

2.1.2.2 线性关系考察 精密量取上述芦丁对照品溶液 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分别置于 25 mL 容量瓶中,按 2.1.2.1 所述方法,进行显色,静置 15 min 后,以乙醇为空白,在 507 nm 的波长处测定吸光度,以吸光度(y)为纵坐标,浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为: $y = 12.607x - 0.0055$, $R^2 = 0.9996$,在质量浓度为 0.0082~0.0820 mg/mL 范围内,芦丁质量浓度与吸光度呈良好的线性关系。结果见图 2。

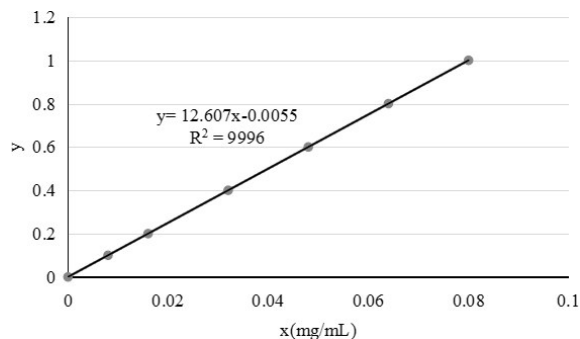


图 2 标准曲线图

Fig 2 Standard curve diagram

2.1.3 总黄酮工艺优化

2.1.3.1 总黄酮含量测定 精密称取 1.0 g 山里红果实粉末,置于圆底烧瓶中,用一定量的乙醇回流提取一段时间后,抽滤,旋转蒸发;用乙醇定容至 50 mL 容量瓶中,摇匀,作为待测液;取 0.5 mL 待测液按 2.1.2.1 所述方法,进行显色,静置 15 min 后,以乙醇为空白,在 507 nm 的波长处测定吸光度。测 3 次,取平均值。根据回归方程,用吸光度计算出被测液中黄酮含量。

$$\text{总黄酮提取率}/\% = \frac{C \times D \times V}{m \times B \times 1000} \times 100$$

式中:V 为提取液定容体积/mL;B 为吸取测定体积/mL;C 为线性方程计算出的质量浓度/(mg/mL);D 为测定时定容体积/mL;m 为称取的样品质量/g。

2.1.3.2 单因素试验

2.1.3.2.1 乙醇浓度对黄酮提取量的影响 精密称取 5 份山里红果实粉末样品各 1.0 g 置于 100 mL 圆底烧瓶中,分别加入 30 mL 乙醇溶液作为溶剂,

控制乙醇浓度分别为 50%、60%、70%、80%、90%,提取 2 h。抽滤,旋转蒸发,用乙醇定容至 50 mL。从中取 1 mL 按 4.2.1.2.1 所述方法显色,在波长 507 nm 处测定提取液吸光度,计算总黄酮提取率。结果见图 3。

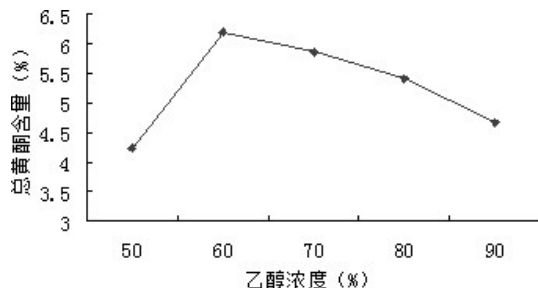


图 3 乙醇浓度影响

Fig 3 Effect of ethanol concentration

由图可知,随着乙醇浓度的增大,山里红果实粉末总黄酮的提取率先增大后减小,这可能是因为乙醇浓度的增加会使一些醇溶性杂质的溶出量增加,这些杂质与黄酮类化合物竞争乙醇,从而导致溶出的黄酮类化合物减少。实验结果表明,60%乙醇作为提取浓度时总黄酮提取率最高。因此,选定 60%、70%、80%作为正交实验中乙醇浓度的三个水平。

2.1.3.2.2 料液比 精密称取 5 份粉碎的山里红果实粉末样品各 1.0 g,置于 500 mL 圆底烧瓶中,分别用 60%乙醇溶液作为溶剂,控制料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50,提取 2 h。抽滤,旋转蒸发,用 60%乙醇定容至 50 mL。从中取 1 mL 按 2.1.2.1 所述方法显色,在波长 507 nm 处测定提取液吸光度,计算总黄酮提取率。结果见图 4。

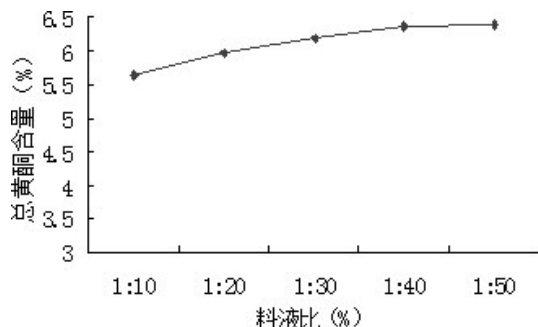


图 4 料液比的影响

Fig 4 Effect of Solid-liquid ratio

山楂收录于《中华人民共和国药典》2015 年版二部,是蔷薇科山楂属植物山里红 (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N. E. Br.) 或山楂 (*Crataegus pinnatifida* Bge.) 的干燥成熟果实,具有消食化积,行气散瘀之功效^[1]。另有山楂叶的记载,其叶片亦具有活血化瘀,理气通脉、化浊降脂之功效^[2]。山楂中含有黄酮类、有机酸类等多种成分^[3-4],不同样品间各成分含量相差较大^[5]。目前已从中分离得到了金丝桃苷、槲皮素、牡荆素、芦丁等多种成分^[6]。同时山楂也作为一种饲料添加剂广泛应用在畜牧业中,发挥着提高饲料蛋白质、脂肪的消化率,降低饲料消耗,防治疾病,提高成活率,促进动物生长发育的作用^[7],从而提高经济效益。因此,山楂总黄酮的研究开发具有重要的经济和社会效益,山楂在兽药饲料中的开发与利用应备受关注。

在我国该属植物种类繁多且分布广泛,《甘肃中草药资源志》^[8]中记载的原植物有山楂、山里红、甘肃山楂、华中山楂四种。试验对甘肃山楂与山里红果实和叶片中总黄酮的提取及含量测定方法进行了研究,以期对甘肃省该属植物的综合开发利用提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器 METTLER AE240 电子天平, METTLER AE110 电子天平, BX8200HP 超声波清洗器, Evolution 300 LC 紫外-可见分光光度计, 旋转蒸发仪, 粉碎机。

1.2 试剂与药材 氢氧化钠, 亚硝酸钠, 硝酸铝,

乙醇, 均为分析纯, 纯化水。芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所提供, 100080-200707), 山里红果和叶药材 (购于兰州黄河药市), 甘肃山楂果和叶 (采于榆中官滩沟), 以上两种材料均由兰州大学马志刚教授鉴定, 以山里红为例进行方法验证实验。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定

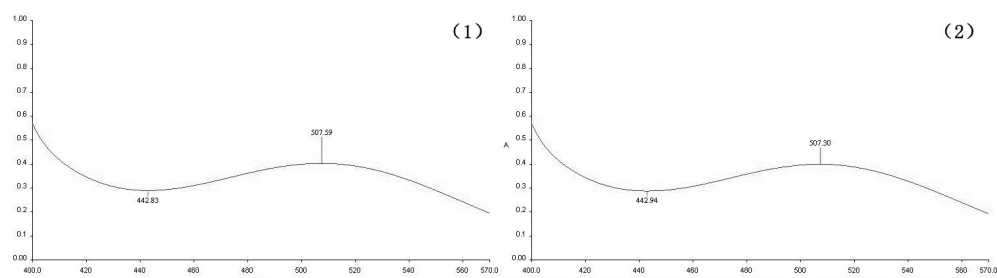
2.1.1 样品与对照品溶液的制备 精密称取山里红果实粉末 1.0 g, 以 20 倍量 60% 乙醇回流 1 h, 抽滤, 滤液转移至 50 mL 容量瓶中, 用 60% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 即为样品溶液。

精密称取芦丁对照品 20.0 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 用乙醇溶解, 超声助溶, 放冷, 定容至刻度, 摇匀, 即为对照品溶液。

2.1.2 标准曲线的制备

2.1.2.1 测定最大吸收波长 将处理好的样品溶液过滤, 精密量取续滤液 1 mL 至 25 mL 容量瓶中, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加 4% 氢氧化钠溶液 10 mL, 加乙醇定容至刻度, 摇匀, 进行显色处理。放置 15 min 后, 以乙醇为空白, 在 480 ~ 570 nm 处进行扫描。

芦丁标准溶液亦按以上步骤进行显色、扫描。由图 1 可知, 芦丁标准溶液和样品溶液吸收曲线形状相同, 且均在 507 nm 处有最大吸收, 故实验选取 507 nm 作为测定波长。结果见图 1。



(1) 芦丁吸光光谱曲线; (2) 山里红吸收光谱曲线

(1) Absorption spectrum curve of rutin (2) Absorption spectrum curve of *Crataegus pinnatifida*

图 1 吸收光谱图

Fig 1 Absorption spectrogram

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.06.06

甘肃山楂与山里红总黄酮的提取及含量测定方法研究

张 旭¹, 张 蕾¹, 马媛媛^{2*}

(1. 甘肃省兽药饲料监察所, 兰州 730030 2. 兰州大学第一附属医院, 兰州 730030)

[收稿日期] 2017-09-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 06-0034-06 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 建立了甘肃山楂与山里红总黄酮的提取及含量的测定方法, 并优选其总黄酮的最佳提取条件。采用紫外-可见分光光度法, 以芦丁为对照品, 硝酸铝显色反应, 在 507 nm 处测定甘肃山楂与山里红总黄酮含量; 并采用正交试验的方法对甘肃山楂与山里红总黄酮提取效果的诸因素(乙醇浓度、料液比、提取时间等)进行优选。结果显示: 芦丁浓度在 0.0082~0.0820 mg/mL 范围内线性关系良好, $r=0.9996$, 加样回收率 $RSD=3.42\%$; 乙醇体积分数 60%、料液比 1:40、提取时间 3 h、提取次数 3 次, 提取效果最好。该方法的提取率高, 精密度高、重现性良好, 加样回收率和准确度高, 为甘肃山楂与山里红总黄酮含量测定及优化提取工艺提供了参考依据。

[关键词] 甘肃山楂; 山里红; 紫外分光光度法; 正交试验设计

Studies on Extract and Determination of Total Flavonoids in *C.kansuensis* and *Crataegus pinnatifida*

ZHANG Xu¹, ZHANG Lei¹, MA Yuan-yuan^{2*}

(1. Gansu institute of Veterinary Drug and Feed Inspection, Lanzhou 730030, China; 2. The first hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

Corresponding author: MA Yuan-yuan, E-mail: mazhigang@lzu.edu.cn

Abstract: To establish a method for extracting and determining the total flavonoids in *C.kansuensis* and *Crataegus pinnatifida*, and study the extracting technology condition of the flavonoids. The flavonoids was determined with Rutin as standard and aluminium nitrate as developer by UV spectrophotometry in 507 nm. The factors of extraction effect (such as ethanol concentration, solid-liquid ratio, extracting time) are preferred by orthogonal test for *C.kansuensis* and *Crataegus pinnatifida*. The linear ranges for rutin were 0.0082~0.0820 mg/mL ($r=0.9996$). The average recovery RSD was 3.42%. When ethanol concentration was 60%, solid-liquid ratio was 1:40, extracting time was 3 h, the extraction times was 3, the extract effect was the best. This method is reliable, sensitive, reproducible, high recovery, accurate. It can provide the references for extracting and determining the total flavonoids of *C.kansuensis* and *Crataegus pinnatifida*.

Key words: *C.kansuensis*; *Crataegus pinnatifida*; UV spectrophotometry; Orthogonal test

作者简介: 张 旭, 从事兽药检测工作。

通讯作者: 马媛媛。E-mail: mazhigang@lzu.edu.cn

- 12947-12948.
- [12] 王亚萍,陈 锴,李宝莉,等.中药体外抑制大肠杆菌实验研究 [J].中医学报,2017,32(4):606-609.
Wang Y P, Chen K, Li B L, *et al.* Experimental study on the inhibitory effect of some Chinese herbal medicine on *Escherichia coli in vitro* [J]. Acta Chinese Medicine, 2017,32(4):606-609.
- [13] 肖莉春,孔祥峰,黄明钱,等. 中药提取物对猪源耐药大肠杆菌分离株的抑制作用 [J]. 江西农业大学学报,2013,35(6):1248-1254.
Xiao L C, Kong X F, Huang M Q, *et al.* Antimicrobial activities of Chinese herb extracts against antibiotic-resistant isolates of *E. coli* from swine farms [J]. Acta Agriculture Universitatis Jiangxiensis, 2013,35(6):1248-1254.
- [14] 李君华.中药饮片对多重抗生素耐药细菌的抑菌作用 [J].中国保健营养,2014,5:2418-2419.
Li J H. The bacteriostasis of Chinese medicine in multiple-resistant bacteria [J]. China Health Care & Nutrition, 2014,5:2418-2419.
- [15] 刘 瑶,蔡 进,陈 瑞,等. 苗药大乌泡叶提取物的体外抑菌作用考察 [J].中国药房,2017,28(1):72-75.
Liu Y, Cai J, Chen R, *et al.* Study on *in vitro* antibacterial effect of extracts form Miao medicine *Rubus multibracteatus* leaves [J]. China Pharmacy, 2017,28(1):72-75.
- [16] 王德志,张 敏,武 瑞. 中草药抑制耐药性大肠杆菌的研究进展 [J].中国畜牧兽医,2009,36(3):140-142.
Wang D Z, Zhang M, Wu R. Advance of the inhibition effects of Chinese medicine on drug-resistance *Escherichia coli* [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009,36(3):140-142.
- [17] 崔煦然,赵京霞,郭玉红,等.细菌耐药背景下中药抗菌作用研究进展 [J].世界中医药,2016,11(10):1940-1944.
Cui X R, Zhao J X, Guo Y H, *et al.* Advances of researches on antibiosis function of traditional Chinese medicine with background of bacterial resistance [J]. World Chinese Medicine, 2016,11(10):1940-1944.

(编 辑:侯向辉)