07	16.13	9 312 310	69.23
6	2	3	1	2	258.10	326.96	15.30	7 666 570	67.41	260.16	356.25	15.07	8 292 130	70.21
7	3	1	3	2	269.86	366.08	19.89	9 360 070	81.33	283.51	340.48	18.77	8 395 530	77.53
8	3	2	1	3	288.74	356.98	17.03	9 583 330	78.05	281.66	338.37	16.66	8 932 340	74.51
9	3	3	2	1	300.97	403.34	15.08	10 205 390	80.16	263.62	322.95	16.99	8 729 290	71.98

表 9 微波提取工艺直观分析
Table 9 Direct analysis of microwave extraction

水平	OFT				OFL				OFA				OFS			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
K ₁	244.50	266.27	230.39	247.13	230.59	248.56	223.65	229.82	233.80	248.85	233.30	231.49	232.68	250.46	228.02	224.51
K ₂	231.74	245.45	250.99	239.52	227.00	226.84	238.01	227.64	230.58	235.97	254.27	233.17	299.07	223.21	241.08	227.21
K ₃	250.87	215.39	245.73	240.46	228.19	210.38	224.12	228.32	239.54	219.10	226.35	239.26	224.02	212.10	216.67	234.05
R	19.13	50.88	20.60	7.61	3.59	38.18	14.36	2.18	8.96	29.75	30.97	7.77	8.66	38.36	24.41	9.54

表 10 微波提取方差分析
Table 10 Variance analysis of microwave extraction

方差来源	OFT					OFL				
	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	63.261 3	2	31.630 6	5.512 5		2.229 4	2	1.114 7	2.687 8	
B	436.205 6	2	218.102 8	38.010 0	P<0.05	244.489 2	2	122.244 6	294.770 4	P<0.01
C	76.371 5	2	38.185 7	6.654 8		44.373 6	2	22.186 8	53.499 4	P<0.05
D (误差)	11.476 1	2	5.738 0			0.829 4	2	0.414 7		

方差来源	OFA					OFS				
	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	13.733 1	2	6.866 5	1.232 5		12.614 5	2	6.307 2	0.782 5	
B	148.394 9	2	74.197 4	13.317 8		259.720 5	2	129.860 2	16.110 9	
C	194.218 9	2	97.109 4	17.430 3		99.470 5	2	49.735 2	6.170 3	
D (误差)	11.142 6	2	5.571 3			16.120 8	2	8.060 4		

表 11 桂花 4 大品种种子 3 种提取方法最佳提取工艺结果分析

Table 11 Analysis of optimized extraction technology by three different extraction methods for four kinds of OF seeds

方法	OFT						OFL					
	最佳工艺	Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE	OET	Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE
超声	A ₃ B ₁ C ₃	192.12	192.12	7.71	8 099 770	39.82	A ₂ B ₁ C ₂	115.08	139.37	7.59	8 565 190	29.39
回流	A ₃ B ₁ C ₃	218.90	286.57	12.91	8 309 950	57.89	A ₂ B ₁ C ₃	235.21	240.98	13.90	8 523 453	58.13
微波	A ₁ B ₁ C ₂	336.21	465.51	19.55	8 436 550	92.63	A ₁ B ₁ C ₂	357.15	480.92	19.15	8 380 990	94.93

方法	OFA						OFS					
	最佳工艺	Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE	OET	Spe/mg	G13/mg	ER/%	TPA	CE
超声	A ₂ B ₁ C ₃	107.61	129.91	7.85	8 453 500	28.29	A ₃ B ₁ C ₂	118.06	138.92	7.31	8 965 380	29.76
回流	A ₁ B ₁ C ₂	234.99	296.24	14.68	8 753 750	63.65	A ₂ B ₂ C ₃	186.55	255.89	13.65	8 798 330	54.64
微波	A ₁ B ₁ C ₃	359.06	375.37	19.94	8 429 250	89.02	A ₁ B ₁ C ₂	362.13	406.15	20.17	8 371 710	91.78

定差异。微波提取方法下,微量成分的差异最明显,分析这与不同提取方法的提取原理有关(关于样品命名的说明:超声提取下金桂、银桂、丹桂和四季桂品种样品依次为 S1、S2、S3 和 S4;回流提取下金桂、银桂、丹桂和四季桂品种样品依次为 S5、S6、S7 和 S8;微波提取下金桂、银桂、丹桂和四季桂品种样品依次为 S9、S10、S11 和 S12)。

2.4 桂花种子抗血栓活性评价

2.4.1 斑马鱼胚胎获取 雌、雄斑马鱼分开喂养,照明 14 h/黑暗 10 h 交替进行,定时喂养人工颗粒状饵料和刚孵出的卤虫无节幼体 *Artemia nauplii*。采卵时取健康性成熟的斑马鱼按雌-雄 1:1 的比例放入交配缸内,次日 9~10 时获得受精卵。对受精卵进行消毒和洗涤后移入斑马鱼胚胎培养用水(含

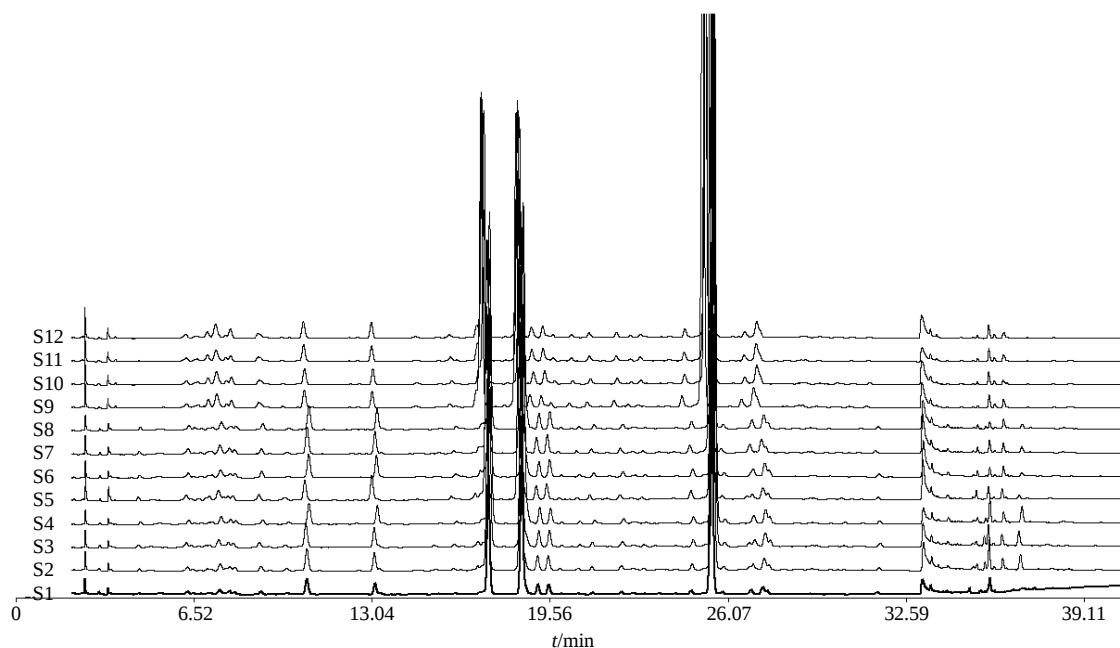


图 2 4 大桂花品种种子 3 种提取方法下含量分析指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of four kinds of OF seeds by three different extraction methods

5.0 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl₂、0.16 mmol/L MgSO₄) 中, 28 °C 下控光培养。

2.4.2 样品对斑马鱼血栓形成的影响 在受精卵发育 3 dpf 时, 于体视显微镜下挑选正常的斑马鱼胚胎, 移入 24 孔培养板中, 每孔 10 枚, 每次每组 2 个重复孔, 实验重复 2 次。加培养水至 2.0 mL, 作为对照组, 以肝素钠 (20 U/mL) 为阳性对照组, 给药组分别加入“2.2.2”项方法下制备的不同质量浓度的银桂种子提取物 (5、10、50 μg/mL), 加培养水至 2.0 mL。置于光照培养箱 (28 °C) 让胚胎继续发育。在 48 hpf (hours post fertilization) 时, 用 60 μg/mL 的三氯化铁分别处理各组斑马鱼。在显微镜下从加入三氯化铁开始, 记录肠下静脉血管形成血栓的时间, 判断样品是否具有抑制血栓形成的活性, 并观察胚胎死亡或畸形情况。

2.4.3 抗血栓活性评价结果 对桂花 4 大品种种子中 Spe 和 G13 含量最高的银桂种子提取物进行抗血栓活性评价。由表 2 结果发现, 与对照组相比, 银桂种子提取物在低质量浓度时显示了一定的血栓抑制活性, 血栓生成时间为 (9.38±0.23) min。但是进一步加大质量浓度至 50 μg/mL 时血栓生成时间反而显著缩短为 (6.58±0.17) min, 推测可能与高质量浓度下造成斑马鱼心包水肿等毒性现象有关。另外, 不同极性桂花种子萃取物、总环烯醚萜富集物的抗血栓活性评价正在进行中。

表 12 银桂种子提取物对斑马鱼血栓形成的影响

Table 12 Effect of extracts from OFL seeds on development of thrombus in zebra fish model

样品	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	血栓形成时间/min
对照	0	8.84±0.10
肝素钠	20 U·mL ⁻¹	13.88±0.31
银桂种子提取物	5	9.38±0.23
	10	8.96±0.18
	50	6.58±0.17*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

3 讨论

本实验采用超声、回流和微波 3 种方法考察桂花 4 大品种种子中 2 种特征性环烯醚萜苷类成分的提取工艺。结果显示, 桂花 4 大品种种子中主要化学成分和含量没有显著差异, 其中银桂品种种子中 Spe 和 G13 含量较高。最佳提取工艺为微波提取, 优选的工艺参数为提取时间 15 min、乙醇体积分数 55%、料液比 1:10。桂花品种分类一直是桂花研究的重点。不同品种群的桂花种子化学成分基本一致, 体现了种子作为生殖器官在遗传进化过程中的稳定性。有关桂花具体品种及性状差异有待于进一步从基因、RNA 序列角度分析。另外, 不同提取方法在微量成分上的差异, 则与不同的提取方法原理有关。

中药材中所含化学成分是其发挥药效作用的物质基础,而化学成分的种类及组合比例受种质资源、品种、生长环境、加工方式等多种因素影响^[23]。本文现阶段对桂花4大品种种子中2种量大的特征性环烯醚萜苷类成分进行了定性定量分析。对于桂花种子中其他环烯醚萜苷类成分及微量成分的定性研究需要进一步进行LC/MSⁿ定性分析,以便从整体上了解桂花种子的化学组成。此外,对于桂花种子的传统治疗心痹的活性评价,一方面除了构建不同的药理模型进行筛选;另一方面也需要制备不同类型的物质组分群或者采用量大的单体成分进行活性研究,为系统阐明其传统药用的物质基础提供更多信息。

参考文献

- [1] 赵宏波,郝日明,胡绍庆. 中国野生桂花的地理分布和种群特征 [J]. 园艺学报, 2015, 42(9): 1760-1770.
- [2] 臧德奎,向其柏. 中国桂花品种分类研究 [J]. 中国园林, 2004, 20(11): 40-49.
- [3] 臧德奎,向其柏,刘玉莲,等. 中国桂花的研究历史、现状与桂花品种国际登录 [J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 49-53.
- [4] 伊艳杰,黄莹,尚富德. 利用RAPD研究桂林桂花品种间的亲缘关系 [J]. 广西植物, 2005, 25(2): 129-133.
- [5] 李瑜,王萍,耿兴敏,等. ⁶⁰Co- γ 辐射对桂花幼苗生长及生理指标的影响 [J]. 西北农业学报, 2017, 26(1): 61-69.
- [6] 陈洪国. 氮磷钾肥处理对桂花生长、花量及光合作用的影响 [J]. 园艺学报, 2009, 36(6): 843-848.
- [7] Wang L M, Li M T, Jin W W, et al. Variations in the components of *Osmanthus fragrans* Lour. essential oil at different stages of flowering [J]. *Food Chem*, 2009, 114(1): 233-236.
- [8] Hu B F, Guo X L, Xiao P, et al. Chemical composition comparison of the essential oil from four groups of *Osmanthus fragrans* Lour. flowers [J]. *J Essent Oil Bear Pl*, 2012, 15(5): 832-838.
- [9] Yu J, Lou Q, Zheng X, et al. Sequential combination of microwave-and ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from *Osmanthus fragrans* Lour. flowers [J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2216-2231.
- [10] Tang W, Zhao Y. Evaluation of fatty acid profiles of four kinds of *Osmanthus fragrans*, seeds by combined smash tissue extraction and GC/MS analysis [J]. *Eur J Integr Med*, 2014, 6(6): 724-724.
- [11] Wang H, Pan Y, Tang X, et al. Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans*' seeds [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2006, 39(5): 496-502.
- [12] Pan Y M, Zhu Z R, Huang Z L, et al. Characterisation and free radical scavenging activities of novel red pigment from *Osmanthus fragrans*' seeds [J]. *Food Chem*, 2009, 112(4): 909-913.
- [13] 尹伟,刘金旗,张国升. 桂花果实的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4329-4334.
- [14] 李佳川,赵兴冉,程雪瑶,等. 桂花子的抗炎镇痛作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2013(3): 123-124.
- [15] 唐伟卓,赵余庆. 木犀属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 590-602.
- [16] 郭建华,田成旺,刘晓,等. 中药环烯醚萜类化合物研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(4): 293-297.
- [17] Ma S C, He Z D, Deng X L, et al. In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum* as antiviral agents [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 33(19): 1471-1473.
- [18] He Y M, Zhu S, Ge Y W, et al. Secoiridoid glycosides from the root of *Gentiana crassicaulis* with inhibitory effects against LPS-induced NO and IL-6 production in RAW264 macrophages [J]. *J Nat Med*, 2015, 69(3): 366-374.
- [19] Pérez J A, Hernández J M, Trujillo J M, et al. Iridoids and secoiridoids from Oleaceae [J]. *Nat Prod Chem*, 2005, 32(5): 303-363.
- [20] 董天骄,崔元璐,田俊生,等. 天然环烯醚萜类化合物研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 185-194.
- [21] Tang W, Cao J, Zhang X, et al. *Osmanthus fragrans* seeds, a source of secoiridoid glucosides and its antioxidizing and novel platelet-aggregation inhibiting function [J]. *J Funct Foods*, 2015, 14(4): 337-344.
- [22] 韩宵,朱磊,闫春风,等. 多指标综合加权评分法优选人参醇提工艺 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(1): 110-113.
- [23] 李震宇,段亚辉,秦雪梅,等. 中药质量差异性研究的思考 [J]. 药学学报, 2017, 52(12): 1820-1826.