

新疆粉绿铁线莲不同部位总黄酮含量比较

古丽巴哈尔·阿巴拜克力¹, 阿不都拉·阿巴斯^{2,*}

(1. 新疆师范大学生命科学与化学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054;

2. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 新疆粉绿铁线莲不同部位中含有黄酮类化合物。本实验采用分光光度法, 以芦丁为标准样品测定其不同部位中的总黄酮的含量, 采用正交试验设计对粉绿铁线莲不同部位中总黄酮提取工艺进行了最佳筛选, 四种因素对不同部位总黄酮含量测定均有影响, 分别得到了最佳提取工艺条件。茎: 乙醇浓度为 70%, 温度为 60℃, 浸提时间为 2.5h, 料液比为 1:60, 吸光度达 0.303; 叶: 乙醇浓度为 60%, 温度为 60℃, 浸提时间为 3.5h, 料液比为 1:30, 吸光度达 0.751; 花: 乙醇浓度 60%, 料液比 1:30, 时间 2.5h, 温度 60℃, 吸光度达 0.590; 果实: 温度为 80℃, 乙醇浓度为 60%, 料液比为 1:50, 浸提时间为 3h, 吸光度达 0.390。

关键词: 粉绿铁线莲; 总黄酮; 提取

Total Flavonoids Extraction and Content Comparison of Various Organs of *Clematis glauca* Willd. in Xinjiang

GULIBAHAER Ababaikeli¹, ABDULLA Abbas^{2,*}

(1. College of Life Science and Chemistry, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China;

2. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Flavonoid exists in *Clematis glauca* Willd. In this study the total flavonoids contents were assayed by spectrophotometry method with rutin as standard. The optimum extraction technologies of the total flavonoids from different parts of *Clematis glauca* Willd. were obtained by orthogonal test. The results were as follows respectively: The best extraction conditions for stem are concentration of ethanol 70%, temperature 60℃, extraction time 2.5h and rate of solid to solution 1:60, and the absorbance is 0.303; The best extraction conditions for leaf are concentration of ethanol 60%, temperature 60℃, extraction time 3.5h and rate of solid to solution 1:30, and the absorbance is 0.751; The best extraction conditions for flower are concentration of ethanol 60%, rate of solid to solution 1:30, extraction time 2.5h and temperature 60℃, and the absorbance is 0.590; The best extraction conditions for fruit are temperature 80℃, concentration of ethanol 60%, rate of solid to solution 1:5 and extraction time 3h, and the absorbance is 0.390.

Key words: *Clematis glauca* Willd; total flavonoids; extraction

中图分类号: 0623.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0210-04

粉绿铁线莲(*Clematis glauca* Willd.)藤本,一至二回羽状复叶;小叶有柄,常为单歧聚伞花序,三花;苞片叶状,四萼片,黄色,或外面基部带紫红色,瘦果卵形至倒卵形,花期6至7月,果期8至10月。生于海拔1700~2500米山地灌丛、平原河漫滩、城郊田间及荒地。

分布于我国新疆、青海、甘肃、陕西、山西。国外在蒙古、西伯利亚及中亚地区也有分布。全草可以入药,可祛风湿,主治慢性风湿性关节炎,关节疼痛;熬膏外敷可以治疗疮;枝叶水煎外洗,可止瘙痒症^[1]。

目前,国内外有一些关于粉绿铁线莲中挥发油的报道,但是对黄酮类化合物提取方法未见报道,用不同浓度乙醇浸提,新疆地产药用植物粉绿铁线莲不同部位中黄酮类化合物,确定最佳提取工艺,可为开发和利用其有效成分提供理论依据^[2]。

1 材料与方法

1.1 原料

新疆粉绿铁线莲于2006年8月采自新疆乌鲁木齐县永丰乡农田田埂等地。

收稿日期: 2007-11-01

基金项目: 新疆师范大学优秀青年教师科研启动基金项目(XJNU-0726)

作者简介: 古丽巴哈尔·阿巴拜克力(1969-),女,讲师,硕士研究生,研究方向为植物有效成分分析。E-mail: xj_rstm@yeah.net

*通讯作者: 阿不都拉·阿巴斯(1951-),男,教授,研究方向为资源植物学。E-mail: abdulla@xju.edu.cn

1.2 试剂

芦丁(rutin)对照品;亚硝酸钠(NaNO_2)、氢氧化钠(NaOH)、硝酸铝($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$)、三氯化铁(FeCl_3)、无水乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)、镁粉均为分析纯。

1.3 仪器

HZ-D 循环水式真空泵、HH-S 型水浴锅、S24 分光光度计、RE-52 旋转蒸发器、回流提取装置及 LAC164 分析天平(精确至 0.0001g)。

1.4 黄酮鉴定方法

1.4.1 盐酸-镁粉反应

在样品液中加入少量镁粉,再滴加 1~2 滴浓盐酸,在沸水溶液中加热 3 min,观察反应结果。

1.4.2 三氯化铝显色反应

将样品液滴于滤纸上,并滴加 5% FeCl_3 指示剂,观察反应结果。

1.4.3 铝盐反应

在样品液中滴加 1% AlCl_3 溶液,观察反应结果。

1.4.4 浓硫酸反应

在样品液中加入浓硫酸观察反应结果。

1.4.5 醋酸镁反应

在样品液中逐滴加入 1% 醋酸镁溶液,观察反应结果^[3-4]。

1.5 单因素试验

1.5.1 乙醇浓度对提取效果的影响

分别用 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇,在温度为 70℃、料液比为(质量:体积)1:15、每次 1h 的提取条件下提取 2 次,合并滤液,过滤,浓缩,然后于 50 ml 容量瓶定容,测定其吸光度。

1.5.2 料液比对提取效果的影响

分别用 10、20、30、40、50、60、70 倍量的 60% 乙醇,在温度为 70℃、料液比为(质量:体积)1:15、浸泡时间每次 1h 的提取条件下提取 2 次,合并滤液,过滤,浓缩,然后于 50 ml 容量瓶定容,测定其吸光度。

1.5.3 浸泡温度对提取效果的影响

温度分别为 30、40、50、60、70、80、90℃ 时,用 60% 的乙醇,在料液比为(质量:体积)1:15,时间为 1h 的提取条件下分别浸泡提取 2 次,合并滤液,过滤,浓缩,然后于 50 ml 容量瓶定容,测定其吸光度。

1.5.4 浸泡时间对提取效果的影响

用 60% 的乙醇,在料液比为(质量:体积)1:15、的提取条件下分别浸泡 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4h 并提取 2 次,合并滤液,过滤,浓缩,然后于 50 ml 容量瓶定容,测定其吸光度。

1.6 黄酮类化合物含量测定^[5-8]

1.6.1 标准溶液的配制

精确称取 0.200mg 经 120℃ 烘干至恒重的芦丁标准品,用体积分数 30% 乙醇溶解并定容至 100ml 即为标准液。

1.6.2 样品溶液的制备

准确称取样品各 1g,以乙醇为溶剂,用最佳条件进行提取,将滤液离心、浓缩,然后于 50ml 容量瓶中定容。

1.6.3 测定波长的选择

分别取标准溶液 1ml,置于 50ml 容量瓶中,加入 0.7ml 5% NaNO_2 ,摇匀,放置 6min 后加入 0.7ml 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,放置 6min 再加入 10ml 1 mol/L NaOH 溶液,混匀,用 30% 乙醇稀释至刻度,同时做空白对照,10min 后测定波长 400~600nm 区段的吸收度,得知芦丁最大吸收在 510nm 波长处,因此分光光度法选测定波长为 510nm。

1.6.4 标准曲线的制作和回归方程的建立

精密量取标准溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0ml 于 7 只 25ml 容量瓶中,再分别加入 0.7ml 5% NaNO_2 ,摇匀,放置 6min 后加入 0.7ml 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,摇匀,6min 后再加入 10ml 1 mol/L 的 NaOH 溶液,混匀,用 30% 乙醇稀释至刻度,15min 后于波长 510nm 处测定吸光度,0.0ml 为空白对照,测得不同浓度下的吸光度。测定结果见表 1。以标准溶液浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标作标准曲线。

表 1 标准溶液的吸光度
Table 1 Standard rutin concentration vs absorbance

标准溶液浓度(mg/ml)	0.00	0.008	0.016	0.024	0.032	0.040	0.048
吸光度	0.0	0.067	0.154	0.232	0.319	0.388	0.460

1.6.5 样品中黄酮含量测定

按标准曲线的制作方法精密量取样品溶液 0.0、1.0ml 于 25ml 容量瓶中,再分别加入 0.7ml 5% NaNO_2 ,摇匀,放置 6min 后加入 0.7ml 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,摇匀,6min 后再加入 10ml 1mol/L 的 NaOH 溶液,混匀,用 30% 乙醇稀释至刻度,15min 后于波长 510nm 处测定吸光度,0.0ml 为空白对照,测得不同浓度下的吸光度,根据回归方程找出样品中总黄酮的浓度,计算得原料中总黄酮含量。

计算公式如下:

$$\text{总黄酮含量}(\%) = [(C \times 50 \times 25) / (1 \times 1000)] \times 100$$

式中,C 为根据所测定的溶液的吸光度,代入回归方程计算出相应的总黄酮含量(mg/ml)。

1.6.6 正交试验设计

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,进一步考察乙醇体积分数、料液比、提取温度、提取时间对提取液中总黄酮含量影响,以确定最佳的总黄酮提取条件。

将 1.00g 粉碎的粉绿铁线莲不同部位按正交试验进行浸取,将滤液离心、浓缩,然后于 50 ml 容量瓶定容,用移液管准确吸取 1ml,放入 25ml 容量瓶中,按芦丁溶液标准曲线的绘制步骤进行操作,分别测定吸光度,按

回归方程分别计算出总黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 黄酮类物质的鉴定

显色反应结果见表2。结果说明粉绿铁线莲含有黄酮类化合物。

表2 显色反应结果
Table 2 Results of colour reaction

材 料	试剂				
	浓硫酸	氢氧化钠	三氯化铝	盐酸+ 镁粉	乙酸镁
粉绿铁线莲茎	橙色	橙红色	黄色	浅红色	黄色
粉绿铁线莲叶	橙黄色	深黄色	黄色	浅红色	黄色
粉绿铁线莲花	黄色	黄色	黄色	黄色	黄色
粉绿铁线莲果实	橙红色	橙红色	黄色	浅黄色	黄色

2.2 单因素试验结果

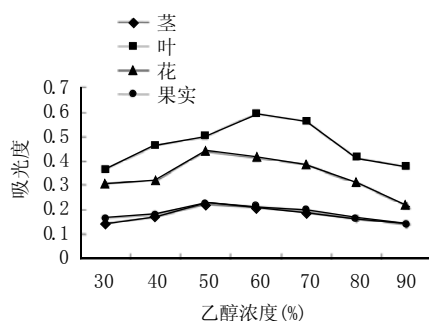


图1 乙醇浓度对提取效果的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on extration

图1表明,随着乙醇浓度的升高,黄酮的提取率先升高后降低,当乙醇浓度达到一定浓度时,提取率最高,随后又降低。考虑到提取操作的经济性,粉绿铁线莲茎、叶、花及果实部位均选用50%~70%的乙醇作为提取液。

图2表明,采用不同料液比进行浸提时总黄酮提取

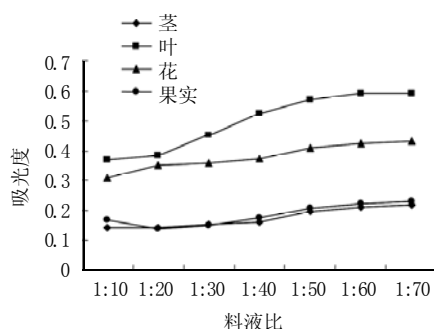


图2 料液比对提取效果的影响

Fig.2 Effects of rate of material to solution (m:V) on extraction

率有差别,料液比实际上是溶剂的用量大小,一般当溶剂的用量越大提取率也越大,但是过多的料液比会造成溶剂和能源的浪费。综合考虑,粉绿铁线莲叶选择1:30~1:50料液比,茎、花、果实则选择1:40~1:60。

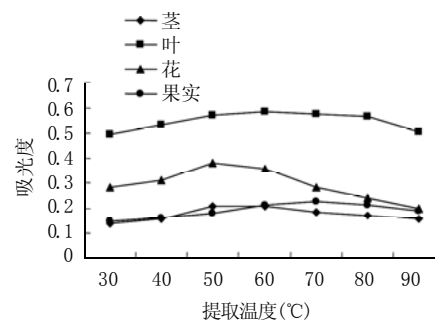


图3 温度对提取效果的影响

Fig.3 Effects of temperature on extraction

图3表明,总黄酮提取率随温度升高而升高,达到一定时提取率最高,随后温度再升高则呈现下降趋势。综合考虑,茎、叶、花均选择50~70℃,而果实则选择60~80℃。

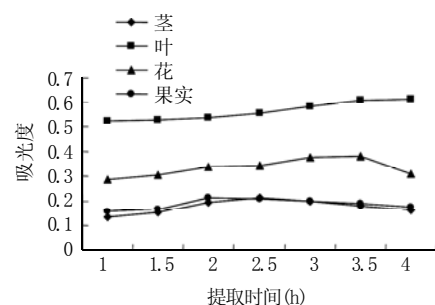


图4 提取时间对提取效果的影响

Fig.4 Effects of time on extraction

图4表明,随着提取时间的延长,不同部位总黄酮提取率有不同程度的增加,当达到一定时间时,提取率最高,随后呈现下降趋势。所以提取时间条件分别为:叶为3~4h,茎、花、果实等部位2~3h。

2.3 标准曲线与回归方程

所得标准曲线与回归方程见图5。

3 讨论

3.1 实验结果表明,粉绿铁线莲含有黄酮类化合物。本实验对新疆粉绿铁线莲不同部位中总黄酮进行了定性分析并用分光光度法对其含量进行比较测定,最终确定叶部含量最高其次为花部,再次为果实,茎部含量最低。

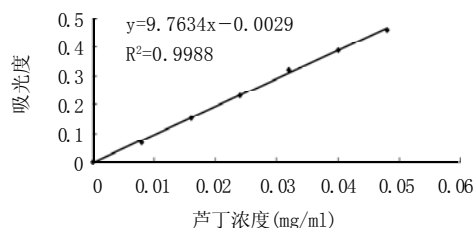


图5 标准曲线

Fig.5 Standard curve of rutin

表3 新疆粉绿铁线莲不同药用部位总黄酮含量测定结果

Table 3 Total flavonoids extraction and contents comparison of various organs of *Clematis glauca* Willd.

测定部位	最佳提取条件				吸光度率均值
	乙醇浓度 (%)	料液比	提取温度 (°C)	提取时间 (h)	
粉绿铁线莲茎	70	1:60	60	2.5	0.303
粉绿铁线莲叶	60	1:30	60	3.5	0.751
粉绿铁线莲花	60	1:30	60	2.5	0.590
粉绿铁线莲果实	60	1:50	80	3	0.390

3.2 以乙醇为提取溶剂,乙醇浓度低时黄酮类物质无法有效溶出,而随着乙醇浓度逐渐升高时,黄酮类化合物的溶解度增加,当乙醇浓度再增加,黄酮类化合物的溶解度减小,可能是由于随着乙醇浓度的增加一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分溶出量增加,这些成分与黄酮类化合物竞争同乙醇-水分子结合,从而导致黄酮类化合物的提取率下降。

3.3 一般来说,溶剂用量越大,提取率越高,但是,过大的料液比会造成溶剂和能源的浪费,并给后序工作带来麻烦,同时增大溶剂量,很有可能把一些不易溶出的成分提取出来,造成黄酮类化合物的提取率降低。

3.4 通常热提效率较冷提效率高。随着温度的不断升高,分子运动速度会逐渐加快,渗透、扩散、溶解速度也加快,同时高温可以引起细胞膜结构的变化,使黄酮类化合物由外层细胞转移到溶剂中。因此,随着

提取温度的升高黄酮类化合物的提取率升高,但是,温度过高可能引起黄酮类化合物结构被氧化破坏导致其提取率降低。

3.5 提取是物质的传质过程,需要一定时间才能达到平衡,时间太短,还未达到平衡,其得率就偏低。当传质过程达到基本平衡后,得率就不会明显上升,时间过长溶剂的挥发损耗和生成也有变化^[9-10]。

3.6 采用正交试验设计对粉绿铁线莲不同部位中总黄酮提取工艺进行了最佳筛选,分别得到的最佳提取工艺条件如下:茎:乙醇浓度为70%,温度60℃,浸提时间为2.5h,料液比为1:60,吸光度达0.303;叶:乙醇浓度为60%,温度为60℃,浸提时间为3.5h,料液比为1:30,吸光度达0.751;花:乙醇浓度60%,料液比1:30,时间2.5h,温度60℃,吸光度达0.590;果实:温度为80℃,乙醇浓度为60%,料液比为1:50,浸提时间为3h,吸光度达0.390。

参考文献:

- [1] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志第二卷: 第一分册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1994.
- [2] 黄文武. 铁线莲属植物的研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(3): 285-288.
- [3] 吴剑峰, 等. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 240-249.
- [4] 帕提古丽·马合木提, 赵永昕. 天山花椒果实的有效成分的初步研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 336-337.
- [5] 张锐, 张振俊, 侯治军, 等. 甘青铁线莲中黄酮类化合物提取工艺探讨[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(4): 58-60.
- [6] 瞿发林, 刘桂容, 赵汉清, 等. 贯叶连翘药材中总黄酮的含量测定研究[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(7): 395-396.
- [7] 方晴霞, 金戈. 黄秋葵中总黄酮的含量测定[J]. 医药导报, 2004, 23(9): 675-676.
- [8] 瞿发林, 刘桂容, 赵汉清, 等. 贯叶连翘药材中总黄酮的含量测定研究[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(7): 395-396.
- [9] 李荣, 李俊. 黄酮类化合物药理活性及其构效关系研究进展[J]. 安徽医药, 2005, 9(7): 481-483.
- [10] 华辉, 郭勇. 黄酮类化合物药理研究进展[J]. 广东药学, 1999, 9(4): 9-12.