

Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(4): 311-318.

- [10] FAN C H, LI S Y, LI M, et al. The clinical significance of IFN- γ , IL-32, IL-1 β in chronic obstructive pulmonary disease

[J]. Chin Foreign Med Treat(中外医疗), 2011(19): 21-23.

- [11] ZHANG W, GU M M. Correlation of blood stasis and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Guide J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报), 2012, 18(7): 3-5.

收稿日期: 2013-07-30

枇杷叶总黄酮的纯化工艺及抗氧化活性研究

吕寒, 滕杰晖, 陈剑, 马丽, 任冰如, 李维林* (江苏省·中国科学院植物研究所, 南京 210014)

摘要: 目的 优选枇杷叶总黄酮分离纯化的工艺条件, 考察枇杷叶总黄酮抗氧化活性。方法 考察不同型号大孔树脂吸附洗脱能力, 及大孔树脂、聚酰胺、硅胶对枇杷叶总黄酮的纯化能力, 选择最佳分离纯化工艺, 并采用 ABTS 自由基清除试验对黄酮提取物进行抗氧化活性评价。结果 D101 树脂对枇杷叶总黄酮的吸附性能最好, 最佳纯化工艺为 D101 树脂每 1 g 上样相当于 1.5 g 原药材样液, 水、10%乙醇、40%乙醇、90%乙醇分别洗脱, 洗脱流速为 80 mL·h⁻¹ (12 BV·h⁻¹), 收集 40%乙醇部分经 D101 大孔树脂同样条件二次洗脱, 收集 40%乙醇洗脱液得总黄酮提取物。提取物对 ABTS 自由基有较好的清除作用。结论 D101 大孔树脂重复吸附是分离纯化枇杷叶总黄酮的理想方法。枇杷叶总黄酮具有良好的抗氧化活性。

关键词: 枇杷叶; 总黄酮; 大孔吸附树脂; 抗氧化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)01-0040-05

Study on Purification Technology and Antioxidant Activity of Total Flavonoid from Eriobotryae Folium

LÜ Han, TENG Jiehui, CHEN Jian, MA Li, REN Bingru, LI Weilin* (*Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the separate and purify technology of total flavonoid from Eriobotryae Folium, and to evaluate the antioxidant activity of total flavonoid. **METHODS** Investigate the adsorption capacity and purification activity of resin, polyamide, silica gel. ABTS free radical-scavenging assay was used to test the antioxidant activity. **RESULTS** Resin D101 has the best capacity to adsorb and purify total flavonoids, the optimal procedure was: 1 g D101 resin, extract solution (1.5 g powder of Eriobotryae Folium), water, 10%, 40% and 90% ethanol gradient elute, adsorbing rate 80 mL·h⁻¹ (12 BV·h⁻¹), 40% fraction was eluted and purified again by resin D101 with same process, then the 40% fraction was concentrated and dried to obtain total flavonoid. Total flavonoid showed a certain ABTS free radical-scavenging activity. **CONCLUSION** The repeated adsorption using resin D101 is the ideal method to separate and purify total flavonoid from Eriobotryae Folium. The total flavonoid of Eriobotryae Folium has a certain antioxidant activity.

KEY WORDS: Eriobotryae Folium; total flavonoids; macroporous adsorbing resin; antioxidant activity

枇杷叶为蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶, 别名巴叶、芦桔叶, 广泛分布于我国中南及陕西、甘肃、江苏、安徽、浙江、江西、福建、台湾、四川、贵州、云南等地^[1]。枇杷叶是一味常用中药, 其味苦、微辛, 性微寒, 主治肺热咳嗽、阴虚劳咳、湿疹等症^[2]。枇杷叶中含多种黄酮成分^[3-5], 近年来研究发现黄酮

类化合物具有良好的抗氧化、降血脂、抗炎、增强免疫等作用^[6], 因此对枇杷叶黄酮成分进行纯化研究很有意义。目前有对枇杷叶黄酮进行精制的报道^[7], 但得到的提取物黄酮含量较低, 为进一步提高提取物总黄酮含量, 本实验采用大孔树脂反复上样的方法, 对枇杷叶总黄酮进行纯化, 并对其抗氧化活性进行了研究, 以期对枇杷叶黄酮成

基金项目: 国家自然科学基金项目(21102058); 江苏省科技基础设施建设计划-科技公共服务平台项目(BM2011117)

作者简介: 吕寒, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (025)84347081
研究员 Tel: (025)84347002 E-mail: lwlcnbj@mail.cnbg.net

E-mail: xiaohan1814@163.com *通信作者: 李维林, 男, 博士, 研

分的进一步应用提供基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

MP120-2 电子天平(上海第二天平仪器厂); TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); 大孔树脂: NKA、NKA-9 购自南开大学化工厂, HPD-600、HPD-417、HPD-100、HPD-450、HPD-722、AB-8、DM130 购自河北沧州宝恩化工厂, D101 购自天津海光化工有限公司; 聚酰胺(30~60 目, 浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂); 柱层析硅胶(100~200 目, 青岛海洋化工厂); 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 0080-9705, 纯度: 98.1%); 其余试剂均为分析纯。

1.2 材料

枇杷叶采于苏州, 由江苏省·中国科学院植物研究所李维林研究员鉴定为蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya Japonica*(Thumb.) Lindl. 的干燥叶, 60 °C 干燥, 后粉碎成粗粉, 备用。

2 方法

2.1 对照品溶液的配制和标准曲线的建立

精密称取 120 °C 下干燥至恒重的芦丁对照品 5.7 mg, 用 70% 乙醇溶解并定容至 25 mL, 配制成浓度为 $0.228 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁对照品溶液。精密吸取芦丁对照品溶液 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 分别加入 0.3 mL 5% NaNO_2 溶液, 摇匀, 6 min 后加入 0.3 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 摇匀, 静置 6 min, 各加入 4.0 mL 4% NaOH 溶液, 并用 70% 乙醇将反应溶液体积补足到 10 mL, 放置 10~15 min, 于 510 nm 处测定吸光值。以吸光值(x)和芦丁含量(y)绘制总黄酮含量标准曲线: $y=0.8503x$, $r=0.9998$ ($n=3$)。

2.2 样品中总黄酮含量的测定

精密移取待测样品溶液 1 mL 于 10 mL 的量瓶中, 加入 0.3 mL 5% NaNO_2 溶液, 摇匀, 6 min 后加入 0.3 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 摇匀, 静置 6 min, 加入 4.0 mL 4% NaOH 溶液, 并用 70% 乙醇将反应溶液体积补足到 10 mL, 放置 10~15 min, 于 510 nm 处测定吸光值。代入标准曲线, 计算总黄酮含量。

2.3 枇杷叶黄酮提取液的制备

取枇杷叶干品粉末 300 g, 用 70% 乙醇热回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并 2 次提取液, 浓缩挥去乙醇, 置冰箱中冷却沉淀 24 h 后, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$

离心 10 min, 取上清液, 以蒸馏水定容至 200 mL, 得枇杷叶黄酮提物液。按“2.2”项下方法测定其总黄酮含量为 $19.799 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4 大孔树脂动态吸附筛选实验

2.4.1 树脂的预处理 大孔树脂用 95% 乙醇浸泡 24 h, 充分溶胀后, 用 95% 乙醇淋洗至流出液与水混合(1:3)不呈白色浑浊为止, 然后以大量蒸馏水洗尽乙醇, 以吸水纸吸去树脂表面水分, 备用。

2.4.2 吸附量的测定 分别取经预处理的 D101、NKA、HPD-100、HPD-722、AB-8、HPD-450、DM130、NKA-9、HPD-600、HPD-417 树脂各 2 g, 湿法装柱, 加枇杷叶黄酮提物液 5.00 mL 于柱顶, 以相同流速进行动态吸附, 收集流出液, 按“2.2”项下方法测定其中的总黄酮含量, 计算总黄酮质量和树脂的上柱量。然后用蒸馏水清洗树脂床中未被吸附的成分, 收集水洗液, 按“2.2”项下方法测定其中的总黄酮含量, 计算总黄酮质量和树脂的吸附量。计算公式如下: 上柱量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)=(原液总黄酮含量×原液体积-过柱流出液总黄酮含量×过柱流出液体积)/树脂质量; 吸附量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)=(原液总黄酮含量×原液体积-过柱流出液总黄酮含量×过柱流出液体积-水洗脱液总黄酮含量×水洗脱液体积)/树脂质量。

2.4.3 解吸率的测定 将“2.4.2”项下充分吸附后的树脂分别用 95% 乙醇以相同的流速进行洗脱, 收集洗脱液, 按“2.2”项下方法测定其中总黄酮的含量, 根据吸附量计算解吸量及解吸率。计算公式如下: 解吸量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)=(解吸液总黄酮含量×解吸液体积)/树脂质量; 解吸率(%)=解吸量/吸附量×100%。

2.5 大孔树脂纯化工艺条件试验

2.5.1 上样量考察 取经预处理的 D101 树脂 5 g, 装柱(柱体积 3.3 mL, 树脂柱床体积 6.5 mL), 加枇杷叶黄酮提物液 15 mL 于柱顶, 控制流速为 $40 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, 每 2 mL 接收流出液, 按“2.2”项下方法测定流出液中的总黄酮含量, 绘制树脂的泄露曲线。

2.5.2 吸附流速考察 取经预处理的 D101 树脂 5 g, 装柱, 分别加枇杷叶黄酮提物液 5 mL 于柱顶, 平行 4 份, 分别按流速 40, 80, 120, $160 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ (即分别为 6, 12, 20, 24 BV·h⁻¹, BV 为树脂体积数)收集流出液, 按“2.2”项下方法测定流出液中的

总黄酮含量。

2.5.3 乙醇洗脱浓度考察 取经预处理的 D101 树脂 10 g, 装柱, 分别加枇杷叶黄酮提物液 10 mL 于柱顶, 分别用不同浓度的乙醇洗脱, 洗脱流速 $80 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ 。按“2.2”项下方法测定每段流出液中的总黄酮含量。

2.5.4 重复性考察 采用优化后的工艺条件进行重复试验, 测定纯化后得到的提取物中总黄酮的含量。

2.6 枇杷叶总黄酮的再纯化

2.6.1 总黄酮粗提物上样液的制备 取 100 g 经预处理的 D101 树脂, 装柱, 加枇杷叶总黄酮提物液 100 mL 于柱顶, 分别用 20%, 40%, 95% 乙醇洗脱, 洗脱流速为 $1600 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, 取 40% 乙醇部分浓缩, 60°C 干燥, 得总黄酮粗提物。分别称取总黄酮粗提物 0.5 g, 加水 10 mL 溶解, 有红棕色不溶物, 过滤, 取上清液作为总黄酮粗提物上样液。

2.6.2 大孔树脂对总黄酮粗提物的再纯化 取经预处理的 D101 树脂 20 g, 装柱, 加总黄酮粗提物上样液于柱顶, 分别用水、10% 乙醇、15% 乙醇、20% 乙醇、30% 乙醇、40% 乙醇、50% 乙醇、90% 乙醇梯度洗脱, 洗脱流速为 $300 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集各份洗脱液, 以 BAW[正丁醇: 乙酸: 水(4: 1: 1)]为展开剂展开, 3% AlCl_3 显色于 365 nm 下检测荧光, 薄层展开鉴定黄酮斑点, 合并 20%~40% 乙醇洗脱液, 减压回收至近干, 60°C 干燥 1 h, 称重, 以 70% 乙醇溶解, 测定总黄酮含量。

2.6.3 聚酰胺对总黄酮粗提物的再纯化 取聚酰胺(30~60 目)10 g, 装柱, 总黄酮粗提物上样液, 分别用水、10% 乙醇、20% 乙醇、30% 乙醇、40% 乙醇、50% 乙醇、60% 乙醇、90% 乙醇梯度洗脱, 洗脱流速为 $300 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集各份洗脱液, 薄层展开鉴定黄酮斑点, 合并 20%~50% 乙醇洗脱液, 减压回收至近干, 60°C 干燥 1 h, 称重, 以 70% 乙醇溶解, 测定总黄酮含量。

2.6.4 硅胶对总黄酮粗提物的再纯化 取硅胶(100~200 目)0.5 g, 加入总黄酮粗提物上样液, 拌样, 水浴干燥。另取硅胶(100~200 目)1.0 g 空白硅胶于柱内, 将拌样硅胶加于空白硅胶上, 分别用 95% 乙醇、70% 乙醇梯度洗脱, 洗脱流速为 $300 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集各份洗脱液, 薄层展开鉴定黄酮斑点, 合并 95% 乙醇洗脱液, 减压回收至近干,

60°C 干燥 1 h, 称重, 以 70% 乙醇溶解, 测定总黄酮含量。

2.6.5 重复性考察 取经预处理的 D101 树脂 50 g, 装柱, 加总黄酮上样液于柱顶, 分别用水、10% 乙醇、40% 乙醇、90% 乙醇梯度洗脱, 洗脱流速为 $600 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集 40% 乙醇洗脱液, 减压回收至近干, 60°C 干燥 1 h, 称重, 以 70% 乙醇溶解, 测定总黄酮含量。

2.7 枇杷叶总黄酮提取物清除 ABTS 自由基实验

样品溶液配制: 取枇杷叶总黄酮提取物, DMSO 溶解, 配制成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 母液, 并以 DMSO 稀释成一系列浓度。

ABTS 混合液的制备: 将 $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABTS 水溶液与 $2.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过硫酸钾水溶液(终浓度)混合, 将混合液在室温避光条件下放置 12~16 h, 形成 ABTS 储备液。将此工作液与乙醇按照约 1: 20 比例混合在 734 nm 下调吸光度为 0.700 ± 0.02 即得, 于 30°C 下预热备用。在 96 孔板中, 每孔分别加入 $10 \mu\text{L}$ 不同浓度的样品溶液, $190 \mu\text{L}$ ABTS 混合液, 反应体系 $200 \mu\text{L}$ 。反应 10 s, 静置 10 min, 将 96 孔板放入酶标仪中, 在 734 nm 波长处检测样品的吸光度(A_i); 取 $10 \mu\text{L}$ DMSO 代替样品溶液测得空白吸光度(A_0); 以 $190 \mu\text{L}$ 无水乙醇代替 ABTS 混合液测得样品本底吸光度(A_j); 每个浓度做 4 个平行, 取其平均值。以维生素 C 做阳性对照, 按清除率 = $\frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\%$ 计算清除率,

并计算 IC_{50} 值^[8]。

3 结果

3.1 各种树脂对枇杷叶黄酮的吸附效果

通过动态吸附实验, 发现不同类型大孔树脂对枇杷叶黄酮的吸附和解吸附能力有差异。各种树脂对枇杷叶总黄酮的动态吸附效果见表 1, NKA 和 NKA-9 解吸附能力很强, 但吸附能力较差, 综合考察吸附量和解吸附量, 非极性的 D101 树脂吸附能力和解吸附能力较好。

3.2 大孔树脂纯化枇杷叶总黄酮的工艺条件

3.2.1 上样量的考察 选用 D101 型大孔树脂, 上样量的考察结果见表 2, 上样量 $> 4.0 \text{ mL}$ 后, 大孔树脂对总黄酮的吸附趋于饱和, 因此上样量应选取 5 mL 提取液为宜, 折合计算后的上样量为每 1 g 树脂上样 1.0 mL 粗提物样品液(相当于 1.5 g

原药材)。

表 1 大孔树脂对枇杷叶黄酮的动态吸附效果

Tab 1 The dynamic adsorption effect of macroporous resins

型号	树脂类型	上柱量/ mg·g ⁻¹	吸附量/ mg·g ⁻¹	解吸附量/ mg·g ⁻¹	解吸率/ %
D101	非极性	24.31	19.20	12.96	67.50
NKA		23.80	18.27	14.22	77.83
HPD-100		25.48	20.10	11.79	58.66
HPD-722		24.34	18.06	12.15	67.27
AB-8	弱极性	23.96	19.32	13.23	68.47
HPD-450		25.42	18.84	12.15	66.40
DM130		24.58	18.72	13.23	66.82
NKA-9		24.88	16.14	12.51	77.47
HPD-600	极性	27.55	20.58	10.89	52.91
HPD-417		25.93	17.22	12.15	70.56

表 2 上样量考察

Tab 2 The investigation of sample volumn

上样总体积/mL	流出液体积/mL	流出液中总黄酮浓度/mg·mL ⁻¹
2	2	0.786
4	2	2.018
6	2	3.511
8	2	4.674
10	2	5.657
12	2	6.009
15	3	6.061

3.2.2 流速 选用 D101 型大孔树脂, 流速考察结果见表 3, 由结果可知, 当流速>80 mL·h⁻¹后, D101 大孔树脂流出液中总黄酮的浓度高于吸附饱和的大孔树脂水洗脱液浓度(即“3.2.1”项下上样 6 mL 后流出液浓度 3.511 mg·mL⁻¹), 此时大孔树脂不能够完全吸附样品。从节约时间及样品吸附程度考虑, 吸附流速选用 80 mL·h⁻¹(12 BV·h⁻¹)为好。

表 3 吸附流速考察

Tab 3 The investigation of adsorption velocity

流速/mL·h ⁻¹	流出液中总黄酮浓度/mg·mL ⁻¹
40	2.436
80	2.483
120	3.686
160	4.244

3.2.3 洗脱液选择 选用 D101 型大孔树脂, 洗脱液考察结果见表 4。20%和 30%乙醇洗脱部分中的总黄酮含量较高, 洗脱液通过硅胶薄层层析, 以 BAW[正丁醇:乙酸:水(4:1:1)]为展开剂展

开, AlCl₃显色于 365 nm 下检测荧光, 发现 20%乙醇、30%乙醇、40%乙醇洗脱液均含有黄酮斑点, 而水、10%乙醇、50%乙醇和 90%乙醇洗脱液没有黄酮斑点, 说明黄酮主要在 20%~40%乙醇洗脱极性段。故选择以水、10%乙醇、40%乙醇、90%乙醇梯度洗脱, 收集 40%乙醇洗脱液。

表 4 乙醇洗脱浓度考察

Tab 4 The investigation of alcohol concentration

洗脱液	干膏重/g	干膏总黄酮含量/%
10%乙醇	0.063	10.22
20%乙醇	0.103	45.27
30%乙醇	0.070	48.22
40%乙醇	0.053	28.83
50%乙醇	0.022	16.59
90%乙醇	0.028	17.41

3.2.4 重复性 经重复试验, 得到的提取物总黄酮含量为 47.18%。

综合以上结果确定, 枇杷叶总黄酮纯化工艺条件为: D101 型大孔树脂, 每 1 g 树脂上样相当于 1.5 g 原药材的枇杷叶提取液, 分别用水、10%乙醇、40%乙醇、90%乙醇梯度洗脱, 流速为 80 mL·h⁻¹(12 BV·h⁻¹), 收集合并 40%乙醇洗脱液, 浓缩干燥, 得总黄酮粗品。

3.3 枇杷叶总黄酮再纯化的工艺条件

3.3.1 D101 型大孔树脂的再纯化效果 通过 D101 型大孔树脂的各份洗脱液经过薄层鉴定, 发现 20%乙醇、30%乙醇、40%乙醇洗脱液均含有黄酮斑点, 而水、10%乙醇、50%乙醇和 90%乙醇洗脱液没有黄酮斑点, 说明黄酮主要在 20%~40%乙醇洗脱极性段。

3.3.2 聚酰胺的再纯化效果 通过聚酰胺的各份洗脱液经过薄层鉴定, 发现 20%乙醇、30%乙醇、40%乙醇、50%乙醇洗脱液均含有黄酮斑点, 而水、10%乙醇、60%乙醇、90%乙醇洗脱液没有黄酮斑点, 说明黄酮主要在 20%~50%乙醇洗脱极性段。

3.3.3 硅胶的再纯化效果 通过硅胶柱的各份洗脱液经过薄层鉴定, 发现 95%乙醇洗脱液含有黄酮斑点, 而 70%乙醇洗脱液没有黄酮斑点, 说明 95%乙醇可以将黄酮洗脱完全。

3.3.4 测定各种材料纯化所得总黄酮含量 各种材料纯化所得总黄酮含量结果可知, 采用 D101 树脂再精制提取物总黄酮含量最高, 且提取物的得率较高, 结果见表 5。

表 5 3 种再纯化方法提取物得率和总黄酮含量

Tab 5 The yield and content of total flavonoid prepared by three different purify methods

纯化方法	提取物量/g	提取物得率/%	提取物总黄酮含量/%
D101 纯化	0.302	60.4	74.29
聚酰胺纯化	0.145	29.1	68.90
硅胶纯化	0.376	75.2	55.37

3.3.5 重复性结果 采用优化后的工艺条件进行纯化, 经重复性试验, 测得所得枇杷叶总黄酮提取物总黄酮含量为 73.28%。

3.4 ABTS 自由基清除作用结果

枇杷叶总黄酮提取物 ABTS 自由基清除作用的 IC_{50} 值为 $(6.92 \pm 0.08) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, IC_{50} 值低于阳性对照维生素 C $[(7.20 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}]$, 说明枇杷叶总黄酮提取物有较强的抗氧化清除自由基能力。

4 讨论

本研究对各种精制材料对枇杷叶总黄酮的吸附与解吸附特性进行了筛选和比较, 确定了枇杷叶总黄酮的纯化工艺为: D101 大孔树脂每 1 g 上样 5.0 mL 的提取液(相当于 1.5 g 原药材干品粉末), 水、10%乙醇、40%乙醇、95%乙醇分别洗脱, 洗脱流速为 $12 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集 40%乙醇洗脱液, 40%乙醇洗脱部分浓缩后上样 D101 树脂, 以同样条件洗脱, 收集 40%乙醇部分, 浓缩干燥得枇杷叶总黄酮提取物。大孔树脂 2 次上样工艺得到的枇杷叶总黄酮提取物含量较 1 次上样有了明显提高, 最终得到的提取物总黄酮含量达到 70%以上。经

重复性试验, 表明该精制方法有较好的重复性, 适合工厂放大生产。

抗氧化自由基试验提示枇杷叶黄酮提取物具有良好的抗氧化活性, 这一结果为枇杷叶总黄酮提取物进一步的利用开发提供了依据。

REFERENCES

[1] LI T, XU R Q, LINW J, et al. Establishment and optimization of ISSR reaction system for *Eriobotryae Folium* from Fujian [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2012, 29(4): 315-319.

[2] STATE ADMINISTRATION OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE, "CHINESE MATERIA MEDICA" EDITORIAL BOARD. Chinese Herbal Medicine(中华本草) [M]. Vol IV. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999: 140.

[3] SHA N, LIANG J Y. Development of *Eriobotrya japonica*(Thumb.) Lindl. [J]. *Strait Pharm J*(海峡药学), 2006, 18(1): 6-11.

[4] LU H, LI W L, PEI Y P, et al. Detection of flavonoids in *Eriobotrya japonica*(Thunb.) Lindl. by HPLC-MSⁿ [J]. *Res Pract Chin Med*(现代中药研究与实践), 2009, 22(6): 56-58.

[5] LUO M H, LU H, LI W L. Determination of total flavonol in leaves of *Eriobotrya japonica* by HPLC [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2011, 22(3): 582-583.

[6] HUANG A L. Progress on the pharmacologic action of flavonoid [J]. *Anhui Agricult Sci Bull*(安徽农学通报), 2007, 3(10): 71-72.

[7] LIU Y, ZHU X T. Optimization of purification process for total flavonoids from leaves of *Eriobotrya japonica* by macroporous resin [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(11): 55-57

[8] RER P N. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(9/10): 1231-1237.

收稿日期: 2013-06-28

珍稀药源植物蛇足石杉中石杉碱甲的免疫学快速检测

余宇燕, 张淑玲, 邹艳辉, 滕海英, 邱亚利(福建中医药大学药学院, 福州 350122)

摘要: 目的 制备石杉碱甲单克隆抗体, 分析其免疫学特性, 建立蛇足石杉中石杉碱甲的 ELISA 检测方法。方法 用石杉碱甲人工抗原免疫 Balb/c 小鼠, 采用杂交瘤技术筛选获 4 株单克隆抗体 3E02、4B01、5D03 和 4C04, 对单克隆抗体纯度、亚型、灵敏度、特异性等进行鉴定, 建立 ELISA 检测方法。结果 4 株抗体亚型分别为 IgG2b, IgG2b, IgG1 和 IgG1。ELISA 检测方法的标准曲线方程为 $Y=0.373 \ 6X-0.236$, $r=0.996 \ 5$, 线性范围为 $5 \sim 1 \ 000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测限 $4.387 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。石杉碱甲的平均回收率为 99.5%, RSD 为 0.68%($n=6$)。结论 ELISA 法快速灵敏, 可用于蛇足石杉中石杉碱甲的含量测定。

关键词: 石杉碱甲; 单克隆抗体; ELISA; 蛇足石杉

中图分类号: R962 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)01-0044-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(81202914); 福建省科技计划项目(2011Y0035); 福建省教育厅(JA12171)

作者简介: 余宇燕, 女, 博士, 副教授 Tel: 1370507331 E-mail: yyyfj@163.com