

曼陀罗和毛曼陀罗花的最佳采收期评价

李瑞明¹, 王振月^{2*}, 王谦博³, 王 博³

1. 山东鲁抗辰欣药业有限公司, 山东 济宁 272031

2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

3. 黑龙江省药品检验所, 黑龙江 哈尔滨 150001

摘要: **目的** 探索评价曼陀罗和毛曼陀罗花的最佳采收期的方法。**方法** 将两种曼陀罗花的生长发育过程进行量化, 与 Logistic 生长曲线方程拟合, 建立数学模型, 运用有序聚类分析法将其生长过程划分不同采收期, 以活性成分为指标, 对两者最佳采收期进行界定。**结果** 两种曼陀罗花的生长过程与 Logistic 生长曲线方程拟合良好, 有序聚类分析后将其花的生长发育过程划分为 5 个阶段, 依此确定的最佳采收期与以往研究中药材最佳采收期方法不同。**结论** 该研究中药材最佳采收期的方法值得进一步研究并推广。

关键词: 曼陀罗; 毛曼陀罗; 最佳采收期; Logistic 生长曲线; 聚类分析

中图分类号: R282.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)02-0096-005

Evaluation of the best harvest period of both *Datura stramonium* and *Datura innoxia*

LI Rui-ming¹, WANG Zhen-yue², WANG Qian-bo³, WANG Bo²

1. Lukang Cisen Pharmaceutic Co., Ltd. of Shandong Province, Jining 272031, China

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

3. Heilongjiang Province Institute for Drug Control, Harbin 150001, China

Abstract: Objective To establish the new method for evaluating the best harvest period of *Datura stramonium* and *Datura innoxia* flowers. **Methods** The growth processes of *D. stramonium* and *D. innoxia* flowers were quantified and fit with Logistic growth curve equation, so as to set up a mathematical model, then using cluster analysis method to divide the orderly growth process into different collection periods. The active ingredient was used as the index of the two to optimize the best harvest period. **Results** The growth of *D. stramonium* and *D. innoxia* flowers and Logistic growth curves fit well. After cluster analysis, orderly growth and development of the flowers were divided into five stages so that the differences between the present best harvest period and the best harvest period of the traditional Chinese medicinal materials (TCMM) in the past years were observed and optimized. **Conclusion** The available way to study the harvest period for TCMM is worthy to be further studied and promoted.

Key words: *Datura stramonium* L.; *Datura innoxia* Mill.; best harvest period; Logistic growth curves; cluster analysis

曼陀罗 *Datura stramonium* L. 及毛曼陀罗 *D. innoxia* Mill. 均为茄科曼陀罗属植物。现代医学和临床研究发现, 其具有多种生物活性, 可广泛应用于医学、农林业中^[1], 其应用的广泛性吸引了众多国内外研究者。由于其药理作用特殊, 临床应用广泛, 加之对生长环境要求低, 在各地均有栽培^[2]。天然草药的采收时期是影响药物品质的重要因素之一, 笔者参考农业及林业中研究动植物生长过程的方法, 就如何确定两者花的最佳采收期进行了探索, 为中药材最佳采收期的界定提供了一条新的

思路。

1 仪器、试剂与试剂

1.1 仪器

美国 Waters 高效液相色谱仪 (Waters 2695 型泵、2996 型二极管阵列检测器、Empower 色谱工作站), 色谱柱 Inertsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Dikma 微孔滤膜 (0.45 μm), 瑞士 Mettler AE240 电子天平, ZK—82B 型真空干燥箱 (上海市实验仪器总厂), UV—1601PC 紫外可见分光光度计 (日本岛津公司)。

收稿日期: 2010-12-25

作者简介: 李瑞明, 男, 硕士, 从事生药学研究。Email: cisen_yfb@126.com

*通讯作者 王振月 E-mail: wangzhen_yue@163.com。

1.2 试药

药材采自黑龙江中医药大学药用植物园, 由黑龙江中医药大学中药资源教研室王振月教授鉴定为曼陀罗 *D. stramonium* L. 及毛曼陀罗 *D. innoxia* Mill. 山柰酚 (上海标准物质研究中心, 批号 08040602), 氢溴酸东莨菪碱 (上海标准物质研究中心, 批号 071108)。

1.3 试剂

色谱甲醇 (美国 Dikma 公司)、乙醇 (哈尔滨市新达化工厂, 批号 081023)、乙醚 (天津市富宇精细化工有限公司, 批号 20080904)、浓氨 (汕头市西陇化工厂, 批号 0709261)、硫酸 (哈尔滨理工化学试剂有限公司, 批号 20040926)、氯仿 (天津市化学试剂一厂, 批号 080916)、磷酸 (天津市耀华化学试剂有限责任公司, 批号 20090302)、醋酸钠 (哈尔滨市新春化工厂, 批号 485544)、三乙胺 (天津市博迪化工有限公司, 批号 20080805)、冰醋酸 (天津市耀华化学试剂有限公司, 批号 20080227) 均为分析纯, 蒸馏水。

2 方法

2.1 实验方法

在花蕾出现到凋谢整个过程中, 对花的性状特征 (包括长度、颜色等) 进行描述, 整理获得数据。以花的生长天数为横坐标, 花的长度为纵坐标绘制生长曲线, 描述其整个生长过程。在其生长曲线呈良好的“S”形基础上将其生长过程与 Logistic 生长曲线方程进行拟合, 将复杂的问题转化为数学问题。然后运用有序聚类分析统计学方法对其生长过程进行划分, 整理每个时期花的性状特征, 建立每个时期的采收标准。以已建立的采收标准进行采样, 参考文献方法提取活性成分^[3-4], 运用紫外可见分光光度法和高效液相色谱法对生物活性成分进行分析, 从而界定最佳采收期。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 黄酮类成分供试品溶液的制备 精密称取不同采收期 2 种曼陀罗花样品粉末各 1.5 g, 以 70%乙醇提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 于 60 °C 水浴蒸干, 甲醇溶解, 滤过并转至 10 mL 量瓶中, 甲醇定容后, 再稀释 250 倍作为供试品溶液, HPLC 测定前过 0.45 μm 微孔滤膜。

2.2.2 生物碱类成分供试品溶液的制备 精密称取曼陀罗花不同采收期生药粉末 1.5 g, 加乙醇-浓氨-乙醚 (5:4:10) 几滴, 润湿样品, 静置过夜, 加

乙醚 70 mL, 索氏提取 3 h, 提取液于 60 °C 水浴蒸干, 以 0.25 mol/L H₂SO₄ 溶液 25 mL 溶解, 用氯仿萃取 3 次 (10、5、5 mL), 合并氯仿萃取液, 加 0.05 mol/L H₂SO₄ 萃取 2 次 (每次 10 mL), 合并 2 次酸液, 向酸液中加浓氨试液至中和后再多加 2 mL, 用氯仿迅速振摇提取 3 次 (20、15、15 mL) 至生物碱提尽, 合并氯仿层于 60 °C 水浴蒸干, 得残渣。将残渣转至 10 mL 量瓶中并用甲醇定容, 取 5 mL 于蒸发皿中水浴蒸干, 用 5 mL 氯仿溶解, 加酸性染料, 反复萃取 3 次, 合并氯仿液于 5 mL 量瓶中并定容, 即得 UV 分析用样品溶液, HPLC 分析时不加酸性染料处理, 并过 0.45 μm 微孔滤膜。

2.3 对照品溶液的制备

以甲醇为溶剂, 制备 0.11 mg/mL 山柰酚的溶液及 0.16 mg/mL 氢溴酸东莨菪碱的溶液作对照品溶液, HPLC 检测前过 0.45 μm 微孔滤膜。

2.4 生物活性成分检测条件的选择

2.4.1 UV 检测条件的选择 总黄酮定量测定条件的选择: 精密量取山柰酚对照溶液 5 mL, 以甲醇为空白对照, 用紫外可见分光光度计进行全波长扫描。结果在 365 nm 波长处有最大吸收。

总生物碱定量测定条件的选择: 氢溴酸东莨菪碱对照品溶液按“2.3”项制备。另直接精密量取溴麝香草酚蓝溶液 5 mL, 用氯仿萃取 3 次, 合并氯仿液并定容至 5 mL 做空白对照溶液。用紫外可见分光光度计进行全波长扫描。结果最大吸收波长在 417 nm 处。

2.4.2 HPLC 检测条件 山柰酚 HPLC 检测条件的选择: 流动相为甲醇-0.4%磷酸 (55:45); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温室温; 检测波长 368 nm。

氢溴酸东莨菪碱 HPLC 检测条件的选择: 流动相为甲醇-水 (40:60, 水中含 0.02 mol/L 醋酸钠溶液、0.02%三乙胺, 用醋酸调 pH 值 6.0); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温室温; 检测波长 215 nm。

2.5 标准曲线的制备

2.5.1 UV 法测总黄酮标准曲线的制备 精密量取山柰酚对照品溶液 0、1.0、2.0、4.0、6.0、9.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 以甲醇溶液为空白, 在波长 265 nm 处测定吸光度; 其回归方程为 $Y = 11.849\ 9X + 0.008\ 7$, $r = 0.999\ 6$, 山柰酚在 0~0.099 0 mg 线性关系良好。

2.5.2 UV 法测总生物碱标准曲线的制备 精密量取氢溴酸东莨菪碱对照品溶液 0、1.0、2.0、4.0、6.0、

8.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 各取 5 mL, 挥去甲醇, 用 5 mL 溴麝香草酚蓝溶液溶解并充分反应, 用氯仿萃取 3 次, 每次 5 mL, 合并 3 次氯仿萃取液, 挥去多余氯仿定容至 5 mL, 精密量取 5.0 mL 甲醇, 染料处理后所得溶液为空白溶液, 在 417 nm 波长处测定吸光度; 其回归方程为 $Y=0.6785X+0.0081$, $r=0.9994$, 氢溴酸东莨菪碱在 0~1.600 mg 线性关系良好。

2.5.3 HPLC 测定山柰酚标准曲线的制备 设置山柰酚对照品溶液进样体积分别为 2、4、8、12、16、20 μL , 按照“2.4.2”项山柰酚 HPLC 检测条件测定, 以峰面积 (A) 对山柰酚质量 (X) 进行线性回归计算, 其回归方程为 $A=4221376.476X-11872.673$, $r=0.9992$, 该方法在 0.070~0.688 μg 有良好的线性关系。

2.5.4 HPLC 测定氢溴酸东莨菪碱标准曲线的制备 设置氢溴酸东莨菪碱对照品溶液进样体积分别为 2、4、8、12、16、20 μL , 按照“2.4.2”项氢溴酸东莨菪碱 HPLC 检测条件测定, 以峰面积 (A) 对氢溴酸东莨菪碱质量 (X) 进行线性回归计算, 其回归方程为 $A=8414352.258X+3278$, $r=0.9988$, 该方法在 0.008~0.088 μg 有良好的线性关系。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 精密制取含对照品一定量的各对照品溶液, 按照“2.4”项下条件分析, 4 种方法均重复进样 6 次, 其 RSD 值分别为 0.2%、0.3%、0.4%、0.4%, 表明 4 种方法精密度均良好。

2.6.2 稳定性试验 精密量取曼陀罗标记为 NO.4 的样品溶液, 按“2.4”项下条件分析, 分别于 0、1、2、4、6、8、10、12 h 对 4 种方法进行稳定性试验, 其 RSD 值分别为 0.3%、0.3%、0.8%、1.0%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.6.3 重现性试验 精密称取曼陀罗标记为 NO.4 样品 5 份, 每份 1.5 g, 按“2.4”项下条件检测, 对 4 种方法进行重现性试验, 其 RSD 值分别为 0.3%、0.8%、1.0%、0.6%, 表明 4 种方法重现性均较好。

2.6.4 加样回收率试验 精密称取已知质量分数的曼陀罗标记为 NO.4 样品粉末, 分别加入一定量的山柰酚或氢溴酸东莨菪碱对照品, 按“2.4”项下制备供试品溶液, 测定并计算加样回收率。4 种方法所测平均回收率分别为 100.2%、99.6%、101.1%、100.6%, RSD 值分别为 1.9%、1.3%、1.0%、

1.0%。

3 结果与分析

3.1 采收期拟定

在进行采收期拟定时, 首先对其花的生长过程进行长度测量并进行性状观察, 结果见表 1~4。其次, 进行花的生长曲线描述, 结果见图 1、2。然后计算 Logistic 生长曲线相关参数, 拟合并进行有序聚类分析, 结果拟合度良好, 至此将采收期拟定为 5 个时期。

表 1 曼陀罗花生长过程

Table 1 Growth process of *D. stramonium* flower

天次	花长 (y) / cm	$\frac{15.372-y}{y}$	$y' = \ln\left(\frac{15.372-y}{y}\right)$
1	0.11	138.748	4.933
2	0.29	52.008	3.951
3	0.41	36.493	3.597
4	0.62	23.794	3.169
5	0.79	18.459	2.916
6	0.89	16.272	2.790
7	1.19	11.918	2.478
8	1.50	9.248	2.224
9	1.72	7.937	2.072
10	2.10	6.320	1.844
11	2.63	4.845	1.578
12	4.81	2.196	0.787
13	8.12	0.893	-0.113
14	9.02	0.704	-0.351
15	9.51	0.616	-0.385

表 2 曼陀罗花采收标准

Table 2 Standards of *D. stramonium* flower harvesting

采收期	采收标准
NO.1	未开放的花蕾, 花萼完全包裹花冠, 花总长 2.5~4.5 cm
NO.2	即将开放尚未开放的花蕾末期, 花萼约占花总长的 4/5, 花总长 4.0~5.2 cm
NO.3	花完全开放, 光泽鲜艳, 花萼约占花总长的 1/2, 花总长 5.0~6.5 cm
NO.4	花完全开放, 光泽稍差, 花萼占花总长约 1/3, 花总长 8.0~9.5 cm
NO.5	花萎蔫, 无光泽, 花萼占花总长约 1/3, 花总长 8.0~9.5 cm

表3 毛曼陀罗花生长过程

Table 3 Growth process of *D. innoxia* flower

天次	花长 (y)/cm	$\frac{29.005-y}{y}$	$y' = \ln\left(\frac{29.0051-y}{y}\right)$
1	0.14	206.179	5.329
2	0.29	99.018	4.595
3	0.35	81.872	4.405
4	0.42	68.060	4.220
5	0.50	57.010	4.043
6	0.60	47.342	3.857
7	0.81	34.809	3.550
8	1.20	23.171	3.143
9	1.61	17.016	2.834
10	2.02	13.359	2.592
11	2.61	10.113	2.314
12	3.39	7.556	2.022
13	4.18	5.939	1.782
14	5.21	4.567	1.519
15	6.41	3.525	1.260
16	7.80	2.719	1.000
17	9.02	2.216	0.796
18	10.2	1.844	0.612
19	13.5	1.148	0.138
20	16.7	0.737	-0.305
21	20.0	0.450	-0.798
22	21.0	0.381	-0.964
23	22.0	0.318	-1.144

表4 毛曼陀罗花采收标准

Table 4 Standards of *D. innoxia* flower harvesting

采收期	采收标准
NO.1	未开放的花蕾，花萼完全包裹花冠，花总长 4.5~5.5 cm
NO.2	即将开放尚未开放的花蕾末期，花萼约占花总长的 4/5，花总长 6.0~8.0 cm
NO.3	花完全开放，光泽鲜艳，花萼约占花总长稍大于 1/2，花总长 8.5~10.5 cm
NO.4	花完全开放，光泽稍差，花萼占花总长约 1/3，花总长 14.5~16 cm
NO.5	花萎蔫，无光泽，花萼占花总长约 1/3，花总长 14.5~16 cm

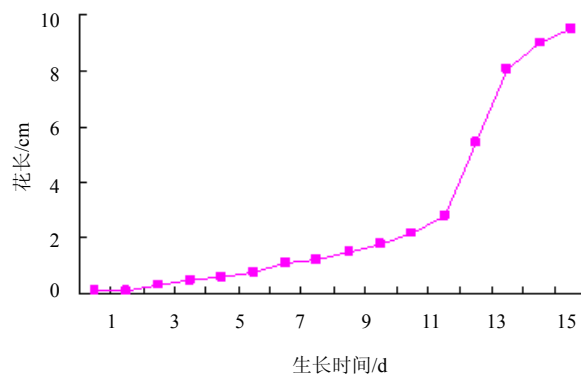


图1 曼陀罗花生长曲线图

Fig. 1 Growth curve of *D. stramonium*

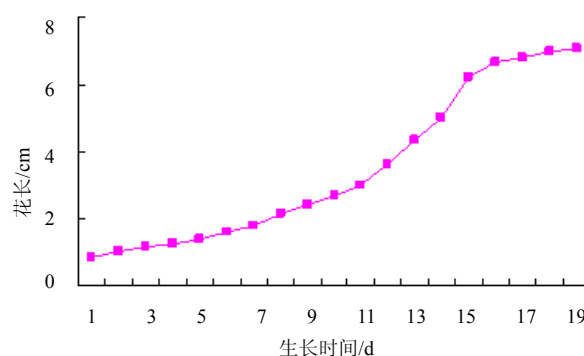


图2 毛曼陀罗花生长曲线图

Fig. 2 Growth curve of *D. innoxia* flower

取等距 x 的生长量 $y_1=0.11$, $y_2=1.50$ 和 $y_3=9.51$ 则:

$$k = \frac{y_2^2(y_2 + y_3) - 2y_1y_2y_3}{y_2^2 - y_1y_3}$$

将 $y_1=0.11$, $y_2=1.50$ 和 $y_3=9.51$ 带入上式求得 $k=15.372$ cm。

根据上表求出 x 、 y' 的平均值 $\bar{x}$ 、 $\bar{y}'$ ，计算出 x 和 y' 回归分析的二级数据： $SSx = \sum(x - \bar{x})^2$ ， $SSy' = \sum(y' - \bar{y}')^2$ ， $SPxy' = \sum(x - \bar{x})(y' - \bar{y}')$

建立曼陀罗花 Logistic 曲线方程:

$$\hat{y} = \frac{15.372}{1 + 3.746e^{0.733x}}$$

建立毛曼陀罗花 Logistic 曲线方程:

$$\hat{y} = \frac{29.005}{1 + 1.176e^{2.264x}}$$

根据以上拟合的曲线方程，对其进行有序聚类

分析, 将 2 种曼陀罗花的生长期划分为生长初期、快速生长期前期、快速生长期、快速生长期后期及生长末期。拟定的 5 个采收期依次标记为 NO.1、NO.2、NO.3、NO.4 及 NO.5。

3.2 指标性成分定量测定结果与分析

见表 5、6。当以黄酮类成分发挥临床作用时，

其最佳采收期宜掌握在快速生长期后期（NO.4）；以生物碱类成分发挥临床作用时，最佳采收期宜掌握在快速生长期后期或生长末期（NO.4 或 NO.5）。分析表 6，无论以黄酮类成分还是以生物碱类成分发挥临床疗效，均以快速生长期后期（NO.4）为最佳采收期。

表 5 曼陀罗花测定结果
Table 5 Determination of *D. stramonium* flower

项 目	质量分数/%				
	NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5
总黄酮	10.370	10.623	12.466	9.217	8.499
总生物碱	0.798	0.808	0.650	0.611	0.474
山柰酚	0.012	0.018	0.064	0.052	0.049
东莨菪碱	0.045	0.074	0.067	0.134	0.123

表 6 毛曼陀罗花测定结果
Table 6 Determination of *D. innoxia* flower

项 目	质量分数/%				
	NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5
总黄酮	8.781	8.935	9.613	9.850	7.712
总生物碱	0.405	0.434	0.365	0.640	0.365
山柰酚	0.036	0.037	0.086	0.071	0.066
东莨菪碱	0.026	0.062	0.062	0.082	0.072

4 讨论

文献在研究中药材最佳采收期时，多依据物候期等进行采收期划分^[5]并评价。而本实验首先建立 2 种曼陀罗花的生长量与生长时间之间的曲线关系，进而对其生长规律进行 Logistic 生长曲线拟合，构建数学模型，运用有序聚类分析统计学方法将采收期拟定为 5 个，最后对每个采收期样品进行分析，以有效成分的量指标进行最佳采收期评价，与以往研究最佳采收期的方法相比，整个研究思路是其独特之处，该研究思路值得进一步验证并发展。

参考文献

[1] 张宏利, 杨学军, 刘文国, 等. 曼陀罗化学成分与生物活性研究现状及展望 [J]. 西北林学院学报, 2004, 19(2): 98-102.

[2] 娄凤菊, 连立峰, 周玉秋, 等. 曼陀罗的栽培技术及应用 [J]. 特种经济动植物, 2004, 5: 30.

[3] 努尔阿米娜·阿尤普, 阿不都拉·阿巴斯. 曼陀罗种子中总黄酮含量测定及提取工艺的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(3): 260-263.

[4] 曾常青, 罗北亮. 酸性染料比色法测定钩藤的总生物碱含量 [J]. 中药材, 2007, 30(8): 1021-1024.

[5] 金 斌, 金蓉鸾, 何宏贤, 等. 高效液相色谱法测定洋金花不同采收时期东莨菪碱和阿托品的含量 [J]. 药物分析杂志, 1994, 14(6): 20-22.