

积雪草总黄酮提取工艺和含量测定研究^①

王 荣^a 黎云祥^{②a} 蔡凌云^{a,b} 高 侠^a

^a 西华师范大学生命科学学院 四川省高校环境科学与生物多样性保护重点实验室 四川省南充市师大路 1 号 637002)
^b 凯里学院化学系 贵州省凯里市文化北路 22 号 556000)

摘 要 确定积雪草总黄酮最佳提取工艺和含量测定方法。采用微波辅助法提取积雪草中的黄酮类化合物,通过正交实验确定了最佳提取工艺。分别以槲皮素和山奈酚为对照,采用紫外分光光度法在 320nm 处测定积雪草全草中的总黄酮。最佳工艺条件:提取次数 3 次,辐射时间 20s,固液比 1:10,功率 480W。按最佳工艺条件提取总黄酮含量为 8.40mg/g。回归方程为(槲皮素): $y=29.993C+0.027$,相关系数 $r^2=0.9982$,精密度和稳定性试验 RSD 分别为 0.265% 和 0.172% ($n\geq 6$),平均加样回收率为 99%,RSD = 1.51% ($n=5$)。回归方程为(山奈酚): $y=36.928C+0.0178$,相关系数 $r^2=0.9991$,精密度和稳定性试验的 RSD 分别为 0.231% 和 0.190% ($n\geq 6$),平均加样回收率为 99%,RSD= 0.714% ($n=5$),样品的稳定性试验 RSD 为 0.218% (60min)。选择的最佳工艺对提取积雪草全草总黄酮确为最佳。用槲皮素或山奈酚标准品,采用紫外分光光度法,操作简便,结果准确,灵敏度高,重复性好,为积雪草全草中总黄酮含量测定的一种切实可行的方法。

关键词 积雪草; 总黄酮; 微波辅助提取; 紫外分光光度法; 正交实验
中图分类号: O657.32 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-8138(2009)03-0544-06

1 前言

积雪草 *Centella asiatica*(L.) Urb. 为《中国药典》收载的常用中药,为伞形科积雪草属植物积雪草的干燥全草,始载于《神农本草经》,列为中品^[1],又称落得打、崩大碗、半边钱等,广泛分布于我国长江流域以南各地,全草入药。我国医学上用积雪草外用及内服治病已有两千多年历史。其性寒、味苦、辛,具有清热利湿,解毒消肿之功效^[2]。我国民间常用于治疗感冒、扁桃腺炎、传染性肝炎、痢疾、跌打损伤、疮痍肿毒、外伤出血等^[3]。南非、印度、东南亚等许多国家和地区也将其作为传统药物加以应用,其有效成份积雪草苷在国内外广泛用于临床^[4]。近十年多来,国内外学者对积雪草进行了大量的研究,目前有关积雪草的化学成分、药理作用、保健作用、及积雪草中积雪草苷的提取和分离屡屡见报^[5-7],但积雪草中黄酮的相关报道却很少,有研究初步证实积雪草黄酮以苷元和苷两种形式存在于植物中^[8],因此本文以积雪草为研究对象,探讨积雪草全草中总黄酮的提取工艺和含量测定方法,为进一步提取分离纯化,探讨其药理作用提供理论基础。

① 四川省重点学科项目(SZD0420)资助,四川省教育厅重点项目(2006A 078)
② 联系人,手机:(0) 13708271946; (0) 13281952481; E-mail: yx_li@263.net
作者简介:王荣(1984—),女,山东省德州市人,硕士研究生,主要从事天然产物研究。
收稿日期:2008-10-30;接受日期:2009-01-20
© 1994-2019 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c

2 实验部分

2.1 主要仪器、试剂

积雪草 2008 年 7 月采集于四川省长宁县,经西华师范大学生命科学学院秦自生教授鉴定为伞形科积雪草属植物积雪草。

R-200 旋转蒸发仪(瑞士 Buci 公司),Eppendorf Research 移液器(德国 Eppendorf 公司),GBC 916 紫外-可见分光光度计(澳大利亚 GBC 科学仪器有限公司),G8023CSL-K3 微波炉(广东格兰仕微波炉电器有限公司),LD4-2 低速医用离心机(北京医用离心机厂),SHZ-II 循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂),101A-2 电热鼓风恒温干燥箱(杭州蓝天化验仪器厂),JA 1003 电子天平(上海精科天平厂)。

槲皮素标准品(中国药品生物制品检定所,编号:100081-200406),山奈酚标准品(中国药品生物制品检定所,编号:110861-200808),无水乙醇为分析纯(安徽安特生物化学有限公司),实验水为蒸馏水。

2.2 方法

2.2.1 样品处理和校准曲线

2.2.1.1 样品处理和提取液制备

称取自然干燥的积雪草全草粉末 50g,过 100 目筛,置于索氏提取器中,用石油醚(b. p. 30—60℃)连续回流脱脂、脱色 20 h,样品置于通风处干燥备用。

精确称取上述积雪草粉 1.000g,置于 50mL 锥形瓶中,按料液比 1:10 加甲醇,微波功率 480W 间歇提取 3 次,每次 20s,合并提取液,减压蒸干,用甲醇溶解,甲醇定容于 100mL 容量瓶,待用。

2.2.1.2 标准溶液的配制

精确称取 5.000mg 槲皮素标准品(120℃减压干燥至恒重)和 4.795mg 山奈酚标准品,各用甲醇溶解后,分别定容于 50mL 容量瓶中,即得槲皮素对照品液(0.1mg/mL)和山奈酚对照品液(0.0959mg/mL)。

2.2.1.3 测定波长选择

分别移取一定的槲皮素和山奈酚对照品溶液,用紫外分光光度计在 200—400nm 范围扫描,发现槲皮素、山奈酚和样品在 320nm 处均有最大或较大吸收波长,因此将 320nm 作为测定波长。

2.2.1.4 校准曲线制作

取对照品溶液 0.00、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50mL 分别放入 1—8 号 10mL 容量瓶中按 2.2.1.3 项下操作。以吸光度 A 为纵坐标、槲皮素(或山奈酚)浓度 C 为横坐标绘制校准曲线。

2.2.1.5 精密度试验

分别精密吸取槲皮素、山奈酚对照品溶液 1mL,按 2.2.1.3 项下处理,重复测定 6 次,计算 RSD。

2.2.1.6 稳定性试验

精密吸取 2.2.1.1 制备的提取溶液和上述两标准液各 1mL,按 2.2.1.3 项下分别处理,每 10min 测定 1 次吸光度,考察(60min),计算 RSD。

2.2.1.7 回收率测定

精密吸取 2.2.1.1 制备的提取液 5 份,分别置 10mL 容量瓶中,加入一定量槲皮素或山奈酚对

照品,按测定波长项下处理,计算平均回收率和 RSD。

2.2.2 正交实验

选取微波功率、固液比、辐射时间、提取次数 4 个因素进行 4 因素 3 水平正交试验。因素水平见表 1。

表 1 实验因素及水平

水平	因素			
	A 微波功率(W)	B 固液比	C 辐射时间(s)	D 提取次数
1	160	10	10	1
2	320	15	15	2
3	480	20	20	3

3 结果与讨论

3.1 波长确定和校准曲线绘制

3.1.1 波长确定

经测定,在波长 320nm 处槲皮素和山奈酚均有最大吸收,样品也有较大吸收,确定测定波长为 320nm。

3.1.2 校准曲线绘制

经计算得到校准曲线(槲皮素)的回归方程为 $y = 29.993C + 0.027$, 相关系数 $r^2 = 0.9982$, 在 0.005—0.035mg/mL 范围内呈良好的线性关系(图 1)。校准曲线(山奈酚)的回归方程为 $y = 36.928C + 0.0178$, 相关系数 $r^2 = 0.9991$, 在 0.00480—0.0336mg/mL 范围内呈良好的线性关系(图 2)。

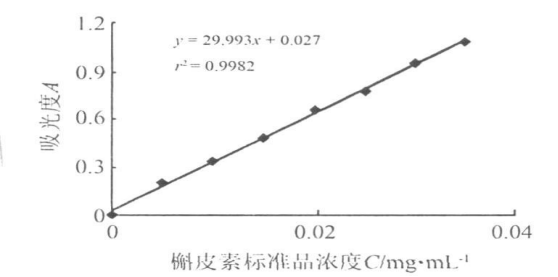


图 1 槲皮素对照品校准曲线示意图

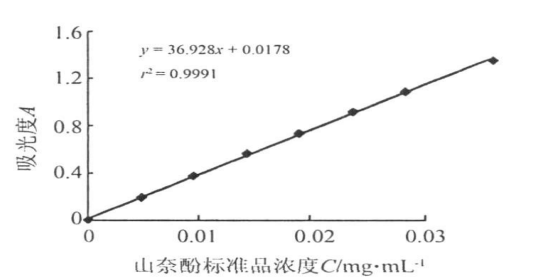


图 2 山奈酚对照品校准曲线示意图

3.2 精密度、稳定性、回收率试验结果

表 2 精密度实验结果

序号	1	2	3	4	5	6	RSD(%)
吸光度(槲皮素)	0.378	0.378	0.378	0.377	0.378	0.378	0.265
吸光度(山奈酚)	0.435	0.434	0.434	0.436	0.434	0.434	0.231

表 3 稳定性实验结果

时间(min)	0	10	20	30	40	50	60	RSD(%)
吸光度(槲皮素)	0.336	0.336	0.335	0.335	0.336	0.336	0.336	0.172
吸光度(山奈酚)	0.372	0.372	0.372	0.373	0.372	0.373	0.373	0.190
吸光度(样品)	0.264	0.264	0.263	0.264	0.264	0.264	0.263	0.218

表 4 加样回收率实验结果

样品	总黄酮含量(mg)		加标量(mg)		加标后总黄酮含量(mg)		回收率(%)		平均回收率(%)		RSD(%)	
	槲皮素	山奈酚	槲皮素	山奈酚	槲皮素	山奈酚	槲皮素	山奈酚	槲皮素	山奈酚	槲皮素	山奈酚
1	0.0790	0.0667	0.050	0.04795	0.1270	0.1143	98	100	99	99	1.51	0.714
2	0.0790	0.0667	0.100	0.09590	0.1804	0.1616	100	99				
3	0.0790	0.0667	0.150	0.14385	0.2227	0.2081	97	99				
4	0.0790	0.0667	0.200	0.19180	0.2765	0.2590	99	100				
5	0.0790	0.0667	0.250	0.23975	0.3268	0.3024	99	99				

以槲皮素为标准品时,精密度和稳定性试验的 RSD 分别为 0.265%(见表 2)和 0.172%(见表 3),平均回收率为 99%,RSD 为 1.51%(见表 4)。以山奈酚为标准品时,精密度和稳定性试验的 RSD 分别为 0.231%(见表 2)和 0.190%(见表 3),平均回收率为 99%,RSD 为 0.714%(见表 4)。样品的稳定性实验,RSD 为 0.218%(见表 3)。以上结果表明两种测定方法的精密度和稳定性良好,经回收率试验证明都具有良好的准确度和重现性,都适用于积雪草总黄酮的测定。

3.3 不同标准品测定样品总黄酮含量结果比较

分别以槲皮素和山奈酚为对照品,测定药材同一份样品时(2.2.1.1 制备的提取溶液 1.0mL,吸光度 0.279),以槲皮素为对照品测定的结果(8.40mg/mL),比以山奈酚为对照品测定的结果(7.03mg/mL)高。由于槲皮素(302.24)和山奈酚(286.23)的分子量相差不大,当吸收度相同时含量有一定差别,说明积雪草中槲皮素含量比山奈酚的含量稍高,最终计算得到的含量就会稍高一些。

3.4 正交试验结果

表 5 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

序号	A	B	C	D	总黄酮含量(mg/g)	提取率(%)
1	1	1	1	1	4.734	0.473
2	1	2	2	2	5.835	0.584
3	1	3	3	3	8.169	0.817
4	2	1	2	3	7.535	0.754
5	2	2	3	1	4.777	0.478
6	2	3	1	2	6.001	0.600
7	3	1	3	2	7.135	0.714
8	3	2	1	3	7.335	0.734
9	3	3	2	1	5.235	0.524
K_1	6.246	6.470	6.023	4.915		
K_2	6.104	5.982	6.202	6.324		
K_3	6.568	6.468	6.694	7.680		
R	0.464	0.486	0.671	2.765		

表 6 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
功率(误差)	0.339	2	1.000	19.000	
固液比	0.472	2	1.392	19.000	
辐射时间	0.723	2	2.133	19.000	
提取次数	11.464	2	33.817	19.000	*

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

从级差(表 5)和方差分析(表 6)可知,提取次数对积雪草总黄酮提取具有显著的影响,4 种因素影响的主次顺序是:提取次数> 辐射时间> 固液比> 功率。积雪草提取总黄酮的最佳工艺为 $D_3C_3B_1A_3$,即间隔提取 3 次,辐射时间 20s,固液比 1:10,功率 480W。

3.5 最佳工艺条件的验证

按 $D_3C_3B_1A_3$ 组合进行 3 次平行实验,总黄酮平均含量为 8.40mg/g,选取的工艺确为最佳工艺。

3.6 讨论

(1) 总黄酮含量的测定方式一般有分光光度法和高效液相色谱法^[8-10],高效液相色谱法虽然重现性、稳定性等指标均较好,但仪器设备昂贵,操作复杂,费用较高。分光光度法测定黄酮含量,不但操作简单方便,而且结果准确可靠。

黄酮类化合物具有特定的紫外吸收带(其结构中的肉桂酰环产生的 I 带在 300—400nm 内,由苯甲酰环产生的 II 带在 240—285nm 内)^[11]。我们在 200—400nm 内测定槲皮素和山奈酚标准品液及样品提取液的吸收值,槲皮素和山奈酚在 I 带 320nm 均有最大吸收,样品有较大吸收,确定选择波长 320nm 作为紫外分光光度法的测量波长。

本实验分别用槲皮素和山奈酚作标准品,在 320nm 处测定吸光度,所得校准曲线线性良好,稳定性良好,精密度良好,结果表明:紫外分光光度法(以槲皮素或山奈酚作标准品),操作简便,结果准确,重复性好,为积雪草中总黄酮含量测定的一种简便可行的方法。

(2) 测定同一份药材样品时,以槲皮素为对照品测定的结果(8.40mg/mL),比以山奈酚为对照品测定的结果(7.03mg/mL)高。

(3) 本文以乙醇为提取剂,利用微波法首次提取积雪草全草中的黄酮类化合物。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验确定了提取的最佳工艺条件按最佳工艺条件提取总黄酮含量为 8.40mg/g。该提取工艺具有稳定性好,操作简便,生产成本较低的优点。

参考文献

- [1] 赵宇新,李曼玲,冯伟红等.积雪草的研究进展[J].中国中医药信息杂志,2002,9(8):81—84.
- [2] 徐皓,李新生,吴三桥.积雪草药理作用的研究[J].氨基酸和生物资源,2005,27(2):17—20.
- [3] 王宝奎,翁东明,刘锡钧.积雪草甙的提取与分离[J].海峡药学,1996,8(4):3.
- [4] 秦路平,庄卫国,郑汉臣等.积雪草研究进展[J].国外医药.植物药分册,1997,12(4):154—157.
- [5] Bonte F, Dumas M, Chaudagne C *et al*. Influence of Asiatic Acid, Madecassic Acid, and Asiaticoside on Human Collagen I Synthesis [J]. *Planta Medica*, 1994, 60(2): 133—135.
- [6] 于泉林,高文远,陈海霞等. HPLC-ELSD 测定积雪草提取物中积雪草苷的含量[J]. 中国中药杂志,2007,32(6):503—505.
- [7] Cheng C L. Effect of Centella Asiatica on Ethanol-Induced Gastric mucosal Lesions in Rats [J]. *Life Science*, 2006, 7(21): 2647—2653.
- [8] 董朝敏. 积雪草黄酮和皂苷的提取分离及其性质研究[D]. 桂林:广西师范大学,2008.
- [9] 严赞开. 紫外分光光度法测定植物黄酮含量的方法[J]. 食品研究与开发,2007,28(9):164—167.
- [10] 曹建国,赵则海,李庆勇等. 刺五加丁香苷和总黄酮含量及其季节动态[J]. 植物学通报,2006,23(3):269—274.
- [11] 姚新生主编. 天然药物化学[M]. 第2版,北京:人民卫生出版社,1996. 191—193,194—195.

Extracting Technology and Determination of Total Flavonoids in Centella Asiatica

WANG Rong^a LI Yun-Xiang^a CAI Ling-Yun^{a,b} GAO Xia^a

^a College of Life Science, Key Laboratory of Environmental Science and Biodiversity Conservation of Sichuan Higher Education, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637002, P. R. China

^b Department of Chemistry, The Kaili University, Kaili, Guizhou 556000, P. R. China

Abstract Microwave-assisted extraction of total flavonoids in leaves of *Centella asiatica*, the optimum technology parameters were obtained by orthogonal tests. Total flavonoids in *Centella asiatica* were determined at 320nm by ultraviolet spectrophotometry with quercetin and kaempferol as standard control. The result shows the following the optimal extraction conditions: intermittent time was 3, MAE time 20s, solid/liquid ratio 1 : 10, and applied power 480W. under the optimal conditions, the content of total flavonoids was 8.40mg/g. The regression equation with quercetin was $y = 29.993C + 0.027$, $r^2 = 0.9982$, the precisions: RSD = 0.265%, RSD = 0.172% ($n \geq 6$), the average recovery of flavonoids was 99%, RSD = 1.51% ($n = 5$). The regression equation with kaempferol was $y = 36.928C + 0.0178$, $r^2 = 0.9991$, the precisions: RSD = 0.231%, RSD = 0.190% ($n \geq 6$), the average recovery of flavonoids was 99%, RSD = 0.714% ($n = 5$), stability test of the sample, RSD was 0.218% (in 60min). The method is highly sensitive and reproducible and can be used as a quantitative analysis method for total flavonoids in *Centella asiatica*.

Key words *Centella Asiatica*; Total Flavonoids; Microwave-Assisted Extraction; Ultraviolet Spectrophotometry; Orthogonal Experiment

欢迎您投稿 “高效、保质”的中文核心期刊

《光谱实验室》

这是您的发明、发现获得“优先权”的可靠保障!

发表周期多数(50% - 75%)为4—8个月,

少数(20% - 45%)为1—4个月,个别(0- 7%)为15—30天

及时发表科技论文,是尽早实现其社会效益的前提,也是作者创造性劳动得到尊重、为在世界上取得“优先权”的可靠保障,因为发明、发现的“优先权”通常是以出版时间为准的。因此,本刊把尽快发表作者的论文,视为自己的神圣职责。

确保论文质量是论文早日发表的条件。作者发表论文总是要反映自己在工作中有所发明、有所发现和有所创造的成绩,而不是去暴露自身的“缺欠”和“毛病”,换言之,作者发表论文总是要为自己争“光”,而不是自己要出“丑”。因此,作者投稿之前,除了自己要反复检查外,一定要多请您周围的同事、专家挑“毛病”,把“毛病”消灭在投稿之前,再投本刊才能发表得快。如果本刊挑出毛病,再请作者修改,反复“折腾”,不仅消耗双方精力,而且必然延长发表时间。保证质量的基本要求就是论文要做到“齐、清、定”。“齐”即全稿包括表、图和照片等齐全;“清”即文字图片打印(书写)清楚,不得有模糊不清的文字、图片和数字,段落要分明,便于排版和校对;“定”即做到稿件内容完整,在编辑过程中无须增删修改。

来稿请用 Word 或北大方正排版,用电子邮件发到本部电子信箱[E-mail: (1) gpsys@263.net; (2) gpsys@public.sti.ac.cn; (3) gps@chinajournal.net.cn; (4) gpsys@periodicals.net.cn]。为避免某一电子信箱的服务器发生故障而延误收稿,建议作者向本刊两个或两个以上信箱同时发送电子邮件。

本刊收到作者来稿后,都会在 16 小时(遇公休日顺延)内发出“关于收到稿件的通知”。因此,作者发送稿件后 5 日以上都没有消息,一定要及时来电查询。

一篇论文出版,常常需要反复沟通“作者→编辑部→审者→编辑部→作者”之间的联系,其中与作者的联系是最重要的一环,一旦脱节,必然中断编辑过程。因此作者来稿时,务必将联系人的详细地址、办公室电话、手机号码、传真号码和电子信箱等(通讯方式要尽可能全)告诉编辑部,以便能与您及时联系。否则,由此而耽误出版由作者自己负责。

《光谱实验室》编辑部