

Cc 两居群聚在一起,这与 RAPD 分析中 Cb 居群和 Cc 居群遗传一致度最大且聚为一类相一致;所进行的巢式方差分析结果显示鳞茎秋水仙碱含量的变异有 89.24% 存在于居群内个体间,10.75% 存在于居群间。因此,在居群内个体间选育高含量单株,培养无性系品种,利用不同地理分布区高含量植株进行杂交育种,在 GAP 种植中具有现实的意义。

丽江山慈菇鳞茎秋水仙碱含量在居群内个体间和居群间的变异程度及其聚类分析,与其 RAPD 检测分析的结果有一定的相关性,丽江山慈菇鳞茎秋水仙碱含量可作为其遗传变异的一个重要性状,RAPD 分析结果可为遗传选育高含量单株、高含量居群以及杂交选育工作的开展提供分子层次的理论依据。

利用 DNA 片段多态性分子标记技术,开展丽江山慈菇居群遗传多样性和遗传结构的分析,可为丽江山慈菇的保护、引种驯化、遗传育种、繁育栽培和 GAP 种植提供理论依据。在构建丽江山慈菇 RAPD 指纹图谱的基础上,完善其 DNA 指纹图谱,

对制定丽江山慈菇保护策略和措施以及 GAP 种植标准,有着直接的指导意义。

References:

[1] Rama T V, Rao P N, Rao R S. Somatic chromosome morphology in the genus *Iphigenia* [J]. *Cytologia*, 1987, 52: 439-444.
 [2] Delectis Florae Reipublicae Populares Sinicae Aegendae Aca dem iae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1980.
 [3] Institutum Botanicum Kunmingense Aca dem iae Sinicae Edita. *Flora Yunnanica* (云南植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1997.
 [4] Dolye J J, Dolye J L. A Rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
 [5] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, diversity, barbarium, and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 69-76.
 [6] Hogbi P M, Peakall R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata* [J]. *Conserv Biol*, 1999, 13: 514-522.
 [7] Meng Z N, Zhang Z M, Jin X S, et al. Genetic diversity in small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis*) by RAPD analysis [J]. *Chin Biodiversity* (生物多样性), 2003, 11(3): 197-203.
 [8] He X J, Li B, Yu H. The population study of *Lilium nepalense* [J]. *J Yunnan Univ* (云南大学学报), 2003, 25: 78-83.
 [9] Gao H X. *Applied Statistical Method and SAS System* (实用统计方法与 SAS 系统) [M]. Beijing: Peking University Press, 2001.

柱色谱-紫外分光光度法测定广金钱草中总黄酮的含量

杨美华, 卢充伟, 匡岩巍*, 孙仲诒, 吴祖泽

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 建立广金钱草中总黄酮的含量测定方法。方法 选用测定波长 272 nm, 以 6-C-葡萄糖-8-C-木糖洋芹素 (vicenin-2) 为对照品, 采用柱色谱-紫外分光光度法对不同来源的广金钱草进行了总黄酮的含量测定。结果 vicenin-2 在 10.8~ 25.2 μg/mL 具有良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 0.0309X + 0.016$ ($r = 0.9999$), 平均回收率为 100.82%, RSD 为 1.30%。结论 该方法操作简便, 结果准确, 重复性好, 可用于广金钱草的质量控制。

关键词: 广金钱草; vicenin-2; 总黄酮; 含量测定; 柱色谱-紫外分光光度法

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)06-0688-03

Quantitative determination of total flavonoids in *Desmodium styracifolium* by column chromatogram-UV spectrophotometry

YANG Meihua, LU Yanwei, KUANG Yanwei, SUN Zhongyi, WU Zuzhe

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Key words: *Desmodium styracifolium* (O sbeck) Merr.; vicenin-2; total flavonoids; quantitative determination; column chromatogram-UV spectrophotometry

广金钱草为常用中药, 来源于豆科山蚂蝗属植物金钱草 *Desmodium styracifolium* (O sbeck)

Merr. 的干燥地上部分, 收载于《中华人民共和国药典》2000 年版一部^[1]。具有清热除湿, 利尿通淋之功

* 收稿日期: 2003-09-15

作者简介: 杨美华(1964—), 女, 博士, 研究方向为生药分子鉴定、生药分析及新药研究开发。Tel: (010) 62899730 (O)

E-mail: yangmeihua15@hotmail.com

* 河南中医学院 中药系 97 级毕业生

效。含有黄酮类、皂苷类、鞣质和生物碱等成分^[2-5]。药理研究证明,广金钱草总黄酮具有预防草酸钙结石形成和复发的作用^[6,7],另外还有显著的抗炎作用^[8],增加冠脉血流量等^[9,10]。《中华人民共和国药典》只收录了广金钱草中黄酮、生物碱的定性检查方法。本实验首次以黄酮中含量较高的成分 6-C-葡萄糖-8-C-木糖洋芹素(vicenin-2)为对照品,采用柱色谱-紫外分光光度法,测定了广金钱草中总黄酮的含量,为广金钱草原药材的质量控制提供了依据。

1 仪器与试剂

UV-2501PC(岛津)UV-Vis 光谱记录仪, TP-300 超声波清洗机。

vicenin-2 对照品自制,采用自身对照 HPLC 法测得含量为 98% 以上。所用试剂均为分析纯。柱色谱用聚酰胺(60~90 目)(江苏临江试剂厂)。

广金钱草药材购于海南省、广东省和广西省不同的药房和医药公司。经北京大学药学院陈虎彪教授鉴定为豆科山蚂蝗属植物 *D. styracifolium* (O sbeck) Merr. 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 测定波长的选择:对照品溶液和供试品溶液(上柱前及上柱后)在 200~400 nm 进行扫描,发现均在 272 及 339 nm 附近有最大吸收峰,但波长 272 nm 处的响应值比波长 339 nm 波长处的响应值大,故选择测定波长 272 nm。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取经五氧化二磷干燥 24 h 的 vicenin-2 对照品适量,加 50% 乙醇制成 36 μg/mL 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备:取本品粉末(过二号筛)0.5 g(同时另取本品测定水分),精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加 80% 乙醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 440 W,频率 50 Hz)60 min,取出,放冷,再称定质量,用 80% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 mL,蒸至近干,残渣加 50% 乙醇使溶解,放冷,通过聚酰胺柱(60~90 目,1 g,内径 1 cm,湿法装柱),以 50% 乙醇洗脱,收集洗脱液并定容至 100 mL,摇匀,作为供试品溶液。样品含量均以干燥品计算。

2.4 线性关系考察:精密吸取上述对照品溶液 3, 4, 5, 6, 7 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加 50% 乙醇稀释至刻度,摇匀,以 50% 乙醇为空白对照,于 272 nm 处测定吸光度,以 vicenin-2 溶液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程为: $Y = 0.0309X + 0.016$, $r = 0.9999$ 。结果表

明 vicenin-2 在 10.8~25.2 μg/mL 与吸光度具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验:取一定浓度供试品溶液连续测定 5 次,测定吸光度,其 RSD 值为 0.38%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验:取对照品及供试品溶液于室温分别放置 0, 30, 60, 90, 120 min 测定吸光度,计算对照品及供试品的 RSD 分别为 1.20%, 0.74%。表明对照品及供试品溶液在 2 h 内稳定。

2.7 重复性试验:精密称取同批样品 5 份,按含量测定方法进行测定,平均含量为 2.24%, RSD 为 1.70%,表明重现性良好。

2.8 回收率试验:精密称取已知含量的广金钱草药材(过二号筛)5 份,分别精密加入 vicenin-2 对照品适量,各份均按含量测定方法进行测定,平均回收率 100.82%, RSD 1.30% ($n = 5$)。

2.9 样品测定:按 2.3 项制备供试品溶液,对 11 批来源不同的广金钱草进行了总黄酮的含量测定,结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Analytical results of sample ($n = 3$)

| 药材批号 | 来源 | 含量/% | RSD/% |
|------------|---------|------|-------|
| 200207030 | 海口宏发大药房 | 2.59 | 0.08 |
| 200207028 | 海南 | 2.43 | 0.64 |
| 200207029 | 海南 | 2.41 | 0.21 |
| 200207027 | 海口益民药行 | 1.48 | 1.44 |
| 20001220 | 汕头制药厂 | 1.34 | 1.59 |
| 20020520 | 广州 | 2.21 | 0.67 |
| 2002061301 | 广西 | 1.71 | 0.33 |
| 2002061302 | 广西 | 2.26 | 0.31 |
| 2002061303 | 广西 | 2.04 | 0.10 |
| 20010708 | 广州市药材公司 | 2.28 | 0.34 |
| 20010718 | 广州市药材公司 | 2.08 | 0.27 |

3 讨论

3.1 测定方法的选择:黄酮类化合物含量测定方法有比色法^[11]、紫外分光法^[12]等。很多文献报道总黄酮的含量测定均以芦丁为对照品,采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 为显色剂进行含量测定^[13-15]。郭亚健等^[16]选择了一些黄酮类成分和非黄酮类成分,照上述比色法在波长 400~700 nm 进行扫描测定。结果表明,有些黄酮类物质在 500 nm 处无最大吸收或吸收很弱,而有些非黄酮类物质在 500 nm 处有最大吸收或有较强吸收。实验结果说明以芦丁为对照品,以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 为显色剂,于 500 nm 进行总黄酮含量测定的方法专属性不强,有局限性,准确性较差。石淋通片系广金钱草的浸膏片,席先蓉等^[17]曾参照《中华人民共和国药典》测定

槐花中芦丁含量方法,以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 为显色剂,对石淋通片中黄酮类化合物的含量进行了测定。结果未见供试品溶液在 500 或 510 nm 处与对照品有相似吸收峰,显然用该法测定石淋通片中总黄酮的含量是不妥的。笔者也曾采用上述方法,以芦丁为对照品,对广金钱草原药材进行总黄酮的含量测定,实验结果与席先蓉等一致。此外,还以 vicenin-2 为对照品,以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 为显色剂,采用上述方法,对广金钱草中总黄酮的含量进行了测定,结果仍未见对照品溶液和样品溶液在 500 或 510 nm 处有吸收峰,该结果亦表明以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 为显色剂的比色法不能用于广金钱草中总黄酮的含量测定。从实验结果可知,以广金钱草黄酮中含量较高的成分 vicenin-2 为对照品,采用柱色谱-紫外分光光度法测定其总黄酮的含量,操作简便,重现性好,结果准确。

3.2 提取溶剂和提取方法的选择: 实验中比较了 50% 甲醇, 30% 乙醇, 80% 乙醇超声提取或加热回流提取样品, 结果以 80% 乙醇超声提取的样品杂质少, 操作简便。

3.3 提取时间的确定: 采用 80% 乙醇超声提取样品, 分别测定了不同提取时间样品中总黄酮的含量, 结果在以 60 min 时总黄酮含量最高。

3.4 洗脱溶剂和体积的确定: 实验中曾采用甲醇 5% ~ 30%, 乙醇 10% ~ 50% 洗脱, 结果以 50% 乙醇 75 mL 即可洗脱完全。

3.5 本方法简便快速, 准确度高, 重现性好, 为《中华人民共和国药典》广金钱草的质量标准的进一步提高提供了依据。

References

[1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed Vol I.
 [2] Kubo T, Hamada S, Nohara T, et al. Study on the constituents of *Desmodium styracifolium* [J]. *Chem Pharm Bull*,

1989, 37(8): 2229-2231.
 [3] Yang J S, Su Y L, Wang Y L. Studies on the chemical constituents of *Desmodium styracifolium* (O sbeck) Merr [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1993, 28(3): 197-201.
 [4] Su Y L, Wang Y L, Yang J S. Study on the flavonoid compounds of slow bell leaf tickclover (*Desmodium styracifolium*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24(7): 343-344.
 [5] Wang Z R, Bai X Z, Liu F, et al. Study on the chemical compounds of *Desmodium styracifolium* [J]. *J Guangxi Med Univ* (广西医科大学学报), 1998, 15(3): 10-14.
 [6] Wang Z R, Bai X Z, Qin G X, et al. Effects of *Desmodium styracifolium*-triterpenoid (Ds-t) and *Desmodium styracifolium*-aromatic compound (Ds-a) on calcium oxalate renal stones induced in rats [J]. *Chin J Urol* (中华泌尿外科杂志), 1991, 12(1): 13-16.
 [7] Hirayama H, Wang Z, Nishi K, et al. Effects of *Desmodium styracifolium*-triterpenoid on calcium oxalate renal stones [J]. *Brit J Urol*, 1993, 71: 143-147.
 [8] Gu L Z, Zhang B X, Nan J H, et al. Studies on the anti-inflammatory effects of two species of *Lysimachia christinae* Hance and *Desmodium styracifolium* (O sbeck) Merr [J]. *Bull Chin Mater Med* (中药通报), 1988, 13(7): 40-42.
 [9] Xu S B, Zhong R Y, Xian S Y. The cardio-cerebrovascular effects of the flavonoids from Guangjinqiancao (*Desmodium styracifolium*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1980, 11(6): 265-267.
 [10] Jin J Y, Song L F, Chen Z Z, et al. A study of the extract from Guangjinqiancao (*Desmodium styracifolium*) on the effect of blood flow and vascular resistance in dog's brain [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1980, 11(8): 362-364.
 [11] Sun L L, Xie H X, Sun J Y, et al. Determination of flavonoids in *Fructus Crataegi* by colorimetry [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(10): 748-750.
 [12] Li H J, Li P. Quantitative determination of total flavonoids in *Senecio Ziziphii Spinosa* by UV spectrophotometry [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(1): 73-74.
 [13] Xi X R, Li S X. Analysis on contents of flavonoids and polysaccharides in pollen of *Typha angustifolia* L. and its different processed products [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(1): 25-28.
 [14] Wei Q, Wang D M, Ma X H, et al. A study on the measurement of flavonoids in the leaves of *Eucommia ulmoides* [J]. *J Northwest Sci-Tech Univ of Agric and For-Nat Sci* (西北农林科技大学学报·自然科学版), 2001, 29(5): 119-123.
 [15] Sun P X, Yie L K, Zhang X L, et al. Colorimetric determination of the total content of the flavonoids in *Epimedium* capsules [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1999, 16(1): 68-70.
 [16] Guo Y J, Fan L, Wang X Q, et al. Discussion about $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ colorimetry for determination of total flavonoids [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2002, 22(2): 97-99.
 [17] Xi X R, Zhang X R, Zhang H P, et al. Quantitative determination of the flavonoids in Shilintong Pian [J]. *J Guiyang Coll Tradit Chin Med* (贵阳中医学院学报), 1995, 17(3): 59-60.

乌药的显微鉴别

王旭红, 徐珞珊, 秦民坚*

(中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038)

乌药来源于樟科 (Lauraceae) 植物乌药 *Lindera strychnifolia* (Sieb et Zucc) V allar 的干燥块根, 是一应用历史久远的常用中药, 早在《本草拾

遗》中已有记载, 陈藏器谓: “乌药生岭南、邕州、容州及江南, 树生似茶, 高丈余, 一叶三桠, 叶青阴白。根状似山芍药及乌樟, 根色黑褐。”苏颂谓: “以天台者

* 收稿日期: 2003-09-29