

葎草中总黄酮与木犀草素含量的季节动态变化

曹伟国¹, 陶燕铎², 张 丹^{1*}, 王 刚¹

(1. 重庆医科大学 中医药学院, 重庆 401331; 2. 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海 西宁 810000)

摘 要:研究了葎草中总黄酮和木犀草素含量的季节变化规律。分别采用分光光度法和高效液相色谱法测定了重庆地区不同月份葎草中总黄酮与木犀草素的含量, 结果表明: 不同月份葎草总黄酮与木犀草素含量差异较大, 且两指标成分含量的季节变化趋势基本一致, 总黄酮与木犀草素的含量分别为 14.74~23.83 mg·g⁻¹ 和 0.25~1.11 mg·g⁻¹, 其中 10 月份总黄酮与木犀草素的含量均最高。

关键词:葎草; 总黄酮; 木犀草素; HPLC

中图分类号:S759.82 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2010)06-0134-04

Seasonal Variation of Total Flavonoids and Luteolin in *Humulus scandens*

CAO Wei-guo¹, TAO Yan-duo², ZHANG Dan¹, WANG Gang¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 401331, China;

2. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academic of Sciences, Xining, Qinghai 810000, China)

Abstract: Seasonal variation of total flavonoids and luteolin in *Humulus scandens* were investigated. The content of total flavonoids was determined by ultraviolet spectrophotometric method. The content of luteolin was measured by RP-HPLC. The contents of total flavonoids and luteolin in *H. scandens* in different months were significantly different. The trend of seasonal variation of total flavonoids and luteolin were similar. The content range of total flavonoids varied from 14.74 mg·g⁻¹ to 23.83 mg·g⁻¹. The contents of luteolin ranged from 0.25 mg·g⁻¹ to 1.11 mg·g⁻¹. The contents of total flavonoids and luteolin in the sample harvested in October were higher than others.

Key words: *Humulus scandens*; total flavonoids; luteolin; HPLC

葎草(*Humulus scandens*)为桑科葎草属 1a 生或多年生草本植物^[1], 又名拉拉秧、拉拉藤等, 全国各地均有分布, 资源十分丰富。作为一种民间常用药物, 全草具有清热解毒、利尿消肿等功效, 民间常用来治疗肺结核潮热、胃肠炎、痢疾、感冒发热、膀胱炎、肾盂肾炎、泌尿系结石、痔疮等, 外用治疗痈疮肿毒、湿疹、虫蛇咬伤等症^[2]。据文献报道, 葎草有效成分主要为黄酮类化合物, 主要含木犀草素、牡荆素、芸香苷、异槲皮苷和山奈酚苷等^[3]。目前已有关于葎草总黄酮提取工艺以及含量的研究^[4-7], 但尚未见关于葎草中木犀草素的研究报道, 而木犀草素是葎草总黄酮的主要组分之一。选择葎草典型生境为

样地, 研究葎草中总黄酮与木犀草素含量的季节动态变化规律, 为进一步开发利用葎草资源并对其进行质量控制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

葎草样品采自重庆沙坪坝, 采集时间为 2008 年 4—10 月, 每月采集 1 次。

实验所用样品为葎草全草, 每次采集葎草样品 3 kg, 切段, 洗净, 自然风干后干燥, 粉碎过 20 目筛备用。

收稿日期: 2009-11-24 修回日期: 2010-04-06

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(No2007BA145B00); 重庆医科大学校级科研课题(XBYB2008088)

作者简介: 曹伟国, 男, 硕士, 讲师, 主要从事中药与天然药物质量标准的研究。

* 通讯作者: 张丹, 女, 讲师, 硕士, 从事药用植物资源开发与利用工作。E-mail: cwgzd2001@sohu.com。

1.2 主要仪器与试剂

仪器 主要有岛津 LC-2010A 高效液相色谱仪、CLASS-VP 色谱工作站、龙尼柯 UV-2102PC 紫外可见分光光度计、Millipore 溶剂过滤系统、METTLER TOLEDO AG204 万分之一电子分析天平。

试剂 芦丁、木犀草素对照品由中国药品生物制品检定所提供;甲醇为色谱纯;水为重蒸水。其余所用试剂均为分析纯。

1.3 总黄酮含量测定^[8-10]

1.3.1 芦丁对照品溶液的制备 称取 120℃减压干燥至恒重的无水芦丁 8.7 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加 80%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀即可。

1.3.2 供试品溶液的制备 取葎草细粉 1 g,置索氏提取器中,加石油醚 150 mL,加热回流至提取液无色,弃去石油醚提取液。药渣挥干石油醚后,将药渣粉末置烘箱中 60℃干燥 1 h,然后转移至具塞锥形瓶中,加入 80%乙醇 100 mL,密塞,称重,超声提取 60 min,放冷再称重,用 80%乙醇补足减失的重量,摇匀,过滤后作为供试品溶液。

1.3.3 测定波长的选择 取芦丁对照品溶液和供试品溶液各 2 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,各加入 80%乙醇 6 mL,加入 2%三氯化铝溶液 0.5 mL,摇匀,再加 80%乙醇至刻度,放置 60 min 显色,即得芦丁对照品三氯化铝溶液和供试品三氯化铝溶液,在 200~600 nm 波长范围内扫描。结果表明,芦丁对照品和葎草样品溶液均在 410 nm 处有最大吸收,因此选 410 nm 为测定波长。

1.3.4 线性关系分析 取芦丁对照品溶液 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,各加 80%乙醇至 8 mL,加入 2%三氯化铝溶液 0.5 mL,摇匀,再加 80%乙醇至刻度,放置 60 min 显色,以第 1 瓶溶液作为空白,在 410 nm 处测定各溶液的吸收度。以吸收度(A)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,得回归方程: $A = 0.0249C - 0.0069$, $r = 0.9991$,表明芦丁在 3.48~27.84 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内与吸光度呈线性关系。

1.3.5 精密度实验 取同一对照品溶液 6 份,置于 25 mL 容量瓶中,加 80%乙醇至 8 mL,分别加入 2%三氯化铝溶液 0.5 mL,摇匀,再加 80%乙醇至刻度,放置 60 min 显色,在 410 nm 处测定吸收度,吸收度的 $RSD=1.76\%$ 。

1.3.6 重复性实验 取同一批葎草样品细粉 6 份,每份 1 g,分别按照“1.3.2”的方法制备供试品溶液,分别精密吸取 2 mL 置于 25 mL 容量瓶中,加 80%乙醇至 8 mL,加入 2%三氯化铝溶液 0.5 mL,摇匀,再加 80%乙醇至刻度,放置 60 min 显色,于 410

nm 处测定吸收度,吸收度的 $RSD=2.44\%$ 。

1.3.7 稳定性实验 取供试品溶液 2 mL,置于 25 mL 容量瓶中,加 80%乙醇至 8 mL,加入 2%三氯化铝溶液 0.5 mL,摇匀,再加 80%乙醇至刻度,放置 60 min 显色,分别于 0、30、60、90、120 min 测定吸收度,吸收度的 $RSD=1.92\%$,表明供试品溶液显色后 2 h 内稳定。

1.3.8 加样回收率实验 取已知总黄酮含量的葎草细粉 9 份,每份约 0.8 g,分别加入高、中、低 3 个质量浓度的芦丁对照品溶液适量,按照“1.3.2”的方法制备供试品溶液,分别吸取 2 mL 置于 25 mL 容量瓶中,加 80%乙醇至 8 mL,加入 2%三氯化铝溶液 0.5 mL,摇匀,再加 80%乙醇至刻度,放置 60 min 显色,于 410 nm 处测定吸收度,计算加样回收率,结果平均加样回收率为 98.1, $RSD=2.76\%$ 。

1.3.9 样品的测定 取供试品溶液 2 mL,置于 25 mL 容量瓶中,加 80%乙醇至 8 mL,加入 2%三氯化铝溶液 0.5 mL,摇匀,再加 80%乙醇至刻度,放置 60 min 显色,于 410 nm 处测定吸收度,计算总黄酮含量(表 1)。

1.4 木犀草素含量测定^[11]

1.4.1 高效液相色谱条件 色谱柱为 C_{18} 柱(5 μm ,250 mm×4.6 mm);流动相为甲醇-2%醋酸(50 : 50);流速为 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长为 350 nm;柱温室温;进样量为 20 μL ,理论塔板数按木犀草素计不低于 4 000。在此条件下,各组分得到良好分离,得到 HPLC 色谱图(图 1)。

1.4.2 对照品溶液的制备 称取木犀草素 7.5 mg,置 50 mL 容量瓶中,加 80%乙醇溶解并定容,摇匀,即得对照品储备溶液。

1.4.3 样品溶液的制备 取葎草细粉 5 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,加 80%乙醇 50 mL,加热回流 2 h,过滤,滤液回收乙醇至干后加 2% H_2SO_4 50 mL,酸水解 1 h,放冷后,分别用 40、40、20 mL 的乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液,回收乙酸乙酯至浸膏。取 80%乙醇溶解浸膏并定容到 60 mL,过滤后作为供试品溶液。

1.4.4 线性关系分析 取木犀草素对照品溶液适量,加 80%乙醇制成系列标准溶液,进样测定。对色谱峰面积(A)与对进样量(M)进行线性回归,结果表明,木犀草素在进样量 0.3~3.0 μg 时与峰面积线性关系良好,回归方程为 $A = 3\,912\,439\,M + 495\,238$, $r = 0.9997$,其中,A 为色谱峰面积($\text{mv} \cdot \text{s}$),M 为进样量(μg)。

A. 对照品 B. 葎草 a. 木犀草素

图 1 样品高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

1.4.5 精密度实验 取木犀草素对照品溶液,在上述色谱条件下,进样 20 μL,重复进样 6 次,测得峰面积的 RSD 为 1.26%,表明精密度良好。

1.4.6 重复性实验 对同一批样品按样品溶液的制备方法平行制备 6 份,在上述色谱条件下,分别进样 20 μL,依照样品测定方法测定,得 RSD 为 1.34%。

1.4.7 稳定性实验 在上述色谱条件下,取同一供试品溶液 20 μL,在室温下于 0、1、2、4、6、8 h 进样,并测定峰面积,RSD 为 1.75%,表明样品溶液在 8 h 内稳定。

1.4.8 加样回收率实验 取已知木犀草素含量的葎草样品细粉 9 份,每份 2 g,分别加入高、中、低 3 个质量浓度的木犀草素对照品溶液适量,按照供试品溶液制备方法制备,同一质量浓度制备 3 份,并在上述色谱条件下测定,得平均加样回收率为 99.5%,RSD 为 1.83%。

1.4.9 样品测定 分别取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,按上述色谱条件进行测定,以外标法计算样品中木犀草素的含量。

2 结果与分析

由表 1 知,不同月份葎草中总黄酮与木犀草素含量有显著差异。10 月份,葎草样品中总黄酮与木犀草素的含量最高,分别为 23.83 mg·g⁻¹ 和 1.11 mg·g⁻¹。

从图 2 可以看出,不同采收时间葎草中总黄酮与木犀草素的含量变化趋势基本一致,均以 10 份采集的样品含量最高,且两者的含量变化均呈现波浪形,4—5 月份呈上升趋势,5—7 月份呈下降趋势,7—10 月呈上升趋势。

葎草为 1 a 生或多年生草本植物,3 月中下旬开始发芽,5—8 月份为生长旺盛期,8—9 月为花期,一

般在 11 月上旬部分茎叶开始枯死。从实验结果可知,葎草采收时间以 10 月份为宜。

表 1 样品测定结果

Table 1 Cotents of total flavonoids and luteolin in *H. scandens* in different months

采收时间	总黄酮/(mg·g ⁻¹)	木犀草素/(mg·g ⁻¹)
2008-04-28	14.74	0.25
2008-05-26	18.70	0.53
2008-06-23	16.55	0.47
2008-07-27	15.73	0.43
2008-08-27	19.02	0.69
2008-09-25	21.01	0.81
2008-10-28	23.83	1.11

图 2 不同采收时间葎草中总黄酮与木犀草素的含量变化

Fig. 2 Variation of the contents of total flavonoids and luteolin in *H. scandens*

3 结论与讨论

葎草中总黄酮与木犀草素含量的季节变化规律明显,不同采收时间葎草中总黄酮与木犀草素的含量变化趋势基本一致,呈现波浪形变化,以 10 月份样品中含量最高,而 4 月份苗期和 7 月份生长旺盛期样品中总黄酮与木犀草素含量较低。陈伟光^[4]等

研究表明,嘉兴地区葎草中总黄酮的含量 8 月份达到顶峰,与本实验结果存在一定差异,可能是不同产地生态环境影响的结果,重庆地区与嘉兴地区环境差异较大,造成次生代谢产物的转化规律存在差异。

在重庆地区,10 月份葎草全草中总黄酮与木犀草素的含量最高,其中总黄酮含量为 $23.83\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。冯俊霞^[5-7]等测得石家庄地区葎草叶中总黄酮含量高达 $53.19\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,陈伟光^[4]等测得嘉兴地区葎草叶中总黄酮含量为 $37.58\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,丁勇^[6]等测得淮阴地区葎草叶中总黄酮含量为 $3.72\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,结果差异较大。说明产地对药用植物活性成分的影响较大,不同产地葎草中总黄酮含量差异较大。

在木犀草素含量测定中,分别使用了不同比例的甲醇-水、甲醇-1%醋酸和甲醇-2%醋酸做流动相,比较发现,使用甲醇-水做流动相时,木犀草素峰拖尾严重,而使用甲醇-2%醋酸时,则峰型较好,因此,宜选用甲醇-2%醋酸做流动相。葎草中含有木犀草素和葡萄糖苷木犀草素-7-O-葡萄糖苷,本实验在木犀草素含量测定时样品制备采用了酸水解处理,制得木犀草素苷元,因此,所测得木犀草素含量为葎草中总木犀草素的含量。

参考文献:

[1] 中国植物志编委会. 中国植物志(第 23 卷)[M]. 北京:科学出版社, 1995. 220-221.
Flora of China Editorial Committee. Flora of China, Vol. 23 [M]. Beijing: Science Press, 1995. 220-221.

[2] 朱有昌. 东北药用植物[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社, 1989. 234-235.
ZHU Y C. Medicinal plant of northeast[M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 1989. 234-235.

[3] 许鸿源. 汉药之化学成分(I) [M]. 北京:中国医药科技出版社, 1982. 473-474.
XU H Y. The chemical components of traditional Chinese drug (I) [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 1982. 473-474.

[4] 陈伟光, 盛静. 葎草叶总黄酮的测定及最佳采收期研究[J]. 中草药, 2008, 39(1): 120-122.
CHEN W G, SHENG J. Determination of total flavonoid in

the leaf of *Humulus scandens* and the study of its harvest season[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2008, 39(1): 120-122.

[5] 冯俊霞, 常永芳, 武戈, 等. 荧光分析法测定野生葎草叶中总黄酮的含量[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(8): 3578-3579.
FENG J X, CHANG Y F, WU G, *et al.* Determination of total flavone content in wild Japanese hop leaf by fluorescence spectrophotometry[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2009, 37(8): 3578-3579.

[6] 丁勇, 王新风, 杨芳. 葎草的黄酮含量测定及抗氧化性研究[J]. 江苏中医药, 2009, 41(2): 55-57.
DING Y, WANG X F, YANG F. Content and antioxidant activity of flavonoid in *Humulus scandens* [J]. Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine, 2009, 41(2): 55-57.

[7] 冯俊霞, 戚秀菊. 葎草总黄酮和微量元素含量的测定分析[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(4): 963-964.
FENG J X, QI X J. Determination of total flavone and trace elements in *Humulus scandens* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2009, 48(4): 963-964.

[8] 尹海波, 康廷国, 王冰, 等. 正交实验法优选葎草的提取工艺[J]. 中药材, 2005, 28(12): 1112-1113.
YIN H B, KANG T G, WANG B, *et al.* Study on extraction technology for *Humulus scandens* (Lour) Merr. by orthogonal design[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2005, 28(12): 1112-1113.

[9] 郭丽冰, 王蕾. 降香总黄酮含量测定方法的研究[J]. 中药材, 2008, 31(5): 694-699.
GUO L B, WANG L. Study the method of determination of total flavonoids in rosewood [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008, 31(5): 694-699.

[10] 叶菊, 苏印全, 吕建荣, 等. 罗布麻总黄酮含量的研究[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(3): 114-115.
YE J, SU Y Q, LV J R, *et al.* The comparison study of content of flavonoid of *Aprocynum venetum* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006, 21(3): 114-115.

[11] 湖碧波, 蒋惠娣, 杨俊, 等. HPLC 法测定不同采收期杭白菊中木犀草素及其苷的含量[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2004, 33(1): 29-32.
HU B B, JIANG H D, YANG J, *et al.* Determination of luteolin and luteolin-7-β-glucoside in chrysanthemum morfolium ramat from different collection time by RP-HPLC [J]. Journal of Zhejiang University: Medical Sciences Edition, 2004, 33(1): 29-32.