

别为 94.96%、100.72%, RSD 分别为 0.44%、0.81% ($n=6$)。

2.10 样品测定: 每组细胞培养物按 2.3.1 项方法制备供试品溶液, 依法进样测定, 每个样品进样 2 次, 取平均值, 并计算 10-DAB III 的量, 结果见表 1。

表1 OGA 诱导红豆杉细胞培养中10-DAB III的测定结果($n=4$, $\alpha=0.05$)

Table 1 Determination of 10-DAB III in *T. yunnanensis* cell suspension induced by OGA

OGA 诱导子浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	10-DAB III 质量分数	
	细胞内/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	培养液中/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
0	0.052 $\pm$ 0.001	0.092 $\pm$ 0.039
20	0.143 $\pm$ 0.011	0.151 $\pm$ 0.055
40	0.178 $\pm$ 0.026	0.275 $\pm$ 0.059
60	0.139 $\pm$ 0.022	0.179 $\pm$ 0.027
80	0.154 $\pm$ 0.015	0.219 $\pm$ 0.048

3 讨论

3.1 本实验建立了 HPLC 测定云南红豆杉细胞悬浮培养物(细胞及胞外液)中 10-DAB III 量的方法。将 10-DAB III 对照品的甲醇溶液在 200~400 nm 内扫描, 结果在 232 nm 处有最大吸收, 故选 232 nm 为检测波长。同时, 分别采用不同流动相组成: 甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水, 以及各流动相不同配比等多种条件下进行洗脱, 考察各种流动相对细胞培养物供试品中 10-DAB III 分离度的影响, 结果发现以甲醇-乙腈-水(2:3:8)为流动相等度洗脱下, 10-DAB III 得到良好的分离, 见图 1。本操作简便可靠、重现性好、灵敏度高, 对红豆杉细胞大规模生产

具有实用价值, 此方法的建立将为云南红豆杉细胞生产 10-DAB III 开发研究提供依据。

3.2 诱导作用: OGA 为果胶的不完全酶解产物, 其单体半乳糖醛酸是组成植物细胞壁中果胶质的主要成分, 参与细胞壁复杂网架的形成。以 OGA 为诱导物, 可促进人参细胞中人参皂苷的合成^[8], 但未见其对红豆杉属植物和紫杉烷类合成诱导作用的报道。本实验测定结果可见, OGA 可显著提高云南红豆杉细胞中 10-DAB III 的量, 其中 OGA 为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时诱导效果较优, 关于 OGA 对 10-DAB III 等紫杉烷类化合物生物合成的诱导作用机制有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 王达明, 杨德军, 邱琼, 等. 云南红豆杉短穗条扦插育苗试验[J]. 云南林业科技, 2002(2): 15-19.
- [2] 王达明, 周云, 李莲芳. 紫杉醇药物的发展态势与云南省的红豆杉资源[J]. 西部林业科学, 2005, 34(2): 38-42.
- [3] Bissery M C, Guenad D, Voegelien G, et al. Experimental antitumor activity of taxotere, a taxol analogue[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(18): 4845-4852.
- [4] 胡益明, 甘炳远, 鲁春华, 等. 利用云南红豆杉悬浮细胞生产紫杉醇和紫杉烷类化合物(英文)[J]. 植物学报, 2003, 45(3): 373-378.
- [5] Wang Y D, Yuan Y J, Wu J C. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Biochem Eng J*, 2004, 19: 259-265.
- [6] 周忠强, 梅兴国. 前体饲喂对细胞培养生产紫杉醇的促进作用(英文)[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(3): 51-54.
- [7] Wang Z Y, Zhong J J. Repeated elicitation enhances taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors[J]. *Biochem Lett*, 2002, 24: 445-448.
- [8] Hu X Y, Neill S, Cai W M, et al. Hydrogen peroxide and jasmonic acid mediate oligogalacturonic acid-induced saponin accumulation in suspension-cultured cells of *Panax ginseng* [J]. *Physiol Planta*, 2003, 118: 414-421.

葎草叶总黄酮的测定及最佳采收期研究

陈伟光, 盛 静*

(嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001)

摘要: 目的 建立葎草叶总黄酮的测定方法, 并考察总黄酮的量随葎草不同采摘时间的动态变化。方法 通过单因素试验、正交试验, 考察乙醇体积分数、料液比、提取时间对提取液中总黄酮量的影响, 确定最佳提取条件, 然后在该条件下对不同时间采收的葎草叶进行总黄酮提取并进行定量测定。结果 所考察的因素中, 葎草总黄酮的超声提取工艺各因素影响程度为: 乙醇体积分数> 提取时间> 料液比; 最佳水平搭配为: A₂B₃C₃₀。不同时间采收的葎草中总黄酮的量有明显变化。结论 葎草中黄酮类成分提取的最佳工艺为 75% 乙醇, 料液比 1:60, 超声提取 50 min。葎草总黄酮的量与采摘时间密切相关, 以 8 月采收量最高。

关键词: 葎草; 总黄酮; 正交设计

中图分类号: R 282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0120-03

收稿日期: 2007-03-15

基金项目: 嘉兴市科技局科研基金资助项目(2005A Y3042)

作者简介: 陈伟光(1952—), 男, 副教授, 研究方向为天然药物化学成分的提取分离和定量分析。 Tel: (0573) 82259796

E-mail: jxweiguang@126.com

葎草为桑科植物 *Humulus scandens* (Lour.) Merr. 的全草。具清热解毒、利尿消肿等功效,用于肺结核、潮热、胃肠炎、痢疾、淋症、痔疮等证。据报道葎草叶含木犀草素葡萄糖苷、大波斯菊苷、牡荆素等黄酮类成分^[1]。在研究葎草提取物的抗菌作用时发现,其水提取液对革兰阳性菌具有较强的抗菌活性,并证实抗菌作用与葎草中所含的黄酮类成分有关。本研究通过单因素试验,正交试验考察了乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间3因素对葎草叶中总黄酮提取率的影响,建立紫外分光光度法测定葎草总黄酮量的方法,继而观察不同采收期葎草总黄酮量的动态变化,从而为合理开发利用葎草资源提供科学依据。

1 仪器与材料

岛津UV-2401PC 紫外分光光度计,SWB 5200型超声清洗机(上海必能信超声有限公司),电子天平(北京赛多利斯)。芦丁对照品(中国药品生物制品检定所),其他试剂均为分析纯。葎草采自嘉兴郊区,由本学院生药、天然药物化学教研室陈伟光副教授鉴定。采集葎草叶置通风处晾干,密闭保存,临用前在60℃下烘烤至恒重后备用。

2 方法与结果

2.1 葎草叶中黄酮的紫外测定

2.1.1 标准曲线制备:精密称取干燥至恒重的无水芦丁10.000 mg,置50 mL量瓶中,加60%乙醇至刻度,摇匀,即得0.20 mg/mL对照品溶液。精密吸取该对照品溶液2、4、6、8、10 mL,分别置25 mL量瓶中,用亚硝酸钠-硝酸铝法^[2]于512 nm处测吸光度。以质量浓度为纵坐标,吸光度值为横坐标进行线性回归,得回归方程为: $A = 0.0141C - 0.0037$, $R^2 = 0.9999$ 。线性范围为16~80 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.2 供试品溶液制备:分别精密称取葎草叶粉末1.000 g,置100 mL锥形瓶中,加入适量溶剂,超声提取一定时间,滤过,用少量溶剂淋洗药渣,水浴蒸干得浸膏,浸膏加适量溶剂,超声助溶,定容于25 mL量瓶中,3000 r/min离心15 min,精密吸取上清液1.00 mL,按标准曲线制备项下处理,测定吸光度,计算黄酮的量。

2.1.3 精密度试验:取同一质量浓度对照品溶液4份,按上述实验方法操作,测定其吸光度。结果表明,吸光度RSD为1.42%。

2.1.4 稳定性试验:测定同一供试品溶液在不同时间吸光度,结果表明,吸光度值在10~40 min内基本不变,RSD为2.12%,因此测定应控制在40 min

内完成。

2.1.5 重现性试验:称取同一批样品粉末4份,按上述方法制备样品,测定吸光度计算黄酮质量分数的RSD为1.63%。

2.1.6 回收率试验:取已知总黄酮量的样品1 g,再加入0.2 mg/mL的芦丁对照品溶液1 mL,按2.1.2项制备供试品溶液,测定黄酮的量,结果平均回收率为99.3%,RSD=1.87% ($n=3$)。

2.2 影响葎草黄酮提取效果的单因素分析

2.2.1 乙醇体积分数对葎草黄酮提取效果的影响:考察了不同体积分数乙醇对葎草叶总黄酮提取的影响,选择50%、60%、75%、85%、95%乙醇进行试验,料液比为1:60,超声提取40 min,按上述方法测定黄酮的量。结果见图1-A。在乙醇为75%时,黄酮的提取量最大。在此基础上随着乙醇量的增大,黄酮的提取量显著减少。

2.2.2 提取时间对葎草黄酮提取效果的影响:分别以料液比为1:60,乙醇为75%,超声提取30、40、50、60、70 min后,按上述方法测定总黄酮的量,结果见图1-B。在提取时间为50 min左右时,黄酮的提取量最大。从30~50 min,随着提取时间的增加,黄酮的提取量亦持续增加。但是超过50 min后,黄酮的提取量反而有所下降。

2.2.3 料液比对葎草黄酮提取效果的影响:分别以1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80的料液比,各自在乙醇为75%,超声提取50 min后,按上述方法测定总黄酮的量,结果见图1-C。在料液比为1:60时,黄酮的提取量最大。低于1:60时随料液比的增加,黄酮的提取量增加。超过1:60随着乙醇量的增大,黄酮的提取量趋于平稳,说明在料液比为1:60时,黄酮已基本提取完全。

2.3 正交试验及结果:对影响葎草黄酮提取效果的3个主要影响因素乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)进行研究。按表1所示的因素水平进行正交试验,测定黄酮的量,结果见表2。

由表2可知,对葎草黄酮的提取,各因素的影响效果依次是A>C>B,通过正交试验得出的最佳组合是A₂B₃C₃。即乙醇体积分数为75%、料液比为1:60、提取时间为50 min,这与单因素试验结果吻合。

2.4 方差结果分析:方差分析结果见表3。可见乙醇体积分数对总黄酮提取有极显著影响,而溶剂用量、提取时间也有影响,但无显著差异。

2.5 不同时间采集的葎草叶总黄酮测定:将不同时间采收的葎草粉碎成粗粉,称取1.000 g,以上述优

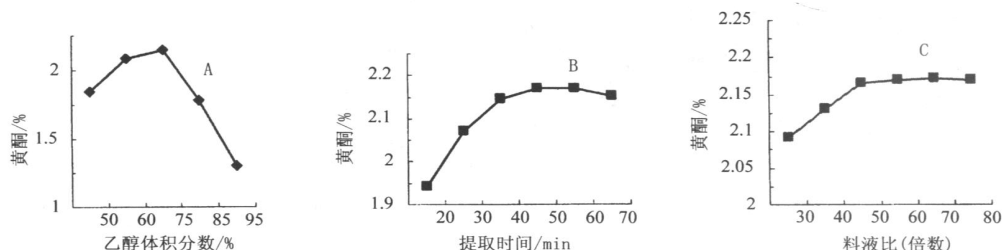


图1 黄酮化合物单因素水平实验结果

Fig 1 Single-factor experiment of flavonoids

表1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A/%	B/倍	C/min
1	60	30	30
2	75	45	40
3	95	60	50

表2 正交试验结果(n=3)

Table 2 Results of orthogonal test (n=3)

实验号	A	B	C	D	黄酮/%
1	1	1	1	1	1.810
2	1	2	2	2	1.921
3	1	3	3	3	2.081
4	2	1	2	3	2.077
5	2	2	3	1	2.138
6	2	3	1	2	2.072
7	3	1	3	2	1.244
8	3	2	1	3	1.223
9	3	3	2	1	1.301
K ₁	5.81	5.13	5.10	5.25	
K ₂	6.29	5.28	5.30	5.24	
K ₃	3.77	5.45	5.46	5.38	
R	2.52	0.32	0.36	0.14	

表3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	1.1948	2	0.5974	279.8621	P<0.01
B	0.0174	2	0.0087	4.0712	
C	0.0214	2	0.0107	5.0211	
D(误差)	0.0043	2	0.0021		

F_{0.01}(2,2)=99.0

选的条件提取,按2.1.2法测定其吸光度,计算黄酮的质量分数,结果见表4。同一区域,不同时间采摘的葎草叶黄酮的量变化较大,以8月最高,9月次之,10月采集的最低。

表4 不同采集期葎草叶总黄酮的量(n=3)

Table 4 Flavonoids in leaves of *H. scandens* collected at different times (n=3)

采集日期	黄酮/%	RSD/%
06-20	2.973	2.23
07-20	2.906	1.94
08-19	3.758	2.16
09-20	3.500	2.05
10-20	2.171	1.76

3 讨论与结论

3.1 葎草黄酮是葎草中抗菌的主要活性成分之一,叶中黄酮量是全草的3倍,本实验建立了紫外分光光度法测定葎草中总黄酮的方法。实验表明,本法具有操作简单、灵敏度高、重现性好等优点,用于葎草中总黄酮的测定,结果满意。

3.2 葎草总黄酮量与采摘时间密切相关,以8、9月采摘量最高,故以此时采收为宜。

参考文献

- [1] 尹海波,王颖,郑太坤,等.中国葎草属植物的研究进展[J].辽宁中医学院学报,2001,3(1):60-61.
- [2] 杨俊,蒋惠娣,徐娟华.杭白菊总黄酮的提取工艺及其含量的动态变化研究[J].中草药,2002,33(11):988-990.

(上接第98页)

从而使线粒体能量合成障碍,导致线粒体功能下降,出现肌膜破损,细胞核消失;肌丝排列紊乱,肌丝溶解、断裂、紊乱;线粒体肿胀,嵴断裂现象。本实验研究证实,蒲黄总黄酮能明显降低Cu的水平,提高Zn和Ca的水平。减轻自由基的损害,促进能量代谢恢复,减轻心肌梗死时的心肌损害。抑制线粒体内自由基的增加,减轻心肌细胞超微结构的损伤。

参考文献

- [1] 苑可武,徐文豪.蒲黄的化学及药理研究概况[J].中草药,1996,27(4):693-696.
- [2] 毛俊琴,黄晓瑾,李铁军,等.蒲黄总黄酮对心肌耗氧量的影响[J].中国医院药学杂志,2006,26(9):1089-1091.
- [3] 秦俊法,潘伟清,华栋,等.微量元素与心血管疾病II,微量元素在心血管病中的可能作用及机制[J].广东微量元素科学,2002,9(12):1-19.
- [4] 王德海,程国富.铜抗氧化自由基作用的研究进展[J].微量元素与健康研究,2001,18(4):70-73.
- [5] Tager Y R, Zhang S Q, Xiong Y, et al. Studies of five microelement contents in human serum, hair, and fingernails correlated with aged hypertension and coronary heart disease[J]. Biol Trace Elem Res, 2003, 92(2): 97-104.