

微波辅助萃取诸葛菜中的总黄酮研究

王欣 夏新奎 徐国华 (信阳农业高等专科学校, 河南信阳 464000)

摘要 采用微波辅助萃取乙醇浸提法从诸葛菜中提取黄酮类物质, 对所提取的黄酮类物质进行验证, 并用紫外分光光度法测定其含量。结果表明, 诸葛菜中总黄酮含量为 0.3807 ng/ml , 回收率为 97.79% , 其纯度和产率均较高。该方法采用全物理过程, 无任何污染, 是提取诸葛菜中黄酮类物质的有效途径。

关键词 微波提取; 诸葛菜; 总黄酮; 鉴别

中图分类号 O658.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)22-06705-02

Research on Extraction of Total Isoflavones in *Orychophragmus violaceus* by Microwave-assisted

WANG Xin et al. (Xinyang Agricultural College, Xinyang, Henan 464000)

Abstract The microwave-assisted and ethanol extraction were used to extract the flavonoids from the leaves of *Orychophragmus violaceus*, and the flavonoids were checked and determined by spectrophotometry. The results showed that content of the total flavanone in *Orychophragmus violaceus* leaves was 0.3807 ng/ml and the rate of recovery was 97.79% . This method was a purely physical process and had not any pollution, and it was an ideal way to extract the flavanone from *Orychophragmus violaceus* leaves.

Key words Microwave-assisted; *Orychophragmus violaceus*; Total flavanone; Identification

诸葛菜, 别名二月兰, 分布于我国山东、河南、安徽、江苏、江西等地, 其嫩茎叶可作为早春蔬菜利用。有人分析了诸葛菜茎叶的营养成分, 建议将其作为一种新型野生蔬菜进行开发利用^[1-3]。黄酮类化合物广泛分布于诸葛菜的茎、叶、花、根等多种器官中^[4], 其具有抗癌、降血糖、治疗骨质疏松、抗辐射^[5-10]等作用。近年来植物药以其天然低毒的特点倍受青睐, 笔者根据当地植物资源, 选用河南信阳鸡公山野菜诸葛菜为原料, 采用微波辅助萃取乙醇浸提法提取诸葛菜中的黄酮类物质。

近年来, 微波技术常被用于提取植物中的生物活性物质, 结果表明, 其具有耗能低、效率高、不破坏有效成分等特点。目前微波技术应用于提取诸葛菜中黄酮类物质的研究尚未见报道, 笔者以诸葛菜茎叶黄酮提取率为参考指标, 用微波技术提取诸葛菜中总黄酮并进行纯度鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。诸葛菜采自河南省信阳鸡公山, 经信阳农业高等专科学校药用植物教研室高级实验师周巍鉴定为诸葛菜。

1.1.2 试剂。芦丁为生化试剂, 中国药品生物制品检定所出品; 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇、30%乙醇、正丁醇、三氯化铝、盐酸、氨水、镁粉、乙酸镁、冰醋酸、乙酸乙酯, 均为分析纯。

1.1.3 仪器。752 紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司生产; 电热恒温水浴槽, 北京市医疗设备厂; SHZ-D (91I) 型循环水真空泵, 巩义市英峪予华仪器厂; MCL-3 型连续微波反应器、GZX-9070MBE 电热恒温鼓风干燥箱、电子天平、HH 数显恒温水浴锅。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备。精确称取在 120°C 下减压干燥至恒重的芦丁对照品 10 ng 于 50 ml 容量瓶中, 加适量 30% 乙醇温热溶解, 冷却, 用 30% 乙醇稀释至刻度, 摇匀。精确吸

取上述溶液 1 ml 置于 50 ml 容量瓶中, 用 30% 乙醇稀释至刻度, 摇匀。

1.2.2 芦丁标准曲线的制作^[11]。准确称取芦丁标准品 10 ng , 用 30% 的乙醇溶解, 转入 50 ml 容量瓶中, 定容, 得到浓度为 0.2 ng/ml 的芦丁标准溶液。精确吸取该溶液 $0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0 \text{ ml}$, 分别置于 10 ml 试管中, 用 30% 乙醇补充至 5 ml , 分别加入 5% 的 NaNO_2 溶液 0.3 ml , 混匀, 放置 6 min ; 然后分别加入 0.3 ml 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 摇匀, 放置 6 min ; 再分别加入 4% 的 NaOH 溶液 2 ml , 摇匀; 最后用 30% 乙醇稀释至刻度, 放置 $15 \sim 20 \text{ min}$, 所得溶液即为芦丁标准品溶液。在 500 nm 下测定标准品溶液的吸光值。以 30% 乙醇为空白对照, 可得浓度为 $0.0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 \text{ ng/ml}$ 的标准品溶液, 吸光值分别为 $0.037, 0.247, 0.468, 0.690, 0.883, 1.123$ 。用最小二乘法作线性回归, 可得芦丁浓度 C 与吸光度 A 间的回归方程为 $C = 0.092 A - 0.003$ 。相关系数 $r = 0.999$ 。

1.2.3 供试品溶液的制备。取新鲜诸葛菜, 烘干, 粉碎。称取诸葛菜粉末约 2.5 g , 加 80 ml 30% 乙醇浸透, 将微波功率调至 600 W , 微波提取 4 min , 冷却, 抽滤。滤渣再加 80 ml 30% 乙醇, 微波提取 4 min , 冷却, 抽滤。合并 2 次滤液, 减压回收乙醇至滤液仅为 $5 \sim 7 \text{ ml}$ 为止, 置于 50 ml 容量瓶中, 用 30% 乙醇稀释至刻度, 即得样品溶液。

1.2.4 总黄酮的鉴别^[12-13]。

1.2.4.1 紫外光下呈色反应。取该样品溶液点在滤纸上, 可见光下呈浅黄色, 紫外光下呈浅蓝色荧光斑点。

1.2.4.2 浓氨水反应。取该样品溶液点在滤纸上, 将滤纸置于氨水上方熏 0.5 min , 立即在紫外光下观察, 呈极明显的黄褐色荧光斑点。

1.2.4.3 三氯化铝反应。取样品溶液点在滤纸上, 滴加 2% 三氯化铝乙醇溶液, 吹干。在可见光下呈黄绿色, 在紫外光下呈黄绿色荧光斑点。

1.2.4.4 乙酸镁反应。取样品溶液点在滤纸上, 滴加 1% 乙酸镁甲醇溶液, 吹干, 紫外光下呈黄色斑点。

1.2.4.5 盐酸—镁粉反应。取乙醇提取液 1 ml 于试管中加镁粉, 再加入浓盐酸数滴 (1 次加入), 在泡沫处呈紫红色。

1.2.4.6 样品含量的测定。从定容至 50 ml 的各样品液中,

吸取1 ml 于10 ml 容量瓶中,按“1.2.2”方法测定溶液吸光值,代入回归方程即得提取液中总黄酮含量。总黄酮含量计算公式为:总黄酮得率=(提取液浓度×稀释倍数×体积)/样品重×100%。

2 结果与分析

2.1 波长的选择 取样品液适量,在0.30 ml 5%亚硝酸钠溶液存在的碱性条件下,经硝酸铝显色后,以试剂为空白参比液在420~700 nm 波长范围测定络合物的吸光度,按“1.2.2”项下方法操作。络合物于500 nm 波长处有最大吸收,故测定时选用该波长。

2.2 精密度考察 精确量取同一供试品溶液1 ml,按“1.2.2”项下方法操作重复进行7次,结果得RSD为0.082%,表明该方法精密度良好。

2.3 稳定性考察 取同一供试品溶液,依法显色,自加完显色剂开始,每隔10 min 测定吸光度1次,得RSD为0.690%,表明供试品溶液在80 min 内的测定结果稳定。

2.4 样品含量 试验测得的样品吸光度为0.4464,代入回归方程可得样品中的总黄酮含量为0.3807 ng/ml,总黄酮得率为0.761%。

2.5 回收试验结果 精确量取样品液1.00 ml,加入标准芦丁对照品1.00 ml(0.20 ng/ml),按“1.2.2”方法测定溶液吸光度,可求得该法回收率为97.79%。

3 结论

(1) 试验结果显示,微波辅助萃取大大加快了反应速度,

有效提高了黄酮得率。微波辅助提取比传统方法反应时间缩短20倍,使样品中的黄酮含量由传统方法的0.568%,提高为0.761%。

(2) 微波辅助提取诸葛菜黄酮类化合物纯度较高,可达到省时、高效、节能的目的。同时该方法为纯物理过程,无任何污染,是提取黄酮类物质的一条理想途径,应用前景广阔。

参考文献

- [1] 任全进,于金平,张广伦. 诸葛菜资源的综合利用[J]. 中国野生植物资源,1998(2):24-25.
- [2] 肖龙,罗鹏. 诸葛菜的研究现状和开发前景[J]. 西北植物学报,1994,14(3):237-241.
- [3] 李新华,贺善安,任冰如,等. 诸葛菜的营养成分及作为新型蔬菜的评价[J]. 植物资源与环境,1997,6(3):8-12.
- [4] 中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分提取与分离[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,1983:15-16,319-323.
- [5] 华光军,郭勇. 黄酮类化合物药理研究进展[J]. 广东药学,1999,9(4):9.
- [6] 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):499.
- [7] 王玮,王琳. 黄酮类化合物的研究进展[J]. 沈阳医学院学报,2002,4(2):115.
- [8] 曹纬国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.
- [9] 姜国芳,谢宗波,乐长高. 银杏叶黄酮类化合物的研究进展[J]. 时珍国医国药,2004,15(5):306.
- [10] 黄锁义,黎海妮,余美料,等. 益母草总黄酮的提取及鉴别[J]. 时珍国医国药,2005,16(5):398.
- [11] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典1部[S]. 广州:广东科学技术出版社;北京:人民出版社,1995:311.
- [12] 肖崇厚. 中药提取鉴定原理[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983:33-39.
- [13] KR 马卡姆. 黄酮类化合物结构鉴定技术[M]. 北京:科学出版社,1990:23-29.