

穿心莲中总黄酮含量的测定

毕和平^① 韩长日 廖家旺 何猛雄

(海南师范大学化学系 海口市龙昆南路99号 571158)

摘要 以芦丁为对照品, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 体系为显色剂, 利用分光光度法测定了穿心莲中的总黄酮含量。确定了总黄酮提取方法、显色剂浓度和显色时间等。回归方程为 $A = 0.00652 + 11.0329C$, 相关系数 $r = 0.9997$ 。平均回收率为 104.20%, $\text{RSD} = 1.85\%$ ($n = 5$)。本法操作简便, 可行, 重现性好。

关键词 总黄酮, 分光光度法, 穿心莲。

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2006)02-0356-04

1 前言

穿心莲 (*Andrographis Paniculata*) 为常用中药, 又名一见喜、苦胆草、四方草、榄核莲等, 为爵床科穿心莲属植物^[1]。具有清热解毒, 凉血, 消肿之功效。用于感冒发热, 咽喉肿痛, 口舌生疮, 顿咳劳嗽, 泄泻痢疾, 热淋涩痛, 痈肿疮疡, 毒蛇咬伤等^[2]。穿心莲中黄酮类化合物主要有甲氧基黄酮类化合物、吡喃葡萄糖基黄酮类化合物等^[3,4]。文献曾报道穿心莲总黄酮对心肌组织形态损伤、心电图异常有明显的改善作用, 对急性心肌梗塞有明显的对抗作用, 对冠状动脉血栓性心肌梗塞有防治作用等^[5-7]。为进一步开发和利用其药用价值, 本文对穿心莲地上部分的总黄酮含量进行了测定, 目前尚未见有相关报道。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UV757CRT 紫外-可见分光光度计(上海精密仪器有限公司); FA1604 型电子天平(上海精科天平厂); RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 索氏提取器(自制)。

芦丁对照品(质量分数为 99.2%, 中国药品生物制品检定所); 穿心莲干燥样品(野生, 2004 年 4 月采集于海南省三亚市, 经海南师范大学生物系植物分类学高级实验师钟琼芯鉴定为 *Andrographis Paniculata* 的地上部分; 亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝、甲醇、乙醇, 石油醚等试剂均为分析纯; 实验用水为蒸馏水。

2.2 穿心莲黄酮类化合物的提取

(1) 准确称取穿心莲地上部分的干燥样品 4.0g, 置索氏提取器中, 加入 300mL 石油醚, 在 70℃加热回流至提取液无色, 放冷, 弃去石油醚液。将药渣中石油醚挥干, 继续用甲醇提至无色, 提

① 联系人, 电话: (0898) 65883680; E-mail: bhphx@hainnu.edu.cn

作者简介: 毕和平(1955—), 男, 山西省新绛县人, 教授, 主要从事天然药物化学研究。

收稿日期: 2005-11-13; 接受日期: 2005-12-05

取液移置 100mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 待用。

(2) 准确称取穿心莲地上部分的干燥样品 4.0g, 置索氏提取器中, 加入甲醇 300mL, 在 70℃ 加热回流至提取液无色, 浓缩, 提取液移置 100mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 待用。

2.3 校准曲线的绘制

精确称取芦丁对照品 20mg, 置 100mL 容量瓶中, 加入甲醇 70mL, 置水浴中微热使其溶解, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得浓度为 0.2mg/mL 的标准溶液。精确吸取芦丁标准液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL, 分置于 10mL 比色管中, 各加甲醇至 5mL, 再分别加入质量分数为 5% 的 NaNO_2 溶液 0.5mL, 摇匀, 室温放置 6min, 再加质量分数为 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.5mL, 摇匀, 室温放置 6min, 再加质量分数为 4% 的 NaOH 溶液 4.0mL, 摇匀, 室温放置 15min, 在 500nm 波长下测定吸光度, 同时以试剂空白作参比。以吸光度 A 为纵坐标, 浓度 $C(\text{mg/mL})$ 为横坐标, 绘制校准曲线。

3 结果与讨论

3.1 最大吸收波长的选择

精密吸取 3.0mL 芦丁标准溶液, 余下部分按 2.3 方法操作, 在紫外-可见分光光度计上, 波长 450—600nm 区间扫描。确定最大吸收波长为 500nm, 见图 1。

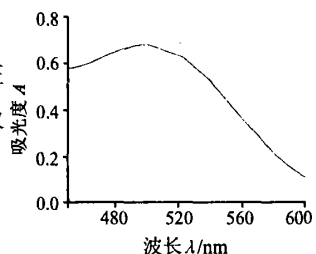


图 1 芦丁标准液显色后光吸收曲线

3.2 所用试剂浓度的选择

按 2.3 校准曲线制备各项所述的方法, 分别对显色剂 NaNO_2 — $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ — NaOH 体系的浓度变化对吸光度影响进行考察。试验结果表明: 亚硝酸钠质量分数在 4%—10%、硝酸铝质量分数在 8%—16%、氢氧化钠质量分数在 4%—9% 之间, 吸光度没有变化。故本法选择质量分数为 5% 的亚硝酸钠溶液、10% 的硝酸铝溶液和 4% 的氢氧化钠溶液为加入的显色剂浓度。

3.3 显色液的稳定性试验

试验结果表明, 在室温 $\leq 28^\circ\text{C}$ 的环境中, 显色时间在 10—60min 范围内, 吸光度是稳定的, 基本没有变化。因此, 在本试验选择的测定时间内, 黄酮类化合物与铝离子生成的络合物显色是稳定的。

3.4 校准曲线与回归方程

结果表明, 在芦丁标准溶液浓度 0.00—0.10mg · mL⁻¹ 的范围内, 线性关系良好 (见图 2)。得回归方程: $A = 0.00652 + 11.0329C$, 相关系数: $r = 0.9997$ 。

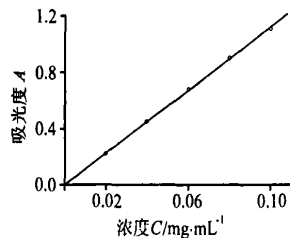


图 2 校准曲线

3.5 穿心莲总黄酮含量的测定

准确吸取样品液 1.0 或 2.0mL, 置于 10mL 比色管中, 加入甲醇至 5.0mL; 加入 5.0% 亚硝酸钠溶液 0.5mL, 摇匀, 放置 6min, 余下部分按 2.3 项方法操作, 在 500nm 下平行测定 5 次, 同时以样品空白做参比。根据回归方程, 计算总黄酮浓度。根据公式: 总黄酮含量 = (黄酮类化合物质量 / 干样品质量) × 100%, 得穿心莲总黄酮含量。石油醚除脂和叶绿素后, 再用甲醇提取总黄酮的测定结果见表 1。甲醇提取的测定结果见表 2。

表 1 穿心莲总黄酮含量测定结果(除脂后)

测定次数(<i>n</i>)	1	2	3	4	5	平均值	RSD(%)
吸光度 <i>A</i>	0. 119	0. 116	0. 113	0. 117	0. 120	0. 118	2. 48
含量(%)	0. 255	0. 248	0. 241	0. 250	0. 257	0. 250	

表 2 穿心莲总黄酮含量测定结果(不除脂)

测定次数(<i>n</i>)	1	2	3	4	5	平均值	RSD(%)
吸光度 <i>A</i>	0. 243	0. 243	0. 238	0. 237	0. 238	0. 239	1. 26
含量(%)	0. 268	0. 268	0. 262	0. 261	0. 262	0. 264	

从表 1 和表 2 可知, 穿心莲总黄酮的提取方法不同, 测定结果略有差异。单纯采用甲醇提取总黄酮的含量稍高, 这可能是样品供试液中某些脂溶性化学成分与碱作用生成有色物质或提取液中的原有色素所引起的误差^[8—11]。如果采用乙醇法提取穿心莲中的总黄酮, 平均含量为 0. 210%, RSD 为 3. 10%, 则测定结果明显偏低。故本法选择用石油醚除去脂溶性物质和叶绿素, 再用甲醇提取总黄酮的方法。

3. 6 精密度试验

试验方法见 3. 5 项, 结果见表 1 和表 2。采用本法测定穿心莲总黄酮含量, 精密度良好, 其相对标准偏差 RSD 分别为 2. 48%, 1. 26% 。

3. 7 加标回收试验

精确吸取已知总黄酮含量的穿心莲提取液 1. 0—2. 0mL, 置于 10mL 比色管中, 分别加入 0. 2mg/ mL 的芦丁标准溶液 0. 5mL, 余下部分按 2. 3 项下的方法操作, 测定总黄酮, 平行测定 5 次, 计算加标回收率, 结果见表 3 和表 4。

表 3 加标回收率试验(除脂后)

试品量	加标量	加标回收量	加标回收率
(μg)	(μg)	(μg)	(%)
101	100	208	107. 00
101	100	205	104. 00
101	100	204	103. 00
101	100	206	105. 00
101	100	203	102. 00

表 4 加标回收率试验(不除脂)

试品量	加标量	加标回收量	加标回收率
(μg)	(μg)	(μg)	(%)
211	100	314	103. 00
211	100	308	97. 00
211	100	307	96. 00
211	100	308	97. 00
211	100	309	98. 00

这 2 种不同方法的平均回收率分别为 104. 20% 和 98. 2% , 相对标准偏差 RSD 分别为 1. 85% 和 2. 83% , 具有良好的精密度和回收率。

本法采用石油醚除脂后, 再用甲醇提取穿心莲中总黄酮, 以 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 体系为显色剂, 利用分光光度法测定总黄酮, 操作简便, 重现性好, 结果可靠。

参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003. 1728.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 189.
[3] 张涛. 穿心莲的研究进展[J]. 中药材, 2000, 23(6): 366—368.
[4] 杨树良. 穿心莲属 *Andrographis neesiana* 中的新查耳酮和黄酮化合物[J]. 国外医学中医中药分册, 2004, 26(2): 115.
[5] 梁龙, 戴静, 杨大坚. 穿心莲防治心血管疾病的研究进展[J]. 中草药, 1997, 27(1): 52—54.
[6] 王琳, 杨静伟, 宋凤平. 穿心莲的药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2003, 20(6): 27—29.

- [7] 韩谷鸣, 姚倩. 穿心莲黄酮对血小板活化反应的抑制作用及机理研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, **20**(7): 527—529.
- [8] 林曼斌, 张曼虹. 紫马缨丹花色素的提取及稳定性研究[J]. 现代食品科技, 2005, **21**(3): 70—73.
- [9] 蒋新龙, 蒋益花. 蟹爪兰红色素的提取及性质研究[J]. 中国调味品, 2005, **317**(7): 38—41.
- [10] 丁利君, 赵丽琴. 红甘蔗皮红色素的提取及稳定性研究[J]. 食品与科技, 2005, **21**(2): 29—31.
- [11] 郭艳华. 荸荠皮色素的提取和稳定性研究[J]. 食品科学, 2004, **25**(12): 115—121.

Determination of Total Flavonoids in *Andrographis Paniculata*

Bi He-Ping HAN Chang-Ri LIAO Jia-Wang HE Meng-Xiong
(Department of Chemistry, Hainan Normal University, Haikou, Hainan 571158, P. R. China)

Abstract The total flavonoids in *Andrographis Paniculata* were determined by spectrophotometry with rutin standard and $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ system. The regression equation is $A = 0.00652 + 11.0329C$, $r = 0.9997$. The average recovery was 104.20% with the RSD of 1.85% ($n = 5$). The method is simple, reproducible and suitable for the determination of total flavones.

Key words Total Flavonoids, Spectrophotometry, *Andrographis Paniculata*.

本刊论文发表的正常周期: 2—8 个月 ——您的发明创造得到“优先权”荣誉的必要保障

缩短论文发表周期, 是尽早实现学术论文的社会效益的前提, 也是作者创造性劳动得到尊重、为其在世界范围内取得“优先权”荣誉的必要保障, 因为发明创造的“优先权”通常是以出版时间为准的。因此, 本刊在严格保证质量的前提下, 把尽快发表作者的论文, 视为自己的神圣职责。

来稿要符合“《光谱实验室》投稿须知”(见本刊 1994—2003 年每年第 1 期)、特别是其中第 4—7 项要求, 做到“齐、清、定”。“齐”即全稿包括表、图和照片等齐全, 符合本刊对稿件的各项要求; “清”即书写清楚, 段落分明, 便于排版和校对; “定”即做到稿件内容完整, 在排校过程中无须增删修改) 是保证论文质量不可缺少的条件。如果您希望论文早日发表(如 2—8 个月), 请务必按“须知”写稿。

如果来稿附有同行专家评语及单位推荐信, 论文还可以更快发表(0.5—2 个月)。

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) gpsy@263.net; 2) gpsy@citiz.net; 3) gpsy@chinajournal.net.cn; 4) gpsy@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, 建议作者向本刊几个信箱同时发送电子邮件, 并请作者发了邮件后, 打电话通知编辑部, 以便及时查询; 在尚未开通电子邮件业务的情况下, 作者也可向本刊投稿处直接邮寄纸质稿件两份。稿件邮寄地址: 北京市 81 信箱 66 分箱 《光谱实验室》编辑部联络处 刘建林, 100095。

本刊收到作者来稿后, 都会及时(1—3 日) 回信, 并发出“关于收到稿件的通知”。因此, 作者发送稿件后 10 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、办公室和家中的电话、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