

## 维药阿育魏果中总黄酮提取工艺及含量测定

木艾塔尔·努尔麦麦提<sup>1</sup>, 夏木西努尔·艾克拜尔<sup>1</sup>, 太力艾提·吐尔洪<sup>1</sup>, 刘永刚<sup>2\*</sup>

(1. 新疆维吾尔医学专科学校, 新疆和田 848000; 2. 北京中医药大学, 北京 100102)

**摘要** [目的]探讨阿育魏果中总黄酮的提取方法及含量测定方法。[方法]采用正交试验,以提取的总黄酮的含量为评价指标,紫外可见分光光度法测定总黄酮含量。[结果]超声法提取阿育魏果中总黄酮的含量为10.378%,相对标准偏差为2.38% ( $n=3$ )。最优工艺如下:时间为15 min,功率为150 W,料液比为1:20,乙醇浓度为70%。上述4个因素对阿育魏果中总黄酮提取率的影响从大到小依次为乙醇浓度、料液比、超声功率和超声时间。[结论]超声提取阿育魏果中总黄酮快速且高效;紫外可见分光光度法准确度较高,偏差较小。

**关键词** 阿育魏果;总黄酮;正交试验;紫外可见分光光度法;超声提取

中图分类号 R284 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)24-0121-02

**Determination of Extraction Process of Total Flavonoids in Seed of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague of Uyghur Crude Drug MUAITAER · Nuermaiti<sup>1</sup>, XIAMUXINUER · Aikebaier<sup>1</sup>, TAILIATI · Tuerhong<sup>1</sup>, LIU Yong-gang<sup>2\*</sup>** (1. College of Xinjiang Uyghur Medicine, Hetian, Xinjiang 848000; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102)

**Abstract** [Objective] The aim was to study the methods of extraction and determination of total flavonoids in seed of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. [Method] Through orthogonal experiments and taking total flavonoids extracted as the evaluation index, UV-Vis spectrophotometry method was used to determine the optimum technological conditions of total flavonoids extraction in seed of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. [Result] The total flavonoids content measured in seed of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague was 10.378%, and the relative standard deviation was 2.38% ( $n=3$ ). The best ultrasonic extraction technology of total flavonoids was as followed: the ultrasonic time was 15 min; the ultrasonic power was 150 W; the solid-liquid ratio was 1:20; and the concentration of ethanol was 70%. The effects of the four factors was in order of ethanol concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic power and ultrasonic time. [Conclusion] The ultrasonic extraction techniques of total flavonoids from seed of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague are quick and efficient. The UV-Vis spectrophotometry method is accurate and reliable.

**Key words** Seed of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague; Total flavonoids; Orthogonal experiments; UV-Vis spectrophotometry method; Ultrasonic extraction

阿育魏果,维吾尔语称“*Juwine*”,音译为“居维纳”,汉语通用名为“阿育魏果”,为伞形科植物细叶糙果芹 [*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague.] 的成熟果实<sup>[1-2]</sup>。阿育魏果作为维吾尔常用药材,被收录于《卫生部药品标准:维吾尔要分册》<sup>[3]</sup>。阿育魏果中总黄酮具有体外抗氧化活性,因此可作为新型天然抗氧化物质的来源<sup>[4]</sup>。阿育魏果总黄酮抗氧化活性研究已见报道<sup>[4]</sup>,但未见总黄酮含量测定的相关报道。超声提取技术在医药、化学等各领域,尤其在药材成分提取中作用日益重要<sup>[5]</sup>。笔者采用超声波提取法和正交试验,以芦丁为对照品,通过紫外分光光度法对阿育魏果中总黄酮提取进行了优化,旨在为阿育魏果的质量标准研究及开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 阿育魏果购自新疆和田,由木艾塔尔·努尔麦麦提鉴定;芦丁标准品由中国药品生物制品检定所提供,批号为100080-200707;无水乙醇;蒸馏水;其余试剂均为分析纯。2802型紫外可见分光光度计,上海尤尼柯仪器有限公司;KQ5200DE型数控超声波清洗器,江苏省昆山市超声仪器有限公司。

**1.2 方法** 黄酮类物质含量测定,以芦丁为标准品,采用分光光度法进行测定<sup>[6]</sup>。

**1.2.1 对照品溶液的制备。**称取芦丁50.0 mg,置于25 mL量瓶中,加适量甲醇溶解,定容。量取10 mL,置于100 mL量瓶中,加水定容,得0.2 mg/mL标准液。

**1.2.2 标准曲线的绘制。**量取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL对照品溶液置于25 mL容量瓶中,制成系列标准溶液。分别加入5% NaNO<sub>2</sub>溶液1.0 mL,混匀,放置6 min,加入1.0 mL 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液,混匀,放置6 min,再加入10.0 mL 5% NaOH,用蒸馏水定容,摇匀,放置15 min。以相应的试剂为空白,在510 nm波长处测定吸光度,以标准芦丁浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制曲线。

**1.2.3 正交试验。**通过预试验确定超声提取法条件,按照L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)设计4因素3水平的正交试验。称取阿育魏果样品1.0 g若干份,置于锥形瓶中,加入提取溶剂超声提取数分钟,过滤,取1.0 mL提取液进行显色反应,测定提取物中黄酮含量及提取率。选取时间(A)、功率(B)、料液比(C)、乙醇浓度(D)4个因素进行正交试验。超声波提取法因素及水平见表1。

表1 超声波提取法因素与水平设计

Table 1 The factors and level design of the ultrasonic method

水平 Level	因素 Factors			
	时间 Time (A) // min	功率 Power (B) // W	料液比 The ratio of material to liquid (C) // g/mL	乙醇浓度 Ethanol concentration (D) // %
1	10	120	1:10	70
2	15	150	1:15	80
3	20	180	1:20	90

**基金项目** 新疆维吾尔自治区教育厅青年教师培育基金项目(XJEDU2013S50)。

**作者简介** 木艾塔尔·努尔麦麦提(1987—),女,新疆和田人,讲师,从事维吾尔药化学成分及质量标准研究。\*通讯作者,教授,从事民族药物物质基础研究。

**收稿日期** 2017-05-24

**1.2.4 数据处理。**样品中的黄酮含量(以芦丁计) =  $(C \times V_1 \times V_3 / W \times V_2) \times 100\%$ , 式中,  $C$  为样液含黄酮量( $\text{mg/mL}$ );  $V_1$  为提取总体积( $\text{mL}$ );  $V_2$  为显色时抽取体积( $\text{mL}$ );  $V_3$  为显色时定容体积( $\text{mL}$ );  $W$  为称样重量( $\text{g}$ )。

## 2 结果与分析

**2.1 线性关系的考察** 以标准芦丁浓度(8.00 ~ 48.00  $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得出线性方程(图1):  $y = 12.71x + 0.0027$ ,  $R^2 = 0.9994$ ,线性关系良好。

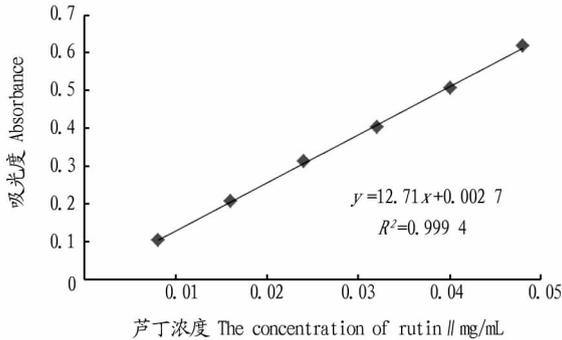


图1 芦丁标准曲线

Fig. 1 The standard curve of rutin standard substance

## 2.2 方法学考察

**2.2.1 精密度考察。**量取对照溶液6份,每份1.0 mL,置于25 mL量瓶中,按“1.2.2”显色方法显色并测定吸光度,通过回归方程计算总黄酮含量。相对标准偏差为0.21%,表明精密度良好。

**2.2.2 稳定性考察。**量取同一供试溶液6份,按“1.2.2”显色方法显色,在510 nm波长处每隔5 min测定吸光度1次,测定60 min。结果显示,供试溶液在30 min内的吸光度稳定,相对标准偏差为2.85%,而30 min后其吸光度下降明显,表明供试溶液在30 min内的稳定性良好。

**2.2.3 重复性考察。**称取样品6份,按“1.2.2”显色方法显色并测定吸光度,计算其含量,相对标准偏差为2.77%,表明该方法重复性良好。

**2.2.4 加样回收试验。**量取已知总黄酮含量的提取液6份,分别加入已知浓度的芦丁标准品溶液,按“1.2.2”项操作显色,在510 nm波长处测定吸光度,得出总黄酮含量,根据回收率公式计算出加样回收率。由表2可知,回收率在98.95% ~ 107.09%,平均回收率为101.17%,相对标准偏差为2.92%。

**2.3 正交试验结果** 正交试验结果(表3)显示,乙醇浓度(D)对总黄酮提取效果的影响最大,料液比(C)和超声功

表2 回收率试验结果

Table 2 Recoveries of the measured results

样品号 Sample No.	样品中总黄酮含量 The content of total flavonoids in samples mg/mL	芦丁加入量 The addition of rutin mg/mL	测定量 The determined amount mg/mL	回收率 Recoveries %	平均回收率 Average recovery %	相对标准偏差 Relative standard deviation %
1	0.474	0.762	1.290	107.09	101.17	2.92
2	0.474	0.762	1.243	100.89		
3	0.474	0.762	1.245	101.15		
4	0.474	0.762	1.228	98.95		
5	0.474	0.762	1.232	99.41		
6	0.474	0.762	1.258	102.89		

率(B)影响依次减小,超声时间(A)的影响最小。最佳提取

表3 正交试验设计与结果

Table 3 The orthogonal experimental design and results

试验号 Test No.	因素 Factors				总黄酮含量 The content of total flavonoids mg/g
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	8.321
2	1	2	2	2	4.833
3	1	3	3	3	7.042
4	2	1	2	3	4.893
5	2	2	3	1	10.167
6	2	3	1	2	3.707
7	3	1	3	2	7.461
8	3	2	1	3	3.713
9	3	3	2	1	7.193
$k_1$	6.732	6.892	5.247	8.560	
$k_2$	6.255	6.238	5.640	5.334	
$k_3$	6.122	5.980	8.223	5.216	
R	0.610	0.911	2.976	3.344	

工艺组合为  $A_2B_2C_3D_1$ , 即阿育魏果中总黄酮的最佳提取工艺条件: 超声时间为15 min, 功率为150 W, 料液比为1:20, 乙醇浓度为70%。

**2.4 阿育魏果总黄酮提取率的测定** 在“2.3”确定的最佳提取工艺条件下对阿育魏果进行超声提取, 提取液按“1.2.2”进行总黄酮含量测定, 平行试验3次。结果表明, 总黄酮含量为10.078%, 相对标准偏差为2.38%。

## 3 结论与讨论

目前, 维吾尔药国家和地方标准体系已初步建立, 基本保证了维吾尔医临床需求和质量, 但仍有25.2%<sup>[7]</sup>的维吾尔药材没有质量标准, 所以维吾尔药的质量标准亟需健全和完善。其中, 总黄酮含量测定方法的考察一直是总黄酮研究的一个重要部分。该研究以药典为标准进行初步探讨, 根据多次试验结果得出维吾尔药阿育魏果的最佳超声提取工艺: 超声时间为15 min, 功率为150 W, 料液比为1:20, 乙醇浓度为70%。其操作方法简单常用, 重复性、精密度、加样回收率均

(下转第143页)

上述 mRNA 表达量分析,CC 基因型为肠炎易感基因型,TT 基因型为保护基因型,对肠炎的发生具有一定遗传抗性。

### 3 讨论与结论

家兔肠炎是养兔业中最常见且死亡率最高的消化道代谢疾病。大量研究表明家兔肠炎的发生是多种因素共同作用的结果。致病病原微生物主要有大肠杆菌、病毒、寄生虫、真菌及其毒素等,其中以大肠杆菌导致的细菌性肠炎最常见<sup>[11]</sup>。非病原微生物导致的家兔腹泻,主要包括日粮粗纤维不足性腹泻,外界应激性腹泻,滥用抗生素相关性腹泻,盲肠炎腹泻等,其中日粮纤维性腹泻较为严重<sup>[12-13]</sup>。家兔日粮中的纤维可以维持肠道微生态平衡,促进消化系统的发育,增强胃肠蠕动,防止家兔异食癖等功能。该研究也发现 60 只低纤维诱导肠炎兔群表现为健康的只有 12 只,轻微肠炎和严重肠炎的分别为 13 只和 35 只。相关研究发现低纤维水平日粮 ( $CF < 12\%$ ,  $ADF < 15\%$ ) 可引起家兔发生非特异性肠炎从而导致腹泻<sup>[14]</sup>,这与该研究结论是一致的。

SNP (single nucleotide polymorphism) 是指基因组 DNA 序列中由于单个核苷酸的突变而引起的多态性,具有很高的遗传稳定性,是基因组中最简单、最常见的多态性形式,也是第三代分子生物学标记的代表<sup>[15]</sup>。基因编码区的 SNP 通常被人们称为 cSNP (coding SNP),许多遗传性疾病是由非同义突变导致的,因而成为近年来研究的热点。该试验利用 PCR 产物纯化后直接测序法,发现 *TYK2* 基因 (c. 1477, C > T) 等位基因 C 增加了肠炎的易感性,CC 基因型为肠炎易感基因型,TT 基因型为保护基因型,对肠炎的发生具有一定遗传抗性。近年来,相关研究发现家兔对低纤维日粮诱发的肠炎存在遗传抗性差异,也筛选出了一些抗性基因如 *TLR4*, *NOD2* 等<sup>[16]</sup>。同时,有研究指出 *TYK2* 基因广泛参与机体细胞炎症响应,介导机体免疫调控等一系列生命活动过程<sup>[5-6]</sup>。该研究发现 *TYK2* (c. 1477, C > T) 是家兔肠炎风险等位基因,与家兔肠炎易感性显著相关,为家兔的抗病育种提供了一个可靠的辅助选择标记。

(上接第 122 页)

较好。超声提取法有助于节省提取溶剂并缩短提取时间。此外,可通过石油醚脱脂脱色脱蜡、萃取等<sup>[8-9]</sup> 工艺进一步提高提取含量,达到进一步优化的目的。

### 参考文献

- [1] 中国医学百科全书编辑委员会. 中国医学百科全书维吾尔医学 [M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:235.
- [2] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志 [M]. 乌鲁木齐:新疆科学技术出版社,2011:521-524.
- [3] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔

### 参考文献

- [1] 薛家兵,尹秀凤,周勇岐,等. 兔流行性腹胀病 [J]. 中国养兔,2008(1): 26-28.
- [2] 谷子林. 家兔肠炎的病因分析及其防治技术 [J]. 北方牧业,2010(19): 24.
- [3] 周永昌,葛正广,彭小侠,等. 中国兔肉生产现状与发展 [J]. 肉类工业, 2006(4):1-4.
- [4] PRICE F D, VON MALTZAHN J, BENTZINGER C F, et al. Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function [J]. Nature medicine,2014,20(10):1174-1181.
- [5] MINEGISHI Y, SAITO M, MORIO T, et al. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity [J]. Immunity,2006,25(5):745-755.
- [6] VILLARINO A V, KANNO Y, FERDINAND J R, et al. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease [J]. The journal of immunology, 2015,194(1):21-27.
- [7] TAGAMI N, SERADA S, FUJIMOTO M, et al. Suppressor of cytokine signaling(SOCS)-1 suppresses a proliferation of malignant melanoma cells via the suppression of JAK/STAT and the activation of p53 signaling pathways [J]. Cancer research,2014,74(S19):1348.
- [8] TAKAOMI S, TYNER J W, GUTIERREZ A, et al. TYK2-STAT1-BCL2 pathway dependence in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Cancer discovery,2013,3(5):564-577.
- [9] DERECKA M, GORNICKA A, KORALOV S B, et al. Tyk2 and Stat3 regulate brown adipose tissue differentiation and obesity [J]. Cell metabolism, 2012,16(6):814-824.
- [10] ZHANG G W, GAO L, CHEN S Y, et al. Single nucleotide polymorphisms in the FTO gene and their association with growth and meat quality traits in rabbits [J]. Gene,2013,527(2):553-557.
- [11] SCHLÖLAUT W, HUDSON R, ROEDEL H G. Impact of rearing management on health in domestic rabbits: A review [J]. World rabbit science, 2013,21(3):145-159.
- [12] CARABAÑO R, BADIOLA I, CHAMORRO S, et al. Review. New trends in rabbit feeding: Influence of nutrition on intestinal health [J]. Spanish journal of agricultural research,2008,6(S1):15-25.
- [13] BENNEGADI N, GIDENNE T, LICOIS D. Impact of fibre deficiency and sanitary status on non-specific enteropathy of the growing rabbit [J]. Animal research,2001,50(5):401-414.
- [14] HALIGUR M, OZMEN O, DEMIR N. Pathological and ultrastructural studies on mucoid enteropathy in New Zealand rabbits [J]. Journal of exotic pet medicine,2009,18(3):224-228.
- [15] VIGNAL A, MILAN D, SANCRISTOBAL M, et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics [J]. Genetics selection evolution,2002,34(3):275-306.
- [16] ZHANG G W, WANG H Z, CHEN S Y, et al. A reduced incidence of digestive disorders in rabbits is associated with allelic diversity at the TLR4 locus [J]. Vet immunol immunopathol,2011,144(3/4):482-486.

药分册 [M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:42.

- [4] 张慧,章立华,黄琼,等. 维药阿育魏实总黄酮抗氧化活性研究 [J]. 安徽农业科学,2014,42(15):4624-4625,4639.
- [5] 鄂方宁. 超声提取技术在中草药中的应用 [J]. 中草药,2007,38(2): 315-316.
- [6] 国家药典委员会. 中国药典:一部 [M]. 北京:化学工业出版社,2010:333.
- [7] 苏来曼·哈力克,孙磊,吴光翠,等. 维吾尔药质量标准现状分析及发展建议 [J]. 中国药事,2015,29(12):1256-1262.
- [8] 陈建平,王金辉,王艳杰,等. 蒙药瞿麦中总黄酮超声提取工艺研究及含量测定 [J]. 中华中医药杂志,2013,28(9):2580-2584.
- [9] 曲中堂,王光利,项昭保,等. 青果总黄酮的含量测定及超声提取工艺研究 [J]. 食品工业科技,2012,33(7):291-293.