

分光光度法测定 枳椇子总黄酮含量的比较分析

吕国红¹,钟晓凌²,张江¹,李良¹

(1.武汉市久共合工贸有限公司,湖北武汉 430070;

2.湖北工业大学生物工程学院,湖北武汉 430068)

摘要:利用分光光度法,以芦丁为标准品,通过 AlCl_3 和 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 衍生体系,分别在 412nm 和 499nm 处测定枳椇子总黄酮含量;以柚皮苷为标准品,在 283nm 处测定枳椇子总黄酮含量。比较分析三种测定方法的优劣,实验表明:以柚皮苷为标准品,在 283nm 处测定枳椇子总黄酮含量的方法最优,此时峰值检测明显;含量测定准确:3.28%;测定范围广:5.0~25.0mg/mL;精密度高:RSD=1.3%;相对误差最小:0.21%。

关键词:枳椇子,总黄酮测定,分光光度法,比较分析

Comparative analysis on determination total flavonoids of *Hovenia dulcis* Thunb by spectrophotometry

LV Guo-hong¹, ZHONG Xiao-ling², ZHANG Jiang¹, LI Liang¹

(1. Wuhan Jiugonghe Industry and Trade Co., Ltd. Wuhan 430070, China;

2. Bioengineering College, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: Through AlCl_3 and $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ derived system, total flavonoids of *Hovenia dulcis* Thunb was detected by spectrophotometry, taking rutin as a standard. The content of total flavonoids of *Hovenia dulcis* Thunb was measured at 283nm, taking naringin as a standard. Compared and analyzed the merits of the three experiments, the results showed that: taking naringin as a standard, the optimal method was to determine the total flavonoids of *Hovenia dulcis* Thunb in 283nm. Five kinds of advantages in this method, peak was detected obvious, content was determined accurately 3.28%, a wide range of determination was 5.0~25.0mg/mL, high precision: RSD = 1.3% and the smallest relative error 0.21%.

Key words: *Hovenia dulcis* Thunb; determination of total flavonoids; spectrophotometry; comparative analysis

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)12-0394-03

枳椇子为鼠李科(*Rhamnaceae*)拐枣属(*Hovenia*)植物枳椇(*Hovenia dulcis* Thunb)的带肉质果柄的果实或种子,是国家卫生部批准的“药食同源”植物。具有止渴除烦、解酒毒、镇惊、利尿之功效,用于醉酒、烦热、口渴、二便不利^[1-3]。枳椇子黄酮是其主要生理和药理活性成分之一,主要包括山奈酚、洋芹素、4',5,7-三羟基-3',5'-二甲氧基黄酮、杨梅黄素、槲皮素、双氢杨梅黄素等^[4-5]。现代医学研究表明,黄酮类物质具有降低心肌耗氧量、增加冠状动脉和脑血管中血流量、抗心律失常、软化血管、降低血

糖、血脂、抗氧化、清除机体自由基、解酒护肝和增强机体免疫力等功能^[6-7]。目前关于枳椇子定量的方法很多,常用的有 HPLC 法和分光光度法。由于黄酮类化合物结构中具有酚羟基,可与 Al^{3+} 在碱性溶液中显色,所以在科研和生产中人们多采用芦丁和槲皮素作为标准品^[8-9],以 1% 的 AlCl_3 乙醇溶液和 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 作为显色剂体系,对其进行定量分析。同时,笔者发现枳椇子总黄酮中含有大量的双氢黄酮类化合物,由于此类化合物中 A 环和 B 环间没有完全共轭,所以在 283nm 处有强烈的紫外吸收峰,且其浓度与吸光度符合比耳定律^[10]。所以课题组通过实验分析,以双氢黄酮类化合物柚皮苷为标准品,建立了一种枳椇子总黄酮定量的新方

methods of acrylamide in heat-treated foods review and recent developments[J]. J Chromatogr A, 2005, 1075: 1-21.

[8] Wenzl T, Beatriz M, Calle DE, et al. Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review [J]. Food Additi Contam, 2003, 20: 885-902.

收稿日期: 2009-02-19

作者简介: 吕国红(1969-),男,工程师,主要从事食品饮料的研发。

[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 1996-2002.

[6] John A G Roach, Denis Andrzejewski, Martha L Gay, et al. Rugged LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 7547-7554.

[7] Zhang Y, Zhang G, Zhang Y. Occurrence and analytical

法,并分析比较几种测定方法的优劣,为枳椇子总黄酮的进一步开发研究提供科学的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

枳椇子提取物 市售;芦丁(110722-200610)、柚皮苷(100080-200707) 购于中国生物制品检定所;其它试剂 均为分析纯。

UV-2550 双光束紫外分光光度计 日本岛津仪器株式会社。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的制作

1.2.1.1 AlCl_3 法 称取 7.2g 芦丁,用甲醇溶解并定容至 50mL,得 0.144mg/mL 的芦丁标准品。精密量取标准品 0、1、2、3、4、5mL 于 25mL 容量瓶中,加 1% 的 AlCl_3 溶液 3mL,用 75% 乙醇定容,摇匀后静置 30min。分别标注为 0#、1#、2#、3#、4#、5#。以 0# 为对照,在 800~190nm 间扫描 5# 样品,检测芦丁最大吸收峰在 412nm 处。在 412nm 处测定 1#、2#、3#、4#、5# 样品的吸光值,以吸光值为纵坐标,含量(10~2mg/mL) 为横坐标绘制标准曲线。

1.2.1.2 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 法 分别取 0.144mg/mL 的芦丁标准品 0、0.5、1、2、3、4mL 于试管中,依次标注为 01#、02#、03#、04#、05#、06#。分别加甲醇补足 5mL;加 0.5mL 的 5% NaNO_2 ,摇匀放置 6min;加 0.5mL 的 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,摇匀放置 6min;加 4mL 的 4% NaOH ,摇匀,放置 10~20min。以 1# 为对照,在 800~190nm 间扫描 06# 样品,检测芦丁最大吸收峰在 499nm 处。在 499nm 处测定 01#、02#、03#、04#、05# 样吸光值,以吸光值 A 为纵坐标,含量(10⁻³mg/mL) 为横坐标绘制标准曲线。

1.2.1.3 直接测定法 精密称取柚皮苷标准品 10mg,置于 100mL 容量瓶中,加甲醇溶解。分别取标准品溶液 0、1.25、2.5、3.75、5、6.25mL,于 25mL 容量瓶中,甲醇定容。依次为 0#、1#、2#、3#、4#、5#。以 0# 样调零,以 5# 样做峰值检测(700~200nm),检测柚皮苷标准品在 283nm 处有最大吸收。在 283nm 处,以 0# 样调零,依次测定 1#、2#、3#、4#、5# 样吸光值。以吸光值 A 为纵坐标,含量(10⁻³mg/mL) 为横坐标绘制标准曲线。

1.2.2 枳椇子提取物中总黄酮含量测定

1.2.2.1 AlCl_3 法 称取 0.75g 枳椇子提取物于 500mL 容量瓶中,溶解定容。取上述溶液 5mL,加 1% 的 AlCl_3 溶液 3mL、75% 乙醇 2mL,以 0# 溶液为对照,在 412nm 处测定样品吸光值 A_1 。

1.2.2.2 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 法 称取 1.5g 枳椇子提取物于 500mL 容量瓶中,定容,超声溶解。吸取上述溶液 2mL,加 0.5mL 的 5% NaNO_2 ,摇匀静置 6min;再加入 0.5mL 的 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,摇匀放置 6min;最后加入 4mL 的 4% NaOH ,摇匀放置 10~20min 后,以 1# 溶液为对照,在 499nm 处测定样品吸光值 A_2 。

1.2.2.3 直接测定法 称取 0.75g 枳椇子提取物于 500mL 容量瓶中,定容,超声溶解。吸取上述溶液 2mL,定容至 10mL。以 1# 溶液为对照,在 283nm 处

测定样品吸光值 A_3 。

1.2.3 总黄酮含量计算 枳椇子总黄酮的含量依据下列公式进行计算:

$$C = N \times \frac{(A + x) \times 1000}{B}$$

式中: C—样品中枳椇子总黄酮的含量,mg/L; A—样品吸光度; x—标准曲线截距; B—标准曲线斜率; N— AlCl_3 法时, N = 2; $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 法, N = 3.5; 直接测定法时, N = 5。

2 结果与讨论

2.1 标准品最大吸收峰的检测

$\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 法显示,芦丁标准品在 499nm 处有最大吸收值(图 2),这与 2005 年版《中国药典》规定芦丁用 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 显色的检测波长为 500nm^[11] 报道一致;而 AlCl_3 法芦丁标准品及直接测定法中柚皮苷标准品的最大吸收峰值分别 412nm 和 283nm(图 1、图 3)。并且从图 1~图 3 上均可看出,主要吸收峰能够得到完全分离,符合检测要求。

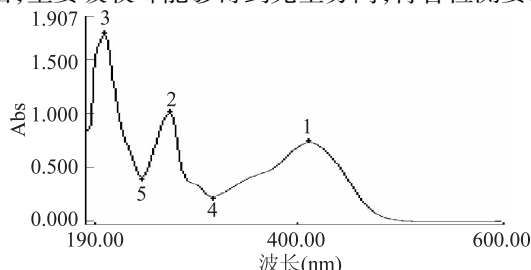


图 1 AlCl_3 法芦丁标准品扫描

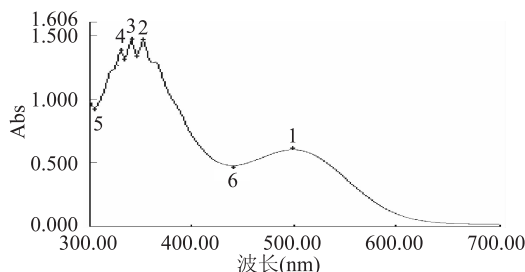


图 2 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 法芦丁标准品扫描

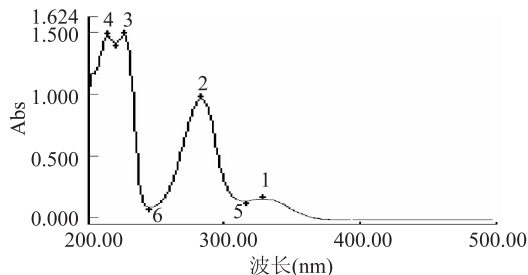


图 3 直接法柚皮苷标准品扫描

2.2 枳椇子总黄酮峰值检测

枳椇子提取物中总黄酮含量在三种波长下检测,仅在 283nm 处检测出目的峰(图 6),而在 412nm(图 5)和 499nm(图 6)处并没有最大吸收峰,这与枳椇子提取物中总黄酮含量很低(1.26%)有一定关系,同时也说明在 AlCl_3 法和 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 法测定枳椇子总黄酮的精密度有限。资料显示:枳椇子提取物中可能存在一定量的双氢黄酮类化合物,由于 A 环和 B 环之间完全没有共轭,所以在 283nm 有强烈的紫外吸收峰^[12],而在 499nm 和

表1 三种方法的标准曲线

测定波长	标准品	标准曲线	线性相关系数	RSD (%, n = 5)	有效黄酮检测含量 (10 ⁻³ mg/mL)
I	芦丁	y = 0.0258x + 0.0024	r ² = 0.9999	1.5	5.76~28.8
II	芦丁	y = 0.1187x - 0.006	r ² = 0.9909	1.6	7.2~57.6
III	柚皮苷	y = 0.0394x - 0.0065	r ² = 0.9996	1.3	5.0~25.0

注:I 为 AlCl₃ 法;II 为 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 法;III 为直接测定法。表2、表3 同。

412nm 处未检测出目的峰。

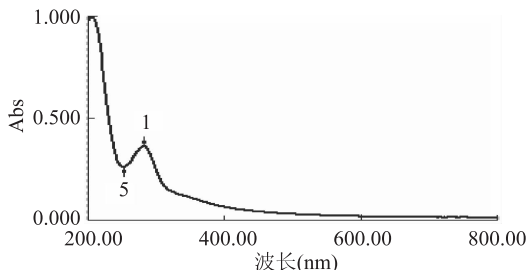


图4 AlCl₃ 法峰值检测枳椇子总黄酮

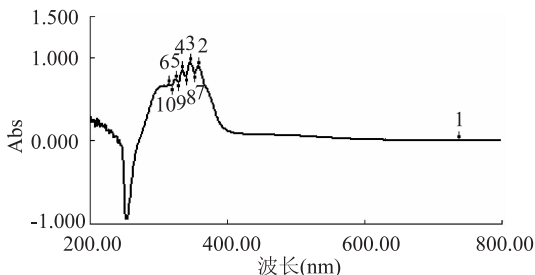


图5 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 法峰值检测枳椇子总黄酮

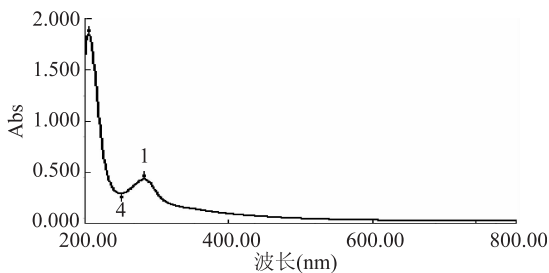


图6 直接法峰值检测枳椇子总黄酮

2.3 标准曲线

三种测定方法所建立的标准曲线见表1。可见在283nm处,测定范围广:5.0~25.0mg/mL;精密度高;RSD = 1.3%。

2.4 枳椇子提取物中总黄酮含量

计算枳椇子提取物中枳椇子总黄酮含量时,分别将对应的吸光值A代入计算公式中,结果见表2。

表2 枳椇子提取物吸光值与总黄酮含量

次数	枳椇子总黄酮含量(10 ⁻³ mg/mL)		
	I	II	III
1	38.65	38.04	97.53
2	37.95	35.38	97.02
3	37.80	38.92	97.27
平均值	38.21	37.45	97.27

2.5 误差分析

在三种波长下,枳椇子总黄酮含量平均相对偏差最小的是在283nm处,仅为0.21%;其次是在412nm处的1.04%,可见在283nm处测定枳椇子黄酮的准确度最高。虽然NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH法

可以提高黄酮检测的专一性,但由于试剂较多,变量难以控制,所以误差相对较大,平均相对偏差达到3.73%,最大相对偏差达到5.60%,实验也证明了此点(见表3)。

表3 枳椇子提取物中总黄酮含量误差分析

次数	总黄酮含量(%)			相对偏差(%)		
	I	II	III	I	II	III
1	1.29	1.27	3.25	1.57	1.60	0.31
2	1.26	1.18	3.23	0.78	5.60	0.31
3	1.26	1.30	3.24	0.78	4.00	0.00
平均值	1.27	1.25	3.24	1.04	3.73	0.21

3 结论

利用分光光度法对枳椇子提取物中总黄酮含量测定进行了比较研究,确定以柚皮苷为标准品,在283nm处测定的方法最优。此时标准曲线为y = 0.0394x - 0.0065(x为枳椇子黄酮含量,y为吸光值),r² = 0.9996,RSD = 1.3%;枳椇子总黄酮峰值检测明显;含量准确:3.28%;测定范围广:5.0~25.0mg/mL;相对误差最小为0.21%。此方法的成功建立为准确快速定量检测枳椇子黄酮提供了理论依据。

参考文献

[1] 张洪,刘秀玲,文为.优化枳椇子的提取工艺[J].华西药
学杂志,2005,20(2):121-122.
[2] 于斌如,汤银红.枳椇子的研究进展[J].时珍国医国药,
2004,15(9):608-609.
[3] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:人民出版社,1977:
1511.
[4] 张会香,杨世军,张静.枳椇子总黄酮提取工艺及解酒作
用[J].食品与生物技术学报,2006,25(3):84-87.
[5] 沙美,丁林生.枳椇子的化学成分研究[J].中国药科大学
学报,2001,32(6):418-420.
[6] 嵇扬,陆红.枳椇子药理研究概况[J].中医药学报,2002,
30(1):54-56.
[7] 丁林生,梁侨丽,腾艳芬.枳椇子黄酮类成分的研究[J].
药科学报,1997,32(8):600.
[8] 胡志林,刘文娜,张永军.枳椇子中总黄酮提取工艺研究
[J].中成药,2004,12(12):1065-1067.
[9] 姚小华,高英,李卫民.枳椇子中总黄酮的含量测定[J].
辽宁中医药大学学报,2008,10(5):151-152.
[10] 庞瑞,杨中林.不同产地不同品种柚皮中总黄酮和柚皮
苷的含量比较[J].药学与临床研究,2005,15(3):205-207.
[11] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典[S].北京:化
学工业出版社,2005:578.
[12] 张甘良,汪钊,朱国孟.柑桔生物类黄酮柚皮苷生物活性
的研究进展[J].天然产物研究与开发,2005(17):117-120.