

· 论著 ·

蕲艾挥发油、总黄酮和鞣质含量测定及最佳采收期确定

胡吉清¹, 夏恒建², 郭双喜², 张熔³, 李路扬¹, 龙妮芳¹, 万定荣¹

(¹中南民族大学药学院, 武汉 430074; ²李时珍医药集团有限公司, 湖北蕲春 435300; ³湖北浠水县农业局, 湖北浠水 438200)

摘要:目的: 通过对艾叶道地产区蕲春县不同采集地、采收期蕲艾挥发油、总黄酮和鞣质含量进行测定, 确定其最佳采收期, 并考察蕲艾的质量, 为该道地药材的合理采收提供依据。方法: 应用水蒸气蒸馏法提取测定挥发油含量; 采用紫外-可见分光光度法, 以芹菜素为对照品, 测定总黄酮含量; 采用磷钼钨酸-干酪素比色法, 以没食子酸为对照品测定鞣质的含量。结果: 不同采收期各蕲艾样品挥发油含量差异不大; 总黄酮含量随生长时间延长而增加, 至6月上旬达最高; 鞣质含量差异较大, 5月下旬或6月上旬达最大值。蕲春县不同产地蕲艾样品挥发油、总黄酮和鞣质含量有一定差异。结论: 6月上旬为最佳采收期; 蕲春县9个采集地的蕲艾样品中, 初步认为竹林湖、鸪鹰岩水库区域的栽培品及独山村野生艾叶质量较好, 值得进一步研究。

关键词: 蕲艾; 挥发油; 总黄酮; 鞣质; 含量测定; 采收期

基金资助: 湖北省科技惠民计划项目 (No.鄂财教发[2014]179号)

Detection of essential oils, total flavonoids and tannins contents in qiai and determination of optimum harvest time

HU Ji-qing¹, XIA Heng-jian², GUO Shuang-xi², ZHANG Rong³, LI Lu-yang¹, LONG Wei-fang¹, WAN Ding-rong¹

(¹College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China; ²LI Shi-zhen Pharmaceutical Group Co., Ltd., Qichun 435300, China; ³Agricultural Bureau of Xishui County in Hubei Province, Xishui 438200, China)

Abstract: Objective: To determine the optimum harvest time and evaluate the quality of qiai by detecting the contents of essential oils, total flavonoids and tannins in the samples collected in different areas and harvest time from the genuine region-Qichun County, which could provide evidence for optimum harvest time of genuine regional drug. Methods: The content of the essential oils was extracted and detected by steam distillation. The content of total flavonoids was detected by UV-spectrophotometry with apigenin as reference substance. And the content of tannins was detected by tungsten molybdophosphate-casein colorimetric method with gallic acid as reference substance. Results: The contents of the essential oils had no obvious differences in the samples of different harvest periods. Total flavonoids content increased along with the time of growing, and reached to the highest level in early June. Great differences were found in the contents of tannins, which reached to maximum in late May or early June. The contents of the essential oils, total flavonoids and tannins in the samples collected from different places of Qichun County had certain differences. Conclusion: The optimum harvest time of qiai is early June. The quality of cultivated samples from Zhulin Lake, Yaoying Yan Reservoir and wild samples from Dushan Village is better than other samples collected from nine habitats of Qichun, which deserves further study.

Key words: Qiai; Essential oils; Total flavonoids; Tannins; Content detection; Harvest time

Funding: Science and Technology Program for Public Wellbeing of Hubei Province (No.[2014]179)

艾叶为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl.et Van. 的干燥叶。其性温, 味辛、苦, 具有温经止血、散寒止

痛的功效。用于吐血、衄血、崩漏、月经过多、胎漏下血、少腹冷痛、经寒不调、宫冷不孕, 外用治皮肤

瘙痒^[1]。全国各地均产艾,但已公认湖北“蕲州”(今蕲春县及邻近地域)者为佳,谓之蕲艾。现代研究表明,艾叶的主要活性物质有挥发油、黄酮和鞣质。其挥发油具有抗菌^[2]、抗病毒、抗炎、抗过敏、镇痛^[3-4]、平喘、镇咳、祛痰^[5-6]、护肝利胆^[7]、抗肿瘤^[8]、增强细胞免疫功能、抗疲劳^[9-11]等活性,黄酮类化合物具有清除自由基、抗氧化、抗衰老^[12]、增强机体免疫力、抗癌防癌^[13-14]等作用,鞣质具有止血等作用。

历代本草对艾叶的采收期均有记载,一般认为,应在农历三月三日和五月五日采。近代药学著作对艾叶的采收期也作了要求,大致为6月花未开前采摘。现代研究中,仅见以挥发油为指标确定蕲艾的采收期,笔者以挥发油、总黄酮和鞣质含量为指标对蕲春县多采集地的样品进行分析,为确定蕲艾最佳采收期和质量评价提供了依据。

材料

1. 仪器 UV-1800PC型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)、AB256-S型1/10万电子分析天平(瑞士METTLER TOLEDO)、DFD-700型水浴锅(东方电工)、挥发油提取器(武汉杰恒达工贸有限公司)、98-1-B型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司)、SB25-12DTD超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2. 试剂 磷钼钨酸试液按照2010版《中华人民共和国药典》一部附录XVB进行配制。全部试剂均为分析纯;水为蒸馏水。芹菜素对照品(批号:111901-201102,供含量测定用,纯度为99.6%)、没食子酸对照品(批号:110831-200302,供含量测定用),均购于中国食品药品检定研究院。

3. 药材样品 实验用蕲艾样品于2014年5月12日至2014年7月1日期间分别采自蕲春县境内的李时珍医药集团院内、鹤鹰岩水库栽培基地、竹林湖基地、三江村和独山村野外。另有2014年6月2日采集于三江村山上、张榜基地、江满春基地和宋勇基地的样品各一批。除独山村为野生品外,其余均为栽培品。所有样品经万定荣教授鉴定均为菊科植物艾*Artemisia argyi* Levl.et Van.的干燥叶(阴干品)。

方法与结果

1. 挥发油含量测定 取各剪碎样品约50g,精密称定(平行3份),照2010版《中华人民共和国药典》挥发油测定法(附录XD)进行测定,见表1。

2. 总黄酮含量测定

2.1 供试品溶液的制备 取样品粉末约1g(过3号筛),精密称定,置100mL圆底烧瓶中,精密加入

70%甲醇50mL,称定重量,85℃水浴回流1h,放冷,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5mL,置25mL容量瓶中,加70%甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芹菜素对照品4.01mg,置100mL容量瓶中,加70%甲醇适量使溶解并定容至刻度,即得。

2.3 测定波长选择 精密量取供试品溶液和对照品溶液各0.5mL,分别置于10mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀。用分光光度计在200-760nm波长范围内进行扫描,二者均在338nm处有较强吸收,故选择338nm为测定波长。

2.4 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液0.5、1、2、4、6、8、10mL,分别置25mL量瓶中,加70%甲醇至刻度,摇匀,以70%甲醇为空白,照紫外-可见分光光度法,在338nm处分别测定吸光度。以吸光度A为纵坐标(Y),对照品溶液的浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标(X),绘制标准曲线,计算得回归方程为 $Y=0.0809X-0.0021$ ($r=0.9999$),表明在0.7988-15.9758 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,芹菜素浓度与吸光度呈良好的线性关系。

2.5 测定方法的确定 精密量取供试品溶液1mL于25mL容量瓶中,加70%甲醇定容至刻度,摇匀,以70%甲醇为空白,在338nm波长处测定吸光度,按标准曲线计算总黄酮的含量。

2.6 方法学考察 以鹤鹰岩水库栽培基地样品(2014年6月16日)为代表,进行方法学考察。

2.6.1 重复性实验:取样品粉末约1g,精密称定,按“2.1”项下方法制备供试品溶液并按“2.5”项下方法操作,测定6次。其测定结果的RSD为0.1%,表明该测定条件下仪器的精密度良好。

2.6.2 重现性实验:取样品粉末约1g,精密称定,平行6份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液并按“2.5”项下方法进行测定。计算得总黄酮含量平均值为4.20%,RSD为1.3%,表明该方法重现性良好。

2.6.3 加样回收试验:取已知总黄酮含量的样品粉末约1g,共6份,精密称定,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,分别精密量取1mL于50mL容量瓶中,各加入对照品溶液4mL(含对照品0.1598mg),按“2.5”项下方法测定,计算芹菜素对照品的平均回收率为98.72%,RSD值为1.1%。表明该方法准确度较高。

2.6.4 稳定性试验:取样品粉末约1g,精密称定,按“2.1”项下方法制备供试品溶液并按“2.5”项下方法,分别于0、2、4、6、8、12、24h测定其吸光度,

按标准曲线计算总黄酮的含量,并计算得RSD为0.4%,表明供试品溶液中总黄酮成分在24h内稳定性良好。

2.7 样品总黄酮含量测定 取各样品粉末(过3号筛)约1g,精密称定(平行3份),按“2.1”项下方法制备供试品溶液,并按“2.5”项下方法进行测定。结果见表1。

3. 鞣质含量测定 取各样品粉末(过3号筛)约1g,精密称定(平行3份),按照2010版《中华人民共和国药典》鞣质含量测定法(附录XB)[没食子酸为对照品,对照品溶液的浓度(mg/mL)为横坐标(X),吸光度A为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算得回归方程为 $Y=102.45X+0.0622$, $r=0.9999$],进行测定。结果见表1。

4. 含量测定结果 按上述各方法对各样品进行测定,结果见表1。

表1 不同采收期5个采集地蕲艾样品含量测定结果

采集地	采集时间	挥发油 (mL/100g)	总黄酮 (%)	总鞣质 (%)	
鹄鹰岩水库	2014-5-12	1.10	4.53	1.21	
	栽培基地	2014-5-19	0.90	4.38	0.82
		2014-5-26	1.00	5.37	1.16
		2014-6-2	0.80	5.52	3.26
	2014-6-9	0.94	6.95	2.89	
	2014-6-16	1.03	4.64	0.89	
	2014-5-12	1.08	1.50	0.30	
集团院内 (栽培品)	2014-5-19	0.98	2.05	0.40	
	2014-5-26	0.82	2.72	1.07	
	2014-6-9	0.70	3.35	0.96	
	2014-5-12	1.08	2.43	1.27	
竹林湖 栽培基地	2014-5-19	0.94	3.83	1.34	
	2014-6-2	1.14	5.58	0.98	
	2014-6-9	1.03	6.08	1.62	
独山村 (野生品)	2014-5-12	1.16	2.11	1.16	
	2014-5-19	1.00	2.39	1.25	
	2014-5-26	1.00	4.29	2.23	
	2014-6-2	1.00	5.89	1.00	
三江村湖边 (栽培品)	2014-6-9	1.24	6.17	1.94	
	2014-5-12	1.16	2.34	1.13	
	2014-6-2	1.20	3.25	1.79	
	2014-6-16	1.12	3.68	1.85	
	2014-7-1	1.22	1.94	0.45	

讨论

1. 总黄酮含量测定对照品和提取条件的选择 现代研究中多以芦丁和槲皮素作为艾叶中总黄酮含量测定的对照品,本实验对芦丁、槲皮素、木犀草素和芹菜素等黄酮类成分对照品溶液与供试品溶液进行了全波长扫描,结果仅芹菜素对照品溶液与供试品溶液有相同的最大吸收波长,且艾叶中含有芹菜素成分,首次以芹菜素为对照品测定艾叶总黄酮含量。

经过考察提取溶剂(甲醇、无水乙醇)、提取方式(超声、回流提取法)、溶剂浓度(50%、60%、70%、80%、90%)、料液比(1:20、1:30、1:40、1:50、1:60g/mL)及提取时间(0.5、1、1.5、2、2.5、3h)对提取效率的影响,结果以50倍量70%甲醇回流提取1h,艾叶总黄酮的提取效率较佳。

2. 采收期对挥发油等活性物质含量的影响 研究表明,不同采收期艾叶样品挥发油含量差异不大;总黄酮含量随植株生长呈上升趋势,至6月上旬达最高;鞣质含量随生长时间变化差异较大,5月下旬或6月上旬达最大值。根据栽培和野生的艾的生长情况,至6月上旬时,枝繁叶茂,以挥发油、总黄酮和鞣质含量为指标,综合考虑艾叶的品质与产量,认为6月上旬为最佳采收期。

传统经验认为,蕲艾应于端午节前后采收,由于不同年份端午节日期(公历)从5月底到6月下旬前后相差近一个月,平均日期在6月10日左右,故传统经验对蕲艾采收期的认识是基本正确的。而6月中旬以后,蕲艾植株下部叶渐枯萎或脱落,产量逐渐减低,且总黄酮、鞣质含量减少,此时艾叶品质下降。

除对上述不同采集地不同采收时间的蕲艾样品进行了挥发油等几种活性物质的比较研究外,还同时对2014年6月2日采集于湖北蕲春多个其它产地的蕲艾样品以及同时间采集于全国10个省区的艾叶样品进行了上述成分的比较研究,发现蕲春县不同产地的样品,其挥发油含量有一定差异,其中竹林湖栽培基地、鹄鹰岩水库栽培样品及独山村野生品质量较优,可能与生长或种植环境及栽培方式等相关。与全国各地的艾叶相比,蕲春产艾叶挥发油成分的平均含量显著高于或略高于全国各地产艾叶样品挥发油含量,这从实验上验证了蕲艾药材的道地性。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.北京:中国医药科技出版社,2010:83
- [2] 刘先华,周安,刘碧山,等.艾叶挥发油体内外抑菌作用的实验

- 研究.中国中医药信息杂志,2006,13(8):25-26
- [3] 杨红菊,于庆海.艾叶挥发油对速发型(I型)变态反应的作用研究.沈阳药科大学学报,1995,12:124
- [4] 蒋涵,侯安继,项志学,等.蕲艾挥发油的抗炎、抗过敏和镇痛作用.医学新知杂志,2005,15(2):36-39
- [5] 谢强敏,卞如濂,杨秋火,等.艾叶油的呼吸系统药理研究 I,支气管扩张、镇咳和祛痰作用.中国现代应用药学杂志,1998,16(4):16-18
- [6] 谢强敏,唐法娣,王砚,等.艾叶油的呼吸系统药理研究 II,抗过敏作用.中国现代应用药学杂志,1999,16(5):3-6
- [7] 胡国胜.艾叶油利胆作用的实验研究.贵阳中医学院学报,1988(3):52-53
- [8] 孙伟,肖家祁,王淳凯,等.精油对人鼻咽癌细胞生长抑制的研究.上海中医药杂志,2005,39(9):53-55
- [9] 黄菁,陈友香,侯安继,等.蕲艾挥发油对小鼠的免疫调节作用.中药药理与临床,2005,21(2):21-22
- [10] 隆雪明.艾叶挥发油的免疫作用及其对部分细胞因子mRNA表达的影响.长沙:湖南农业大学,2008
- [11] 蒋涵.蕲艾挥发油的药效学实验研究.武汉:武汉大学,2005
- [12] 袁慧慧,殷日祥,陆冬英,等.艾叶提取工艺及抗氧化活性的研究.华东理工大学学报(自然科学版),2005,31(6):768-771
- [13] Toru Nakasug,Mika Nakashima,Kotchiro Komal.Antimutagens in Gaiyou(*Aemisia argyi* Levl. et Vant.).J Agric Food Chem, 2000,48(8):3256-3266
- [14] Jeong-Min Seo,Hyun-Mi Kang,Kwang-Hee son,et al.Antitumor activity of flavones isolated from *Artemisia argyi*.Planta Med,2003, 69(3):218-222
- [15] 张袁森,张琳,倪娜,等.艾叶的体外凝血作用实验研究.天津中医药,2010,27(2):156-157

(收稿日期:2015年4月29日)

· 论著 ·

杜仲含药血清对成骨细胞的影响

曹旭¹, 向文英¹, 陆苑^{1,2}, 陈鹏程¹, 孙佳^{1,2}, 王爱民^{2,3}

(¹贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004; ²贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; ³贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

摘要:目的:研究不同浓度杜仲含药血清对体外培养小鼠MC3T3-E1 Subclone 14成骨细胞增殖、分化的影响。方法:大鼠灌胃给予杜仲后制备含药血清,取MC3T3-E1 Subclone 14成骨细胞,分别加入空白血清(空白对照组)和含2%、5%、10%的杜仲含药血清(给药组)的培养基培养,用MTT法检测MC3T3-E1 Subclone 14成骨细胞增殖情况,ELISA法检测细胞中的碱性磷酸酶(ALP)、骨钙蛋白(OTC)、破骨细胞抑制因子与核因子 κ B受体活化因子配体(OPG/RANKL)系统活性。结果:与空白对照组同浓度比较,杜仲含药血清各浓度明显促进细胞增殖并上调ALP、OTC、OPG/RANKL的比值($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:杜仲能促进体外培养的MC3T3-E1 Subclone 14成骨细胞增殖与分化。

关键词:杜仲; 含药血清; MC3T3-E1 Subclone 14细胞; 增殖; 分化; 碱性磷酸酶; 骨钙蛋白; OPG/RANKL

基金资助:国家自然科学基金项目(No.81560683), 国家科技支撑计划课题(No.2013BAI11B01), 贵州省科技重大专项项目(No.黔科合重大专项字[2012]6009号), 贵州省中药现代化专项项目(No.黔科合中药字[2013]5062号), 贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项课题(No.Z10)

Effects of serum containing eucommia ulmoides on osteoblasts *in vitro*

CAO Xu¹, XIANG Wen-ying¹, LU Yuan^{1,2}, CHEN Peng-cheng¹, SUN Jia^{1,2}, WANG Ai-min^{2,3}

(¹Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

²School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; ³Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Drug and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

通讯作者: 王爱民, 贵州省贵阳市云岩区北京路九号贵州医科大学药学院, 邮编: 550004, 电话: 0851-6908468

E-mail: gywam100@163.com