

金莲花不同花部对总黄酮的贡献度研究

袁铭, 王如峰*, 吴秀稳, 安燕南, 孙震晓*
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**测定金莲花不同花部总黄酮的含量及质量分数,确定各花部对金莲花总黄酮的贡献度。**方法:**比色法测定金莲花不同花部中总黄酮的含量;质量分析法测定不同花部的质量分数;采用数学方法计算各花部对金莲花总黄酮的贡献度。**结果:**金莲花各花部的总黄酮含量为:花萼(6.18%)、花柄(2.84%)、花冠(2.22%)、子房(1.52%)、花蕊群(1.07%)。金莲花各花部的质量分数为:花萼(41.90%)、花蕊群(22.40%)、子房(15.29%)、花冠(10.24%)、花柄(10.17%)。**结论:**金莲花5个花部对总黄酮的贡献度依次为:花萼(72.00%)、花柄(8.19%)、花蕊群(6.85%)、子房(6.54%)、花冠(6.42%),花萼对总黄酮的贡献度最大。

[关键词] 金莲花; 花部; 总黄酮; 含量测定; 贡献度

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0081-03

Investigation on the Contribution of Floral Parts to Total Flavonoids of *Trollius chinensis*

YUAN Ming, WANG Ru-feng*, WU Xiu-wen, AN Yan-nan, SUN Zhen-xiao*

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To ascertain the contribution of different floral parts to the total flavonoids of *Trollius chinensis* and the mainly enriched part of total flavonoids. **Method:** Colorimetric method was employed to assay the content of total flavonoids of different floral parts and gravimetric analysis method was used to determine the mass fraction of floral parts. The contribution degree was calculated with special algorithm. **Result:** The content of total flavonoids in each floral part is as follows: calyx (6.18%), stalk (2.84%), corolla (2.22%), ovary (1.52%), and stamen and pistil (1.07%). The mass fraction of each floral part is as follows: calyx (41.90%), stamen and pistil (22.40%), ovary (15.29%), corolla (10.24%), and stalk (10.17%). **Conclusion:** The contribution of five floral parts to total flavonoids is as follows: calyx (72.00%), stalk (8.19%), stamen and pistil (6.85%), ovary (6.54%), and corolla (6.42%). Calyx is the most enriched part of total flavonoids.

[Key words] *Trollius chinensis*; floral parts; total flavonoids; assay; contribution degree

金莲花是毛茛科金莲花属植物金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 的干燥花^[1]。其功效为清热解毒、消肿明目,主要用于治疗呼吸道感染、咽炎、扁桃体炎和支气管炎^[2-3]。目前发现的金莲花中的化学成分

主要有3类,即黄酮类、酚酸类和生物碱类^[4-10]。黄酮类是金莲花中的重要活性成分,具有抗病毒、抗菌、抗氧化等生物活性^[11-13]。金莲花中的黄酮多为碳苷类化合物,其中以荜草素和牡荆素含量

[收稿日期] 20120425(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073018,81274044);教育部留学回国启动基金项目(以金莲花为例研究中药多组分、多靶点的整体化作用机制)

[第一作者] 袁铭,硕士研究生,从事中药化学成分和生物转化研究,E-mail: yuanminggreat@163.com

[通讯作者] *王如峰,博士,副教授,从事中药化学成分及药物代谢研究,Tel: 010-84738646, E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn;

*孙震晓,博士,教授,从事药物筛选研究,E-mail: sunzxcn@hotmail.com

最高^[14-16]。

从生药学的角度来看,金莲花为两性花,由花萼、花冠、花蕊群(雄蕊和雌蕊)、子房、花柄 5 部分组成^[17-18]。这 5 个花部占完整花总质量的分数以及各花部黄酮的含量决定金莲花总黄酮的含量。明确该问题可帮助确定金莲花总黄酮的主要贡献部分,对金莲花的开发利用和栽培育种具有重要的意义,但是迄今为止,未见相关研究报道。本文采用比色法对 11 批金莲花药材的各花部进行了总黄酮含量测定,采用质量分析法对金莲花各花部进行了质量分数分析,最后通过统计学分析确定了各花部对金莲花总黄酮的贡献度。

1 仪器与试剂

TU-1810APC 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),UV-2100 紫外可见分光光度计(优尼柯仪器有限公司)。KQ-300VDE 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。METTLER AE240 型 1/10 万电子天平。

11 批金莲花药材购自全国各地药材市场和药店,由北京中医药大学中药学院王如峰副教授鉴定为毛茛科金莲花属植物金莲花 *T. chinensis* 的干燥花。荜草素对照品为自制,经归一化法测定其纯度不低于 98.7%。亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醇均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的金莲花各花部 80.00 mg,按照文献方法^[19],用 20 倍量的 95% 乙醇超声提取 2 次,每次 20 min。合并提取液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。取续滤液 2 mL,置于 10 mL 量瓶中,用 95% 乙醇稀释至体积。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的荜草素对照品 20.0 mg,置于 50 mL 量瓶中。加适量 95% 乙醇,50 °C 水浴加热溶解。放冷,用 95% 乙醇稀释至体积。精密量取 25 mL 于 50 mL 量瓶中,用 95% 乙醇稀释至体积,即得对照品溶液。其中荜草素的质量浓度为 200 mg·L⁻¹。

2.3 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加 95% 乙醇至 11 mL,摇匀。然后,分别加入 5% NaNO₂ 溶液 1 mL,摇匀。放置 6 min 后,加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1 mL,摇匀。再放置 6 min 后,加入 4% NaOH 溶液 10 mL。最后,用 95% 乙醇稀释至体积,摇匀。放置 15 min 后,以第一管作为空白对照,用比色法在 510 nm 处测定吸光度,以质量浓度(C)为横坐标,

吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A = 11.2649C + 0.0127$ ($R^2 = 0.9998$),线性范围 8.00 ~ 88.00 μg。

2.4 精密度试验 取同一对照品溶液,连续测定吸光度 6 次,根据结果计算 RSD 0.32%,表明该方法精密度良好。

2.5 稳定性试验 精密量取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 h 显色并测定其吸光度,根据结果计算 RSD 1.42%,表明供试品溶液稳定性良好。

2.6 重复性试验 精密称取同一批金莲花同一花部 6 份,每份 80.00 mg,依法制成供试品溶液,显色并测定其吸光度。根据结果计算 RSD 1.97%,表明该方法重复性良好。

2.7 回收率试验 精密称取已知含量的供试品 6 份,定量加入荜草素对照品,依法进行提取并测定含量,结果见表 1。

表 1 荜草素回收率试验

No.	称样量 /mg	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	40.01	0.388 5	0.200 0	0.595 2	103.35		
2	39.94	0.387 8	0.200 0	0.595 2	103.69		
3	40.02	0.388 6	0.200 0	0.589 4	100.41		
4	39.98	0.388 2	0.200 0	0.586 5	99.16	101.34	1.98
5	39.96	0.388 0	0.200 0	0.592 3	102.15		
6	39.96	0.388 0	0.200 0	0.586 5	99.26		

2.8 样品测定 精密量取不同批次金莲花各花部的供试品溶液 5 mL,置于 25 mL 量瓶中,按标准曲线项下的测定方法测定其吸光度值,按照回归方程计算金莲花各花部总黄酮的含量,结果见表 2。

2.9 各花部质量分数分析 随机选取 6 批金莲花药材,每批取干燥至恒重的完整金莲花 10 朵,将各花部分开,精密称取各花部的质量,结果见表 3。结果表明花萼、花蕊群、子房、花冠、花柄分别占金莲花总质量的 41.90%, 22.40%, 15.29%, 10.24%, 10.17%。

2.10 数据统计分析 根据测定的金莲花各花部总黄酮的含量,通过 SPSS 16.0 软件采用单因素方差分析(One Way ANOVA)及其对应的 Kruskal-Wallis H 检验对实验数据进行分析。结果显示 $P < 0.05$,表明金莲花各花部总黄酮含量存在显著性差异。进一步对各花部总黄酮含量进行两两比较,结果显示 $P < 0.05$,表明各花部两两之间总黄酮含量均具有显著性差异,其中花萼的总黄酮含量最高。

采用下列公式,计算各花部对金莲花总黄酮的贡献度(C):

表2 金莲花各花部的总黄酮含量 %

No.	购买地	花萼	花冠	花蕊群	子房	花柄
1	北京市	5.13	2.14	1.05	1.05	1.65
2	天津市	5.28	1.35	0.92	1.45	3.99
3	吉林长春市	7.15	2.40	0.89	1.13	2.02
4	山东济南市	8.26	2.90	1.39	2.09	2.98
5	山西太原市	6.06	2.26	1.02	1.48	3.21
6	江西南昌市	4.83	2.17	1.25	1.50	2.33
7	河北秦皇岛市	6.10	2.21	1.06	1.63	3.17
8	四川成都市	8.15	2.64	1.16	1.97	3.68
9	河南郑州市	7.20	2.29	0.93	1.24	3.12
10	河北安国市	5.68	2.30	1.13	1.96	2.43
11	河北安国市	4.15	1.81	0.95	1.21	2.64

表3 金莲花各花部质量分数 %

No.	花萼	花冠	花蕊群	子房	花柄
1	39.97	8.69	25.44	14.08	11.82
2	41.37	13.39	20.88	15.03	9.33
3	46.83	10.03	22.21	14.50	6.43
4	33.73	7.99	24.34	17.96	15.98
5	44.08	9.66	23.03	17.34	5.89
6	45.42	11.67	18.52	12.81	11.58

$$C = ab / \sum_{i=1}^a a_i b_i$$

其中,a 为各花部总黄酮含量,b 为各花部的质量分数,所得结果为花萼(72.00%)、花柄(8.19%)、花蕊群(6.85%)、子房(6.54%)、花冠(6.42%)。其中,花萼对总黄酮的贡献度最大。

3 结论与讨论

供试品溶液在 72 h 内稳定性良好,但是显色后应该在 30 min 内立刻测定,因为显色后 0,5,10,15,20,30 min 测定吸光度时,RSD 为 1.77%,而超过 30 min 吸光度明显变小,RSD 值明显增大。荜草素是金莲花中含量最高的黄酮类成分,并具有抗菌、抗病毒作用^[9-11],可以作为金莲花的代表性成分,故选用荜草素作为金莲花各花部总黄酮含量测定的对照品。采用硝酸铝比色法,使对照品与样品的最大吸收波长产生红移,并对其在可见光区进行全波长扫描,得最大吸收波长为 510 nm,故本研究选用 510 nm 作为检测波长来测定总黄酮的含量。

通过本方法测定了购自全国各地的 11 批金莲花药材的 5 个花部的总黄酮含量,发现金莲花各花部之间总黄酮含量存在显著性差异,花萼中含量最高。由于完整金莲花中总黄酮的含量取决于各花部占完整花总质量的分数以及各花部总黄酮的含量,故进行综合分析得出 5 个花部对金莲花总黄酮的贡献度。按贡献度从大到小的顺序依次为花萼、花柄、花蕊群、子房、花冠,并确定花萼为金莲花总黄酮的主要贡献部分。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997:1398.
- [2] 高英,李卫民,伍淑华,等. 均匀设计与正交设计在金莲花提取工艺筛选研究中的比较应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1):1.
- [3] 徐秀泉,许源,汤建,等. 响应面法优化金莲花总黄酮的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 35.
- [4] 吴新安,赵毅民,赵刚. 短瓣金莲花黄酮碳苷类化学成分研究[J]. 2007,32(9):864.
- [5] 李胜银. 金莲花化学成分研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2008.
- [6] Wang R F, Yang X W, Ma C M, et al. Trollioside, a new compound from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2004, 6(2):139.
- [7] Cai S Q, Wang R F, Yang X W, et al. Antiviral flavonoid-type C-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. Chem Biodivers, 2006, 3(3):343.
- [8] Li Z L, Li D Y, Hua H M, et al. Three new acylated flavone C-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(5):426.
- [9] Wang R F, Yang X W, Ma C M, et al. A bioactive alkaloid from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. Heterocycles, 2004, 63(6):1443.
- [10] 刘颖,王如峰,袁铭,等. HPLC 测定金莲花中金莲花苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12):73.
- [11] 涂华,陈碧琼,张燕军. 天然类总黄酮物质的提取工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):277.
- [12] 夏晓晖,张宇,郝砚彬,等. 银杏叶化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9):100.
- [13] 叶锦霞,梁日欣,王岚. 氧化应激与心血管疾病的关系研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(10):68.
- [14] 林秋凤,李药兰,冯顺卿,等. 金莲花活性成分研究[J]. 分析试验室, 2003, 22(11):310.
- [15] 林秋凤,冯顺卿,李药兰,等. 金莲花抑菌抗病毒活性成分的初步研究[J]. 浙江大学学报:理学版, 2004, 31(4):412.
- [16] Li Y L, Ma S C, Yang Y T, et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge [J]. J Ethnopharmacol, 2002, 79:365.
- [17] 黄汉清,童玉懿. 金莲花的生药鉴别[J]. 中药材, 1986, (3):31.
- [18] 庞晓斌,王芳,郭文场,等. 金莲花的生药鉴别与药用[J]. 特种经济动植物, 2002, (10):24.
- [19] 严立群,朱殿龙,丁万隆. 金莲花和短瓣金莲花茎叶中总黄酮含量的动态测定[J]. 中国现代中药, 2008, 10(9):12.

[责任编辑 顾雪竹]