

NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH比色法测定乳苣不同部位总黄酮含量研究

李金芳¹, 张守芳^{1,2}, 李丽丹¹, 干苗苗^{1*}

¹新疆医科大学厚博学院, 新疆 克拉玛依

²温宿县克孜勒镇卫生院, 新疆 阿克苏

收稿日期: 2021年11月15日; 录用日期: 2022年1月12日; 发布日期: 2022年1月21日

摘要

建立NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH比色法, 测定乳苣不同部位及其全草总黄酮含量。一定量样品液加5% NaNO₂溶液2.00 ml, 摇匀, 放置6 min, 10% Al(NO₃)₃溶液2.00 ml, 摇匀, 放置6 min, 加4% NaOH溶液12.00 ml, 蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 静置15 min, 于522 nm下测定吸光度, 黄酮含量在0.0080~0.0720 mg/ml范围内与吸光度具有良好的线性关系。精密度和稳定性试验RSD分别为1.5%和2.9%, 平均回收率93.61%, 有较好的精密度和准确度。本试验测得乳苣根、茎、叶及全草总黄酮提取率依次为: 叶(105.4 mg/g) > 全草(77.63 mg/g) > 茎(12.60 mg/g) > 根(11.64 mg/g), 由此可知乳苣总黄酮主要集中在地上部分。

关键词

乳苣, 不同部位, 总黄酮, NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH比色法, 含量测定

Study on the NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH Colorimetric Method for the Determination of Total Flavonoids in Different Parts of *Mulgedium tataricum* L.

Jin Fang Li¹, Shou Fang Zhang^{1,2}, Li Dan Li¹, Miao Miao Gan^{1*}

¹Houbo College of Xinjiang Medical University, Karamay Xinjiang

²Wensu Kizile Town Health Center, Aksu Xinjiang

Received: Nov. 15th, 2021; accepted: Jan. 12th, 2022; published: Jan. 21st, 2022

*通讯作者。

文章引用: 李金芳, 张守芳, 李丽丹, 干苗苗. NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法测定乳苣不同部位总黄酮含量研究[J]. 食品与营养科学, 2022, 11(1): 36-43. DOI: 10.12677/hjfn.2022.111005

Abstract

A $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ colorimetric method was established to determine the total flavonoids content in different parts of *Mulgedium tataricum L.* and its whole grass. A certain amount of sample solution was added with 2.00 ml of 5% NaNO_2 solution, shaken, and placed for 6 minutes, added with 12.00 ml of 4% NaOH solution, and distilled water to determine Volume up to the mark, shake well, stand for 15 min, measure the absorbance at 522 nm, the flavonoid content in the range of 0.0080~0.0720 mg/ml has a good linear relationship with the absorbance. The RSD of the precision and stability tests were 1.5% and 2.9%, respectively, and the average recovery rate was 93.61%, with good precision and accuracy. In this experiment, the extraction rate of total flavonoids from the roots, stems, leaves, and whole plants of *Nicotiana officinalis* was as follows: leaves (105.4 mg/g) > whole plants (77.63 mg/g) > stems (12.60 mg/g) > roots (11.64 mg/g), it can be seen that the total flavonoids of *Mulgedium tataricum L.* are mainly concentrated in the above-ground part.

Keywords

Mulgedium tataricum, Different Parts, Total Flavonoids, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ Colorimetric Method, Content Determination

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

乳苣(*Mulgedium tataricum L.*), 又名紫花山莴苣、苦菜等, 为菊科(*Compositae*)苦苣菜属(*Sonchus*)植物, 我国新疆、甘肃、陕西、内蒙古等均有分布, 资源丰富[1]。乳苣全草可入药, 有消炎、止痛、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等功效, 是一种药食同源的多年生草本植物。

乳苣主要成分为黄酮类[2]、多酚[3]、萜类[4]、多糖、多种氨基酸等。黄酮类化合物可清除自由基、超氧化物, 因而具有抗氧化、抗衰老作用[5]; 另外还有抗心脑血管疾病、抗病毒、抗癌[6]、抗菌[7]、抗糖尿病, 调节血脂等作用。国内外关于乳苣的研究主要集中在其化学成分的提取、富集纯化及活性方面, 有少部分研究了乳苣氨基酸含量的动态变化[8], 对乳苣黄酮含量测定具体方法及乳苣不同部位总黄酮的含量测定未见相关报道。天然产物中黄酮含量测定方法有很多, 如紫外分光光度法直接法、比色法、薄层扫描法、高效液相色谱法、荧光光度法、超临界流体色谱法、毛细管电泳法等[9]-[16], 比色法由于其方法简便、快速, 使用仪器简单、便于推广应用等特点, 常用于天然产物中黄酮含量测定。

本实验采取乙醇回流提取法提取乳苣根、茎、叶及全草总黄酮, 石油醚萃取, 以芦丁作对照品, 用紫外可见分光光度计, 建立 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定乳苣不同部位总黄酮的含量, 为乳苣的药用部位和资源合理利用提供依据。

2. 仪器与试剂

2.1. 仪器

紫外可见分光光度计(UV1801G, 天津冠泽科技有限公司)、电子天平(LE204E, 梅特勒-托利多仪器

(上海)有限公司)、旋转蒸发仪(N-1300, 上海爱朗仪器有限公司)、电热恒温水浴锅(DK-98-II, 天津市泰斯特仪器有限公司)、电热鼓风干燥箱(BGZ-140, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、中草药粉碎机(FW135, 天津市泰斯特仪器有限公司)、尼龙筛(40目)。

2.2. 药品与试剂

乳苣(采自新疆医科大学厚博学院院内); 芦丁(纯度: HPLC \geq 98%, 北京索莱宝科技有限公司)、亚硝酸钠(分析纯, 天津市盛奥化学试剂有限公司)、硝酸铝(分析纯, 天津市盛奥化学试剂有限公司)、氢氧化钠(分析纯, 天津市盛奥化学试剂有限公司)、石油醚(分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司)、无水乙醇(分析纯, 天津永晟精细化工有限公司)。

3. 方法与结果

3.1. 乳苣不同部位提取液的制备

取新鲜乳苣全草洗净, 根、茎、叶分离, 分别阴干, 备用。实验前, 根、茎、叶、全草分别粉碎, 过40目筛。分别称取乳苣根、茎、叶及全草粉末各10.0025 g、10.0003 g、10.0005 g、10.0025 g, 置500 ml圆底烧瓶中, 加30倍70%乙醇, 90℃水浴回流2 h, 抽滤, 滤渣加30倍70%乙醇重复提取2次, 合并3次滤液, 减压浓缩至干, 加蒸馏水溶解并定容至100 ml, 石油醚萃取至醚层无色, 取下层溶液浓缩至干, 70%乙醇复溶并定容至100 ml, 摇匀, 得乳苣不同部位总黄酮提取液, 备用。

3.2. 芦丁对照品溶液配制

称取于120℃下干燥至恒重的芦丁对照品0.0200 g, 置100 ml量瓶中, 70%乙醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 备用($C = 0.2000$ mg/ml)。

3.3. 乳苣总黄酮含量测定条件筛选

3.3.1. 最佳波长的选择

分别精密移取蒸馏水、芦丁对照品溶液和以70%乙醇准确稀释100倍的乳苣全草总黄酮提取液各5.00 ml, 置25 ml量瓶中, 依次加5% NaNO_2 溶液3.00 ml, 摇匀, 放置6 min, 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液1.50 ml, 摇匀, 放置6 min, 加4% NaOH 溶液8.00 ml, 蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 静置15 min, 用紫外可见分光光度计, 在350~700 nm范围内进行全波长扫描(图1、图2)。由图可知: 芦丁对照品溶液和乳苣全草提取液均在522 nm处有较强吸收, 因此确定最佳检测波长为522 nm。

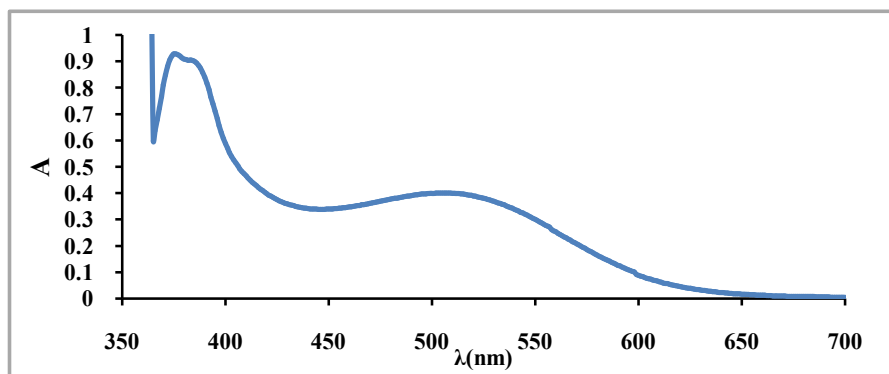


Figure 1. Full-wavelength scan of rutin reference solution

图1. 芦丁对照品溶液全波长扫描图

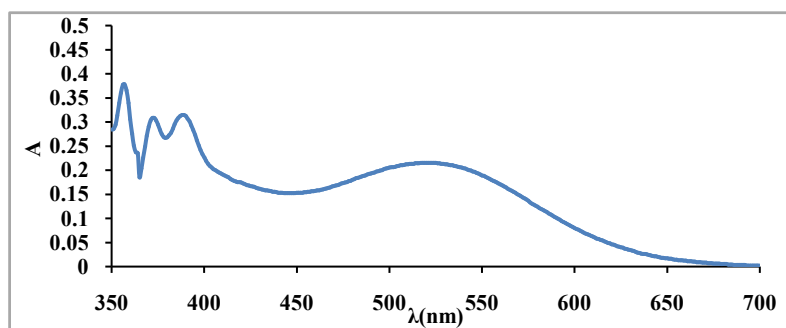


Figure 2. Full-wavelength scan of the whole extract of *Mulgedium tataricum L.*
图 2. 乳苣全草提取液全波长扫描图

3.3.2. 显色剂用量考察

移取 3.00 ml 乳苣全草提取液，置 100 ml 量瓶中，加 70%乙醇定容至刻度，摇匀，分别移取 3.00 ml 置 5 个 25 ml 量瓶中，依次考察 5% NaNO_2 溶液(1.50、2.00、2.50、3.00、3.50 ml)，10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液(1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 ml)，4% NaOH 溶液(6.00、8.00、10.00、12.00、14.00 ml)用量(图 3~5)。结果 5% NaNO_2 溶液、10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液、4% NaOH 溶液最佳用量分别为 2 ml、2 ml、12 ml。

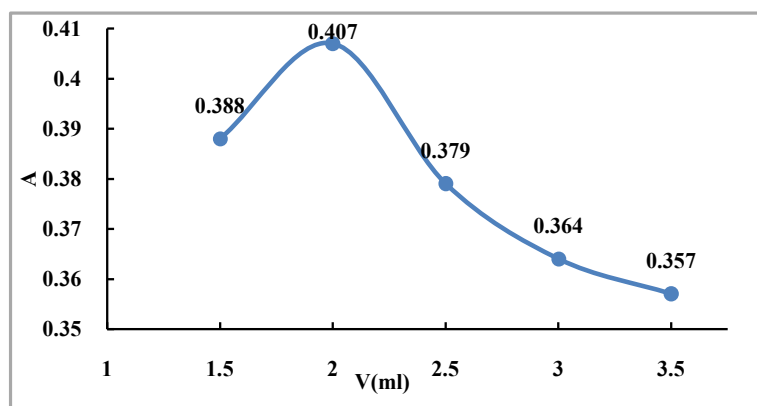


Figure 3. Investigation on the dosage of 5% NaNO_2 solution
图 3. 5% NaNO_2 溶液用量考察

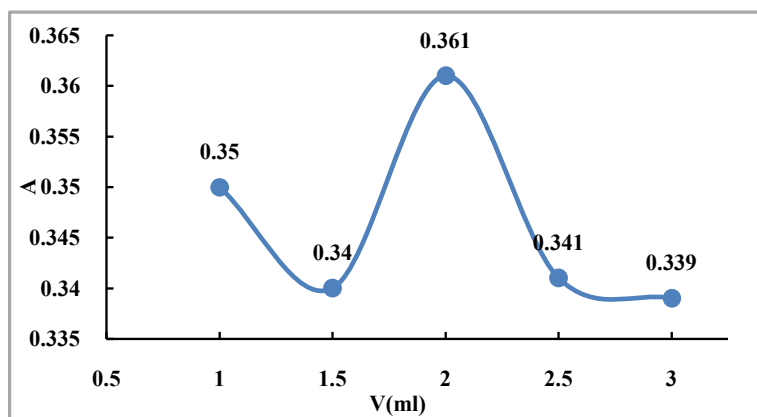


Figure 4. Investigation on the dosage of 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ solution
图 4. 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液用量考察

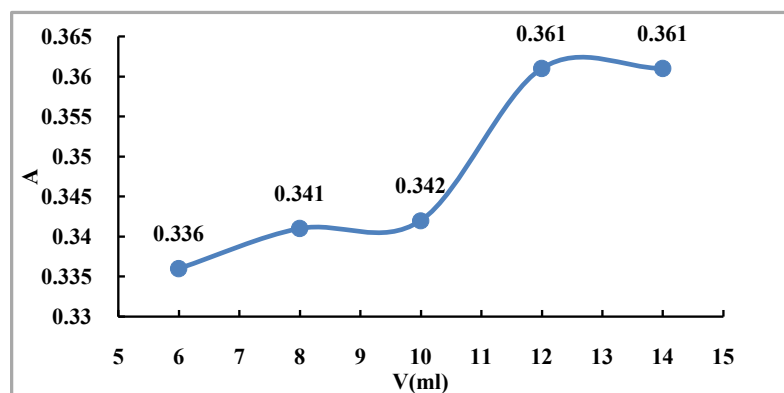


Figure 5. Investigation on the dosage of 4% NaOH solution
图 5. 4% NaOH 溶液用量考察

3.4. 标准曲线绘制

分别移取芦丁对照品溶液 0.00 ml、1.00 ml、3.00 ml、5.00 ml、7.00 ml 和 9.00 ml 置 25 ml 量瓶中，依次加 5% NaNO₂ 溶液 2.00 ml，摇匀，放置 6 min，10% Al(NO₃)₃ 溶液 2.00 ml，摇匀，放置 6 min，加 4% NaOH 溶液 12.00 ml，蒸馏水定容至刻度，摇匀，静置 15 min，于 522 nm 下测定吸光度，以系列芦丁对照品溶液浓度(C)为横坐标，以吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线(图 6)，得线性回归方程 $y = 11.075x - 0.005$ ($R^2 = 0.9989$)，说明芦丁对照品溶液在 0.0080~0.0720 mg/ml 范围内线性关系良好。

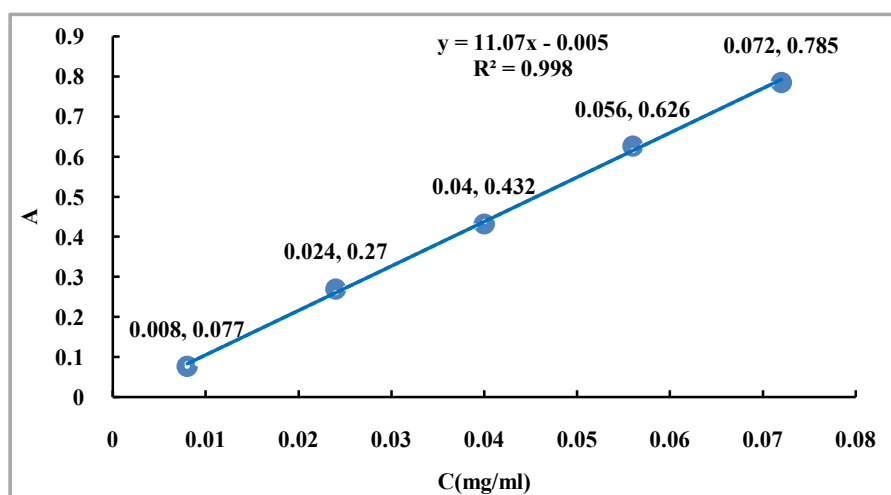


Figure 6. Standard curve of series concentration rutin reference substance
图 6. 系列浓度芦丁对照品标准曲线

3.5. 分析方法的评价

3.5.1. 精密度考察

移取 3.00 ml 乳苣全草提取液，置 100 ml 量瓶中，加 70%乙醇定容至刻度，摇匀，分别移取 3.00 ml 置 6 个 25 ml 量瓶中，依次加 5% NaNO₂ 溶液 2.00 ml，摇匀，放置 6 min，10% Al(NO₃)₃ 溶液 2.00 ml，摇匀，放置 6 min，加 4% NaOH 溶液 12.00 ml，蒸馏水定容至刻度，摇匀，静置 15 min，于 522 nm 下测定吸光度，求 RSD 值，如表 1 所示，精密度 RSD 值为 1.5%，表明本实验具有较高精密度。

Table 1. Precision survey results**表 1.** 精密度考察结果

测定次数	1	2	3	4	5	6
<i>A</i>	0.364	0.378	0.372	0.372	0.376	0.366
<i>RSD</i> (%)	1.5					

3.5.2. 稳定性考察

移取 3.00 ml 乳苣全草提取液, 置 100 ml 量瓶中, 加 70%乙醇定容至刻度, 摇匀, 移取 3.00 ml 置 25 ml 量瓶中, 依次加 5% NaNO₂ 溶液 2.00 ml, 摇匀, 放置 6 min, 10% Al(NO₃)₃ 溶液 2.00 ml, 摇匀, 放置 6 min, 加 4% NaOH 溶液 12.00 ml, 蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 静置 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min 时分别于 522nm 下测定吸光度, *RSD* 为 2.9% (n=5), 说明显色后溶液在 60 min 内基本稳定。如表 2 所示, 30 分钟以内随时间延长, 吸光度略有减小, *RSD* 为 0.41% (n=3), 表明反应液在 30min 内比较稳定, 30~45min 吸光度减小幅度较大, 45~60min 吸光度值又趋于稳定。

Table 2. Stability investigation results**表 2.** 稳定性考察结果

时间(min)	0	15	30	45	60
<i>A</i>	0.379	0.377	0.376	0.359	0.357
(0~30 min) <i>RSD</i> (%)	0.41				
(0~60 min) <i>RSD</i> (%)	2.9				

3.5.3. 加标回收率考察

移取 3.00 ml 乳苣全草提取液, 置 100 ml 量瓶中, 加 70%乙醇定容至刻度, 摇匀, 分别移取 3.00 ml 置 7 个 25 ml 量瓶中, 1~6 号瓶加芦丁对照品溶液 4.25 ml, 依次加 5% NaNO₂ 溶液 2.00 ml, 摇匀, 放置 6 min, 10% Al(NO₃)₃ 溶液 2.00 ml, 摇匀, 放置 6 min, 加 4% NaOH 溶液 12.00 ml, 蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 静置 15 min, 于 522nm 下测定吸光度, 以加标测得量减原样测得量, 除以加标量计算回收率, 如表 3 所示, 加标回收率为 93.61%, *RSD* 为 2.9%, 符合要求。

Table 3. Inspection results of standard addition recovery rate**表 3.** 加标回收率考察结果

样品	<i>A</i>	加标回收率(%)	平均加标回收率(%)	<i>RSD</i> (%)
1	0.730	98.53		
2	0.704	91.62		
3	0.713	94.01		
4	0.702	91.09	93.61	2.9
5	0.709	92.95		
6	0.711	93.48		
7	0.359			

3.6. 乳苣不同部位及全草的含量测定

移取 1.00 ml 根和茎提取液、0.10 ml 叶和全草样品溶液, 分别置 25 ml 量瓶中, 依次加 5% NaNO₂ 溶液 2.00 ml, 摇匀, 放置 6 min, 10% Al(NO₃)₃ 溶液 2.00 ml, 摇匀, 放置 6 min, 加 4% NaOH 溶液 12.00

ml, 蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 静置 15 min, 于 522nm 下测定吸光度, 按公式 1 计算, 如表 4 所示, 得乳苣根、茎、叶、全草中总黄酮提取率依次为 11.64 mg/g、12.60 mg/g、105.4 mg/g、77.63 mg/g。

$$\text{总黄酮提取率} = \frac{\text{提取液中总黄酮的质量}}{\text{样品粉末的质量}} \text{mg/g} \quad \text{公式 1}$$

Table 4. Content determination of *Mulgedium tataricum* L. root, stem, leaf and whole plant
表 4. 乳苣根、茎、叶和全草的含量测定

样品	体积(ml)	A	总黄酮提取率(mg/g)
根	1.00	0.511	11.64
茎	1.00	0.553	12.60
叶	0.10	0.462	105.4
全草	0.10	0.339	77.63

4. 讨论

本试验对 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定乳苣黄酮的含量方法进行考察, 获得较优测定条件为一定量样品液加 5% NaNO_2 溶液 2.00 ml, 摇匀, 放置 6 min, 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 2.00 ml, 摇匀, 放置 6 min, 加 4% NaOH 溶液 12.00 ml, 蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 静置 15 min, 于 522 nm 下测定吸光度, 黄酮含量在 0.0080~0.0720 mg/ml 范围内与吸光度具有良好的线性关系。精密度和稳定性试验 *RSD* 分别为 1.5% 和 2.9%, 平均回收率 93.61%, 由此可见, 本试验对 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定条件进行改进后, 使该法具有精密度高、操作简单、灵敏度高、稳定性好等优点, 适用于乳苣黄酮含量的测定。

本试验测得乳苣根、茎、叶及全草总黄酮提取率依次为: 叶(105.4 mg/g) > 全草(77.63 mg/g) > 茎(12.60 mg/g) > 根(11.64 mg/g), 由此可知乳苣总黄酮主要集中在地上部分。文献报道, 乳苣总黄酮含量与其生长的地理位置、地质条件、环境气候及采收季节等有关, 3~4 月总黄酮含量逐渐升高, 5 月之后总黄酮含量则逐渐下降[17], 本试验所用乳苣采于 8~9 月, 因此测得的根、茎含量可能相对较低。

基金项目

克拉玛依市创新环境建设(创新人才)项目(2020CXRC0066)资助。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编写委员会. 中国植物志第 80 卷第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 75-76.
- [2] 高义霞, 景红艳, 姜祖君, 等. 响应面分析法优化乳苣总黄酮提取工艺的研究[J]. 中药材, 2010, 33(4): 621-624.
- [3] 周向军, 高义霞, 李娟娟, 等. 乳苣多酚提取工艺及抗氧化研究[J]. 中国酿造, 2011(9): 118-121.
- [4] Wang, X.-X., Lin, C.-J. and Jia, Z.-J. (2006) Triterpenoids and Sesquiterpenes from *Mulgedium tataricum*. *Planta Medica*, 72, 764-767. <https://doi.org/10.1055/s-2006-941508>
- [5] 何宝佳, 陶浩楠, 魏蔚, 等. 微波萃取技术提取败酱草中总黄酮的应用研究[J]. 唐山师范学院学报, 2016, 38(5): 44-46.
- [6] 王雪, 刘景楠, 夏顺利, 等. 中药总黄酮抗肿瘤活性及机制的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(4): 484-486+496.
- [7] 高义霞, 史陇陇, 王倩宁, 等. 不同溶剂乳苣萃取物对金黄色葡萄球菌抑制作用研究[J]. 天水师范学院学报, 2017, 37(5): 30-33.
- [8] 李龙梅, 牛俊美, 铁英, 等. 不同生长期乳苣营养器官矿质营养元素含量的动态变化[J]. 中国瓜菜, 2020, 33(8): 40-44.
- [9] 严赞开. 紫外分光光度法测定植物黄酮含量的方法[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(9): 164-165.

-
- [10] 马陶陶, 张群林, 李俊. 中药总黄酮的含量测定方法[J]. 安徽医药, 2007, 11(11): 1030-1032.
- [11] 林勇, 朱良辉, 吴永忠. 比色法测定不同产地乌饭叶总黄酮含量[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(2): 97.
- [12] 景仁志, 陈波, 葛绍荣, 等. 薄层扫描法测定苦荞叶中芦丁的含量[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1997, 36(4): 877-879.
- [13] 李吉来, 于留荣. 薄层扫描法测定银杏叶中总黄酮醇甙的含量[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(2): 106-108.
- [14] 张廷之, 侯镜德, 徐秀珠. 反相高效液相色谱法测定毛竹叶中总黄酮[J]. 理化检验-化学分册, 2001, 37(3): 117-118.
- [15] 王学军, 许振良, 赵锁奇. 银杏叶提取物中槲皮素和芦丁的超临界流体色谱法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(7): 415-417.
- [16] 孙莲, 孟磊, 陈坚, 等. 毛细管电泳法测定桑叶中的黄酮类成分——芦丁和槲皮素[J]. 色谱, 2001, 19(5): 395-397.
- [17] 楚红英, 李瑜, 李华北, 等. 苦菜中总黄酮的提取与含量测定[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(24): 12017-12019.