

小血藤总黄酮的提取研究

赵虹桥, 唐克华, 陈功锡, 龚桂生

(吉首大学城乡资源与规划学院, 湖南 张家界 427000)

摘 要: 运用索式回流提取法、碱提酸沉法、水浴浸提法提取小血藤根、茎、叶中总黄酮, 以硝酸铝显色法测定其总黄酮的含量。进一步以正交试验法研究适宜小血藤根的索氏法提取条件, 结果表明: 小血藤根、茎、叶不同部位的总黄酮提取, 均以索式回流提取法为最好; 以石油醚在 50℃ 下回流 2h 去脂多次, 85% 乙醇按料液比为 1:15 于 70℃ 下提取 3h, 测得小血藤根、茎、叶中总黄酮含量分别为 1.67%、0.94%、2.35%。

关键词: 小血藤; 总黄酮; 提取; 测定; 含量

Comparative Study on Different Extraction Methods of Total Flavonoids and Contents Determination from Roots, Stems and Leaves of *Schisandra Propinqua*

ZHAO Hong-qiao, TANG Ke-hua, CHEN Gong-xi, GONG Gui-sheng

(College of Resources and Planning Science, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China)

Abstract: Soxlet extraction, alkali extraction and water bathe extraction methods were employed to extract the total flavonoids from roots, stems, leaves of *Schisandra Propinqua*, the contents of total flavonoids and were determined by means of aluminium nitrate colouration approach. The experiment results indicated that the optimum extraction method of the total flavonoids from the different parts in *Schisandra Propinqua* is Soxlet extraction. By extracting lipid with benzene in 2 h under 50 °C and then extracting total flavonoids by 85% ethanol (material ratio 1:15) in 3 h under 70 °C, the total flavonoids content of the roots, stems and leaves in *Schisandra Propinqua* are 1.67%, 0.94% and 2.35% respectively.

Key words *Schisandra Propinqua* total flavonoids; extraction; determination; content

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0158-04

小血藤, 又名铁箍散(*Schisandra Propinqua*(Wall.) Baill. Var. *Sinensis* Oliv.), 属五味子科五味子属, 雌雄异株, 为落叶或半落叶木质藤本, 长 2~3 m。小血藤多生长于海拔 400~1500 m 的山地沟谷林缘、灌丛或林下, 主要分布于湖南、湖北、云南、四川、贵州、广西、江西等省^[1]。小血藤全株入药, 根、茎、叶有散瘀消肿、活血散气、去风化痰之效, 可治风湿骨痛、跌打损伤、咳嗽等症; 种子则主治神经衰弱^[2]。

黄酮类化合物(flavonoids)大多具有颜色, 又称为黄酮体、黄碱素, 是广泛存在于自然界的植物次生代谢产物, 其数量列天然酚类化合物之首。植物体内大部分黄酮类化合物与糖成甙, 少部分则以甙元形式存在^[3]。现代医学研究表明, 黄酮类化合物具有降低心肌耗氧量, 使冠脉脑血流量增加, 抗心律不齐、软化血管、降血糖等作用; 它还是一种天然抗氧化剂, 能清除人体中超氧自由基, 具有抗衰老、增强肌体免疫力的生理活性。黄酮类化合物除主要用于医药工业外,

在食品工业中也有广泛用途, 如天然黄色素、抗氧化剂、甜味剂中都有黄酮成分。目前还未见关于小血藤中总黄酮研究的相关报道, 本研究采用三种不同的提取方法对小血藤根、茎、叶的总黄酮进行了提取, 并采用硝酸铝显色法测定总黄酮含量, 探讨小血藤中黄酮类物质的适宜提取方法, 为小血藤有效中药成分的提取研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

鲜小血藤, 采自湖南省桑植县。把采集的鲜小血藤根、茎、叶分开, 洗净, 置于烘箱中 60 °C 干燥 24 h 以上, 将干燥样品粉碎, 备用。

1.2 仪器与试剂

UV-160A 紫外可见分光光度计 日本岛津公司;
SF-6 索氏提取装置 日本; RE540 旋转蒸发器 日本。
芦丁标样(纯度 98%) 西安恒生制药厂; 95% 乙

收稿日期: 2006-10-30

基金项目: 科技部国家自然科技资源共享平台建设项目(2005DKA21006)

作者简介: 赵虹桥(1972-), 男, 讲师, 主要从事植物活性物质提取、分离及纯化研究。

醇、氢氧化钙、石油醚、盐酸、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠等试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 显色液配制

5% NaNO_2 溶液: 称取 5.000g NaNO_2 , 用双蒸水溶解并定容至 100ml, 置于避光处, 备用。

10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液: 称取 10.000g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, 用双蒸水溶解并定容至 100ml, 置于避光处, 备用。

1.5mol/L NaOH 溶液: 称取 15.000g NaOH , 用双蒸水溶解并定容至 250ml, 备用。

1.3.2 标准品溶液的制备

准确称取 120℃干燥至恒重的芦丁标准品 25.0mg, 用 60% 乙醇水浴微热溶解, 并完全转入 50ml 容量瓶中, 用 60% 乙醇定容, 得 0.50mg/ml 的芦丁标准溶液。

1.3.3 显色测定波长选择

准确量取 1.0ml 芦丁标准溶液于 10ml 刻度试管中, 加 5% NaNO_2 溶液 1.0ml, 摇匀后放置 6~8min; 继续加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1.0ml, 摇匀后放置 5~6min; 再加 1.5mol/L NaOH 溶液 5.0ml, 再加 60% 乙醇至满刻度, 摇匀后放置 10min; 立即取 3ml 显色液在 400~600nm 之间扫描测定吸收光谱, 确定最大光吸收波长。

1.3.4 测定标准曲线的绘制^[4-7]

精确吸取 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0ml (空白) 芦丁标准溶液各 3 份, 分别置于 10ml 刻度试管中按 1.3.3 方法, 制备各显色液, 测定显色液的最大光吸收值并求平均值, 计算出标准曲线的回归方程和相关系数。

1.3.5 总黄酮的提取方法^[8-11]

1.3.5.1 三种提取方法的比较

索氏回流提取法。精确称取小血藤根、茎、叶样品干粉末 5.000g, 用脱脂滤纸包好, 放入虹吸管中, 加入 80ml 石油醚于 50℃ 下加热回流去脂 2h, 每 15min 更换一次石油醚; 冷却, 弃去石油醚液, 加入 75ml 85% 乙醇 (料液比 1:15), 70℃ 加热回流提取 3h 后趁热过滤; 滤液用 60% 乙醇定容于 100ml 容量瓶中, 作供试样液。

碱提酸沉法。分别精确称取小血藤根、茎、叶样品干粉末 5.000g, 装入烧杯中, 加入 pH8 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液 150ml (料液比 1:30), 用封口膜封好, 置于 60℃ 恒温水浴锅中提取 2h; 冷却, 用 HCl 调 pH 到 5~6; 加入 95% 乙醇至含醇 85% 以上并过夜, 离心去除蛋白质、多糖等水溶性杂质; 取离心清液在旋转蒸发仪上浓缩至 30ml, 浓缩液用 60% 乙醇定容于 100ml 容量瓶中备用, 作供试样液。

水浴浸提法。分别精确称取小血藤根、茎、叶样品干粉末 5.000g, 装入烧杯中, 加入适量石油醚 (浸没样品即可), 封口膜封口, 并置于 50℃ 恒温水浴锅中去

脂, 每 10min 更换一次石油醚, 1h 后弃去石油醚, 并挥干材料中溶剂; 加入 75ml 85% 乙醇 (料液比 1:15), 于 65℃ 下提取 2h, 过滤提取液, 滤液用 60% 乙醇定容于 100ml 容量瓶中, 作供试样液。

1.3.5.2 提取正交试验

对初步筛选出的索氏回流提取法, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表头, 选择小血藤根作为研究材料, 对提取温度、料液比、提取剂乙醇浓度及提取时间四因素进行不同水平的优选。

1.3.6 总黄酮的含量测定^[12-14]

精密吸取样液 1.0ml 各三份, 分别置于 10ml 刻度试管中, 按 1.3.3 项操作, 测定显色液的最大光吸收值并求平均值。按标准曲线回归方程计算样液浓度 C, 按下式计算干样材料的黄酮含量:

$$\text{黄酮含量}(\%) = (C \times V_1 \times V_2 \times 10^{-3} / W) \times 100$$

式中, C 为测定样液浓度 (mg/ml); V_1 为测定的样液量取体积 (ml); V_2 为提取的供试样液体积 (ml); W 为干粉样重 (g)。

2 结果与分析

2.1 总黄酮含量显色测定波长及标准曲线方程

经测定, 得到芦丁标样的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色法最大光吸收波长为 510nm。制作的标准曲线方程为:

$$C = 0.0871A - 0.0014, r = 0.9996.$$

式中, C 为芦丁标准溶液浓度; A 为吸光度; r 为相关系数。

2.2 三种不同方法提取小血藤根、茎、叶中总黄酮的提取结果与分析

运用三种方法对小血藤不同部位总黄酮进行提取与测定的结果见表 1。

表 1 不同提取方法提取小血藤根、茎、叶中总黄酮的含量
Table 1 Contents of total flavonoids from roots, stems, leaves of *Schisandra propinqua* with different extraction methods

提取方法	A 值			总黄酮含量 (%)		
	根	茎	叶	根	茎	叶
索氏回流提取法	0.974	0.557	1.369	1.67	0.94	2.35
碱提酸沉法	0.675	0.186	0.408	1.15	0.30	0.68
水浴浸提法	0.896	0.528	0.964	1.53	0.89	1.65

从表 1 可以看出, 小血藤根、茎、叶中总黄酮以索氏回流提取法的提取效果最好, 其次是水浴浸提法, 再次是碱提酸沉法。但于根、茎中总黄酮的提取而言, 索氏回流提取法与水浴浸提法差异不大, 其差异主要体现在叶的总黄酮提取。以索氏回流法提取小血藤根、茎、叶的总黄酮含量分别为 1.67%、0.94%、2.35%。

2.3 索氏回流提取法的最适提取条件优选结果与分析

正交试验的因素水平表见表2，试验结果见表3，方差分析见表4。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素与水平
Table 2 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	因 素			
	A	B	C	D
	提取温度(℃)	料液比	乙醇浓度(%)	提取时间(h)
1	60	1:10	75	3
2	70	1:15	80	3.5
3	80	1:20	85	4

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果
Table 3 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

组号	A	B	C	D	样液的 A_{510} 值
1	1	1	1	1	0.832
2	1	2	2	2	0.835
3	1	3	3	3	0.864
4	2	1	2	3	0.921
5	2	2	3	1	0.976
6	2	3	1	2	0.951
7	3	1	3	2	0.930
8	3	2	1	3	0.944
9	3	3	2	1	0.937
k_1	0.844	0.894	0.909	0.914	
k_2	0.949	0.918	0.898	0.905	
k_3	0.937	0.917	0.923	0.910	
R	0.105	0.024	0.025	0.010	

表4 正交试验结果的方差分析
Table 4 Variance analysis of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
温度(℃)	0.020	2	20.000	19.000	*
料液比	0.001	2	1.000	19.000	
乙醇浓度(%)	0.001	2	1.000	19.000	
时间(min)	0.000	2	0.000	19.000	
误差	0.000	2			

表5 精密度测定实验结果
Table 5 Accuracy measurement results of experiments

测定次数	吸光度			平均值			相对标准偏差 RSD(%)		
	根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶
1	1.043	0.601	1.372						
2	1.021	0.585	1.367						
3	0.997	0.531	1.352						
4	0.964	0.546	1.361	0.994	0.557	1.360	3.0	1.4	0.93
5	0.972	0.559	1.349						
6	0.945	0.524	1.358						

表6 小血藤叶中总黄酮含量测定的重现性实验结果
Table 6 Reappearance experiment results from assaying total flavonoids content in leaves of *Schisandra Propinqua*

样品号	样品重(g)	样液总黄酮量(mg)	总黄酮含量(%)	平均含量(%)	标准偏差(%)	RSD(%)
1	5.0011	119.146	2.382			
2	5.0009	118.892	2.377			
3	5.0016	116.098	2.321	2.357	0.027	1.15
4	5.0012	118.450	2.368			
5	5.0019	116.621	2.335			

表3及表4的数据显示，索氏回流提取法中影响总黄酮提取的因素主次为 $A > C > B > D$ ，因素A具有显著性，B、C、D不具显著性。索氏回流提取法提取总黄酮的最适提取条件为： $A_2B_2C_3D_1$ ，即：85%乙醇按料液比为1:15于70℃下提取3h。

2.4 测定方法的精密度实验

准确吸取小血藤根、茎、叶的样液1.0ml，每种样液各6份并按1.3.4的方法测定，结果见表5。

由表5可知，RSD(n=5)为0.93%~3.0%，说明选择的硝酸铝显色法测定小血藤根、茎、叶中总黄酮含量达到了分光光度法的较高精密度要求。

2.5 提取与显色测定方法的重现性实验

精确称量小血藤叶干粉5.000g，各五份，按1.3.5.2项中索氏回流提取法制备供试液，然后测定样液显色后的吸光度，代入标准曲线方程计算得供试液浓度，再计算样品总黄酮含量，结果见表6。

由表6可知，五次测得的叶平均总黄酮含量为2.357%，标准偏差为0.027，相对标准偏差RSD(n=5)为1.15%，这反映以索氏回流提取法及Al(NO₃)₃ 510nm显色法测定小血藤总黄酮的方法重现性好。

2.6 显色测定方法的加标回收率实验

精确吸取五份索氏回流提取法中小血藤叶的供试液1.0ml，置于刻度试管中，分别加入芦丁标准溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml，按标准曲线绘制法显色操作，测定吸光度，计算总黄酮含量。回收率按下式计算：

$$\text{回收率}(\%) = \frac{x_1 - x_0}{m}$$

式中， x_1 为加入标准液后测得的总黄酮含量(mg)； x_0 为材料样品中总黄酮的原含量(mg)；m为加入的标准

表7 显色测定方法的加标回收率实验测定结果
Table 7 Recovery results of coloration with certain addition of standard

样品号	原含量 x_0 (mg)	加标量 m (mg)	加标测得量 x_1 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	1.1784	0.1	1.2743	95.87	97.98	2.3
2	1.1784	0.2	1.3738	97.71		
3	1.1784	0.3	1.4742	98.63		
4	1.1784	0.4	1.5637	96.29		
5	1.1784	0.5	1.6855	101.42		

芦丁量(mg)。

由表7可知,加标平均回收率为97.98%,相对标准偏差RSD($n=5$)为2.3%,反映本研究选取的 $Al(NO_3)_3-NaNO_2-NaOH$ 显色体系中各物质浓度、用量及显色时间均适合于小血藤总黄酮含量测定。

3 结 论

3.1 小血藤各部位的总黄酮的提取以索氏回流法提取效果为最好,影响索氏回流提取法提取效果的最主要因素是提取温度,其次是提取溶剂乙醇浓度、料液比及提取时间。索氏回流提取法的最适提取条件为:石油醚 $50^\circ C$ 下多次去脂2h,85%乙醇按1:15料液比于 $70^\circ C$ 下提取3h。以 $NaNO_2-Al(NO_3)_3-NaOH$ 显色体系法测得索氏回流提取法中小血藤根、茎、叶总黄酮含量分别为1.67%、0.94%、2.35%。

3.2 碱提酸沉法的总黄酮含量在三种方法中最低,推测是由于小血藤中含有较多胶质及鞣质成分,被碱水浸出后呈强力胶状物,从而容易使相当一部分黄酮物质被吸附,而不易在酸化后为醇所转溶。叶的水浴浸提法与索氏回流提取法所显示出的提取样液总黄酮量差异也说明类似的原因。因为鞣质及胶质成分易在水浴浸提时被直接浸出,同样会因一部分黄酮物质吸附住而使测定结果出现偏低。

3.3 石油醚的沸程为 $30\sim 60^\circ C$,去脂过程中温度不宜过高,应控制在 $40\sim 50^\circ C$,否则会影响到去脂的效果。由于石油醚与乙醇互溶,石油醚去脂后,应将滤纸包拿出放入 $60^\circ C$ 的烘箱中,时间 $3\sim 5min$,这样可以使石油醚尽量挥发掉,而不会影响到下一步用乙醇提取黄酮的效果。

3.4 正交试验提取材料的选取:因为叶的量相对根而

言比较少,且叶中的干扰测定的杂质(如颜色物质)相对也较多,加上民间用药多使用根(内服),叶则主要用于外敷的草药中(黏合等),故本研究中选根的粉末做原料进行正交提取研究。

3.5 就总黄酮的含量而言,小血藤作药材使用部位应以叶和根为主,以便有效的对小血藤药材资源进行利用。

参考文献:

- [1] 林祁,文香英.湖南五味子科药用植物资源调查[J].湖南中医杂志,1997,73(3):61-62.
- [2] 孙成仁.五味子属多蕊组内向药亚组[J].四川师范学院学报:自然科学版,1993,15(1):57-64.
- [3] 肖崇厚.中药化学[M].2版.上海:上海科学技术出版社,1996:270-285.
- [4] 谢大年,郭兆贵.银杏叶提取物中黄酮类成分的高效液相色谱分析[J].色谱,1994,12(5):384-385.
- [5] 田新玲,晏佩霞,仝殿荣.分光光度法测定天然植物中黄酮含量[J].仪器仪表与分析监测,2003(3):25-26.
- [6] 包贝华,杨建平,张丽,等.分光光度法测定荆芥穗中总黄酮的含量[J].南京中医药大学学报,2004,20(2):124-126.
- [7] 魏永生,王永宁,石玉平,等.分光光度法测定总黄酮含量的实验条件研究[J].青海大学学报:自然科学版,2003,21(3):61-63.
- [8] 李云志,曾凡骏,李帆.元宝枫叶总黄酮的提取研究[J].食品与生物技术学报,2006,25(1):29-30.
- [9] 丁利君,吴振辉,蔡创海,等.金银花中黄酮类物质最佳提取工艺的研究[J].食品科学,2002,23(2):62-66.
- [10] 刘春宇,唐丽华,顾振纶.不同提取方法对山楂总黄酮含量的影响[J].苏州医学院学报,1998,18(12):1266-1267.
- [11] 王卓慧,张沐新,杨晓虹,等.洋葱中总黄酮乙醇提取工艺的研究[J].中草药,2006,37(3):387-388.
- [12] 周兰香,黄阿根.分光光度法与HPLC法测定荷花总黄酮的研究[J].中草药,2002,33(1):35-37.
- [13] 李梅青,盛旋.反相高效液相色谱法用于葛根黄酮提取物的分离与主要活性成分的测定[J].分析化学,2003,31(2):178-180.
- [14] 裴刚,周朴华,何桂霞,等.皱边石杉中总黄酮含量的研究[J].湖南中医学院学报,2003,23(2):17-18.