

大青叶提取物中总黄酮含量测定

卑占宇^① 罗晓冰

(漯河医学高等专科学校药理学系 河南省漯河市大学路 148 号 462002)

摘 要 建立大青叶中总黄酮含量测定方法。以超声辅助、70% 乙醇提取大青叶总黄酮, 采用紫外可见分光光度法对大青叶总黄酮进行测定。芦丁标准溶液线性方程为: $A = 0.01087C - 0.0005833$, $r = 0.9999$ 。加标回收率为 98.00%, 相对标准偏差为 1.45%。方法简便、快速、准确, 且稳定性好, 适用于测定大青叶总黄酮的含量。

关键词 大青叶; 总黄酮; 紫外-可见分光光度法

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2011)05-2570-03

1 引言

大青叶(Folium Isatidis)是十字花科(Cruciferae)菘蓝属(Isatis)植物菘蓝(Isatis indigotica Fort.)的叶, 性味与归经: 苦, 寒, 归心、胃经, 其根在药典中称为板蓝根。大青叶具有清热解毒, 凉血利咽的功效, 现代药理研究表明具有抗菌、抗病毒、增强免疫调节的作用^[1]。主产于江苏、安徽、河北、河南、浙江等地。大青叶提取物中总黄酮含量测定研究未见报道。本文研究大青叶提取物中总黄酮提取工艺最佳条件及其含量测定, 以期为开发利用其植物资源提供科学依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

New Human U P 900 型超纯水器(韩国 Human 公司); BT 125D 电子天平(北京赛多利斯天平仪器厂); WF-4000 微波快速反应系统(上海屹尧分析仪器有限公司); UV 1900 PPC 紫外-可见分光光度计(上海亚研电子科技有限公司); RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

芦丁标准品(A1049 Rutin UV $\geq 98\%$, 成都曼思特生物科技有限公司); NaNO_2 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 NaOH 、无水乙醇均为分析纯。实验用水为超纯水(用单蒸水经超纯水器制得, 电导率为 $18.3\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

大青叶(河南漯河市第三附属医院中药房)。

2.2 实验方法

2.2.1 实验原理

黄酮类化合物主要包括黄酮苷和黄酮醇苷两大部分。在黄酮类化合物溶液中加入铝离子试剂后, 黄酮类化合物中的酚羟基与 Al^{3+} 生成络合物, 控制适宜 pH 值, 所生成的络合物在可见区能获

① 联系人, 手机: (0) 15803953817; 电话: (0395) 2112611; 传真: (0395) 2112612; E-mail: beizhanyu@sina.com; yu99999@126.com

作者简介: 卑占宇(1964—), 男, 河北省唐山市人, 副教授, 主要从事实验教学改革以及中草药化学成分分析研究工作。

收稿日期: 2011-01-13; 接受日期: 2011-02-22

得特征吸收峰, 其质量浓度与吸光度符合朗伯-比耳定律, 可以定量测定^[2]。

2.2.2 校准曲线的绘制

准确称取 105℃常压干燥至恒重的芦丁标准品 10.0mg, 用少量 70% 乙醇溶液溶解, 然后转移至 50mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇溶液定容至刻度, 充分混匀。芦丁标准品的工作液浓度为 0.2mg/mL, 备用。

分别取芦丁标准品工作液 0、0.05、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50mL 于 8 个 10mL 容量瓶中, 各加 5% NaNO₂ 溶液 0.4mL, 放置 6min 后, 加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.4mL, 放置 6min, 加 4% NaOH 溶液 4mL, 用 70% 乙醇溶液定容至刻度, 摇匀, 得到芦丁标准溶液 0、10.00、20.00、30.00、40.00、50.00、60.00、70.00μg/mL, 以不加标准溶液的相应溶液为空白, 进行全波长扫描, 在 510nm 处有最大光吸收。因此选择 510nm 为测定波长。以空白试剂为参比, 在 510nm 处测定吸光度, 从而得校准曲线方程: $A = 0.01087C - 0.0005833$, $r = 0.9999$, 其线性范围为 0—70μg/mL。结果见表 1。

表 1 芦丁标准品校准曲线

($n = 3$)

序号	1	2	3	4	5	6	7	8
芦丁标准溶液 C(μg/mL)	0.00	10.00	20.00	30.00	40.00	50.00	60.00	70.00
吸光度 A 平均值	0	0.108	0.216	0.326	0.434	0.544	0.651	0.761

2.2.3 大青叶中总黄酮提取

准确称取大青叶干燥粉末 2.50g 置于微波反应釜中, 微波功率为 700W, 依据李加林等报道的盐肤木总黄酮提取工艺研究^[3]的方法, 大青叶总黄酮最佳微波提取工艺条件为温度为 65℃, 提取时间为 10min, 料液比(g/mL) 为 1:65, 70% 乙醇溶液。按最佳微波提取工艺提取, 同法提取 3 次, 合并提取液并 4000r/min 离心 3min, 将离心后的上清液, 用旋转蒸发器减压蒸馏至黄色粘稠状浓缩液, 用 70% 乙醇溶液溶解并定容至 50mL, 得到大青叶样品工作液。

3 结果与讨论

3.1 样品分析

取大青叶样品工作液 1mL 至 50mL 容量瓶中, 加 5% NaNO₂ 溶液 0.4mL, 放置 6min 后, 加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.4mL, 放置 6min, 加 4% NaOH 溶液 4mL, 用 70% 乙醇溶液定容至刻度摇匀静置 15min, 制得样品测定液, 于 510nm 波长处, 按 2.2.2 中方法测定吸光度, 按校准方程求得样品测定液总黄酮的含量为 42.56μg/mL。本实验最佳微波提取条件下的提取率按总黄酮提取率(%) = (黄酮类化合物质量/干物料质量) × 100% 计算, 为 4.26%。

3.2 溶剂对提取率的影响

控制提取时间为 10min, 提取温度为 65℃, 料液比(g/mL) 为 1:65, 用不同含量的乙醇溶液为提取液进行微波辅助提取, 以 3.1 节中方法测定各提取液中总黄酮的含量。实验结果表明, 黄酮提取率随乙醇溶液的浓度增加先增大后减小, 当乙醇含量为 70% 时, 微波提取率最高。

3.3 微波作用时间对提取率的影响

控制提取温度为 65℃, 料液比(g/mL) 为 1:65, 以 70% 乙醇溶液为提取液, 进行不同时间的微波辅助提取, 以 3.1 节中方法测定各提取液中总黄酮的含量。实验结果表明: 黄酮提取率随时间的推移增大, 但是增加趋势不是很明显, 考虑经济因素, 提取时间定为 10min。

3.4 料液比对提取率的影响

以 70% 乙醇溶液为提取液, 提取温度 65℃, 以不同的料液比进行微波辅助提取 10min, 以 3.1

节中方法测定各提取液中总黄酮的含量。实验结果表明: 黄酮提取率随料液比的增加随之增加, 考虑到溶剂与经济因素, 料液比(g/mL) 选为 1:65。

3.5 提取温度对提取率的影响

以 70% 乙醇溶液为提取液, 料液比(g/mL) 为 1:65, 在不同的温度下进行微波辅助提取 10min, 以 3.1 节中方法测定各提取液中总黄酮的含量。实验结果表明, 黄酮提取率随提取温度的提高增大, 到达一定温度 65℃ 后增加的趋势基本保持不变, 因此提取温度选定为 65℃。

3.6 精密度实验

取 5 份大青叶样品工作液 1mL, 其他试剂加入量及时间同 3.1 节, 测定 5 次, RSD= 1.45%, 表明样品重现性良好。

3.7 回收率实验

准确量取大青叶样品工作液 1mL 和标准品工作液 10mL 至 100mL 容量瓶中, 加 5% NaNO₂ 溶液 1.0mL, 放置 6min 后, 加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1.0mL, 放置 6min, 加 4% NaOH 溶液 10mL, 用 70% 乙醇溶液定容至刻度摇匀静置 15min, 测定总黄酮的含量, 测定 3 次, 回收率结果见表 2。

表 2 回收率

(n=3)

样品	加标前 ($\mu\text{g/mL}$)	加标量 ($\mu\text{g/mL}$)	加标后 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)
总黄酮	21.28	20.00	40.88	98.00

从实验结果看, 回收率为 98.00%, 说明测定方法简单、准确、有效, 适用于中药材中总黄酮含量测定。

4 结论

根据文献[3]的正交实验可知, 对大青叶总黄酮提取率的影响顺序为乙醇浓度> 提取温度> 料液比> 提取时间, 在最佳微波提取工艺条件下, 总黄酮含量达到 4.26%。

参考文献

- [1] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用(第 1 卷)[M]. 北京: 北京学苑出版社, 1997. 328.
 [2] 努尔阿米娜·阿尤甫, 阿不都拉·阿巴斯. 曼陀罗种子中总黄酮含量测定及提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 260—263.
 [3] 李加林, 吴素珍, 卑占宇. 盐肤木总黄酮提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1116—1117.

Determination of Total Flavones in the Extract of Folium Isatidis

BEI Zhan-Yu LUO Xiao-Bing

(Department of Pharmacy, Luohe Medical College, Luohe, Henan 462000, P. R. China)

Abstract The method for determination of total flavones in folium isatidis was established. Total flavones in folium isatidis was extracted with 70% ethanol, assisted by ultrasound and determined with ultraviolet-visible spectrophotometry. Linear equation of rutin standard solution was $A = 0.01087C - 0.0005833$ ($r = 0.9999$). Recovery of sample was 98.00%, relative standard deviation was 1.45%. The method is simple, fast, stable and accurate, and suitable to determine the total flavones in folium isatidis.

Key words Folium Isatidis; Total Flavones; Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. <http://www.c>