

不同产地中华卷柏营养器官总黄酮含量分布的研究

赵 昕, 吴子龙, 叶 嘉, 张 浩, 李学鑫

(邯郸学院 生物科学系, 邯郸市资源植物重点实验室, 河北 邯郸 056005)

摘 要: 在对不同产地的野生中华卷柏总黄酮含量及其器官分布规律进行研究的基础上, 进一步对野生中华卷柏总黄酮的提取条件进行了优化。结果表明: 中华卷柏总黄酮含量的器官分布差异显著, 总黄酮的含量在叶片中最高, 茎次之, 根最低; 不同地区的中华卷柏总黄酮含量差异也较大, 河南郭亮村中华卷柏的根、茎和叶片中总黄酮含量最低, 分别为 0.769、1.260 和 1.621 mg/g, 河北小五台山中华卷柏的根、茎和叶片中总黄酮含量最高, 分别是郭亮村的 1.66 倍、1.30 倍和 1.58 倍; 从聚类分析的结果看, 中华卷柏全株总黄酮的含量受纬度影响较大, 纬度降低, 总黄酮含量也降低; 同时还确定了中华卷柏总黄酮的最佳提取条件为 60%乙醇 60℃超声提取 40 min。

关键词: 中华卷柏; 总黄酮; 营养器官; 产地

中图分类号: S 792.119 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)24-0201-03

中华卷柏[*Selaginella sinensis* (Desv.) Spring] 是我国特有的卷柏属药用植物, 广泛分布于东北、华北等地^[1]。现代药理研究表明, 中华卷柏不仅具有传统的清热解毒作用, 还具有抗肿瘤、抗病毒、免疫调节等多种功能, 其主要有效成分是黄酮类化合物^[2,3], 已引起国内外学者的广泛关注。现通过对不同产地的野生中华卷柏总黄酮含量及其器官分布规律进行研究, 以期对中华卷柏的栽培和开发利用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2009 年 7 月中旬, 分别在河南省新乡郭亮村(N35°17', E113°20')和河北省武安朝阳沟(N36°55', E113°48')、长寿村(N36°59', E113°50')、小五台山(N39°55', E114°50')各选取 3 个自然居群, 每个居群均随机选取 10 株中华卷柏。将中华卷柏的根、茎和叶片分开, 于 80℃烘干至恒重, 称重后将样品研磨成粉末状。

1.2 标准曲线的绘制^[4]

精密称取 25 mg 芦丁标准品(购于中国药品生物制品检定所), 加入 60%(体积比)乙醇溶解, 定容至 100 mL。精密吸取上述溶液 0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mL 分别置于 10 mL 的刻度试管中, 对应加入 2.4、2.0、1.6、

1.2、0.8、0.4、0 mL 蒸馏水, 加入 0.4 mL 浓度为 5% 亚硝酸钠混匀, 放置 6 min, 加入 0.4 mL 浓度为 10% 硝酸铝混匀, 放置 6 min, 加入 4 mL 浓度为 4.3% 氢氧化钠加水至刻度, 混匀, 放置 15 min, 于 508 nm 处测定各溶液的吸光度, 得芦丁质量(*Y*, mg)与吸光度 *A*₅₀₈ 间的回归方程: $Y = 8.4821 A_{508} - 0.0062 (r^2 = 0.9994)$ 。根据此方程总黄酮含量在 0~0.6 mg 范围内与吸光度 *A*₅₀₈ 呈良好线性关系。

1.3 总黄酮提取条件的优化

分别称取 0.1 g 小五台山中华卷柏根、茎、叶的粉末于 10 mL 容量瓶中, 加入约 9 mL 60% 的乙醇, 使样品完全浸泡在乙醇中, 盖好盖, 按不同提取方式、提取温度、提取时间进行考察(表 1)。其余产地的样品按上述方法处理, 以最佳提取条件提取, 冷却至室温, 定容。精密吸取 1 mL 提取液, 按标准曲线中所述测定方法, 以空白试剂为参比, 在 508 nm 处测定吸光度, 根据回归方程计算提取液中总黄酮的含量, 并换算出每克(干重)植物样品中含总黄酮的质量(mg), 以此表示总黄酮含量。其中, 全株总黄酮含量=(根总黄酮含量×根干重+茎总黄酮含量×茎干重+叶总黄酮含量×叶干重)/(根干重+茎干重+叶干重)。

由表 1 可得出, 不论是根、茎还是叶片, 相同提取温度和提取时间的条件下, 超声提取法提取中华卷柏总黄酮的含量均高于常压溶剂提取法得到的总黄酮含量, 表明超声提取法优于常压溶剂提取法。并且, 由组间效应检验表明, 不论是中华卷柏的根、茎还是叶片, 提取温度、提取时间以及二者的交互作用效应均为显著, 各因素对总变异的贡献从大到小依次为提取温度、提取时间、二者交互作用。

第一作者简介: 赵昕(1977-), 女, 博士, 副教授, 现从事植物次生代谢生态学研究工作。E-mail: zhaoxinmdj@126.com。

通讯作者: 叶嘉(1963-), 女, 硕士, 教授, 现从事植物学研究工作。

基金项目: 河北省科技支撑计划资助项目(06220111D-1); 邯郸市科学技术发展与研究资助项目; 邯郸学院 2008 年度博士硕士研究生启动基金资助项目(2008006)。

收稿日期: 2010-10-11

表 1 小五台山的中华卷柏总黄酮提取条件的优化

提取方式	提取温度 / °C	提取时间 / min	总黄酮含量/ mg · g ⁻¹		
			根	茎	叶
超声提取	20	20	0.607±0.036a	1.020±0.018a	1.845±0.048a
	20	40	0.776±0.038b	1.225±0.049b	2.132±0.036b
	20	60	1.051±0.054c	1.350±0.013b	2.238±0.030b
	40	20	1.004±0.012a	1.453±0.043a	2.396±0.036a
	40	40	1.075±0.043ab	1.586±0.030b	2.474±0.030a
	40	60	1.134±0.012b	1.594±0.041b	2.600±0.041b
	60	20	1.115±0.018a	1.370±0.031a	2.352±0.024a
	60	40	1.280±0.006b	1.637±0.049b	2.557±0.018b
	60	60	1.276±0.024b	1.653±0.035b	2.560±0.031b
常压溶剂提取	20	20	0.454±0.049a	0.847±0.007a	1.625±0.059a
	20	40	0.592±0.031a	0.973±0.110a	1.798±0.036ab
	20	60	0.706±0.036b	1.028±0.106a	1.869±0.041b
	40	20	0.694±0.056a	1.044±0.106a	1.932±0.036a
	40	40	0.729±0.049a	1.252±0.021a	2.022±0.030a
	40	60	0.895±0.013a	1.283±0.049a	2.026±0.049a
	60	20	0.804±0.042a	1.252±0.012a	1.775±0.018a
	60	40	0.981±0.012b	1.425±0.018b	2.010±0.036b
	60	60	0.922±0.101ab	1.366±0.121ab	2.220±0.042c

注: 在相同提取温度下, 每一列数据中字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

虽然多数是在 60 °C 条件下超声提取 60 min, 总黄酮的得率最高, 但与在 60 °C 条件下超声提取 40 min, 总黄酮的得率接近, 差异不显著, 依据方差分析和影响总黄酮提取效率的因素, 确定中华卷柏中总黄酮的最佳提取条件为 60%乙醇 60 °C 超声提取 40 min。

以小五台山的中华卷柏叶片粉末为材料按最佳条件制备供试品溶液, 进行重复性试验、精密度试验, RSD 分别为 1.48% 和 0.92%, 加样回收率试验所得平均回收率为 97.8%, RSD 为 0.38%, 表明该方法可行。

1.4 数据的统计分析

试验处理及数据测定均重复 3 次, 采用 Spss 软件进行统计分析, Duncan 法多重比较, 最短距离法聚类。

2 结果与分析

2.1 中华卷柏各营养器官总黄酮含量的差异

由图 1 可见, 中华卷柏不同营养器官(根、茎、叶)间的总黄酮含量差异显著, 并且它们的分布规律一致, 都是叶片最高、茎次之、根最低。不同产地中华卷柏总黄酮含量的器官(根、茎、叶)分布也有较大差异。其中, 郭亮村中华卷柏的根、茎和叶片中总黄酮含量最低, 分别为 0.769、1.260 和 1.621 mg/g, 小五台山中华卷柏的根、茎和叶片中总黄酮含量最高, 分别是郭亮村的 1.66 倍、1.30 倍和 1.58 倍, 并且差异显著。长寿村和朝阳沟的中华卷柏根、茎和叶片中总黄酮含量接近, 差异均不显著, 不过, 它们的叶片总黄酮含量均显著高于郭亮村的、低于小五台山的。

2.2 中华卷柏全株总黄酮含量的聚类分析

根据全株总黄酮的含量, 对 4 个产地的中华卷柏进行了聚类分析, 结果可聚为 3 组, 其中, 郭亮村为 I 组, 长寿村、朝阳沟为 II 组, 小五台山为 III 组(图 2)。各组间的

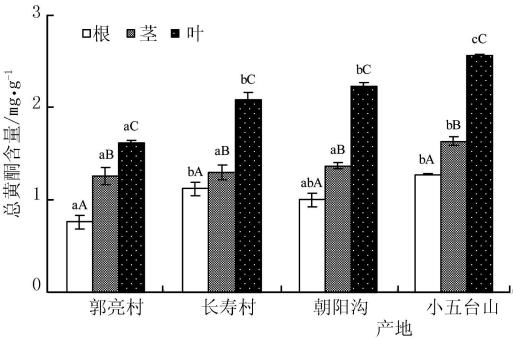


图 1 不同产地中华卷柏各器官中总黄酮的含量

注: 同一器官, 小写字母不同表示差异显著; 同一产地, 大写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

平均总黄酮含量差异显著, III 组平均总黄酮含量最高, 为 2.278 mg/g, 分别是 II 组(1.509 mg/g)、II 组的 (1.931 mg/g) 1.51 倍和 1.18 倍。

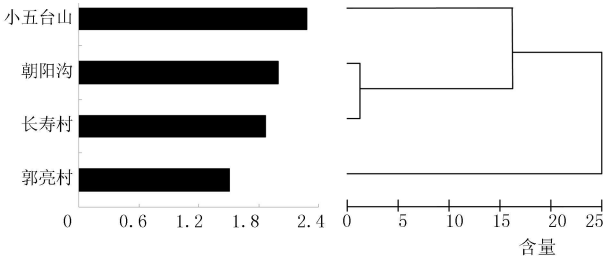


图 2 不同产地中华卷柏总黄酮含量的聚类

3 结论与讨论

黄酮类化合物是广泛存在于植物中的一类重要次生代谢产物^[5], 具有显著的抗真菌、抗肿瘤以及抗病毒

等药理活性^[9], 已经成为新药合成中重要的先导化合物^[7]。相关研究表明, 植物的次生代谢具有器官、组织特异性^[8], 并且, 植物次生代谢产物的积累与环境因子有着密切的关系^[9]。该研究中, 中华卷柏的总黄酮含量也存在明显的器官分布差异和地域环境差异。同一产地中华卷柏总黄酮含量的器官分布差异显著, 总黄酮的含量在叶片中最高, 茎次之, 根最低。不同地区中华卷柏总黄酮含量的器官分布差异也较大, 叶片中总黄酮含量表现尤为突出, 郭亮村的含量最低, 长寿村和朝阳沟次之, 小五台山的含量最高, 差异显著(图 1)。

从聚类分析的结果看, 中华卷柏全株总黄酮的含量也存在明显的地理分布差异(图 2)。河南省郭亮村为Ⅰ组, 河北省的长寿村、朝阳沟为Ⅱ组, 河北省的小五台山为Ⅲ组, 并且各组间的平均总黄酮含量差异显著, Ⅲ组平均总黄酮含量最高, Ⅰ组平均总黄酮含量最低, 显示出中华卷柏全株总黄酮的含量随着纬度的降低, 呈现出下降的趋势。这与郑燕影等对影响 6 个红树群落中木榄叶片总黄酮含量的因素分析结果相类似^[10]。不过, 他们也认为, 木榄叶片总黄酮含量的变化还与其它环境因子(如年均气温等)相关, 因此, 对于中华卷柏中主要药用成分的地域差异还需做进一步的研究。

参考文献

- [1] 中国科学院植物志编委会. 中国植物志[M]. 6 卷. 北京: 科学出版社, 2004: 87.
- [2] 徐世义. 药用植物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 118.
- [3] 张红伟, 孙晓飞, 田景奎. 卷柏属植物黄酮类成分研究概况[J]. 亚太传统医药, 2007, 10(3): 63-65.
- [4] 付戈妍, 付克, 王洪光, 等. 超声波提取紫花地丁总黄酮及含量测定[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2008, 23(5): 512-513.
- [5] Yu L Y, Li X R, Fang X. Inhibitory effect of total flavonoids from mulberry tree leaf on small intestine disaccharidases in diabetic rats[J]. Chin J Endocrinol Metab, 2002, 18(4): 313-315.
- [6] Shimoi K, Masuda S, Shen B, et al. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice[J]. Mutat Research, 1996, 350(1): 153-161.
- [7] Cushnie T P T, Lamb A J. Antimicrobial activity of flavonoids[J]. Inter J Antimicrob agents, 2005, 26(5): 343-356.
- [8] Davey M P, Bryant D N, Cummins I, et al. Effects of elevated CO₂ on the vasculature and phenolic secondary metabolism of *Plantago maritima*. Phytochemistry, 2004, 65: 2197-2204.
- [9] 董乐萌, 魏建和, 刘玉军, 等. 植物次生代谢产物及相关酶的空间特异性分布研究进展[J]. 中草药, 2009(1): 23-26.
- [10] 郑燕影, 张少华, 刘睿, 等. 影响木榄叶片总黄酮含量的主因素分析[J]. 中国天然药物, 2008, 6(5): 362-366.

Study on the Distribution of Total Flavonoids Content in Nutrient Organs of *Selaginella sinensis* from Different Areas

ZHAO Xin, WU Zi-long, YE Jia, ZHANG Hao, LI Xue-xin

(Biology Department, Handan College, Handan Key Laboratory of Resource Plant, Handan, Hebei 056005)

Abstract: Based on the study on total flavonoid content and distribution of organs of wild *Selaginella sinensis* in different areas, and the extraction conditions of total flavonoids of wild *Selaginella sinensis* were optimized. The results showed that the total flavonoids contents among the different organs were significant, leaf was the first place, stem was second place and root was the least. There were significant differences of total flavonoids contents of *S. sinensis* from different areas too. The root, stem and leaf of *S. sinensis* from Guoliangcun of Henan province were the lowest. They were 0.769, 1.260, 1.621 mg/g respectively. The flavonoids contents in root, stem and leaf of *S. sinensis* from Xiaowutai Mountain of Hebei province were the highest. They were 1.66, 1.30, 1.58 times higher than in Guoliangcun of Henan province respectively. The results of cluster analysis showed that the effect of latitude on total flavonoids contents of *S. sinensis* was great, also identified the optimal extraction conditions of total flavonoids were 60% ethanol, ultrasonic extraction 60 °C 40 min.

Key words: *Selaginella sinensis*; total flavonoids; nutrient organs; area