

曼陀罗种子中总黄酮含量测定 及提取工艺的研究

努尔阿米娜·阿尤甫, 阿不都拉·阿巴斯*
(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 采用乙醇浸提法提取山楂中的黄酮类化合物。结果表明: 浸提的最佳条件是: 70ml 95%乙醇在60℃下浸提1h。本实验采用分光光度法, 以芦丁为标准样品测定山楂曼陀罗种子中总黄酮的含量, 总黄酮含量为4.016%。方法简便、快速、重现性好, 可作为检测曼陀罗中黄酮含量的一种手段。
关键词: 曼陀罗; 总黄酮; 分光光度法; 提取工艺

Determination and Extraction Study on Content of Total Flavones in *Datura Stramonium* L.

NURAMINA Ayup, ABDULLA Abbas*
(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Ethanol immersion extraction was used to extract flavonoid compounds of the *Datura Stramonium* L. The results showed that the optimum condition of extraction is 60℃ and 95% ethanol 70ml, extract time 1h. The total flavonoids contents are assayed by using spectroscopic methods with rutin as standard. The flavonoids content is 4.016% at the optimum condition. The method is simple, rapid, reproducible and suitable for the determination of total flavonoids in *Datura Stramonium* L.

Key words *Datura Stramonium* L.; total flavones; spectroscopic methods; extraction process

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0260-04

曼陀罗在植物分类上属茄科曼陀罗属。该属约有15种, 分布于热带和温带。一年生草本, 在低纬度地区可长成亚灌木。生于荒地、旱地、宅旁、路旁、向阳山坡、林缘、草地。花期6~10月, 果期7~11月。种子繁殖。茎直立, 高1~2m。叶宽卵形, 先端渐尖, 基部不对称楔形, 边缘有不规则波状浅裂, 裂片三角形, 脉上有疏短柔毛。花萼筒状, 有五棱角, 长4~5cm; 花冠漏斗状, 长6~10cm, 上部白色或紫色; 花药长3~4mm。蒴果直立, 卵球形, 长3~4cm, 表面生有坚硬的针刺, 成熟后4瓣裂。种子黑色。我国有四种, 南北各省区均有分布。野生或栽培。山东有四种^[1]。常见有白花曼陀罗。全草有毒, 以果实特别是种子毒性最大, 嫩叶次之。干叶的毒性比鲜叶小。有毒成分主要含东莨菪碱、莨菪碱^[2], 其次有阿托品、阿朴阿托品、降阿托品、曼陀罗素、惕各酰莨菪碱、曼陀罗碱、莨菪碱、2, 6-二惕各酰莨菪碱、红古豆碱和7-羟基-3, 6-二惕各酰氧托院^[3]。总生物碱含量开花末期最高, 到种子成熟时迅速下降。从种子还分出血球

凝集素。关于曼陀罗中毒的报导较多, 一般在食后30min, 最快20min出现症状, 最迟不超过3h; 中毒剂量因毒性进入途径、年龄及健康状况而异。

曼陀罗全草入药, 具有镇咳平喘、麻醉止痛、祛风除湿的功效, 能治哮喘、银屑病、惊痛、风湿痹痛、疮疡疼痛、脱肛、泻痢等多种疾病。曼陀罗花治疗银屑病效果十分显著。曼陀罗是重要的麻醉药, 可制作外科手术麻醉剂^[4]。起麻醉作用的主要成分是东莨菪碱。最近几年, 曼陀罗被广泛用于麻醉养肉狗, 制作诱捕野生动物的麻醉剂和杀虫剂^[5]。由于其生理活性较强, 应用广泛, 目前曼陀罗为国际市场上生产和流通量最大的八种药用植物之一。

我国植物资源丰富, 但目前开发利用尚很有限, 应根据曼陀罗制剂的标准进行工艺改进, 以提高产品质量。因此将选择性好, 操作简单的方法提取, 分离曼陀罗有效成分, 是一项很有意义的工作。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-11-30

作者简介: 努尔阿米娜·阿尤甫(1974-), 女, 讲师, 硕士研究生, 研究方向为植物有效成分分析。E-mail: ayup88@xju.edu.cn

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

1.1 材料

曼陀罗于2007年10月采自新疆乌鲁木齐市天山区大湾村宅旁、路旁。经植物教研室鉴定为心草全草。将全草晾干、粉碎,备用。

1.2 试剂

芦丁(rutin)对照品 中国药品生物制品检定所 亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝、三氯化铁、无水乙醇、浓硫酸、锌粉均为分析纯。

1.3 仪器

粉碎机;电热恒温水浴锅;索氏抽提器;可见光分光光度计;分析天平;电热恒温鼓风干燥箱;离心机;电子天平。

1.4 黄酮含量测定原理及鉴定方法

1.4.1 测定原理

黄酮类化合物主要包括黄酮苷和黄酮醇苷两大部分。在黄酮类化合物溶液中加入铝离子试剂后,黄酮类化合物中的酚羟基与 Al^{3+} 生成络合物,控制适宜的pH值,所生成的络合物在可见区能获得特征吸收峰,其质量浓度与吸光度符合比耳定律,其颜色的深浅与黄酮类化合物的量成一定的比例关系,可以定量测定^[6]。

1.4.2 黄酮类物质的鉴定方法

1.4.2.1 金属盐类试剂的络合反应^[7]

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3min,观察反应结果。

三氯化铁显色反应:将样品液滴于滤纸上,并滴加5% $FeCl_3$ 指示剂,观察反应结果。

铝盐反应:在样品液中滴加1% $AlCl_3$ 溶液,观察反应结果。

1.4.2.2 碱性试剂显色反应

在样品液中加入5% $NaNO_2$ 溶液;摇匀,旋转6min后,加入等体积10% $Al(NO_3)_3$ 溶液,6min后再加入4% $NaOH$ 溶液,混匀,用30%乙醇稀释,观察反应结果。

1.4.2.3 酸性试剂显色反应

在样品液中加入浓硫酸观察反应结果。

1.4.3 单因素试验^[8]

1.4.3.1 用不同浓度的乙醇进行提取

分别用55%、65%、75%、85%、95%的乙醇以50ml为一倍量对干燥曼陀罗种子粉末1g进行加热提取1h,将滤液离心、浓缩,然后于50ml容量瓶定容,测定其吸光度。

1.4.3.2 用不同溶媒量的乙醇进行提取

分别用50、60、70、80、100ml量的95%乙醇对曼陀罗种子粉末1g进行加热回流提取1h,滤液离心、

浓缩,然后于50ml容量瓶定容,测定其吸光度。

1.4.3.3 用相同浓度相同溶媒量的乙醇提取不同的时间

分别用80ml,95%的乙醇对干燥曼陀罗种子粉末1g进行加热提取1、1.5、2、2.5、3h,将滤液离心、浓缩,然后于50ml容量瓶定容,测定其吸光度。

1.4.3.4 用相同浓度相同溶媒量相同时间的乙醇提取不同的温度

分别称取五份干燥曼陀罗种子粉末,每份均为1g,各加80ml,95%乙醇于50、60、70、80、90℃进行温浸提取1h,滤液离心、浓缩,然后于50ml容量瓶定容,测定其吸光度。

1.4.4 黄酮类化合物含量测定

1.4.4.1 标准溶液的配制

精密称取干燥恒至重的芦丁对照品0.0345g,置于100ml三角瓶中,先加30ml 30%乙醇在水浴锅加热使其溶解,再定容至刻度,制成浓度为0.345mg/ml的标准溶液。

1.4.4.2 样品溶液的制备^[9]

准确称取1g粉末9份,选择浸提温度、乙醇浓度、浸提时间、乙醇用量四个因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计,因素和水平见表1,正交试验安排见表8。确定最佳的黄酮提取条件。然后准确称取样品1g,以乙醇为溶剂,用最佳条件进行提取,将乙醇浸提液过滤、浓缩,然后于30%乙醇定溶至50ml,摇匀,待测定。

表1 乙醇浸提的因素及水平

Table 1 Factors and levels of ethanol immersion extraction test

水平	A 浸提 温度(℃)	B 乙醇 浓度(%)	C 浸提 时间(h)	D 乙醇 用量(ml)
1	50	75	1	50
2	60	85	1.5	60
3	70	95	2	70

1.4.4.3 测定波长的选择

分别取标准溶液和样品溶液1ml,置于10ml容量瓶中,加入0.7ml 5% $NaNO_2$,摇匀,放置6min后加入0.7ml 10% $Al(NO_3)_3$,放置6min再加入5ml 4% $NaOH$ 溶液,混匀,用30%乙醇稀释至刻度,同时作空白对照,10min后测定波长400~600nm区段的吸光度,得知芦丁最大吸光度在500nm,因此分光光度法选测定波长为500nm。

1.4.4.4 标准曲线的制作和回归方程

精密量取标准溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0ml于7只25ml容量瓶中,用30%乙醇补充至12.5ml,再分别加入0.7ml 5% $NaNO_2$ 溶液,摇匀,放置6min后加入0.7ml 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液,摇匀,放置6min后再

加入5ml 4%的NaOH溶液,再加30%乙醇至刻度,摇匀,放置10min后离心10min,取上清液于波长500nm处测定吸光度,0.0ml为空白对照,测得不同浓度下的吸光度,见表2。以标准溶液浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程为: $y=9.9715x-0.0053$, $R^2=0.9988$ 。

表2 标准溶液的吸光度

Table 2 Absorbance of standard rutin concentration

标准溶液 浓度(mg/ml)	0	0.0138	0.0276	0.0414	0.0552	0.0690	0.0828
吸光度	0	0.119	0.268	0.411	0.564	0.678	0.813

1.4.4.5 样品中黄酮含量测定

精密量取样品溶液0.0、1.0ml并置于25ml容量瓶中,用30%乙醇补充至12.5ml,再分别加入0.7ml 5% NaNO_2 溶液,摇匀,放置6min后加入0.7ml 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,摇匀,放置6min后再加入5ml的4% NaOH溶液,再加30%乙醇至刻度,摇匀,放置10min后离心10min,取上清液于波长500nm处测定吸光度,0.0ml为空白对照。

所测样品吸光度值经标准曲线回归方程换算后,得出提取液总黄酮浓度,然后按下式计算提取率:

提取率(%) = $Y \times \text{稀释倍数} \times V/W \times 100\% = [(C \times 50 \times 25) / (1 \times 1000)] \times 100\%$

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

1.4.4.6 正交试验设计

在以上单因素试验基础上,对影响黄酮类化合物提取效果的因素提取温度(A)、浓度(B)、时间(C)、料液比(D)进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以确定最佳的黄酮提取条件。

用移液管准确吸取1ml样品溶液,放入25ml容量瓶中,用30%乙醇补充至12.5ml,再加入0.7ml 5% NaNO_2 溶液,摇匀,放置6min后加入0.7ml 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,摇匀,放置6min后再加入5ml的4% NaOH溶液,再加30%乙醇至刻度,摇匀,放置10min后取上清液于波长500nm处测定吸光度,按回归方程计算出黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 黄酮类化合物的鉴定

显色反应结果见表3,说明曼陀罗种子中含有黄酮类化合物。

表3 显色反应结果

Table 3 Results of color reaction

试剂	HCl-锌	1% AlCl_3	荧光试验	10%NaOH	浓硫酸
现象	浅绿色	蓝色荧光	黄色荧光	浅红色	黄色

2.2 单因素试验结果

表4 乙醇浓度对提取效果的影响

Table 4 Effects of ethanol concentration on extraction effect

乙醇浓度(%)	55	65	75	85	95
吸光度	0.0856	0.089	0.127	0.202	0.228
提取率(%)	1.1395	1.182	1.658	2.598	2.924

表4结果表明,在溶媒量温度及时间一致的情况下,95%乙醇的提取效果比较好。

表5 溶媒量对提取效果的影响

Table 5 Effects of mass ratio on extraction effect

乙醇用量(ml)	50	60	70	80	100
吸光度	0.132	0.198	0.209	0.260	0.212
提取率(%)	1.721	2.548	2.686	3.325	2.724

表5结果表明,在乙醇浓度温度及浸泡时间一致时,溶媒量50~80ml时提取效果逐渐上升,并在80ml达到最大值,随后出现下降趋势。

表6 温度对提取效果的影响

Table 6 Effects of temperatures on extraction effect

温度(°C)	50	60	70	80	90
吸光度	0.151	0.219	0.189	0.102	0.076
提取率(%)	1.959	2.812	2.435	1.345	1.019

表6结果表明,50~60℃之间总黄酮含量逐渐上升,并在60℃达到最大值,随后出现下降趋势,可能因为持续高温影响某些不稳定的黄酮类化合物,而导致结构破坏,失去功能等,此最佳温度选为60℃。

表7 提取时间对提取效果影响

Table 7 Effects of time on extraction effect

时间(h)	1	1.5	2.0	2.5	3.0
吸光度	0.237	0.213	0.164	0.102	0.066
提取率(%)	3.037	2.736	2.122	1.345	0.893

表7结果表明,当提取时间为1h时,提取效果最佳。

2.3 标准曲线与回归方程

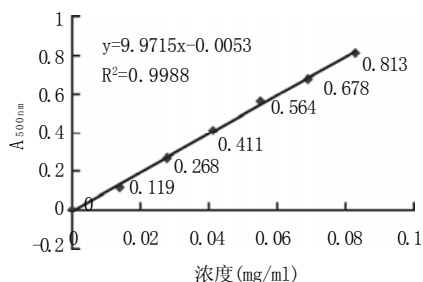


图1 标准曲线

Fig.1 Standard profile of rutin

2.4 正交试验结果

表8 正交试验结果及分析
Table 8 Results and analysis of orthogonal test

水平	因素				提取率(%)
	A 浸提 温度(℃)	B 乙醇 浓度(%)	C 浸提 时间(h)	固液比 (g/ml)	
1	50	75	1	50	1.195
2	50	85	1.5	60	1.3325
3	50	95	2	70	1.115
4	60	75	1.5	70	2.290
5	60	85	2	50	1.790
6	60	95	1	60	2.345
7	70	75	2	60	1.814
8	70	85	1	70	2.272
9	70	95	1.5	50	2.047
均值1	1.214	1.766	1.937	1.677	
均值2	2.142	1.798	1.890	1.831	
均值3	2.044	1.836	1.573	1.892	
极差	0.928	0.070	0.364	0.215	

从表8 可以看出最佳条件为 $A_2B_3C_1D_3$, 乙醇浓度95%、固液比1:70、提取温度60℃、提取时间1h。对提取效果的影响 $A > C > D > B$ 。

3 结 论

研究表明, 曼陀罗种子中含有黄酮类化合物。本文采用乙醇浸提法提取曼陀罗种子中的总黄酮, 乙醇浓度低时黄酮类物质无法有效溶出, 而浓度逐渐升高时, 导致黄酮类化合物的提取率增加。乙醇作为提取溶剂可以毒性小, 价格便宜, 可回收反复使用。本实验同时用正交试验分析出乙醇提取曼陀罗种子总黄酮的最佳工艺条件是: $A_2B_3C_1D_3$, 即用70ml, 95%乙醇在60℃下进行1h, 测的最高总黄酮含量达到4.016%。

参考文献:

- [1] 周俊英. 中药曼陀罗花粉亚显微形态结构研究[J]. 山东科学, 2003, 16(2): 26-28.
- [2] 姚士岩, 王海泉. 曼陀罗有效成分的分析[J]. 辽宁大学学报自然科学版, 1995, 21(1): 99-102.
- [3] 王朝虹, 张春水. 洋金花中生物碱的检验[J]. 刑事技术, 2002(1): 28.
- [4] 由继红. 药用植物曼陀罗[J]. 中国野生植物资源, 1989(2): 19.
- [5] 李鹏翔. 曼陀罗的高产栽培[J]. 乡镇经济, 1999(2): 64.
- [6] 毕和平, 韩长日, 谢新民, 等. 三叉苦中总黄酮的测定[J]. 中药, 2005, 36: 259-261.
- [7] 无锡轻工大学, 天津轻工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [8] 古丽巴哈尔·阿巴拜克力, 阿不都拉·阿巴斯. 新疆长穗柃柳总黄酮提取工艺研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 332-335.
- [9] 买合布白·阿不都热依木, 艾克白尔, 库尔班尼莎, 等. 心草中总黄酮含量的测定及其提取研究[J]. 生物技术, 2007, 17(4): 67-69.