

# 野马追中总黄酮的测定

陈 健<sup>1</sup>, 姚 成<sup>2</sup>

(1. 金陵科技学院 工程系, 江苏 南京 210001; 2. 南京工业大学 理学院, 江苏 南京 210009)

[摘要] 采用冷浸法、加热回流法和超声法 3 种提取方法提取了野马追中的总黄酮, 用芦丁作为对照品, 硝酸铝——亚硝酸钠紫外——可见分光光度法测定野马追中总黄酮含量. 在选定的实验条件下, 芦丁的浓度和吸光度呈良好的线性关系, 标准曲线的相关系数为 0.999 9, 测定的相对标准偏差为 1.27%~1.63%, 平均回收率为 98.20%. 该方法简便、快速、灵敏度高, 并具有良好的精密度与准确度, 适合中药总黄酮含量的测定. 结果显示: 野马追中含大量黄酮类化合物, 含量在 2% 左右; 不同提取方法比较, 超声法黄酮的浸出率最高.

[关键词] 野马追, 总黄酮, 提取, 紫外分光光度法, 含量测定

[中图分类号] TQ460.72, [文献标识码] B, [文章编号] 1672-1292(2004)02-0016-03

黄酮类化合物广泛存在于植物体中, 其化合物的母核上常有一OH, —OCH<sub>3</sub> 等取代基, 由于有助色团的存在, 使该类化合物多显黄色. 黄酮类化合物有重要的生理功能, 可以用作抗氧化剂、酶抑制剂、色素及光屏蔽物、植物生长调节剂及植物抗毒素<sup>[1]</sup>. 近年来, 分离出来的黄酮类化合物有多种药理作用: 金丝桃苷有抗脑缺血、心肌缺血的作用以及对消化性溃疡的保护作用; 槲皮素、芸香苷有抗自由基和镇痛作用; 黄芩苷元、槲皮素有抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>; 芸香苷又称芦丁, 临床用来防治脑溢血、高血压等心脑血管疾病<sup>[3]</sup>; 从泽兰属的植物中分离出的黄酮化合物对 KB 细胞有一定的抑制作用, 某些黄酮类化合物还有较强的抗癌活性<sup>[4]</sup>. 所以了解植物体内的黄酮类化合物对于开发利用中药资源有很大的意义.

野马追(*Eupatorium lindleyanum* DC.) 是菊科植物轮叶泽兰的全草, 中医药理认为本品苦、平, 具有清热解毒、祛痰、定喘、降血压和提高人体免疫力等功效, 用于治疗慢性气管炎、支气管炎、高血压等疾病. 野马追含有黄酮、生物碱、挥发油和香豆素等中药活性成分, 对野马追总黄酮的测定研究未见报道. 本文用 3 种不同的提取方法提取野马追中的总黄酮, 利用黄酮类分子中的酚羟基可与 Al<sup>3+</sup> 在碱性溶液中显色的原理测定其含量<sup>[5]</sup>.

## 1 仪器和材料

### 1.1 仪器

Agilent 6890 series GC/MS system: 载气为高纯氮; 电离方式 EI, 离子源温度 220℃, 电子能量 70

eV, 发射电流 470 μA; 扫描质量范围(m/z) 35~500 amu; DB-5 玻璃毛细管色谱柱 30 m × φ0.32 mm, 柱温从 60℃(保持 6 min) 程序升温至 280℃, 升温速率为 10℃/min.

UV-754 型紫外可见分光光度计: 上海第三分

析仪器厂制造.

DE-360 超声波仪 35 kHz: 浙江宁波市象山县石浦海天电子仪器厂制造.

### 1.2 样品

野马追: 采自江苏盱眙王店乡境内的杜梁山. 取野马追的地上部分, 冲洗后剔除泥沙, 用去离子水反复清洗, 晾干后放入烘箱中 80℃ 烘干(约 5 h), 粉碎过 20 目筛, 装入广口瓶中备用.

### 1.3 试剂

芦丁对照品购自中国药品生物制品鉴定所; 无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠试剂均为分析纯; 蒸馏水为二次蒸馏水.

## 2 实验方法

### 2.1 野马追总黄酮的提取方法<sup>[6]</sup>

#### 2.1.1 冷浸法

精确称取野马追粗粉 3 g(精确至 0.001 g), 置于圆底烧瓶中, 加入 95% 乙醇 90 mL, 室温放置 24 h. 为了提高溶出率, 加入搅拌装置, 前 6 h 不断搅拌, 后 18 h 静置. 过滤, 滤液减压蒸馏回收乙醇, 用 95% 乙醇定容至 25 mL.

#### 2.1.2 加热回流法

精确称取野马追粗粉 3 g(精确至 0.001 g), 置入圆底烧瓶中, 水浴加热回流 3 次, 每次加入 95%

乙醇 30 mL, 回流时间分别为 3 h、2 h、1 h, 趁热过滤, 合并滤液, 减压蒸馏回收乙醇, 用 95% 乙醇定容至 25 mL.

2.1.3 超声提取法

精确称取野马追粗粉 3 g( 精确至 0.001 g), 置入锥形瓶中, 超声波提取 3 次, 每次加入 95% 乙醇 30 mL, 提取时间均为 20 min, 过滤, 合并滤液, 减压蒸馏回收乙醇, 用 95% 乙醇定容至 25 mL.

2.2 野马追总黄酮提取方法比较

用气相色谱-质谱联用分析, 得到 3 种提取方法的总离子流色谱图, 见图 1( 冷浸法)、图 2( 加热回流法)、图 3( 超声法).

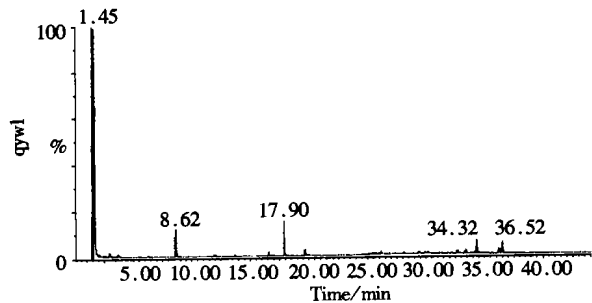


图 1 野马追乙醇提取物气质联用分析总离子流色谱图(冷浸法)

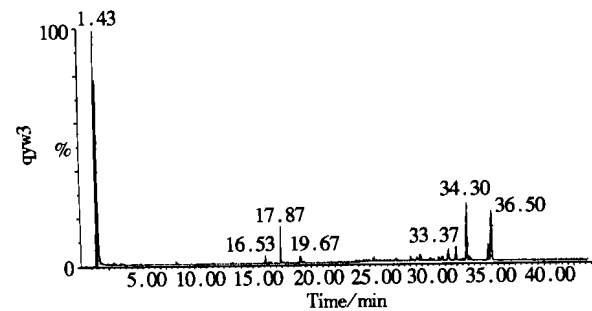


图 2 野马追乙醇提取物气质联用分析总离子流色谱图(加热回流法)

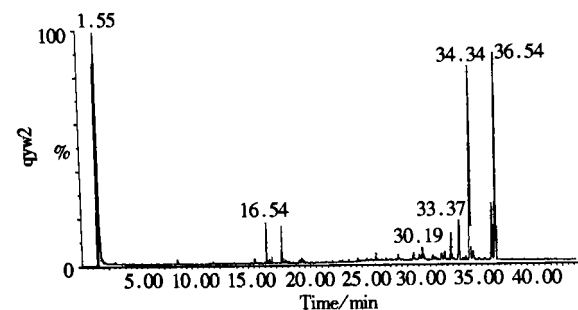


图 3 野马追乙醇提取物气质联用分析总离子流色谱图(超声法)

2.3 野马追总黄酮的测定方法

2.3.1 标准曲线的制备

精密称取经 120℃ 恒温干燥至恒重的芦丁 4.18mg 至 25 mL 容量瓶中用 95% 乙醇稀释至刻度. 精密移取 0.167 2 mg/mL 的标准品溶液 0.00、

1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 摇匀放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀再放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠 4 mL, 再加蒸馏水至刻度, 摇匀放置 15 min. 以 0.00 mL 为参照, 在 510 nm 下测定各溶液的吸光度, 按浓度与吸光度相关关系求出相关系数, 并计算回归方程为:  $A = 11.87C - 0.0155$ ,  $r = 0.9999$ . 结果表明芦丁在 0.016 72~ 0.083 6 mg/mL 之间呈线性关系.

2.3.2 样品的测定

精密移取野马追黄酮提取液各 0.30 mL, 在 510 nm 下按与标准曲线相同的方法显色测定. 通过标准曲线, 计算出样品总黄酮的含量. 重复 4 次, 计算平均值和相对标准偏差.

2.3.3 稳定性实验

精密移取野马追黄酮提取液和标准品溶液各 0.30 mL, 按与标准曲线相同的方法操作, 然后每隔 10 min 测定 1 次. 结果表明, 对照品和野马追提取液在 4 h 内吸光度稳定, RSD 低于 2%.

2.3.4 加样回收率试验

分别移取 1 mL 标准品溶液和 0.3 mL 野马追黄酮提取液( 超声提取法) 于 10 mL 容量瓶中, 各 4 份, 测定吸光度, 计算得总黄酮含量及回收率.

3 实验结果

(1) 3 种不同方法提取的野马追总黄酮含量测定结果见表 1.

表 1 野马追中总黄酮含量的测定结果(  $n = 4$  )

提取方法	平均吸光度 $A$	总黄酮含量/( mg/g )	RSD/ %
冷浸法	0.555	13.35	1.63
加热回流法	0.634	15.20	1.27
超声提取法	0.844	20.12	1.56

(2) 加样回收率试验结果见表 2. 实际加入量 0.891 5 mg, 平均加样回收率 98.20% .

表 2 回收率试验结果

编号	加入总黄酮量/ mg	测得总黄酮量/ mg	回收率/ %
1	0.891 5	0.870 3	97.62
2	0.891 5	0.878 2	98.51
3	0.891 5	0.878 7	98.56
4	0.891 5	0.874 5	98.10

4 讨论

(1) 用 3 种方法提取野马追中的总黄酮, 在本实验条件下, 超声波提取法操作简单, 无需加热, 3 次提取时间合计为 1 h, 即可超过冷浸 24 h 和加热回流 6 h 的测定结果, 使浸出物测定的前处理时间

大大缩短,简化了操作.并且超声波破碎是一个物理过程,它是通过超声波产生的强烈振动、高速度、强烈的空化效应、搅拌作用来破坏植物药材的细胞,使溶媒能渗透到药材细胞中,从而加速药材中的有效成分溶解于溶媒中,故可以提高有效成分的提出率.浸提过程中无化学反应发生.经本文作者用气相色谱—质谱联用分析,3种方法谱图的峰位置完全一致,被浸提的化学成分结构和性质没有发生变化,说明超声波提取是中草药成分提取的一种快速高产的提取方法.

(2) 黄酮类化合物的化学结构复杂,但分子中都含有酚羟基,可与  $\text{Al}^{3+}$  在碱性溶液中形成络合物显色,在一定浓度范围内其浓度和吸光度符合比尔定律,用此方法测定总黄酮的量方便、快速,重现性好.

(3) 经实验测定野马追含总黄酮量为2%左右,黄酮类化合物的生理作用多种多样,有些可以止咳祛痰,有些可以抗菌消炎.野马追的药效和保健作用和它所含大量黄酮类化合物有一定的关系.

# [参考文献]

- [1] J B 哈本. 黄酮类化合物[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [2] 黄河胜, 马传庚, 陈志武. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 589-592.
- [3] 李茂星, 谢景文, 葛欣, 芦丁药效学研究进展[J]. 华西药学杂志, 2000, 15(6): 450-451.
- [4] 李晓群, 金琪漾. 闽台两省黄酮类抗癌植物资源[J]. 福建中医药, 1998, 29(3): 33.
- [5] 田树革, 肖新芳, 周晓英. 槐米不同制品中总黄酮含量变化研究[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(12): 920.
- [6] 冯育林, 谢平, 吴蓓, 等. 中草药提取工艺研究概况[J]. 中医药学刊, 2002, 20(5): 647-648.

## Determination of Total Flavonoids from *Eupatorium Lindleyanum* DC.

CHEN Jian<sup>1</sup>, YAO Cheng<sup>2</sup>

(1. Department of Engineering, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210001, China;

2. School of Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** The total flavonoids content was extracted from *Eupatorium Lindleyanum* DC by three different methods: infusion, ultrasonic and reflux. Rutin was used as a control. The total flavonoids content of *Eupatorium lindleyanum* DC was determined by  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - $\text{NaNO}_2$  colorimetry. Under chosen experimental conditions, there was a linear relationship between the concentration of Rutin solution and absorption spectrum in the range of 0.016 72~0.083 6 mg/mL with correlation coefficient of 0.999 9. The average recovery of this method was 98.20%, and the relative standard deviation was 1.27%~1.63%. The analysis method developed was simple, fast and highly sensitive. With a better accuracy and precision, and suitable for the determination of the total flavonoids content of conventional Chinese medicine. The result shows that the total content of flavonoids in *Eupatorium lindleyanum* DC was about 2%. Among the three extraction methods, ultrasonic extraction was the highest in extraction efficiency.

**Key words:** *Eupatorium lindleyanum* DC, total flavonoids, extraction, UV spectrophotometry, content determination

[责任编辑: 严海琳]