

# AlCl<sub>3</sub>比色法测定箬叶总黄酮含量

乐 薇,吴士筠

(武汉工商学院 环境与生物工程学院,湖北 武汉 430065)

**摘要:**为研究一种测定箬叶黄酮含量简便且标准的方法,以箬叶为试材,建立了 AlCl<sub>3</sub>比色法测定箬叶提取液中总黄酮的测定方法,考察了乙醇的浓度、AlCl<sub>3</sub>的加入量、pH 以及显色时间等对显色物吸光度的影响。结果表明:AlCl<sub>3</sub>法测定箬叶总黄酮的溶剂为 50%乙醇,适宜酸度为 pH 5~6,显色剂 AlCl<sub>3</sub>用量为 0.025 mol·L<sup>-1</sup>,显色时间 20 min,测定波长 415 nm,以芦丁为标样,回归方程  $A=0.0246c+0.0181$ ,相关系数  $R^2=0.9992$ ,方法的回收率为 97.94%~103.8%,相对标准偏差为 2.4%。

**关键词:**箬叶;总黄酮;AlCl<sub>3</sub>;比色法

**中图分类号:**R284 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)02-0098-04 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.02.0098

生物类黄酮是植物次级代谢产物,具有调节血脂、消除氧自由基、抗氧化、抗肿瘤和抗病毒等生理活性<sup>[1-3]</sup>,因此受到国内外学者的广泛关注,成为研究的热点问题<sup>[4-6]</sup>。箬叶为禾本科竹亚科箬竹属植物叶的总称,主要分布于我国长江以南各省区,自古以来就是端午节标志食品-粽子的包装物<sup>[7]</sup>。现代药理分析发现,箬叶杀菌、防腐、抗癌等多种作用显著,可广泛应用于医药、食品及日化用品等<sup>[8-9]</sup>。黄酮为箬叶的重要活性成分<sup>[10]</sup>,但研究报道较少,为加快箬叶黄酮的开发利用,有必要对箬叶黄酮的

含量进行快速有效的监测。测定黄酮类化合物的方法主要有薄层色谱法<sup>[11]</sup>、分光光度法<sup>[12]</sup>、荧光法<sup>[13]</sup>和 HPLC<sup>[14]</sup>法等。由于分光光度法具有设备投资小、操作简便和易于工业推广等优点,因此考虑选用分光光度法作为箬叶类黄酮含量的检测方法。分光光度法测定类黄酮的方法主要有 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH 显色法和 AlCl<sub>3</sub>显色法,经研究发现凡是具有邻苯二羟基的物质均能用 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH 显色法进行显色定量,准确度不高,后者对测定总黄酮的专属性较强<sup>[15]</sup>,故拟采用 AlCl<sub>3</sub>显色-分光光度法测定箬叶类黄酮,并对方法的精密度、准确度和稳定性等性能进行考察,为箬叶黄酮含量测定提供一种简便准确的方法。

收稿日期:2014-10-10  
基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2013C111)  
第一作者简介:乐薇(1979-),女,湖北省沙市人,硕士,副教授,从事生物分析方面研究。E-mail:yuewei11@126.com。

## Study on Extraction Technology of Alion from *Aloe* by Ultrasonic

Ji Hui-jie,YANG Yan-jun,XUE Jun-li,ZHAO Wen-zhuo

(College of Chemical and Pharmaceutical Engineering,Jilin University of Chemical Technology,Jilin,Jilin 132022)

**Abstract:**In order to investigate the optimum conditions to extract aloin from *Aloe*,taking aloin content as an indicator,the effect of ultrasonic-assisted extraction on aloin in *Aloe* were studied,and the optimal extraction conditions was determined.The results showed that the optimum conditions for ultrasonic extraction: ethanol concentration was 80%,solid-liquid ratio was 1:55,uhrasonic temperature was 35℃ and uhrasonic time was 40 min.Determination of aloin by UV spectrophotometry,the extraction rate could reach 8.520 mg·g<sup>-1</sup> under these conditions.The results of orthogonal extraction process of aloin were reliable.

**Keywords:***Aloe*; aloin; ultrasonic-assisted extraction; orthogonal

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 仪器 756 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司), pH S-3D pH 计(上海精密科学仪器有限公司), AU Y120 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.1.2 试剂 芦丁标准品(中国药品生物制品鉴定所)、三氯化铝、醋酸钠、冰醋酸、乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠均为分析纯,水为超纯水。

1.1.3 材料 所用箬叶为 2014 年 3 月采自湖北武陵山区鹤峰县。采后洗净,叶片在  $50^\circ\text{C}$  的烘箱中烘 6 h 后粉碎,用石油醚脱脂脱色后晾干,贮于干燥器中置暗处保存备用。

### 1.2 方法

试验于 2014 年 3-4 月在武汉工商学院环境与生物工程实验中心进行。

1.2.1 箬叶总黄酮提取液的制备 称取 3.0 g 箬叶,加入 75 mL 75% 乙醇在  $75^\circ\text{C}$  下浸提 40 min,趁热过滤,用少许 75% 乙醇洗涤滤渣,滤渣在相同条件下再浸提 1 次,合并滤液和洗液,并用 75% 乙醇定容至 250 mL,此即为箬叶总黄酮提取液。

1.2.2 芦丁标准溶液的制备 准确称取经  $105^\circ\text{C}$  干燥至恒重的芦丁标准试剂 0.076 8 g,用 30% 乙醇  $60^\circ\text{C}$  水浴溶解,并定量转入 250 mL 容量瓶中,用 30% 乙醇定容,摇匀得  $0.307\ 2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  标准溶液。

1.2.3  $\text{AlCl}_3$  法测定总黄酮含量 准确移取一定量的芦丁标准溶液或箬叶总黄酮提取液于 10 mL 容量瓶中,加入乙醇 5.0 mL,  $0.5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{AlCl}_3$  溶液 0.50 mL, pH 为 5.4 的 HAc-NaAc 缓冲液 2 mL,用水定容至 10.00 mL。显色 20 min 后,在 415 nm 下以不加  $\text{AlCl}_3$  的试液为空白,测定吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\text{AlCl}_3$ 法测定条件的选择

2.1.1 测定溶剂的选择 按文献[16]操作时发现箬叶总黄酮的测定试液呈现浑浊,说明箬叶总黄酮含量测定时溶剂不适合用水,考虑到黄酮类化合物易溶于有机溶剂,且提取箬叶总黄酮时采用的是乙醇,因此在测定中加入乙醇。经试验证明,测定液中乙醇的体积百分比在 50% 比较合适,原因有两点:(1)该乙醇浓度下溶液能较长时

间保持澄清,在试验时间内吸光度稳定。试验中发现乙醇的体积百分比在 40% 时初始阶段溶液澄清,但测定时吸光度无法稳定,经过几个小时的放置后发现测定液有白色沉淀析出。(2)避免了乙醇浓度越大挥发性越大带来的测定影响。

2.1.2 测定波长及缓冲溶液 pH 的选择 准确吸取 0.4 mL 芦丁标准溶液按 1.2.3 在不同 pH 下显色, pH 分别为 3.6、4.0、4.4、5.0 和 5.4,所得吸收曲线见图 1。可见随着酸度的提高,最大吸收峰位置逐渐红移,最大吸收波长处的吸光度也逐渐增大,  $\text{pH} \geq 5.0$  时,最大吸收峰位置不变,为 415 nm,且该波长下的吸光度趋于稳定。故在 pH 5.4 的情况下,进一步考察箬叶总黄酮的显色情况(见图 2)。结果表明芦丁和箬叶总黄酮显色后都在 415 nm 处有最大吸收。因此本试验选用缓冲溶液 pH 5.4,测定波长为 415 nm。

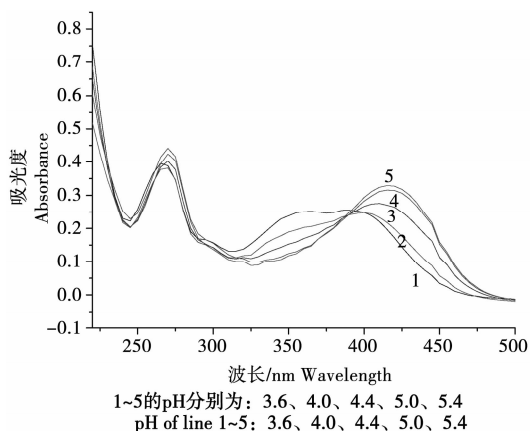


图 1 不同 pH 下的芦丁显色液的吸收曲线  
Fig. 1 Absorption curve of rutin color liquid under different pH

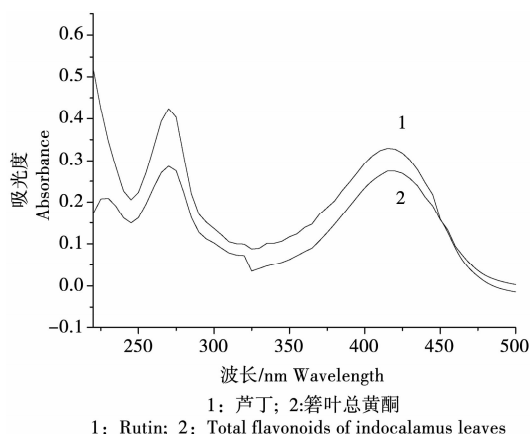


图 2 pH 5.4 下芦丁与箬叶总黄酮显色液的吸收曲线  
Fig. 2 Absorption curve of rutin and total flavonoids of Indocalamus leaves under pH 5.4

2.1.3 显色剂  $\text{AlCl}_3$  用量的选择 取 0.4 mL 芦丁标准溶液,按 1.2.1 操作,考察  $\text{AlCl}_3$  用量对吸光度的影响(见图 3),发现显色剂用量在 0.40~0.60 mL 时,吸光度稳定,因此本试验选用  $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{AlCl}_3$  0.50 mL,即显色液中  $\text{AlCl}_3$  的浓度为  $0.025\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

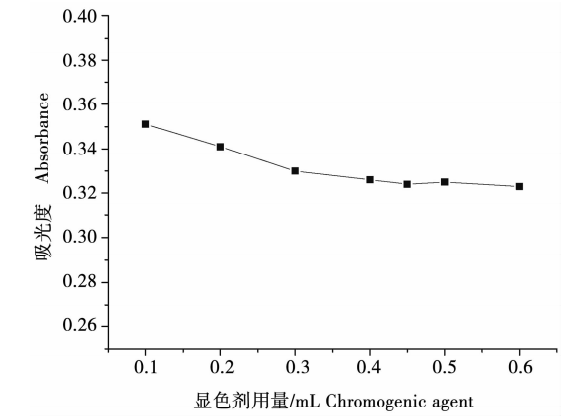


图 3 显色剂用量对芦丁显色液吸光度的影响

Fig. 3 Effect of chromogenic agent on absorbance

2.1.4 显色稳定性考察 分别取 0.40 mL 芦丁标准溶液和箬叶总黄酮提取液,按 1.2.1 操作,显色不同时间后测定 A 值(见图 4)。表明芦丁显色 10 min 后吸光度稳定,且在 2 h 内吸光度变化很小。而箬叶总黄酮显色 15~60 min 内吸光度变化小于 3%。因此本试验选用显色时间 20 min。

2.2  $\text{AlCl}_3$  法标准曲线

分别取芦丁标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和

1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,按 1.2.3 操作,以芦丁浓度为 0 的试液为参比,以吸光度 A 对芦丁浓度做图,得到标准曲线,曲线方程为  $A = 0.0246c + 0.0181$ ,相关系数  $R^2 = 0.9992$ ,线性范围为芦丁质量浓度  $6.14\sim30.72\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

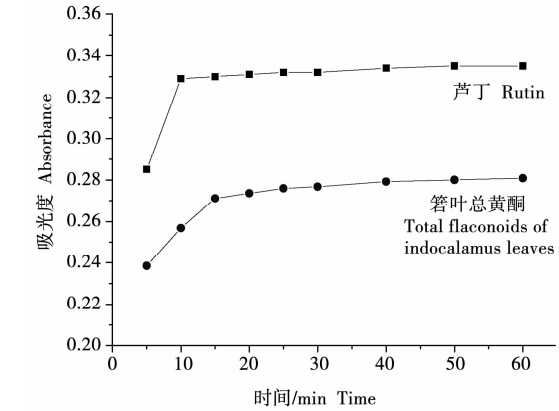


图 4 时间对显色液吸光度的影响

Fig. 4 Effect of time on absorbance

2.3  $\text{AlCl}_3$  法的样品测定及回收验证

按选定的试验方法,测定了箬叶总黄酮的含量,并对样品溶液进行了平行测定。为验证试验方法的准确性,也进行了加标回收试验。结果见表 1 和表 2。由此可见,该法测定箬叶总黄酮提取液的相对标准偏差(RSD)为 2.4%,精密度较好。在试验中,加标回收率在 97.94%~103.80%,准确度较高。因此,可以采用此法测定箬叶总黄酮含量。

表 1 精密度试验结果

Table 1 The results of the RSD experiments

样品取用量/mL Sample volume	吸光度 Absorbance	箬叶总黄酮含量/(mg·g <sup>-1</sup> ) Sample content of total flavonoids	平均值/(mg·g <sup>-1</sup> ) Average value	相对偏差/% Relative deviation	RSD/%
0.2	0.119	17.09	17.05	0.24	2.4
0.2	0.117	16.75		-1.8	
0.2	0.114	16.41		-3.7	
0.4	0.223	17.35		1.8	
0.4	0.225	17.52		2.8	
0.4	0.221	17.18		0.78	

3 结论

箬叶总黄酮在适宜的显色条件下,可与  $\text{AlCl}_3$  形成稳定的黄色络合物,该显色络合物的

吸光度与箬叶总黄酮在一定范围内成正比,可测定箬叶黄酮含量。该法简便可靠,可用于箬叶总黄酮提取过程中的含量检测。

表 2 加标回收试验结果  
Table 2 The results of the recovery experiments

提取液 Sample	测得量/μg Sample content	加标量/μg Rutin added	吸光度 A Absorbance	加标后测得量/μg Total found	回收率/% Recovery	平均回收率/% Average recovery
1	40.92	61.44	0.267	101.2	102.40	
2	40.92	61.44	0.270	102.4	103.20	
3	40.92	61.44	0.274	104.2	101.60	
4	81.85	61.44	0.374	144.7	101.00	
5	81.85	61.44	0.371	143.9	102.70	101.1
6	81.85	61.44	0.368	142.2	103.8	
7	122.8	61.44	0.467	182.5	99.04	
8	122.8	61.44	0.465	181.2	98.60	
9	122.8	61.44	0.462	180.4	97.94	

参考文献:

[1] 杜崇民,刘春宇. 黄酮类化合物抗肿瘤研究进展[J]. 中国野生植物资源,2007,26(3):4-7.

[2] 李彩霞,李复兴,李鹏,等. 国槐叶黄酮的抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(5):676-680,683.

[3] 饶澄,黄显. 黄酮类化合物抗炎和抗肿瘤共同作用机制的研究进展[J]. 海峡药学,2010,22(6):8-11.

[4] Mohammad Fattahi, Vahideh Nazeri, Laura Torras-Claveria, et al. Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC-DAD-ESI- MS[J]. Food Chemistry, 2013, 141(1):139-146.

[5] Leandro N Francescato, Silvia L. Debenedetti, Thiago G, et al. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification[J]. Talanta, 2013, 105:192-203.

[6] Didem Söhretoglu, Olov Sterner. Isoflavonoids, flavonoids from *Potentilla astracanica* [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39(4-6): 666-668.

[7] 苏春花. 箬竹林结构特征及竹叶生物活性成分研究[D]. 南京:南京林业大学,2011.

[8] 崔健. 箬竹属植物黄酮类物质与挥发性成分的研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2011.

[9] 靳伟,王恩军,宋洁,等. 箬叶多糖对宫颈癌的抑制及免疫功能的影响[J]. 中国计划生育学杂志,2012,20(3): 164-167.

[10] 李水芳,李娇娟. 箬叶化学成分的比较研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(12): 7-10.

[11] Jia Sun, Yongde Yue, Feng Tang, et al. Simultaneous HPTLC analysis of flavonoids in the leaves of three different species of bamboo[J]. JPC-J Planar Chromat, 2010, 23(1):43-48.

[12] 许海丹,陈珍,顾霞敏. 乌药叶中总黄酮的含量测定[J]. 应用化工,2010,39(9): 1405-1406.

[13] 马登磊,邵建群,何深知,等. 荧光分析法测定元宝枫叶中总黄酮含量的研究[J]. 首都医科大学学报,2014,35(1): 113-117.

[14] 魏琦. 苦竹属竹叶化学成分及其生物活性研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2013.

[15] 马陶陶,张群林,李俊,等. 三氯化铝比色法测定中药总黄酮方法的探讨[J]. 时珍国医国药,2008,19(1): 54-56.

[16] 陈丛瑾,黄克瀛,李德良,等. AlCl<sub>3</sub>显色分光光度法测定香椿叶中总黄酮[J]. 分析试验室,2006,25(12):91-94.

Determination of Total Flavonoids from Indocalamus  
Leaves by AlCl<sub>3</sub> Colorimetric Method

YUE Wei, WU Shi-yun

(College of Environmental and Biological Engineering, Wuhan Technology and Business University, Wuhan, Hubei 430065)

**Abstract:** In order to study the simple and standard method for measuring indocalamus leaves, taking indocalamus leaves as material, A AlCl<sub>3</sub> colorimetric method for the determination of total flavonoids from indocalamus leaves was established, the effect of solvent, the dosage of AlCl<sub>3</sub>, pH and standing time were studied. The results showed that the optimum conditions were 50% ethanol as solvent, added 0.025 mol · L<sup>-1</sup> AlCl<sub>3</sub> with pH 5~6, after 20 min total flavonoids reacts with AlCl<sub>3</sub> to form a stable yellow complex, the determine wavelength was 415 nm. The regression equation was  $A=0.0246c+0.0181$ , correlation coefficient R<sup>2</sup> was 0.9992. The recovery was 97.94%~103.8%, and RSD was 2.4%.

**Keywords:** indocalamus leaves; total flavonoids; AlCl<sub>3</sub> colorimetric method