

不同海拔高度地区沙棘果中总黄酮含量的研究

马建滨 都玉蓉 (青海师范大学生命地理科学学院, 青海西宁 810008)

摘要 [目的] 研究不同海拔高度地区沙棘果中的总黄酮含量。[方法] 于2007年9月在青海大通、甘肃天水、山西右玉、辽宁建平不同海拔高度地区采集沙棘果, 榨汁后沉淀, 然后将沉淀物在室温下晾干并粉碎, 之后进行超临界萃取, 采用分光光度法对沙棘果中的总黄酮含量进行测定。[结果] 青海大通沙棘果的总黄酮含量最高, 为1.27%, 然后依次是甘肃天水沙棘果、山西右玉沙棘果、辽宁建平沙棘果, 总黄酮含量分别为1.13%、0.95%、0.89%, 可见, 高海拔地区沙棘果中的总黄酮含量显著高于低海拔地区沙棘果中的总黄酮 ($P < 0.05$)。[结论] 不同海拔高度地区的沙棘果中的总黄酮含量存在明显差异。

关键词 沙棘; 海拔高度; 总黄酮含量

中图分类号 S793.6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)25-10942-01

Study on Total Flavonoids Content in Seabuckthorn Fruit from Different Altitude Areas

MA Jianbin et al (College of Life and Geography Science, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008)

Abstract [Objective] The aim was to study the total flavonoids content in seabuckthorn fruit from different altitude areas. [Method] The seabuckthorn fruits were collected from different altitude areas of Datong in Qinghai, Tianshui in Gansu, Youyu in Shanxi and Jianping in Liaoning in September of 2007 and they were deposited after juicing, then the deposits were dried and grinded for the supercritical fluid extraction. The total flavonoids content in seabuckthorn fruit was detected by the spectrophotometry. [Result] The total flavonoids content in seabuckthorn fruit from Datong in Qinghai was highest, being 1.27%, followed by that from Tianshui in Gansu, Youyu in Shanxi and Jianping in Liaoning, being 1.13%, 0.95% and 0.89%, resp. It can be seen that the total flavonoids content in seabuckthorn fruit from high altitude area was significant higher than that in the low altitude area ($P < 0.05$). [Conclusion] The total flavonoids content in seabuckthorn fruit from different altitude areas existed obvious difference.

Key words Seabuckthorn; Altitude; Total flavonoids content

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 是胡颓子科 (Elaeagnaceae) 沙棘属的一种野生浆果植物, 是世界上公认的珍贵药食同源植物。黄酮类化合物是一类具有重要生物活性的物质, 是沙棘中的主要活性成分, 能显著增加冠状动脉血流量, 增加心肌营养血流量, 降低心肌耗氧量, 抑制血小板聚集, 预防心脑血管疾病等^[1-3]。近几年来沙棘在工业上的需求呈现出明显的增长趋势^[4]。笔者对产自不同地区的沙棘经超临界萃取后的总黄酮含量进行测定, 旨在为相关研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料 沙棘于2007年9月分别采自青海大通、甘肃天水、山西右玉和辽宁建平。仪器与试剂: 752型紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司); JA1003电子天平; 异鼠李素(中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110860-200406); 无水乙醇、三氯化铝均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 样品的预处理。 将沙棘果通过榨汁后沉淀, 然后将沉淀物(果泥)在室温下晾干并粉碎, 进行超临界萃取, 提至无沙棘果油放出为止, 作为被测样品。

1.2.2 对照品溶液的制备。 精密称取在100℃干燥至恒重的异鼠李素, 加无水乙醇至制成每1 ml含20 μg的溶液作为对照品溶液(即0.020 ng/ml)。

1.2.3 样品溶液的制备。 取脱脂果泥2.000 g, 烘干恒重后, 加无水乙醇约80 ml, 在80℃水温下回流提取1 h, 过滤, 转移至100 ml容量瓶中, 冷却至室温, 用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

1.2.4 线性关系分析。 精密吸取对照品溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml分别置于25 ml容量瓶中, 各加浓度1%三氯化铝无水乙醇溶液1 ml, 用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 放置10 min, 以相应试剂(浓度1%三氯化铝无水乙醇溶液1 ml置25

ml容量瓶中, 加无水乙醇至刻度)为空白, 在430 nm波长处测定吸收度, 分析溶液吸收度与浓度的线性关系。

1.2.5 样品测定。 量取供试品溶液1 ml各5份, 置25 ml容量瓶中, 各加浓度1%三氯化铝无水乙醇溶液1 ml, 用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀; 另取未加显色剂的同样量供试品溶液作空白, 自“放置10 min”起, 依次测定吸收度。根据标准曲线计算得到每份供试品溶液中总黄酮浓度 M (ng/ml), 代入公式计算每份供试液中的总黄酮含量, 取平均值, 即为果泥样品中的总黄酮含量(%, $RSD < 3\%$)。

$$\text{总黄酮含量} = \frac{M \times V}{1000 \times m} \times 100\% = \frac{M \times 100}{1000 \times 2.00} \times 100\% = 0.05 M \times 100\%$$

式中, M 为样品总黄酮浓度 (ng/ml); V 为供试液体积 (ml); m 为样品称样量 (g)。

2 结果与分析

2.1 线性关系分析结果 以吸收度为纵坐标, 浓度 (ng/ml) 为横坐标, 得回归方程: $Y = 3.000 X + 0.069$ ($r = 0.9997$)。

2.2 样品分析结果 由表1可知, 不同产地中, 高海拔地区的沙棘中黄酮含量比低海拔地区沙棘中黄酮含量显著升高。

表1 沙棘果泥原料总黄酮含量

Table 1 Total flavonoids content in raw materials of seabuckthorn fruit paste

产地	总黄酮含量 %	平均海拔 m
Producing area	Total flavonoids content	Average altitude
青海 Qinghai	1.27 ± 0.10 aA	2 800
甘肃 Gansu	1.13 ± 0.12 aAB	1 700
山西 Shanxi	0.95 ± 0.09 aB	1 360
辽宁 Liaoning	0.89 ± 0.05 bB	800

注: 样品数均为8; 同列数据后不同小写字母表示在0.05水平有差异, 不同大写字母表示在0.01水平有差异。

Note: The number of samples is 8. Different capital letters behind the data mean differences at 0.01 level. Different lowercases mean differences at 0.05 level.

作者简介 马建滨(1965-), 男, 青海西宁人, 副教授, 从事资源生物及天然产物开发研究。

收稿日期 2008-06-06

(下转第10953页)

$\times 10^5$ 个/ml 的细胞悬液,按每孔200 μ l 接种于96 孔板中,每孔加入2 μ l 不同浓度的样品或空白溶液,37 $^{\circ}$ C 下培养24 h。取药物作用下培养后的细胞,首先在光学显微镜下观察药物处理引起的形态学变化,判断有无细胞周期抑制以及细胞凋亡或细胞坏死的形态学特征。每孔细胞中加入浓度80% 三氯醋酸50 μ l,置于4 $^{\circ}$ C 固定1 h,用水冲洗5 次,空气干燥。每孔加入浓度0.4% SRB 的醋酸溶液50 μ l,并在室温静置30 min。用浓度1% 醋酸水清洗4 次,除去未结合的游离SRB 染料。每孔加入150 μ l 10 mmol/L Tris 缓冲液(pH 值10.5) 溶解蛋白结合染料,并利用酶标仪测定每孔在波长570 nm 处的光密度值(OD)。在同一块96 孔板中,样品的每个浓度均设置3 孔,另设3 孔空白对照和无细胞调零孔(若药物有颜色,则要做相应药物浓度无细胞调零)。各孔 OD 先做相应无细胞调零,再取3 孔平均 OD。按以下公式计算每个浓度下的细胞增殖抑制率(IR)。

$$IR = (OD_{\text{空白对照}} - OD_{\text{样品}}) / OD_{\text{空白对照}} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与分析

以抑制 K562 细胞增殖为指标,对207 株冬凌草根际微生物发酵产物进行抗肿瘤活性筛选。由表1 可知,在100 μ g/ml 浓度下,对 K562 细胞增殖活性抑制率大于40% 的活性菌株共有27 株,阳性率为13.0%。活性菌株包括放线菌13 株(11.6%)、真菌14 株(14.7%)。由表2 可知,编号为 THSF-093、THSF-014、THSF-025、THSF-016、THSF-077 的真菌和编号为 THSA-015、THSA-006、THSA-107、THSA-081、THSA-009 的放线菌发酵样品明显抑制 K562 细胞增殖活性,在镜检下可观察到使 K562 细胞发生明显的坏死性形态变化并伴有部分细胞凋亡。

表1 冬凌草根际微生物抗肿瘤活性菌株筛选结果

Table 1 The screening results of anti-tumour active strains from the rhizosphere microorganisms of *Rabdosia rubescens*

种类 Species	分离菌株 Number of isolated strains	活性菌株 Active strains	
		数量 Number	百分比 % Percentage
放线菌 Actinomycete	112	14	12.5
真菌 Fung	95	13	13.7
总计 Total	207	27	13.0

3 小结与讨论

根际土壤通常是指去掉根部大块土壤、有机质后仍然粘附在根表面的土壤,该区域一般仅几毫米宽。在植物、土壤和微生物的相互作用下,根际区域形成了特殊的土壤生态系统,其理化、生物学特性等有别于非根际生态系统^[6]。根际土壤微生物生活在植物的根际周围,形成一个相对稳定的微生态环境。目前,人们正采取各种手段寻找新的高效药物,

其中微生物作为一类资源有其独特的优势。微生物形体极小,代谢类型多样,生长繁殖速度惊人,所以它既可以提供多样化的产品,又适于人工控制条件下的大规模生产。从分子生物学观点来看,微生物的基因组较小,调控系统相对简单,进行基因操作要比动植物容易得多。对微生物资源的开发,不存在“过度”问题,也不会因开发造成原产地微生物资源减少或绝灭的问题^[7]。根际土壤微生物作为一种新兴的微生物资源,同样具备以上优势,具有广阔的开发前景。

表2 活性菌株对 K562 细胞增殖的抑制作用

Table 2 The inhibition of active strains to the proliferation of K562 cells %

序号 No.	菌株编号 Strain code	抑制率 Inhibition rate	序号 No.	菌株编号 Strain code	抑制率 Inhibition rate
1	THSA 015	60.3	15	THSF 093	70.9
2	THSA 006	58.2	16	THSF 014	67.1
3	THSA 107	58.2	17	THSF 025	66.9
4	THSA 081	50.9	18	THSF 016	59.2
5	THSA 009	50.6	19	THSF 077	51.7
6	THSA 020	49.7	20	THSF 038	51.4
7	THSA 021	48.5	21	THSF 090	46.6
8	THSA 102	47.4	22	THSF 005	46.3
9	THSA 023	47.0	23	THSF 033	44.0
10	THSA 042	45.5	24	THSF 051	41.2
11	THSA 051	45.2	25	THSF 062	40.7
12	THSA 067	44.4	26	THSF 073	40.4
13	THSA 079	44.1	27	THSF 023	40.0
14	THSA 028	42.5			

国内外对植物根际土壤微生物进行了广泛研究,但其微生物学机理尚不清楚。从根际微生物中寻找活性代谢产物的研究鲜有报道。该文利用体外抗肿瘤筛选模式筛选出207 株冬凌草根际土壤微生物,得到活性菌株27 株。从植物根际土壤微生物中寻找抗肿瘤活性菌株的研究尚属首次。研究结果表明,药用植物根际土壤微生物可能是寻找抗肿瘤活性代谢产物的良好资源。

参考文献

- [1] 左海军,李丹,吴斌,等.冬凌草的化学成分及其抗肿瘤活性[J].沈阳药科大学学报,2005,22(4):258-262.
- [2] 薛健,宋洁,沈彩霞.冬凌草的抗肿瘤作用研究[J].时珍国医国药,2007,18(9):2277-2288.
- [3] 卢海英,梁敬钰,陈荣.冬凌草的化学成分[J].中国天然产物,2007,5(4):269-271.
- [4] 许光辉,郑洪元.土壤微生物分析方法手册[M].北京:中国农业出版社,1996.
- [5] 张均田.现代药理实验方法[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:822-823.
- [6] 郑艳.中药材的地道性与根际土壤微生物[J].现代中药研究与实践,2007,21(6):60-63.
- [7] 姜成林,徐丽华.微生物资源开发利用[M].北京:中国轻工业出版社,2001:1-3.

[J].沙棘,2001,12(3):28-30.

- [3] 刘风云.沙棘总黄酮的药理研究概况[J].中药材,2004,27(2):145-147.
- [4] 高彦祥,崔亚娟.沙棘中黄酮类化合物的研究进展[J].饮料工业,2006,9(1):17-23.

(上接第10942页)

参考文献

- [1] 金怡,姚敏.沙棘的研究概况[J].中医药信息,2003(3):21-22.
- [2] 刘朵花,李建辉,吴伸.沙棘果肉和叶中黄酮类化合物组分的比较研究