

青藏高原藏木香总黄酮提取工艺研究 及含量测定

杨月琴^{1,2,3} 彭敏¹ 胡凤祖¹ 常小平⁴ 马海乐³ 马世震^{1,*}

(1.中国科学院西北高原生物研究所,青海西宁 810008 2.中国科学院研究生院,北京 100049;
3.河南科技大学,河南洛阳 471003 4.青海省大通宝库林场,青海大通 810100)

摘要:目的:研究藏木香中总黄酮的提取工艺及含量测定。方法:采用正交实验进行优选,考察乙醇浓度、溶剂倍数、提取时间等因素对黄酮得率的影响,用紫外分光光度法测定其含量。结果:乙醇浓度是主要的影响因素,最佳提取工艺为选用75%乙醇作为提取溶剂,料液比1:20,水浴热回流提取2h。以芦丁为对照品,采用分光光度法测定出总黄酮平均含量为0.28mg/g。结论:提取工艺可行,紫外分光光度法简单、快速、准确;为藏木香深度开发提供了科学依据。
关键词:藏木香,黄酮,提取工艺,紫外分光光度法

Study on the extraction technique and quantification of total flavonoids in *Inula racemosa* grown in Qinghai-Tibet plateau

YANG Yue-qin^{1,2,3} PENG Min¹ HU Feng-zu¹ CHANG Xiao-ping⁴ MA Hai-le³ MA Shi-zhen^{1,*}

(1.Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;
2.Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3.Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;
4.Qinghai Baoku Forestry Farm, Datong 810100, China)

Abstract: Objective: Aim to study the best conditions of extraction techniques for total flavonoids in *Inula racemosa*. Methods: The best conditions of extraction technique for total flavonoids were optimized with orthogonal experiment. Developed by ethanol solution with different concentrations, solvent multiples and extraction duration, determination of total flavonoids with UV-spectrophotometry was made. Results: Ethanol concentration was the major factor for determining total flavonoids contents. The best conditions for the extraction techniques of total flavonoids were 75% ethanol which was 20 times of the medicine amount, reflux extracting 2 hours. The yield of total flavonoids in *Inula racemosa* was estimated at 0.28mg/g. Conclusion: The extraction techniques are feasible and the UV-spectrophotometric method is simple, quick and accurate.

Key words: *Inula racemosa*; flavonoids; extraction technique; UV-spectrophotometric method
中图分类号:TS201.2 文献标识码:B 文章编号:1002-0306(2011)02-0251-03

藏木香(*Inula racemosa* Hook.f.)为菊科植物,主要分布在青海、甘肃、西藏、四川等省区海拔2000m以上地区,气味芳香浓郁,具有行气镇痛、健脾消食、温中和胃等功效,藏木香既含有药用成分,又是保健食品敷料和香料的主要成分^[1-4],是一种急需开发利用的资源,其潜在的功能食品开发前景值得我们发掘和研究。目前仅青海、甘肃和四川省相关科研与企业开展了藏木香的人工栽培和繁育技术研究,与攻

关,其营养价值、药用价值及抗病机理及产品研发等却尚未得到深入的研究^[4-5]。黄酮类化合物是中草药的活性成分之一,具有多种医疗、保健功效,可清除体内自由基,延缓衰老和抑制肿瘤,防护紫外线伤害等,除了具有显著的药用价值外,还可作为食品添加剂直接应用在食品中或者作为活性成分开发成为功能性食品。而定性定量检测是对其进行分类和质量评价的前提条件,尽管其他一些现代化的仪器分析方法如毛细管电泳和微胶束毛细管色谱也已经被应用于黄酮类物质的检测,但目前应用最广泛的还是分光光度法及使用C₁₈柱的HPLC系统^[6-12]。青藏高原藏木香的黄酮类化合物尚未被开发利用,本研究首次对藏木香根中的总黄酮进行提取工艺研究及含量测定,旨在为藏木香保健品的进一步研究与开发提供基础的科学的理论依据。

收稿日期:2010-05-20 *通讯联系人

作者简介:杨月琴(1975-),女,硕士,讲师,从事功能性食品开发方面的研究。

基金项目:河南科技大学特聘教授科研启动费(09004004),青海省重点攻关项目(2006-034)。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

藏木香 青海省大通宝库林场药材人工种植实验基地栽培,取其根,洗净,自然阴干,粉碎,备用;芦丁对照品 中国药品生物制品检定所;亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇 分析纯,超纯水。

Cary 300 紫外扫描分光光度仪 美国 Varin; KQ-100E型超声波清洗器 昆山科技有限公司; MOLEMENT 元素型超纯水机 上海摩勒生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 正交实验设计提取工艺 根据单因素考察结果、联系生产实际及参考文献资料,认为总黄酮成分的提取与乙醇浓度(因素 A)、溶剂倍数(因素 B)及提取时间(因素 C) 3 个因素有关,故选择其作为考察因素,用 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验设计、优选,见表 1。

表 1 总黄酮提取条件因素水平表

水平	因素		
	A 乙醇浓度 (%)	B 溶剂倍数 (倍)	C 提取时间 (h)
1	55	10	1.0
2	75	15	1.5
3	95	20	2.0

1.2.2 含量测定方法 采用分光光度法。黄酮类化合物是具有苯并吡喃环结构的一类天然化合物的总称,一般具有 4 位羰基,且呈现黄色。黄酮类化合物多分布于植物中,大多数以苷的形式存在。黄酮类化合物中的 3-羟基、4-羟基或 5-羟基、4-羰基或邻位酚羟基在亚硝酸盐存在的碱性条件下与 $Al(NO_3)_3$ 形成稳定的红色络合物。此络合物可不经分离用分光光度法直接测定样品液中总黄酮的含量。该法中总黄酮的含量的最低检测限为 $3.5 \mu g/mL$ 。

1.2.2.1 对照品溶液和样品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 5.0mg, 60% 乙醇溶解,转入 50mL 容量瓶中,用 60% 乙醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 0.10mg/mL 的对照品溶液。

称取干燥的栽培藏木香粉末 1.500g,置平底烧瓶中,按照表 1 正交实验设计方法加入一定浓度、一定体积的乙醇,在 $80^\circ C$ 恒温水浴中回流提取 2 次,过滤,合并提取液,滤液减压回收乙醇至无乙醇味,再用 60% 乙醇定容至 50mL,摇匀,即为样品液,备用。

1.2.2.2 分光光度法 精密吸取一定量对照品和样品溶液置于 50mL 容量瓶中,取 2.0mL 加 60% 乙醇至 6.0mL,加 5% $NaNO_2$ 溶液 1.0mL,摇匀,放置 6min,加 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液 1.0mL,摇匀,放置 6min,加 10% $NaOH$ 溶液 10mL,用 60% 乙醇定容至刻度,摇匀,放置 15min,以相应试剂作空白,测定吸光度。显色后的对照品和样品溶液在 400~600nm 间扫描,对照品和样品溶液均在 510nm 处有最大吸收。

2 结果与分析

2.1 含量测定方法研究结果

2.1.1 标准曲线 精密量取对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL,置于 50mL 容量瓶中,各取 2.0mL 以上述

1.2.2.2 方法测定吸光度(见图 1)。

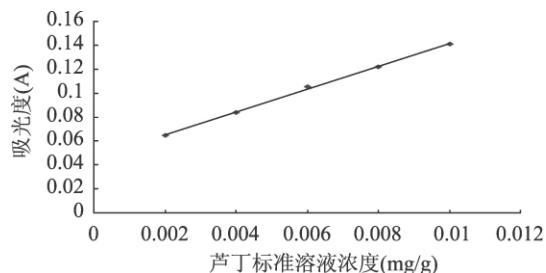


图 1 芦丁标准曲线图

以质量浓度(X)与吸光度(Y)进行线性回归,得回归方程为 $Y = 9.53X + 0.0462$, $r = 0.9993$,结果表明在此范围内线性关系良好。

2.1.2 精密度实验 取同一浓度的对照品溶液 5 份,各 2.0mL,依 1.2.2.2 测定方法测定吸光度(见表 2)。

表 2 精密度实验结果 (n=5)

序号	吸光度 (A)	平均值	RSD (%)
1	0.0837	0.08288	1.10
2	0.0826		
3	0.0817		
4	0.0839		
5	0.0825		

计算 RSD 为 1.10% (n=5)。结果表明,在该条件下精密度良好。

2.1.3 重复性实验 对 5 份平行制备的藏木香样品溶液,各取 2.0mL,依 1.2.2.2 测定方法测定吸光度,计算总黄酮的平均含量为 0.2536mg/g, RSD 为 1.64%。表 3 表明,该条件下重现性良好。

表 3 样品重复性实验 (n=5)

序号	含量 (mg/g)	平均值 (mg/g)	RSD (%)
1	0.252	0.2536	1.64
2	0.258		
3	0.249		
4	0.251		
5	0.258		

2.1.4 回收率实验 称取同一批藏木香粉末,分别精密加入 0.20mg 芦丁对照品,按样品溶液制备法制备,并测定含量,计算回收率,结果见表 4。

表 4 回收率实验结果 (n=5)

序号	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	0.139	0.2	0.338	99.5	99.0	1.54
2	0.141	0.2	0.343	101		
3	0.142	0.2	0.337	97.5		
4	0.138	0.2	0.334	98		
5	0.138	0.2	0.333	97.5		

计算总黄酮回收率的平均值为 99.0%, RSD 为 1.54% (n=5)。测定结果表明,用此方法进行青藏高原藏木香总黄酮的测定,回收率符合要求。

2.2 正交实验提取工艺结果

结果见表 5 及表 6。

表 5 的结果表明,用正交实验进行优选,得到藏木香总黄酮提取的较优水平搭配为 $A_2B_3C_3$; 因素主次顺序 $A > B > C$ 。即藏木香总黄酮较优提取工艺

为 选用 75% 乙醇作为提取溶剂,料液比 1:20,水浴热回流提取 2h。表 6 方差分析结果表明,乙醇浓度对总黄酮含量的影响显著 F 值 = 26.57143 > $F_{0.05}$,而溶剂倍数和提取时间均对其无显著影响。如从节约资源及时间方面考虑,建议在生产实践中,将较优水平搭配 $A_2B_3C_3$ 中的 B_3 改为 B_2 , C_3 改为 C_1 ,即用 75% 乙醇做提取液,料液比 1:15,回流提取 1h,重复 2 次来作为藏木香总黄酮类化合物提取的较优提取工艺。

表 5 藏木香总黄酮正交实验结果($n=5$)

实验号	A	B	C	空白	总黄酮含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	0.2471
2	1	2	2	2	0.2561
3	1	3	3	3	0.2572
4	2	1	2	3	0.2509
5	2	2	3	1	0.2703
6	2	3	1	2	0.2681
7	3	1	3	2	0.2194
8	3	2	1	3	0.2226
9	3	3	2	1	0.2358
k_1	0.253	0.239	0.246	0.251	
k_2	0.263	0.250	0.248	0.248	
k_3	0.226	0.254	0.249	0.244	
R	0.037	0.015	0.003	0.007	
较优水平	A_2	B_3	C_3		

表 6 方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	均方和	F 值	显著性
A	0.002232	2	0.001116	26.57143	$\alpha=0.05$
B	0.000339	2	0.000170	4.047619	不显著
C	0.000014	2	0.000007	0.166667	不显著
误差	0.000085	2	0.000042		
总和	0.002670	8			

注 $F_{0.01}(2,2)=99.0$, $F_{0.05}(2,2)=19.0$, $F_{0.1}(2,2)=9.0$ 。

2.3 验证实验

按最佳提取工艺 $A_2B_3C_3$ 进行验证实验,重复 5 次,结果总黄酮含量分别为 0.273、0.282、0.285、0.279、0.281mg/g,平均为 0.28mg/g,RSD 为 1.60%。

3 结论

3.1 采用分光光度法检测藏木香黄酮类化合物,仪器操作简单方便,芦丁标准溶液浓度 Y 在 2~10 μ g/mL

范围内与吸光度 X 呈良好的线性关系($Y=9.53X+0.0462$, $r=0.9993$);精密度良好,RSD 为 1.10% ($n=5$);重现性良好,RSD 为 1.64% ($n=5$);平均回收率为 99.0%。

3.2 用正交实验进行优选,得到藏木香总黄酮最佳提取工艺为:选用 75% 乙醇作为提取溶剂,料液比 1:20,水浴热回流提取 2h。乙醇浓度对总黄酮含量的影响显著 F 值 > $F_{0.05}$;而溶剂倍数和提取时间均对其无显著影响 F 值 < $F_{0.05}$ 。经验证实验得到藏木香总黄酮的平均含量为 0.28mg/g。在本研究的基础上,继续开展对藏木香黄酮类物质的作用机制、疗效等研究,为藏木香功能食品及其他产品研发提供科学依据。

参考文献

[1] 中国药典[S]第一部 2005.
 [2] 杨永昌,何廷农,卢生莲,等.藏药志[M].西宁:青海人民出版社,1991.
 [3] 中华藏本草[M].北京:民族出版社,1997:254-255.
 [4] 中国科学院西北高原生物研究所.青海经济植物志[M].西宁:青海人民出版社,1987.
 [5] 肖远灿,胡风祖.RP-HPLC 测定藏木香中土木香内酯和异土木香内酯含量[J].中国药学杂志,2007,42(7):491-493.
 [6] 王延峰,李延清,郝永红.超声法提取银杏叶黄酮的研究[J].食品科学,2002,23(8):166-167.
 [7] 陈刚,章慧琴,吴性良,等.毛细管电泳电化学检测葛根和葛藤中几种黄酮类化合物[J].复旦学报:自然科学版,2004,43(4):672-675.
 [8] 田呈瑞,李昀.银杏叶黄酮的乙醇提取方法研究[J].西北植物学报,2001,21(3):556-561.
 [9] 孙仕萍,张文德,马志东,等.单扫示波极谱法测定保健食品中总黄酮的研究[J].中国食品卫生杂志,2002,14(6):15-16.
 [10] 郑莹,李绪文,金永日.RP-HPLC 法测定三七叶中黄酮类成分的含量[J].药物分析杂志,2005,25(9):1089-1019.
 [11] 李莉,刘成梅,田建文,等.现代提取分析技术在黄酮类化合物中的应用[J].江西食品工业,2006(4):42-44.
 [12] 张岩,曹国杰,张燕,等.黄酮类化合物提取以及检测方法的研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(1):154-157.
 [5] 胡国华.功能性食品胶[M].北京:化学工业出版社,2004:50-59.
 [6] 周家华.食品添加剂[M].北京:化学工业出版社,2001.
 [7] 栗衍华,谭成玉,王秀武,等.硫酸化多糖的制备及其生物活性的研究进展[J].精细与专用化学,2006,21(8):6-9.
 [8] 徐文清.硫酸酯化多糖研究的新进展[J].天津药学,2002,14(6):1-4.
 [9] 张继,高义霞,武光朋,等.沙蒿多糖的提取、纯化工艺研究[J].食品科学,2007,28(5):125-127.
 [10] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].第二版.浙江:浙江大学出版社,1994:12-13.
 [11] 杨铁虹,贾敏,商澎,等.当归硫酸酯的合成及其对脾细胞增值的作用[J].第四军医大学学报,2001(5):432-434.

(上接第 143 页)

化的修饰,旨在生产成本低廉、产物量大、生物学活性高、应用广泛的罗望子硫酸多糖,为罗望子的深度开发和其在医药方面的应用提供参考。

参考文献

[1] 田龙.猕猴桃果水溶性多糖硫酸酯的制备及抗氧化活性[J].华中农业大学学报:自然科学版,2007,26(4):570-573.
 [2] 向道斌,李晓玉.硫酸化多糖:一类治疗 AIDS 的新药[J].国外医药药学分册,1992,19(1):1-5.
 [3] 詹晓北.食用胶的生产、性能与应用[M].北京:中国轻工业出版社,2003:199-227.
 [4] 蒲彪,邓继尧,蒋华曾,等.罗望子果肉的营养成分分析[J].四川农业大学学报,1994(4):455-457.