

子,而包括 POD 在内的氧化还原酶类参与细胞信号转导过程中的信号级联放大过程<sup>[8,9]</sup>,因此可以推测 POD 在 MJ 的信号转导中起很大作用。如前所述, MJ 加入后并未显著诱导细胞 SOD 的活性而在 MJ 作用下胞内必然会产生大量活性氧自由基,所以 SOD 必须借助胞内其他物质共同完成清除自由基的任务。在这种协同作用下,胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的积累可以提前达到诱导 POD 活性的浓度水平,从而造成了 POD 活性峰的提前出现。在培养的第 13 天,实验组 CAT 活性水平受到显著抑制而 POD 同样可以完成 CAT 消除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损害的功能,因此出现了第 2 个 POD 活性峰,即 CAT 与 POD 的功能互补性是导致 POD 多产生一个活性峰的原因。此外,有文献报道 POD 活性的增高在一定程度上表征了细胞次生代谢水平的增强,有利于抗毒素的合成,因此 MJ 的加入也刺激了细胞的次生代谢活动。

CAT 是清除活性氧的关键酶,是维持活性氧代谢平衡的重要因素。MJ 加入后细胞产生了防御应答反应,产生的过多活性氧自由基需要包括 CAT 在内的自由基清除酶类加以消除,因此 MJ 对 CAT 首先表现出较强的诱导作用;而随后 CAT 酶活的急剧下降是同时期 POD 酶活的高水平所导致的,即 CAT 与 POD 功能上的互补性抑制了 CAT 的活性水平。除此之外,还有多种因素都能够对 CAT 活性产生影响,因此有关 MJ 作用下细胞 CAT 活性的变化规律需要更加深入的研究。

综上所述,外源加入 MJ 能够诱导南方红豆杉细胞 SOD 的活性;对 POD 活性的诱导作用极为显著(约为对照组的 10 倍),且 POD 活性在培养第 10

天达到峰值;CAT 活性先升高后降低,即外源 MJ 在表现出较强的诱导作用之后又抑制了 CAT 的酶活水平。MJ 作用下细胞产生了防御应答反应,次生代谢水平增强,POD 在 MJ 的信号转导中贡献最大。MJ 通过影响细胞 SOD、POD 和 CAT 的活性改变胞内氧自由基分布状况,进而影响细胞的氧代谢及其他生理代谢活动。

#### 参考文献:

- [1] Ketchum R E B, Gibson D M, Croteau R B, *et al.* The kinetics of taxol accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 62: 97-105.
- [2] Mirjalili N, Linden J C. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models[J]. *Biotechnol Prog*, 1996, 12: 110-118.
- [3] Furmanowa M, glowniak K, Sykowska-Baranek K, *et al.* Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus media* var. *hatsfieldii* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1997, 49: 75-79.
- [4] 苗志奇, 未作君, 元英进. 甲基茉莉酮酸诱导下紫杉醇合成途径中拟稳态转移模式及其作用位点的研究[J]. *生物物理学报*, 2000, 16(2): 204-211.
- [5] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [6] Creelman R A, Mellut J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plant[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 355-381.
- [7] Choi D, Bostock R M, Avdiushko S, *et al.* Lipid-derived signals that discriminate wound and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 96: 2329-2333.
- [8] Doke N, Chai H B. Activation of superoxide generation and enhancement of resistance against compatible races of *Phytophthora infestans* in potato plants treated with digitonin[J]. *Physiol Plant Pathol*, 1985, 27: 323-334.
- [9] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 251-275.

## 杭白菊总黄酮的提取工艺及其含量的动态变化研究

杨 俊, 蒋惠娣\*, 徐娟华\*

(浙江大学药学院, 浙江 杭州 310006)

**摘要:** 目的 确定杭白菊总黄酮的最佳提取工艺,并考察总黄酮含量随杭白菊不同采摘时间的动态变化。方法 采用正交试验法,考察提取温度、提取时间、乙醇浓度及提取次数对提取液中总黄酮含量的影响,确定最佳提取条件,然后在该条件下对同一种植区域,不同时间采摘的杭白菊进行总黄酮提取并进行含量测定。结果 在所考察的因素中,对杭白菊黄酮提取影响程度为:乙醇浓度>提取温度、提取次数>提取时间,不同时间采摘的杭白菊,其总黄酮含量未见明显变化。结论 杭白菊黄酮最佳提取条件为:75%乙醇,100℃水浴回流提取 3 次,每次 1.5 h;杭白菊总黄酮含量与采摘时间无关。

\* 收稿日期: 2002-01-14

基金项目: 浙江省教育厅资助项目(G20062); 浙江省桐乡市科委资助项目(H20000792)

\* 通讯作者 E-mail: Hdjiang@zju.edu.cn

关键词: 杭白菊; 总黄酮; 正交试验; 动态变化

中图分类号: R 284. 2; R 286. 02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)11-0988-03

# Study on extraction technics and variety trends of flavonoids in *Chrysanthemum morifolium*

YANG Jun, JIANG Hui-di, XU Juan-hua

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

**Abstract:** **Object** To optimize the extraction conditions for flavonoids from *Chrysanthemum morifolium* Ramat., and observe the variety trends of flavonoids during collection time. **Methods** Optimized conditions (bath temperature, extraction hours, ethanol concentration and extraction times) were determined by the orthogonal test. The flavonoids in *C. morifolium* collected at different time were measured under the optimized extraction conditions. **Results** The order of factors to affect the flavonoid extraction was ethanol concentration > bath temperature, extraction times > extraction hours. No significant difference of flavonoids content was observed among the different collecting time of *C. morifolium*. **Conclusion** The optimum extraction conditions were 75% ethanol, reflux for 1.5 h at 100 °C water bath for three times. The flavonoids would not be bound up with the harvest time.

**Key words:** *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; flavonoids; orthogonal test; variety trends

杭白菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 产于浙江桐乡、海宁、嘉兴等地,为“浙八味”之一,具有清热散风、平肝明目等功能。杭白菊含橙皮素、芹菜素、木犀草素、刺槐素等多种黄酮类化合物<sup>[1,2]</sup>。现代药理研究证明:菊花黄酮具有抗氧化<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗艾滋病<sup>[5]</sup>等作用,杭白菊还具有显著的心血管病治疗作用<sup>[6,7]</sup>。本实验近期研究表明:杭白菊的心血管病治疗作用与其所含黄酮密切相关。根据观察,不同时间采摘的杭白菊在外观上存在较大的差异,杭白菊的市场价格也因此受到很大影响。本研究采用正交试验法考察乙醇浓度、提取温度、提取次数、提取时间对杭白菊总黄酮提取效果的影响,以确定其最佳提取条件;继而观察不同采摘期杭白菊总黄酮含量的动态变化,从而为合理开发利用杭白菊资源提供科学依据。

## 1 材料与仪器

杭白菊产自浙江桐乡,11月采摘于同一种植区域,蒸制(严格控制蒸制条件);芦丁对照品由中国药品生物制品检定所提供,其余试剂均为国产分析纯;Shimadzu UV-160A 型分光光度计。

## 2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备:精密称取干燥至恒重的无水芦丁 50 mg 置 25 mL 容量瓶中,加乙醇适量使之溶解,用乙醇稀释至刻度,摇匀,即得芦丁对照液贮备液。精密量取贮备液 5 mL 于 50 mL 容量瓶中,用乙醇稀释至刻度,摇匀,即得 0.20 mg/mL 对照品溶液。

2.2 标准曲线制备:取 0.20 mg/mL 对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9 mL, 分别置 25 mL 容量瓶中,加 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 摇匀,放置 6 min,加 10% 硝酸

铝溶液 1.0 mL, 摇匀,放置 6 min,加 4% 氢氧化钠 10.0 mL, 用水稀释至刻度,摇匀,放置 10 min 后于 512 nm 处测吸光度。以浓度为纵坐标,吸光度值为横坐标进行线性回归,得方程:  $C = 2.4615A + 0.0095$ ,  $r = 0.9999$ 。线性范围: 0.2 ~ 1.8 mg/mL。

2.3 样品提取与测定:称取杭白菊粗粉 5.000 g, 按表 1 条件,采用不同浓度的 12 倍量乙醇在水浴中回流提取数次,合并提取液,过滤,定容于 250 mL 容量瓶中。量取约 5 mL 于离心管中,离心 3 000 r/min, 10 min。取上清液 1.00 mL 按 2.2 项下方法处理,测定吸光度值,代入方程,计算总黄酮含量。

表 1 因素水平表

| 水平 | 因 素        |           |           |           |
|----|------------|-----------|-----------|-----------|
|    | A 提取温度(°C) | B 提取时间(h) | C 提取次数(次) | D 乙醇浓度(%) |
| 1  | 25         | 0.5       | 1         | 25        |
| 2  | 50         | 1.0       | 2         | 50        |
| 3  | 75         | 1.5       | 3         | 75        |
| 4  | 100        | 2.0       | 4         | 95        |

2.4 正交试验设计及结果:按  $L_{16}(4^5)$  正交表对杭白菊进行提取并测定,结果见表 2。由表 2 可见,乙醇浓度(D)对总黄酮提取影响最大,提取温度(A)、提取次数(C)次之,提取时间(B)影响最小。最优水平组合为  $A_4B_3C_3D_3$  即溶剂为 75% 乙醇,100 °C 水浴,回流提取 3 次,每次 1.5 h。

2.5 正交试验结果分析:按方差分析理论得方差分析结果见表 3。

由表 3 可见乙醇浓度对总黄酮提取有显著影响,而提取温度、提取次数、提取时间无显著影响。

2.6 提取工艺的细微调节:根据正交试验的结果,将最佳条件中的提取时间、提取次数固定,利用黄金

分割律优选其他两项的水平,按 2.3 项下方法测得吸光度值,代入方程,计算总黄酮含量(表 4)。

表 2 正交设计及试验结果

| 试验号 | A     | B     | C     | D     | E(误差) | 总黄酮含量(%) |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| 1   | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 5.00     |
| 2   | 1     | 2     | 2     | 2     | 2     | 6.12     |
| 3   | 1     | 3     | 3     | 3     | 3     | 6.68     |
| 4   | 1     | 4     | 4     | 4     | 4     | 2.58     |
| 5   | 2     | 1     | 2     | 3     | 4     | 7.05     |
| 6   | 2     | 2     | 1     | 4     | 3     | 2.37     |
| 7   | 2     | 3     | 4     | 1     | 2     | 6.48     |
| 8   | 2     | 4     | 3     | 2     | 1     | 7.48     |
| 9   | 3     | 1     | 3     | 4     | 2     | 4.53     |
| 10  | 3     | 2     | 4     | 3     | 1     | 7.60     |
| 11  | 3     | 3     | 1     | 2     | 4     | 6.35     |
| 12  | 3     | 4     | 2     | 1     | 3     | 6.55     |
| 13  | 4     | 1     | 4     | 2     | 3     | 7.14     |
| 14  | 4     | 2     | 3     | 1     | 4     | 6.73     |
| 15  | 4     | 3     | 2     | 4     | 1     | 4.97     |
| 16  | 4     | 4     | 1     | 3     | 2     | 6.92     |
|     | 20.38 | 23.72 | 20.64 | 24.76 | 25.05 |          |
|     | 23.38 | 22.82 | 24.69 | 27.09 | 24.05 |          |
|     | 25.03 | 24.48 | 25.42 | 28.25 | 22.74 |          |
|     | 25.76 | 23.53 | 23.80 | 14.45 | 22.71 |          |
| R   | 1.34  | 0.42  | 1.20  | 3.45  | 0.58  |          |

表 3 方差分析结果

| 方差来源  | 离均差平方和   | 自由度 | 均方      | F 值   | P 值    |
|-------|----------|-----|---------|-------|--------|
| A     | 4.280 4  | 3   | 1.426 8 | 4.47  |        |
| B     | 0.349 1  | 3   | 0.116 4 | 0.36  |        |
| C     | 3.324 1  | 3   | 1.108 0 | 3.47  |        |
| D     | 29.716 2 | 3   | 9.905 4 | 31.03 | < 0.01 |
| E(误差) | 0.957 8  | 3   | 0.319 3 |       |        |

$F_{0.05}(3,3)=9.28$   $F_{0.01}(3,3)=29.5$

表 4 提取工艺的细微调节黄酮含量测定结果(%)

| 水浴温度( ) | 65%乙醇 | 75%乙醇 | 87%乙醇 |
|---------|-------|-------|-------|
| 75      | 7.31  | 7.40  | 7.20  |
| 84      | 7.32  | 7.68  | 7.60  |
| 90      | 7.63  | 7.78  | 7.41  |
| 100     | 7.74  | 8.07  | 7.70  |

从表 4 可见乙醇浓度、温度的变化对黄酮提取效率的影响,其中以 75%乙醇浓度、100 水浴回流提取效果最佳。

2.7 不同时间采摘的杭白菊总黄酮含量测定:将不同日期采摘的杭白菊粉碎成粗粉,称取 5.000 g,以 75%乙醇为溶剂,100 水浴回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,过滤,定容于 250 mL 容量瓶中,测定其吸光度值,代入方程,计算总黄酮含量(表 5)。从表 5 可见,同一种植区域,不同时间采摘,随着采摘时间的推迟,杭白菊外观质量虽然下降,总黄酮含量反而有所上升,但未见明显变化。

表 5 杭白菊总黄酮含量随采摘日期的变化(n=4)(%)

| 采摘日期      | 总黄酮含量 | RSD  |
|-----------|-------|------|
| 11 月 2 日  | 7.53  | 2.03 |
| 11 月 7 日  | 7.89  | 2.20 |
| 11 月 12 日 | 8.10  | 1.96 |
| 11 月 18 日 | 8.14  | 1.45 |

3 讨论

3.1 以总黄酮含量为指标,杭白菊用乙醇提取有利于黄酮类化合物的溶出,提高溶剂乙醇的浓度及水浴温度,可加快杭白菊中总黄酮的溶解扩散速度,使溶出量增加。但溶剂乙醇浓度>75%,溶出量下降,可能是溶剂乙醇浓度增加,反而使植物细胞脱水、皱缩,不易于溶胀破裂及总黄酮的溶出。

3.2 结合正交设计与黄金分割律得出优选的最佳因素水平为 75%乙醇溶剂,100 水浴回流提取 3 次,每次 1.5 h。正交统计结果分析,提取时间因素的水平对总黄酮含量影响最小,从节能、经济考虑,不同样品的提取与测定中采用每次提取 1 h 为佳。

3.3 浙江桐乡为杭白菊之乡,其杭白菊产量占我国菊花总产量的 70%。传统上,杭白菊在 10 月底至 11 月分 3 次采摘,分头水花、二水花、三水花<sup>[8]</sup>,随着采摘日期的推迟,杭白菊的外观质量逐渐降低。由于目前杭白菊除 50%以原料出口外,其余大部分仍以饮品销售,其市场价值在很大程度上受到外观的影响。本研究显示在杭白菊的整个采摘期内,其总黄酮含量无明显变化,因此,可以将外观较好的头水花、二水花作为饮品销售,而价格低廉的三水花用于总黄酮的提取,使杭白菊资源得以充分利用。

参考文献:

[1] 胡立宏,陈仲良.杭白菊的化学成分研究:正戊基果糖甙的结构测定[J].植物学报,1997,39(1):85-90.  
[2] 胡立宏,陈仲良.杭白菊的化学成分研究:两个新三萜的结构测定[J].植物学报,1997,39(2):181-184.  
[3] 张尔贤,方黎,张捷,等.菊花提取物的抗氧化活性研究[J].食品科学,2000,21(7):6-9.  
[4] Wang H K, Xia Y, Yang Z Y, et al. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents[J]. Adv Exp Med Biol, 1998, 439: 191-225.  
[5] Hu C Q, Chen K, Shi Q, et al. Anti-AIDS agents, 10. A-cacetin-7-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids[J]. J Nat Prod, 1994, 57(1): 42-51.  
[6] 浙江医科大学生理学教研组.菊花制剂对冠脉作用的实验研究[J].浙江医科大学学报,1978,7(4):5-8.  
[7] 杨学运,孙孔富,奚毓妹,等.中药杭白菊酚性部分的药理作用探讨[J].浙江医科大学学报,1989,18(6):282.  
[8] 刘德军.药用动植物种养加工技术——菊花[M].北京:中国中医药出版社,2001.