

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.06.030

竹叶总黄酮测定方法优化

杨开友¹, 邓小宽¹, 江秀平², 廖梦², 高平¹

(1. 四川大学生命科学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;
2. 筠连县富农林业科技开发有限责任公司, 宜宾 644000)

摘要: 为了建立一种快速、精确的竹叶总黄酮测定方法, 采用以碱性样品溶液为参比溶液, 以异荭草苷为标准品以及缩短加入显色试剂后的静置时间等措施, 来对一般的比色法进行优化。该比色法在减少杂质干扰和排除芦丁标准品引起的测定误差的同时, 使测定时间缩短了三分之一。且该方法具有良好的线性和精密度, 平均加样回收率为 100.14%, RSD 为 0.79% ($n=5$)。结果表明, 优化的比色法可用于竹叶总黄酮的测定。

关键词: 竹叶总黄酮; 比色法; 参比溶液; 异荭草苷; 静置时间

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)06-1182-05

Optimization of the determination method of the total flavonoids in bamboo leaves

YANG Kai-You¹, DENG Xiao-Kuan¹, JIANG Xiu-Ping², LIAO Meng², GAO Ping¹

(1. Key Laboratory of Bio-resource and Eco-environment Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. Junlian County Funong Forestry Science and Technology Co. LTD, Yibin 644000, China)

Abstract: In order to establish a rapid and accurate determination method for measurement of total flavonoids in bamboo leaves, a general colorimetric method was optimized by using the alkaline sample solution as the reference solution, using isoquertoside as the standard, and shortening the staining time after adding the staining reagent. The optimized colorimetric method reduced the measurement time by 1/3 while reducing the impurities interference and eliminating the measurement error caused by the rutin standard. Furthermore, the method provided good linearity and precision. The average recovery rate was 100.14%, and the RSD was 0.79% ($n=5$). The results showed that the optimized colorimetric method can be used for the determination of total flavonoids in bamboo leaves.

Keywords: Total flavonoids in bamboo leaves; Colorimetric method; Reference solution; Isoorientin; Standing time

1 引言

黄酮是竹叶提取物的主要活性成分, 具有抗菌、抗氧化等作用^[1-2], 广泛应用于食物保鲜及化

妆品、药物开发, 其含量的准确测定具有重要意义。对于植物提取物总黄酮含量的测定, 一般采用比色法^[3]。此法操作简便、成本较低^[4]。而特定于竹叶总黄酮的测定, 绝大多数文献采用芦丁比色

收稿日期: 2019-01-21

基金项目: 四川省科技计划(2016NFP0080)

作者简介: 杨开友(1993-), 男, 硕士生, 主要研究药用天然产物化学。E-mail: 1406263527@qq.com

通讯作者: 高平。E-mail: gaop@scu.edu.cn

法^[5-7],也有少部分文献^[8]采用 HPLC 法测定.由 HPLC 法原理可知,在无法获取全部黄酮对照品的情况下,HPLC 法很难完成总黄酮测定.此外,由于仪器昂贵、试剂费用高,许多小企业并不具备 HPLC 条件.综合考虑,比色法是竹叶总黄酮含量测定的最优选择.但芦丁比色法存在较多问题.

其一,竹叶提取物中含有很多杂质,检测波长下有吸收,使测定结果偏高^[9].其二,竹叶黄酮中不含芦丁,其主要成分为碳苷黄酮^[10],与芦丁分子量、分子结构差异较大.采用芦丁为标准品,测定结果不准确^[11].其三,常规的芦丁比色法耗时较长.针对以上问题,本研究采用先对竹叶提取物进行前处理,再选择合适的参比溶液和标准品,以及缩短显色静置时间的方法,全面优化了竹叶总黄酮测定的比色法.本方法准确、快捷,为竹叶总黄酮测定以及竹叶质量控制提供了参考.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 植物材料 竹叶(产自成都、宜宾、乐山、亳州等地);

2.1.2 试剂 芦丁、异荭草苷(HPLC>98%,成都植化纯公司);亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醇、石油醚(分析纯,成都科龙公司);蒸馏水(实验室自制).

2.1.3 仪器 UV8100 可见分光光度计(北京莱伯泰科公司);LD5-2A 离心机(北京京立离心机公司).

2.2 方法

2.2.1 样品前处理 烘干(60℃,4 h)的竹叶粉碎(过40目筛),精确称取1.0 g于50 mL三角瓶中,加入30 mL 60%乙醇溶液,混匀后保鲜膜密封60℃水浴浸提2 h.减压抽滤得到滤液,浓缩去除乙醇,后转入50 mL容量瓶,加水定容至刻度.取20 mL此溶液以5000 r/min的转速离心10 min.收集上清液于分液漏斗,加石油醚萃取.收集下层液体于50 mL容量瓶,加水定容至刻度,即为样品原液.

2.2.2 溶液配制 准确吸取5 mL样品原液两份,分别置于25 mL容量瓶.其中一份加入10 mL NaOH溶液,均以蒸馏水定容至刻度,摇匀,即为样品溶液和碱性样品溶液.精密称取芦丁20 mg、异荭草苷15 mg,分别用甲醇充分溶解,并于100 mL

容量瓶中定容至刻度线,得到芦丁和异荭草苷对照品原液.

2.2.3 显色反应及测定 准确吸取5 mL样品原液于25 mL容量瓶,用蒸馏水补充至6 mL,再加入1 mL 5% NaNO₂溶液,摇匀静置6 min;加入1 mL 10% Al(NO₃)₃溶液,摇匀静置6 min;加入10 mL 4% NaOH溶液,再用蒸馏水定容至刻度,充分混匀后静置15 min,得到显色样品溶液.用分光光度计测定其吸光值.

2.2.4 参比溶液选择 比色法易受杂质干扰,导致测定结果偏高.通过选择合适的参比溶液,可以消除竹叶样品中杂质引起的误差.参比溶液通常有:纯溶剂、空白溶剂、样品溶液、加入特定试剂的样品液等^[12].结合本实验的具体情况,参比溶液在样品溶液和碱性样品溶液^[13]中选择.对样品溶液和碱性样品溶液分别进行可见光谱扫描.确定参比溶液,对显色样品溶液进行可见光谱扫描,选择最大吸收波长.

2.2.5 标准品的选择 比色法通常选用芦丁为标准品,但特定到竹叶黄酮的测定,应选取竹叶中的特征性黄酮成分作为对照.文献报道^[13],竹叶黄酮有四种特征性成分:荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、异牡荆苷,其分子量与分子结构均异于芦丁.故以芦丁为标准品测定竹叶中的总黄酮,导致结果存在偏差,采用上述四种成分作为标准品更为科学^[11].这四种成分分子量、分子结构相似,同一浓度下吸光度大致相同.而异荭草苷在竹叶黄酮中含量最高^[11,14],选择异荭草苷作为标准品,结果更为准确.依次精确吸取标准品原液1、2、3、4、5 mL加入25 mL容量瓶,按2.2.3中方法于510 nm波长下测定吸光值.以标准品浓度(mg/mL)为横坐标、吸光值(A)为纵坐标,经excel线性拟合,得到标准曲线.分别测定竹叶提取物样品的吸光值,以芦丁标曲和异荭草苷标曲分别计算黄酮含量.

2.2.6 显色时间的优化 按照2.2.3中显色方法,样品溶液加入NaNO₂溶液后,分别静置2~6 min,其它条件不变,以吸光值稳定的最短静置时间为优化时间.再以此优化时间进行标准品溶液的吸光度测定,其它条件不变,判断其吸光值是否稳定.若不稳定,则在此时间上延长至吸光度稳定为止,并以此时间为最终优化时间.按照2.2.3中显色方法,样品溶液加入Al(NO₃)₃溶液后,分别静置3~6 min,其余步骤同上.按照2.2.3中显色方法,样品溶液加入NaOH溶液后,分别静置

9, 11, 13, 15 min, 其余步骤同上。

2.2.7 方法学考察 综合前述结果, 确定优化后的竹叶总黄酮测定方法, 对此方法进行方法学考察。取异荛草苷溶液以此显色方法重复检测 5 次吸光值, 计算相对标准偏差 (RSD); 取样品溶液以此方法显色, 于 13、15、20、25、30 min 分别测定吸光值, 计算 RSD 值; 使用批次相同的竹叶平行制备 5 份样品溶液。各精确吸取相同体积, 以优化方法测定各样品溶液的吸光值, 求出 RSD 值。取含量已知的 5 份竹叶, 按 2.2.1 方法得到样品溶液。取一定量样品溶液中加入相应体积异荛草苷原液, 以此显色方法测定吸光值, 计算加样回收率和 RSD 值; 取产自全国各地的竹叶样品, 按 2.2.1 方法得到样品溶液。以优化的比色法测定总黄酮含量。

3 结果与讨论

3.1 参比溶液选择

样品溶液和碱性样品溶液的可见光谱扫描结果如图 1a。对比可知, 在 460~800 nm 范围内, 碱性样品溶液吸光值均小于样品溶液, 并且两者在 500 nm 附近均存在较高吸收。结合前期的实验结果, 以碱性样品溶液为参比溶液的方法具有不错的效果, 本文考虑以此进行后续研究。

以碱性样品溶液为参比溶液, 显色样品溶液的可见光谱扫描结果如图 1b。可知显色样品溶液在 470~520 nm 之间有最大吸收。选择 510 nm 作为测定波长。

3.2 标准品的选择

芦丁和异荛草苷的标准曲线如图 2。

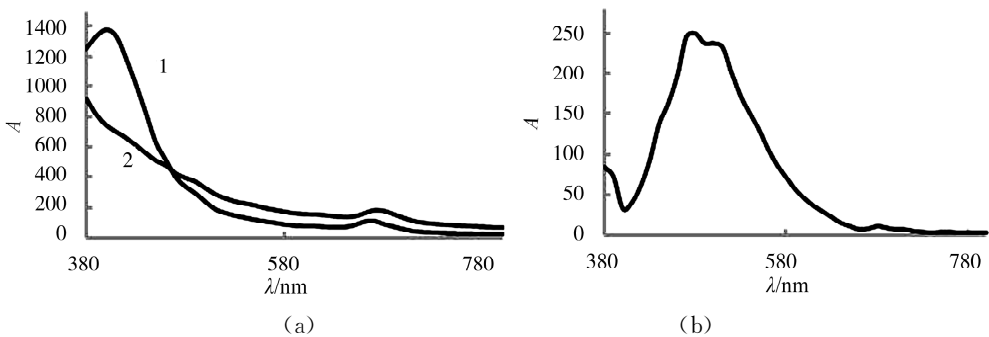


图 1 可见光谱扫描结果

a. 样品溶液和碱性样品溶液 (1. 样品溶液, 2. 碱性样品溶液); b. 显色样品溶液 (以碱性样品溶液为参比溶液)

Fig. 1 Visible spectrum scanning results

a. the sample solution and the alkaline sample solution (1. the sample solution, 2. the alkaline sample solution); b. the sample solution combined with the agent by using the alkaline sample solution as the reference solution

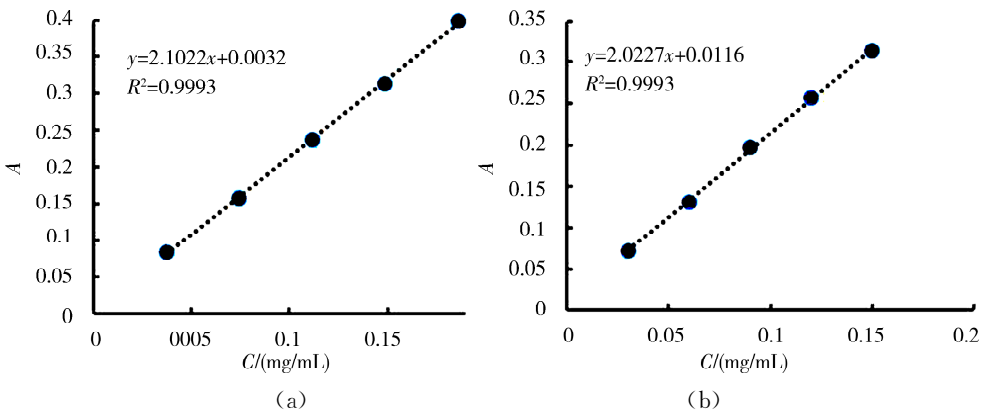


图 2 芦丁(a)、异荛草苷(b)的标准曲线

Fig. 2 The standard curve of rutin (a) and isoorientin (b)

分别计算竹叶样品的含量(表 1), 两者结果比较, 差异显著($P < 0.05$).

表 1 以不同标曲计算竹叶样品中的总黄酮含量($\bar{X} \pm s, n=3$)
Tab. 1 The content of total flavonoids of bamboo leaves samples calculated by different standard curve($\bar{X} \pm s, n=3$)

样品编号	以芦丁标曲计算/ μg	以异荭草苷标曲计算/ μg
I	76.3 \pm 0.22	75.5 \pm 0.23
II	133.2 \pm 0.45	134.6 \pm 0.47
III	146.1 \pm 0.59	147.9 \pm 0.62
IV	151.1 \pm 0.67	153.6 \pm 0.70
V	161.6 \pm 0.39	164.0 \pm 0.40

3.3 显色时间的优化

3.3.1 加入 NaNO_2 溶液后静置时间的优化 加入 NaNO_2 溶液后, 不同静置时间的结果见表 2, 静置 3 min 后已完全反应.

表 2 加入 NaNO_2 后不同静置时间的吸光值

Tab. 2 The absorption value by the different standing time after NaNO_2 added

试剂	静置时间/min	竹叶样品/A	异荭草苷/A
NaNO_2	2	0.283	\
	3	0.276	0.289
	4	0.277	0.288
	5	0.277	0.287
	6	0.278	0.288

表 3 加入 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 后不同静置时间的吸光值

Tab. 3 The absorption value by the different standing time after $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ added

试剂	静置时间/min	竹叶样品/A	异荭草苷/A
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	3	0.265	\
	4	0.277	0.287
	5	0.278	0.288
	6	0.278	0.288

表 4 加入 NaOH 后不同静置时间的吸光值

Tab. 4 The absorption value by the different standing time after NaOH added

试剂	静置时间/min	竹叶样品/A	异荭草苷/A
NaOH	9	0.286	\
	11	0.279	0.283
	13	0.278	0.288
	15	0.279	0.288

3.3.2 加入 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液后静置时间的优化 加入 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液后, 不同静置时间的结果见表 3, 静置 4 min 后吸光值稳定.

3.3.3 加入氢氧化钠溶液后静置时间的优化 加入氢氧化钠溶液后, 不同静置时间的结果见表 4, 静置 13 min 后吸光值保持稳定.

3.4 方法学考察

优化后的竹叶总黄酮测定方法为: 精确吸取一定体积的样品溶液于 25 mL 容量瓶, 加入 10 mL 4% NaOH 溶液, 用 50% 乙醇溶液定容, 以此溶液为参比溶液. 另取同体积的样品加入 25 mL 容量瓶, 用 50% 乙醇补充至 6 mL, 再加入 1 mL 5% NaNO_2 溶液, 摇匀静置 3~6 min; 加入 1 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 摇匀静置 4~6 min; 加入 10 mL 4% NaOH 溶液, 再用 50% 乙醇定容到刻度, 充分混匀后静置 13~15 min, 于 510 nm 波长下测定吸光值. 最后通过异荭草苷标曲(图 3)计算样品的总黄酮含量.

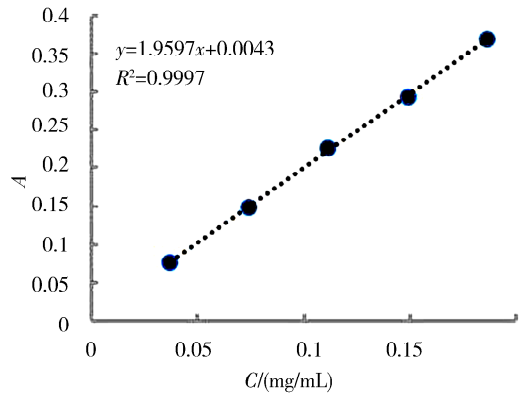


图 3 异荭草苷标准曲线(以碱性异荭草苷溶液为参比溶液)

Fig. 3 The standard curve of isoorientin by using the alkaline isoorientin solution as the reference solution

表 5 不同产地竹叶样品的总黄酮含量

Tab. 5 The content of total flavonoids of the bamboo leaves samples from different producing areas

产地	平均含量/%	RSD/%
成都	1.60	1.37
乐山	1.49	0.93
宜宾	1.32	1.66
亳州	1.18	1.25
安国	2.02	1.84
禹州	1.55	1.12

精密度 RSD 为 0.73%; 稳定性 RSD 为 0.82%; 重复性 RSD 为 1.30%; 平均加样回收率为 100.1%, RSD 为 0.79%; 不同产地竹叶样品的总黄酮含量测定结果见表 5, RSD 小于 3%。

4 结 论

本文提出了一种优化的竹叶总黄酮测定方法, 解决了样品中杂质的干扰以及不合适的标准品等问题, 提高了测定准确性和测定效率。方法学考察表明, 本文提出的方法准确可靠, 可用于竹叶总黄酮测定和竹叶质量控制, 有助于促进竹叶黄酮相关产业的良性发展。

参考文献:

- [1] 史娟, 李江, 葛红光. 汉中毛竹叶黄酮提取及抗氧化稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37: 53.
- [2] 栗明月, 焦梦荷, 蒋林树, 等. 竹叶黄酮的生理功能及其应用前景[J]. 中国农学通报, 2018, 34: 144.
- [3] 张岩, 曹国杰, 张燕, 等. 黄酮类化合物的提取以及检测方法的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 01: 154.
- [4] 李涛, 刘晓璠, 杨小兰. 啤酒花总黄酮测定方法的比较研究[J]. 食品科学, 2014, 35: 89.
- [5] 梁倩, 郑艳玲, 刘云, 等. 野龙竹竹叶黄酮含量及其抗氧化活性测定实验[J]. 西部林业科学, 2013, 42: 110.
- [6] 刘康莲, 冯定坤, 贺银菊, 等. 三都麻竹叶总黄酮的提取及其含量测定[J]. 食品研究与开发, 2015, 36: 62.
- [7] 潘佳佳, 叶生月, 丁东栋, 等. 4 种竹子竹叶黄酮质量分数及抗氧化活性的季节变化[J]. 浙江农林大学学报, 2014, 31: 280.
- [8] 江相兰. 竹叶黄酮的提取、检测、分离、抗氧化活性及构-效关系的研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2005: 19.
- [9] 张春娟, 孟志芬, 郭雪峰, 等. HPLC 结合紫外光谱法快速定性定量分析四种竹叶黄酮碳苷[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34: 2568.
- [10] 潘智然, 王腾华, 朱首伦, 等. 基于超高压液相色谱-高分辨多级质谱联用技术的中药淡竹叶化学成分分析[J]. 广东药学院学报, 2016, 32: 300.
- [11] 李栋, 方婷, 吴晓琴, 等. 竹叶提取物中总黄酮含量测定方法的比较与改进[C]//中国林学会竹子分会成立 20 周年暨中国竹业学术大会, 2012: 524.
- [12] 邹学贤, 赵云斌, 高希宝. 分析化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [13] 楚秉泉, 庞美蓉, 张英. 竹叶中黄酮类化合物丰度的文献调研[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27: 1308.
- [14] 王晖, 陈梅荣, 刘良玉. HPLC 法测定竹叶提取物中荜草苷、异荜草素、牡荆素和异牡荆素的含量[J]. 江西中医药大学学报, 2014, 26: 58.

引用本文格式:

- 中文: 杨开友, 邓小宽, 江秀平, 等. 竹叶总黄酮测定方法优化[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2019, 56: 1182.
 英文: Yang K Y, Deng X K, Jiang X P, *et al.* Optimization of the determination method of the total flavonoids in bamboo leaves [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2019, 56: 1182.