DOI:10.3969/j. issn. 1000-9760. 2018. 04. 002

# 蒲公英总黄酮含量测定及对小鼠体液免疫功能的影响*

孙珊珊[1]　张　千[2]　丁　林[1]　刘树玲[1]　刘玉国[1]　李艳芝[1△]

([1] 济宁医学院药学院，日照 276826；[2] 济宁市食品药品检验检测中心，济宁 272000)

**摘　要　目的**　研究不同采集时间蒲公英(根、叶、花)总黄酮含量变化规律及含量最高时期蒲公英根、叶、花总黄酮对小鼠体液免疫功能的影响。**方法**　超声提取法提取蒲公英中总黄酮,用 HPD-400 型大孔树脂进行纯化,紫外分光光度法测定总黄酮含量;溶血素测定法测定小鼠体液免疫功能。**结果**　蒲公英总黄酮含量 4 月 10 日采集的最高。同一时期蒲公英根、叶、花中总黄酮含量高低为花 > 叶 > 根。蒲公英根、叶、花总黄酮均有增强小鼠体液免疫的作用,其中花作用最强,与黄芪精口服液组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　不同时期蒲公英根、叶、花中总黄酮含量不同,4 月 10 日采集的蒲公英花含量最高;蒲公英花总黄酮增强小鼠体液免疫的作用最强。

**关键词**　蒲公英;总黄酮;含量测定;体液免疫

**中图分类号**:R284.1　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-9760(2018)08-235-03

## Determination of total flavonoids content and effects of Taraxacum mongolicum Hand. Mazz. on humoral immune function in mice

*SUN Shanshan*[1], *ZHANG Qian*[2], *DING Lin*[1], *LIU Shuling*[1], *LIU Yuguo*[1], *LI Yanzhi*[1△]

([1] *School of Pharmacy*, *Jining Medical University*, *Rizhao* 276826, *China*;

[2] *Jining City Food and Drug Inspection Testing Center*, *Jining* 272000, *China*)

**Abstract**: ***Objective***　To study the changes of total flavonoids in different stages of Taraxacum mongolicum Hand. Mazz. (root, leaf, flower) and the effects of total flavonoids on the humoral immune function in mice. ***Methods***　Total flavonoid was extracted by ultrasonic extraction method and purified by HPD-400 macroporous resin. Ultraviolet spectrophotometric method was used for the determination of the content of total flavones of T. mongolicum Hand. Mazz. in different periods, and hemolysin assay method was used for determination of humoral immune function. ***Results***　The content of total flavonoids of root, leaf and flower from T. mongolicum Hand. Mazz. were different in different periods. In the same period, the content of total flavonoids from high to low was flower > leaf > root. The total flavonoids of root, leaf and flower from T. mongolicum Hand. Mazz. could enhance humoral immune effect (compared with negative control group, $P<0.05$). The total flavonoids of flower had the strongest effect in enhancing humoral immune function in mice. Compared with Astragalus essence oral liquid there was not statistically significant ($P>0.05$). ***Conclusion***　The content of total flavonoids of flower from T. mongolicum Hand. Mazz. was collected in April 10 which was much higher than others. The total flavonoids of flower had the strongest effect in enhancing humoral immune function in mice.

**Keywords**: Taraxacum mongolicum Hand. Mazz.; Total flavonoids; Content determination; Humoral immunity

*[基金项目]济宁医学院青年教师科研扶持基金重点项目(JY2016KJ010Z);济宁医学院教师科研扶持基金(JY2017KJ048)

△[通信作者]李艳芝,E-mail:461328261@qq.com

蒲公英为常用的药食两用中药材，其嫩苗是人们喜爱的野菜，含有多种维生素和人体所必需的常量和微量元素[1-2]，具有很高的食用价值，食用历史悠久，早在《唐本草》中就有记载[3]。蒲公英含有黄酮类、萜类等化学成分[4-5]，具有免疫调节等作用[6]。本文探讨了不同采收期蒲公英根、叶、花中总黄酮含量变化规律，并观测其对小鼠体液免疫功能的影响，为其合理采收利用及药效学应用提供科学依据。

## 1　材料和方法

### 1.1　材料

**1.1.1**　原料及试剂　蒲公英药材采集于山东日照，经济宁医学院药学院王建安副教授鉴定，采集时间 3 月 25 日至 6 月 25 日，期间每月 10 日、25 日采摘，采集总量为 500g，50℃烘干后备用。样品保存于济宁医学院药学院中药标本室。槲皮素对照品（南昌贝塔生物科技有限公司）。HPD-400 型大孔树脂购自上海劲凯树脂有限公司。Drabkin 试剂（D5941-6VL, Sigma 公司）。

**1.1.2**　实验动物　清洁级 KM 小鼠，(20 ± 2)g，雌雄兼用；新西兰家兔，(2 ± 0.2)kg；豚鼠，(200 ± 20)g。以上动物均采购于山西医科大学动物中心（生产许可编号 2009-0001），动物实验符合实验福利和动物伦理学的要求。

**1.1.3**　仪器　紫外可见分光光度计（UV754N，上海精科实业有限公司）；离心机（LD5-2A，北京雷勃尔离心机有限公司）；超声波提取机（昆山市超声仪器有限公司）。

### 1.2　总黄酮含量测定

**1.2.1**　供试品溶液的制备　将采集于不同时期的蒲公英根、叶、花药材，50℃干燥，粉碎过 40 目筛，分别称量药材粉末 100g，加入 65% 乙醇 50ml 浸泡 30min 后，在 60℃、80KHz 的频率下超声提取 3 次，每次 20min，冷却后抽滤合并提取液，旋转蒸发回收溶剂得提取浸膏，按照文献[7]进行纯化，回收洗脱液得浸膏，再用甲醇将浸膏溶解，将其转移至 100ml 容量瓶中，加甲醇定容，摇匀得待测液。

**1.2.2**　对照品溶液的配制　用万分之一分析天平称取槲皮素对照品 0.0100g，用甲醇溶解后转移至 100ml 容量瓶，甲醇定容，得槲皮素对照品溶液，浓度为 0.1 mg/ml。

**1.2.3**　检测波长的选择　取蒲公英供试品溶液和槲皮素对照品溶液，按照文献[7]的方法显色，于 200 ~ 700 nm 的波长范围内进行全程扫描，扫描结果两者在 388 nm 波长处均出现最大吸收，且干扰小，故选择检测波长为 388 nm。

**1.2.4**　标准曲线的建立　用移液管准确量取 1.2.2 项下的槲皮素对照品溶液 0、1、2、3、4、5、6ml，分别转移到 25ml 容量瓶中，按照文献[8]的方法显色，用甲醇定容，在 388 nm 波长处测定其吸光度。以浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标，得回归方程为 $Y = 25.518X - 0.0076$，$r = 0.9995$。

**1.2.5**　总黄酮含量测定　精密量取不同编号的供试品溶液 1ml，转移至 25ml 容量瓶中，按照 1.2.4 项下方法配制溶液，于 388 nm 波长处测定其吸光度，根据回归方程计算得出各药材总黄酮含量。

### 1.3　小鼠体液免疫功能的测定

**1.3.1**　蒲公英供试液的制备　分别称取 4 月 10 日采集的蒲公英花、叶、根药材粉末 5g，按照 1.2.1 项下方法得总黄酮浸膏，在 100ml 容量瓶中用蒸馏水定容，配得浓度为 0.05g/ml 的蒲公英供试液。

**1.3.2**　兔血红细胞悬液的制备　家兔耳缘静脉取血 20ml，离心 2000r/min，5min，弃上清液；加与沉淀等量的生理盐水，离心 1500r/min，5min，清洗 2 次，弃上清液；离心 2000r/min，10min，弃上清液，得兔血红细胞，用生理盐水 1∶5稀释，得兔血红细胞悬液，测定小鼠体液免疫功能时用作抗原。

**1.3.3**　豚鼠血清溶液的制备　取豚鼠心脏血 10ml，离心 2000r/min，10min，取上清，用生理盐水 1∶10（V∶V）稀释，置于 4 ℃冰箱中备用，测定小鼠体液免疫功能时用作补体。

**1.3.4**　溶血素测定法测定小鼠体液免疫功能[9]

50 只 KM 小鼠随机分为空白组（生理盐水）、阳性对照组（黄芪精口服液）、蒲公英根、叶、花供试液组，共 5 组，每组 10 只，分别灌胃给药 0.5ml，给药后 0.5h，每鼠腹腔注射 0.2ml 兔血红细胞悬液，免疫小鼠常规喂养 6d，眼球取血，处理样品[10]，离心 2000r/min，10min，取上层血清，用生理盐水稀释 500 倍。取 1ml 已稀释好的血清置于试管中，加入兔血红细胞悬液 0.5ml，将试管置于冰浴中冷却，向试管中加入补体 1ml，再将其移至 37℃恒温水浴中，保温 10min，随即放置于冰浴中。2000r/min，10min，取上清液，测其吸收度。经兔红细胞免疫后的小鼠，可产生兔红细胞抗体即溶血素，血清溶血素含量以半数溶血值（$HC_{50}$）表示。计算公式如下

式即抗体含量。

$$HC_{50}=\frac{\text{样品吸收度值}}{\text{免红细胞溶液半数溶血时的吸收度值}}\times\text{稀释倍数} \quad (1)$$

**1.4 统计学方法**

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。

## 2 结果

**2.1 蒲公英中总黄酮含量**

4 月 10 日各器官中总黄酮的含量比其它时期含量高，花中总黄酮含量最高。见表 1。

表 1 蒲公英中总黄酮含量(%)

| 采集日期 | 总黄酮含量 | | |
|---|---|---|---|
| | 花 | 叶 | 根 |
| 2015.3.25 | 3.00 | 1.75 | 1.25 |
| 2015.4.10 | 3.70 | 3.50 | 2.00 |
| 2015.4.25 | – | 2.50 | 1.75 |
| 2015.5.10 | – | 2.37 | 0.63 |
| 2015.5.25 | – | 2.25 | 0.50 |
| 2015.6.10 | – | 2.13 | 0.45 |
| 2015.6.25 | – | 2.01 | 0.40 |

注：–表示没有蒲公英花

**2.2 小鼠体液免疫功能测定结果**

蒲公英根、叶、花总黄酮均有增强小鼠体液免疫功能的作用，其中花作用最强，与黄芪精口服液组相比，差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 蒲公英根、叶、花总黄酮对小鼠半数溶血值($HC_{50}$)的影响($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | $HC_{50}$ |
|---|---|---|
| 空白对照组(生理盐水) | 10 | 23.32 ± 9.34 |
| 阳性对照组(黄芪精口服液) | 10 | 280.88 ± 86.85* |
| 蒲公英根组 | 10 | 186.23 ± 38.79* |
| 蒲公英叶组 | 10 | 104.41 ± 44.24* |
| 蒲公英花组 | 10 | 236.32 ± 103.37*△ |

注：与空白对照组相比，$^{*}P<0.05$；与阳性对照组相比，$^{\triangle}P>0.05$。

## 3 讨论

本文结果显示，同一时期蒲公英不同部位的总黄酮含量有明显差异，其高低顺序为花>叶>根，与蒲公英的传统药用部位为地上部分相一致。中药质量取决于其中有效物质的含量，而有效物质的含量高低与采收期有密切关系。蒲公英是人们喜爱的绿色保健中草药，为使其发挥更大的保健作用，笔者测定了不同时期蒲公英总黄酮含量，结果表明，3～6 月份蒲公英花、叶、根中总黄酮含量变化遵循逐渐升高达到峰值又逐渐降低的动态变化规律，4 月 10 日各器官中总黄酮的含量达到最高值，其中花含量最高，该结果为蒲公英的合理采收提供了科学依据。

本文以 $HC_{50}$ 观测蒲公英根、叶、花对小鼠体液免疫功能的影响。笔者选取总黄酮含量最高的 4 月 10 日蒲公英花、叶、根，研究了其对小鼠体液免疫功能的影响，结果表明均有增强小鼠体液免疫的作用，其中花作用最强，该结果为蒲公英药效物质基础的研究提供了参考。综上所述，蒲公英花中总黄酮含量最高，而且增强小鼠体液免疫的作用最强，有必要对其展开深入研究，如开发蒲公英花茶等保健品。

**参考文献：**

[1] 孙玉顺，姜秋杰，唐晓珍. 野菜蒲公英的开发与利用[J]. 食品研究与开发，2003，24(6)：101-103.
[2] 袁瑾，钟华，姚宗仁，等. 野生植物蒲公英营养成分的研究[J]. 氨基酸和生物资源，2006，28(2)：22-23. DOI：10.3969/j.issn.1006-8376.2006.02.006.
[3] 周震. 蒲公英药理研究与临床应用[J]. 光明中医，2009，24(9)：1801-1802. DOI：10.3969/j.issn.1003-8914.2009.09.121.
[4] 赵守训. 蒲公英的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源，2001，20(3)：1-3.
[5] 谷肄静，王立娟. 蒲公英总黄酮的提取及其抑菌性能[J]. 东北林业大学学报，2007，35(8)：43-45.
[6] 谢沈阳，杨晓源，丁章贵，等. 蒲公英的化学成分及其药理作用[J]. 天然产物研究与开发，2012，24(S1)：141-151.
[7] 郑淑霞，易骏，吴锦忠，等. 大孔树脂纯化莲房总黄酮的工艺研究[J]. 中国药房，2015，26(31)：4405-4408. DOI：10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.28.
[8] 李艳芝，王建安，张辰辰. 连翘花中总黄酮提取工艺的优化[J]. 中国医院药学杂志，2012，32(18)：1502-1504.
[9] 张均田. 现代药理实验方法(上册)[M]. 北京：北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社，1998：855-856.
[10] 仇成凤，雷林生，吴玉英，等. 以免红细胞作为抗原建立小鼠体液免疫反应动物模型[J]. 南方医科大学学报，2009，29(12)：2473-2476.

(收稿日期 2017-04-18)
(本文编辑：石俊强)