

# 绵阳荔枝草中总黄酮的提取及含量测定

刘晓燕 (绵阳师范学院化学与化学工程学院, 四川绵阳 621000)

**摘要** [目的]提取及测定绵阳荔枝草中总黄酮的含量。[方法]用超声波乙醇浸提法从荔枝草中提取黄酮类物质,通过正交设计试验,得出乙醇浸提法提取荔枝草中黄酮类化合物最佳试验条件,并对提取的黄酮类物质进行光谱扫描、显色反应等定性鉴定,用紫外分光光度法测定其含量。[结果]提取荔枝草中总黄酮的最佳工艺条件:60%乙醇为溶剂系统,料液比为1:30,在超声波温度为35℃下提取35 min,测得荔枝草中总黄酮的含量为1.20%,平均回收率为97.43%~100.17%。[结论]此方法采用全物理过程,无任何污染,是一条理想的提取黄酮类物质的途径,为荔枝草的广泛开发和利用提供一定理论依据。

**关键词** 荔枝草;正交试验法;总黄酮;提取工艺;含量测定

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)05-073-05

## Extraction and Determination of the Content of Total Flavonoids in *Salvia plebeia* R. Br in Mianyang

LIU Xiao-yan (School of Chemistry and Chemical Engineering, Mianyang Normal University, Mianyang, Sichuan 621000)

**Abstract** [Objective] The research aimed to extract and determine the content of total flavonoids in *Salvia plebeia* R. Br. [Method] The flavonoids extracted from *Salvia plebeia* R. Br by the method of ultrasonic ethanol extraction and the orthogonal experiment, the optimal experimental conditions of the ethanol extraction extracted flavonoids from *Salvia plebeia* R. Br were obtained. And the content of the extracted compounds had been characterized by ultraviolet spectrophotometry. [Result] The optimum conditions of extracting total flavonoids from *Salvia plebeia* R. Br were as follows: the solvent was 60% ethanol; the ratio of material to liquid 1:30; ultrasonic temperature 35℃; the optimum time was 35 min. The results shows the content determination of total flavonoids in *Salvia plebeia* R. Br was 1.20% and the average recovery rate was 97.43% - 100.17%. [Conclusion] This method without any pollution, low cost, simple operation, provides a theoretical basis for the development and utilization of *Salvia plebeia* R. Br widely.

**Key words** *Salvia plebeia* R. Br; Orthogonal experiment; Total flavonoids; Extraction process; Content determination

荔枝草(*Salvia plebeia* R. Br)为唇形科雪见草的全草<sup>[1]</sup>,别名癩疙宝草,其性味苦、辛、凉,以全草入药,为常用中药,分布于印度、朝鲜、阿富汗、越南、日本、马来西亚、缅甸、泰国以及中国大陆的青海、新疆、西藏、甘肃等地,多生在路旁、山坡、沟边或田野潮湿的土壤上,目前已由人工引种栽培<sup>[2-3]</sup>。荔枝草具有抗氧化功能<sup>[4-5]</sup>,镇咳、祛痰、平喘作用<sup>[6]</sup>,抗病毒作用,治疗肺癌作用;荔枝草性味微苦、凉,具有解毒消肿<sup>[7-8]</sup>、利湿止痒、清热凉血等作用<sup>[9-10]</sup>。目前荔枝草的相关研究已有很多报道,包括化学成分、提取工艺<sup>[11-12]</sup>、药理活性等的研究,但对绵阳荔枝草中总黄酮的提取及含量的测定尚未见报道。笔者采用超声波乙醇浸提法,用紫外分光光度法以芦丁为对照品,并对荔枝草根、叶中总黄酮的含量进行测定,为荔枝草的广泛开发和利用提供一定理论依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器** 101-2A型恒温干燥箱(上海沪南电炉烘箱厂)、KQ-300E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、T6新世纪紫外分光光度仪(北京普析通用仪器有限责任公司)、微型高速万能试样粉碎机(湖北省黄骅新兴电器厂)、SHD-2000型循环水式多用真空泵(河南巩义市英予华仪器厂)。

**1.2 试剂** 荔枝草(于2月份采自绵阳市游仙区);芦丁标准品(中国药品生物制品检定所);95%乙醇、无水乙醇、石油醚、NaNO<sub>2</sub>、Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、NaOH,均为AR,成都市科龙化工试剂厂。

**1.3 试验方法** 摘取新鲜荔枝草叶、根(绵阳市游仙区)→洗净后阳光晾晒备用→分离根、叶→恒温烘干(60℃)→粉

碎→称量→溶剂浸泡12 h(乙醇浓度、料比)→超声波处理<sup>[13]</sup>(温度、时间)→减压抽滤→石油醚萃取→浓缩定容→稀释→测定吸光度值→分析试验结果。

**1.3.1 原料处理。**摘取新鲜荔枝草叶、根(绵阳市游仙区),洗净后阳光晾晒备用,分离根、叶,用烘干箱在60℃下烘干,再用中草药粉碎机粉碎。

**1.3.2 芦丁标准溶液的配制。**准确称取10 mg芦丁标准样品于小烧杯中,加入少量30%的乙醇溶液,使标准样品的溶解,转至100 ml容量瓶中,用30%的乙醇溶液定容至100 ml,即得0.1 g/L的芦丁标准溶液。

**1.3.3 建立标准曲线。**分别移取上述芦丁标准溶液0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml于25 ml比色管中,加入0.7 ml 5%亚硝酸钠溶液混合均匀,静置7 min后再加入0.7 ml 10%硝酸铝溶液混合均匀,静置7 min后,加入5 ml 1 mol/L的氢氧化钠溶液,摇匀后用30%乙醇溶液定容至刻度线,再充分摇匀,静置15 min,在波长为510 nm处比色测定各样品液吸光度,试剂空白为参比液,在平行处理的条件下测定3次,求其平均值。

**1.3.4 正交试验设计。**以提取溶剂系统即乙醇浓度、料液比、超声波处理温度、超声波处理时间作为影响提取物中总黄酮含量的4个主要因素,其中乙醇浓度取4个水平,料液比、超声波处理温度、超声波处理时间各取3个水平,选用L<sub>9</sub>(1<sup>4</sup>×3<sup>3</sup>)正交试验表安排试验,共108组,其中乙醇浓度为95%、80%、60%、0%,料液比为1:10、1:20、1:30,超声波处理时温度为25、30、35℃,超声波处理时间为15、25、35 min,超声波处理功率100 W。称取荔枝草根、叶各2 g,加入4种不同的溶剂系统,用3种不同料液比,平行操作条件下,在常温下密封静置浸泡12 h,分别在25、30、35℃不同温度下进行

15、25、35 min 不同超声波时间处理,减压抽滤后,用石油醚萃取3次后置于恒温水箱中浓缩,在室温下冷却后转移至50 ml 的容量瓶中,用30%乙醇溶液定容,再移取0.5 ml 待测液于25 ml 比色管中,按芦丁标准曲线测定方法测定即可。

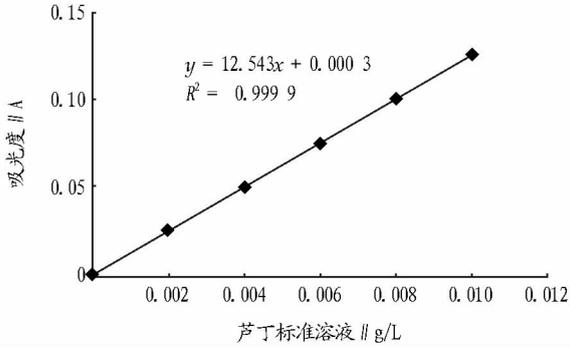


图1 芦丁标准曲线

## 2 结果与分析

**2.1 芦丁标准曲线的建立** 以芦丁标准溶液作为横坐标、吸光度作为纵坐标,绘制出标准曲线(图1)。用最小乘法进行线性回归分析得出标准回归方程为  $y = 12.543x + 0.0003$  ( $R^2 = 0.9999$ )。

## 2.2 正交试验

**2.2.1 溶剂系统的选择。**以不同的溶剂系统(溶剂浓度分别为95%、80%、60%、0%)作为影响因素,在平行操作条件下分别测定其稀释液的吸光度,根据试验稀释的倍数计算得到其质量浓度(表1)。由表1可知,溶剂系统对荔枝草总黄酮提取以60%的乙醇水溶液最佳选择,用乙醇溶剂既可以提取出黄酮苷元又可以提取出黄酮苷,提取的产率更高。通过试验现象可以看出,用水作溶剂系统时,试验过程中发现过滤速度极慢,且水的极性大,还很容易把蛋白质、糖类溶于水的成分提取出来,不利于黄酮类物质的提取。

表1 荔枝草叶正交试验安排及结果(溶剂系统)

因素水平	溶剂系统 %	料液比	超声波处理 温度//℃	超声波处理 时间//min	吸光度 A	总黄酮含量 mg/g
1	95	1:10	25	15	0.936	0.093 2
2	80	1:10	25	15	1.229	0.121 9
3	60	1:10	25	15	1.263	0.125 5
4	0	1:10	25	15	0.101	0.010 0
5	95	1:10	25	25	1.178	0.110 9
6	80	1:10	25	25	1.342	0.133 2
7	60	1:10	25	25	1.470	0.146 3
8	0	1:10	25	25	0.172	0.017 0
9	95	1:10	25	35	1.078	0.107 2
10	80	1:10	25	35	1.326	0.131 8
11	60	1:10	25	35	1.527	0.151 6
12	0	1:10	25	35	0.931	0.042 5
13	95	1:20	25	15	0.940	0.093 4
14	80	1:20	25	15	1.220	0.121 0
15	60	1:20	25	15	1.360	0.134 9
16	0	1:20	25	15	0.248	0.024 7
17	95	1:20	25	25	1.192	0.118 6
18	80	1:20	25	25	1.347	0.1337
19	60	1:20	25	25	1.581	0.157 5
20	0	1:20	25	25	0.631	0.062 6
21	95	1:20	25	35	1.103	0.109 7
22	80	1:20	25	35	1.452	0.144 3
23	60	1:20	25	35	1.065	0.159 7
24	0	1:20	25	35	0.757	0.075 2
25	95	1:30	25	15	0.947	0.094 1
26	80	1:30	25	15	1.338	0.133 1
27	60	1:30	25	15	1.421	0.140 9
28	0	1:30	25	15	0.335	0.033 2
29	95	1:30	25	25	1.195	0.118 8
30	80	1:30	25	25	1.426	0.141 7
31	60	1:30	25	25	1.635	0.162 8
32	0	1:30	25	25	0.789	0.078 4
33	95	1:30	25	35	1.139	0.113 1
34	80	1:30	25	35	1.639	0.163 0
35	60	1:30	25	35	1.665	0.165 3
36	0	1:30	25	35	0.931	0.092 4

**2.2.2 料液比的选择。**以不同的料液比(1:10、1:20、1:30)作为影响因素,在平行操作条件下分别测定其稀释液的吸光度,根据试验稀释的倍数计算得到其质量浓度(表2)。由表

2 可得,在料液比为 1:10、1:20、1:30 的条件下处理,经过 1:30 处理后荔枝草提取溶液中总黄酮含量更高,由此可以得出提取荔枝草中总黄酮含量料液比以 1:30 为最佳选择。

表 2 荔枝草叶正交试验安排及结果(料液比)

因素水平	溶剂系统 %	料液比	超声波处理温度//℃	超声波处理时间//min	吸光度 A	总黄酮含量 mg/g
1	95	1:10	25	15	0.936	0.093 2
2	95	1:20	25	15	0.094	0.093 4
3	95	1:30	25	15	0.947	0.094 1
4	80	1:10	25	15	1.229	0.121 9
5	80	1:20	25	15	1.220	0.121 0
6	80	1:30	25	15	1.338	0.133 1
7	60	1:10	25	15	1.263	0.125 5
8	60	1:20	25	15	1.360	0.135 0
9	60	1:30	25	15	1.421	0.140 9
10	0	1:10	25	15	0.101	0.010 0
11	0	1:20	25	15	0.248	0.024 7
12	0	1:30	25	15	0.335	0.033 2
13	95	1:10	25	25	1.178	0.117 0
14	95	1:20	25	25	1.192	0.118 6
15	95	1:30	25	25	1.195	0.118 8
16	80	1:10	25	25	1.342	0.133 2
17	80	1:20	25	25	1.347	0.133 7
18	80	1:30	25	25	1.426	0.141 7
19	60	1:10	25	25	1.470	0.146 3
20	60	1:20	25	25	1.581	0.157 5
21	60	1:30	25	25	1.635	0.162 8
22	0	1:10	25	25	0.172	0.017 0
23	0	1:20	25	25	0.631	0.062 6
24	0	1:30	25	25	0.789	0.078 4
25	95	1:10	25	35	1.078	0.107 2
26	95	1:20	25	35	1.103	0.109 8
27	95	1:30	25	35	1.139	0.113 1
28	80	1:10	25	35	1.326	0.131 8
29	80	1:20	25	35	1.452	0.144 3
30	80	1:30	25	35	1.639	0.163 0
31	60	1:10	25	35	1.527	0.151 6
32	60	1:20	25	35	1.605	0.159 7
33	60	1:30	25	335	1.665	0.165 3
34	0	1:10	25	35	0.428	0.042 5
35	0	1:20	25	35	0.757	0.075 2
36	0	1:30	25	35	0.931	0.092 4

**2.2.3 超声时间的选择。**不同的超声时间(15、25、35 min)作为影响因素,在平行操作条件下分别测定其稀释液的吸光度,根据试验稀释的倍数计算得到其质量浓度(表3)。从表3可以得出,超声波在 15、25、35 min 的条件下处理,经过 35 min 处理后荔枝草提取溶液中总黄酮含量更高,由此可以得出提取荔枝草中总黄酮含量超声波时间以 35 min 更为最佳选择。

料液比 1:30、最佳超声时间 35 min 的条件下,平行测定在不同超声波温度下,超声波温度对荔枝草中总黄酮含量的提取效果的影响,在平行操作条件下分别测定其稀释液的吸光度,根据试验稀释的倍数计算得到其质量浓度(表4)。从表4可以得出,超声波在 25、30、35 ℃ 的条件下处理,经过 35 ℃ 处理后荔枝草提取溶液中总黄酮含量更高,由此可以得出提取荔枝草中总黄酮含量超声波温度以 35 ℃ 更为最佳选择。

**2.2.4 超声温度的选择。**以最佳溶剂系统 60% 乙醇、最佳

表 3 荔枝草叶正交试验安排及结果(超声时间)

因素 水平	溶剂系统 %	料液比	超声波处理 温度//℃	超声波处理 时间//min	吸光度 A	总黄酮含量 mg/g
1	95	1:10	25	15	0.936	0.093 2
2	95	1:10	25	15	0.940	0.093 4
3	95	1:10	25	15	0.947	0.094 1
4	95	1:20	25	25	1.178	0.116 9
5	95	1:20	25	25	1.192	0.118 6
6	95	1:20	25	25	1.195	0.118 8
7	95	1:30	25	35	1.078	0.107 2
8	95	1:30	25	35	1.103	0.109 8
9	95	1:30	25	35	1.139	0.113 1
10	80	1:10	25	15	1.229	0.121 9
11	80	1:10	25	15	1.220	0.121 0
12	80	1:10	25	15	1.338	0.133 1
13	80	1:20	25	25	1.342	0.133 2
14	80	1:20	25	25	1.347	0.133 7
15	80	1:20	25	25	1.426	0.141 7
16	80	1:30	25	35	1.326	0.131 8
17	80	1:30	25	35	1.452	0.144 3
18	80	1:30	25	35	1.639	0.163 0
19	60	1:10	25	15	1.263	0.125 5
20	60	1:10	25	15	1.360	0.134 9
21	60	1:10	25	15	1.421	0.140 9
22	60	1:20	25	25	1.470	0.146 3
23	60	1:20	25	25	1.581	0.157 5
24	60	1:20	25	25	1.635	0.162 8
25	60	1:30	25	35	1.527	0.151 6
26	60	1:30	25	35	1.605	0.159 7
27	60	1:30	25	35	1.665	0.165 3
28	0	1:10	25	15	0.101	0.010 0
29	0	1:10	25	15	0.248	0.024 7
30	0	1:10	25	15	0.335	0.033 2
31	0	1:20	25	25	0.172	0.017 0
32	0	1:20	25	25	0.631	0.062 6
33	0	1:20	25	25	0.789	0.078 4
34	0	1:30	25	35	0.428	0.042 5
35	0	1:30	25	35	0.757	0.075 2
36	0	1:30	25	35	0.931	0.092 4

表 4 荔枝草叶正交试验安排及结果(超声温度)

因素 水平	溶剂系统 %	料液比	超声波处理 温度//℃	超声波处理 时间//min	吸光度 A	总黄酮含量 mg/g
1	60	1:30	25	35	1.663	0.162 2
2	60	1:30	30	35	1.642	0.163 1
3	60	1:30	35	35	1.668	0.167 4

## 2.3 提取物的分析

### 2.3.1 提取物定性鉴定。

**2.3.1.1 紫外光谱分析。**黄酮类的化合物大部分具有 C6-C3-C6 的基本结构,在 240~400 nm 紫外光谱下大多数黄酮类化合物具有 2 个吸收峰,在 320~380 nm 光谱带 I 是由 B 环取代基性质决定,240~270 nm 光谱带 II 是由环取代基性质决定的。芦丁标准溶液在经过加入亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠显色处理后带 I 和带 II 转移至 450~510 nm 和 415~470 nm 处,而在 510 nm 左右所提取的样品图谱(图 3)的吸收峰基本与芦丁标准溶液图谱(图 2)相似。

**2.3.1.2 显色反应。**黄酮类化合物基本碳架上含有碱性的氧原子,且绝大多数均是带有酚羟基的衍生物,因此能够与一些金属离子发生络合反应或与一些较强的还原性试剂发

生颜色反应。根据黄酮类化合物的这种特性可以对其样品进行定性鉴定。定性鉴定如下:①加中性醋酸铅溶液。取 1 ml 待测溶液于小试管中,滴加几滴中性醋酸铅溶液,摇匀静止观察颜色变化,溶液出现黄色粒状沉淀。②锌粉(+盐酸)。取 1 ml 待测溶液于小试管中,加入适量锌粉,滴加几滴盐酸,摇匀静止观察颜色变化,由黄色并转至微红。③三氯化铁溶液。取 1 ml 待测溶液于小试管中,滴加几滴三氯化铁溶液,摇匀静止观察颜色变化,溶液呈墨绿色。④碳酸钠溶液。取 1 ml 待测溶液于小试管中,滴加一定量碳酸钠溶液水溶液,摇匀静止观察颜色变化,溶液呈亮黄色。⑤浓硫酸。取 1 ml 待测溶液于小试管中,滴加几滴浓硫酸,摇匀静止观察颜色变化,由深黄色转至橙红色。⑥氢氧化钠水溶液。取 1 ml 待测溶液于小试管中,滴加适量氢氧化钠水溶液,摇匀

静止观察颜色变化,溶液呈黄色。通过以上试验证明是黄酮

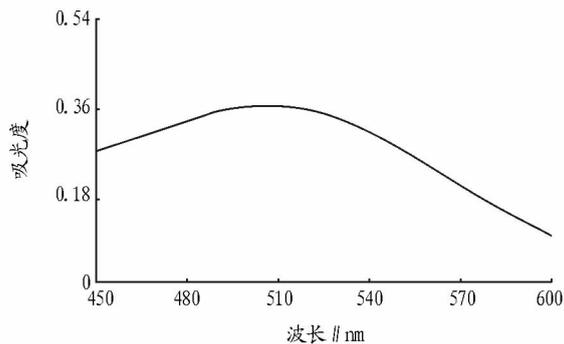


图2 芦丁标准品的紫外吸收光谱图

类物质。

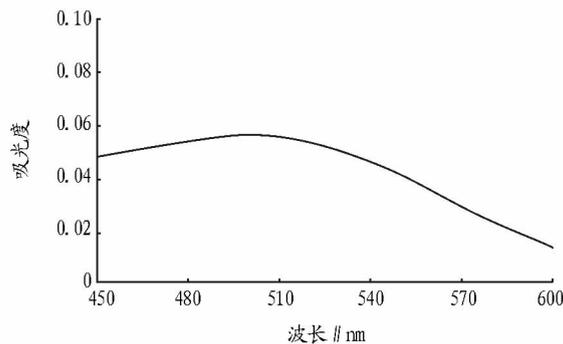


图3 荔枝草提取物的紫外吸收光谱图

**2.3.2 荔枝草叶、根总黄酮含量测定。**在最佳试验条件下,即60%乙醇为溶剂系统,料液比为1:30,超声波温度为35℃超声时间为35 min,对荔枝草根和叶进行提取,在平行操作条件下分别测定其稀释液的吸光度,根据试验稀释的倍数计

算得到其质量浓度(表5)。由表5可见,荔枝草不同部位总黄酮含量有一定差异,其中荔枝草根中的总黄酮含量大于它的叶中总黄酮含量。

表5 最佳条件下荔枝草叶和根总黄酮含量

因素水平	溶剂系统 %	料液比	超声波处理温度/℃	超声波处理时间/min	吸光度//A		总黄酮含量//mg/g	
					叶	根	叶	根
1	60	1:30	35	35	1.696	0.671	0.168 8	0.213 0
2	60	1:30	35	35	1.657	0.731	0.164 4	0.232 2
3	60	1:30	35	35	1.688	0.752	0.168 1	0.238 8

**2.3.3 加标回收试验。**准确称取3份已知总黄酮含量的叶和根,并加入一定量芦丁对照品0.050 0 g/L,按“1.3.3”制得样品液,在510 nm波长测定样品液的吸光度,进行回收试验。用回归方程计算它的总黄酮含量。将一定的芦丁加入荔枝草叶和根样品液中做回收试验,结果发现回收率分别为95.01%~98.97%、99.76%~100.53%(表6~7),均符合定量分析要求。

表6 荔枝草叶的加标回收

样品编号	原样浓度//g/L	加标量 g/L	回收量 g/L	回收率 %	平均回收率//%	RSD %
1	0.135 2	0.050 0	0.184 7	98.97	97.43	2.18
2	0.132 1	0.050 0	0.179 6	95.01		
3	0.134 6	0.050 0	0.183 8	98.31		

表7 荔枝草根的加标回收

样品编号	原样浓度//g/L	加标量 g/L	回收量 g/L	回收率 %	平均回收率//%	RSD %
1	0.053 5	0.050 0	0.103 4	99.76	100.17	0.38
2	0.058 3	0.050 0	0.108 4	100.23		
3	0.060 0	0.050 0	0.110 3	100.53		

### 3 结论

用超声波乙醇浸提法从荔枝草中提取黄酮类物质,得出乙醇浸提法提取荔枝草中黄酮类化合物最佳试验条件,并对提取的黄酮类物质进行光谱扫描、显色反应等验证,用紫外分光光度法测定其含量。结果表明,采用正交试验得出提取荔枝草总黄酮的最佳试验条件:60%乙醇为溶剂系统,料液

比为1:30,在超声波温度为35℃下提取35 min,测得荔枝草中总黄酮的含量为1.20%,平均回收率为97.43%~100.17%。且用超声波乙醇浸提法,达到省时、高效、节能的目的,此方法采用全物理过程,无任何污染,是一条理想的提取黄酮类物质的途径,为荔枝草的广泛开发和利用提供一定理论依据。

### 参考文献

- [1] 徐国钧,何宏贤,徐璐珊,等.中国药理学[M].北京:中国医药科技出版社,1996:1549.
- [2] 余磊,于敬海,彭湘君,等.蛤蟆草化学成分的研究[J].哈尔滨医科大学学报,2006,40(5):74-77.
- [3] 蒋毅,罗思齐,郑民实.荔枝草活性成分的研究[J].中国医药工业杂志,1987,18(8):349.
- [4] 董新伟,曹国峰,段杉,等.荔枝草对鱼油的抗氧化作用[J].海洋科学,2000,24(1):33-37.
- [5] 师梅梅,杨建熊,任维.荔枝草总黄酮的体外抗氧化研究[J].陕西师范大学学报,2012,40(5):60-63.
- [6] 郭仁永,李玲,郝洪.荔枝草止咳平喘作用的研究[J].国医论坛,2000,15(4):42.
- [7] 张梅,孙霞.荔枝草治疗带状疱疹的临床研究[J].中华医学实践杂志,2004,3(3):262.
- [8] 张增友.荔枝草在痔科应用[J].中国社区医师,1992,8(11):17.
- [9] 董维汉,黄瑞平.荔枝草注射液在小儿呼吸道疾病方面的应用[J].广西医学,1978,1(1):14.
- [10] 王学,魏峰.单味蛤蟆草治疗瘙痒性皮肤病[J].中国乡村医生,2001,16(1):36.
- [11] 周文华,杨辉荣,岳庆磊.生物碱提取和分离方法的研究进展[J].当代化工,2003,32(2):111-113.
- [12] 宋秋华,俞自由,方裕勋,等.微波萃取银杏叶黄酮类化合物[J].东华理工学院学报,2005,28(2):151-154.
- [13] 范志刚,麦立军.微波技术对雪莲中黄酮浸出量影响的研究[J].中国民族医药杂志,2000(1):43-44.