

分光光度与 HPLC法测定荷叶总黄酮的研究

周兰香, 黄阿根*, 谢凯舟**, 钱建亚*

(扬州大学理学院 化学化工系, 江苏 扬州 225009)

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)01-0035-03

荷叶 *Nemlumbo lotus* 用作中草药早就收载入传统医书中^[1], 现代医学研究证明荷叶浸提液有显著降低血脂的作用^[2]。我们的研究发现荷叶含有丰富的黄酮类化合物, 资料显示有多种植物黄酮具有降血脂功能^[3], 而对荷叶黄酮类化合物的研究非常缺乏, 荷叶黄酮含量的分析方法尚未见报道。我们建立荷叶黄酮分析方法对深入开展荷叶黄酮的结构降脂功能因子及荷叶黄酮提取精制等方面的工作有积极的参考价值^[4]。

1 材料与方法

1.1 仪器: 722光栅分光光度计; Waters 高效液相色谱仪; 490可调波长检测仪; 740色谱数据处理机。

1.2 试剂和原料: 槲皮素 (Sigma公司)、甲醇、磷酸为色谱纯, 芦丁 (生化试剂, 上海生化试剂二厂), 其它试剂均为分析纯。荷叶于 10月中旬从江苏宝应县水泗乡荷藕科技示范区采集, 扬州大学园艺系鉴定为藕莲美人红品系。

1.3 实验方法

1.3.1 荷叶黄酮提取方法: 新鲜荷叶低温烘干, 水分小于 8%, 剪成 3 mm 左右的碎片, 用 60% 乙醇水溶液 (固液比为 1:40) 80℃ 浸提 3 h, 并不断搅拌, 抽滤洗涤后, 合并滤液定容, 供分析用。

1.3.2 分析方法: ①分光光度法: 对 3,5位羟基含量较多的黄酮类化合物的测定可采用在亚硝酸盐存在时, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 在碱性条件下与黄酮形成络合物, 在一定波长下有最大吸收峰的特点, 进行比色分析。标准品选用芦丁。

测定方法: 将一定标准样品液 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或荷叶浸提液置 25 mL 容量瓶中, 用纯水补充至 12.5 mL, 加入 0.7 mL NaNO_2 (1:20) 摇匀, 放置 5 min, 加入 0.7 mL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (1:10), 6 min 后再加入 5 mL 1 mol/L NaOH 混匀, 用纯水稀释至刻度, 10 min 后于 500 nm 波长处进行比色测定, 以试

剂作为空白

②高效液相色谱法: 荷叶浸提液的高效液相色谱图显示, 黄酮类化合物结构多样, 很难一一分析, 故采用酸水解法先将黄酮苷水解为黄酮苷元后, 用高效液相色谱法测定其苷元含量, 以槲皮素为标样折换成具体含量。

色谱条件: 色谱柱选用 Nova-pak C_{18} 柱 (3.9 mm \times 150 mm), 预柱 C_{18} (3.9 mm \times 15 mm), 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸 (1:1); 检测波长: 360 nm, 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 20 μL , 柱温: 室温。

标准曲线制备: 精密称取干燥至恒重的槲皮素对照品 10 mg, 用甲醇定容至 100 mL 容量瓶中, 避光保存, 作为对照品贮备液; 再分别准确吸取上述贮备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 然后分别准确吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积。

样品测定: 吸取一定量浸提液, 适当浓缩, 加入 5 mL 25% 的盐酸, 水浴回流酸解 90 min, 冷却后甲醇定容至 50 mL, 摇匀后用 0.45 μm 微滤膜过滤, 分别吸取此溶液与对照品溶液各 20 μL 进样, 样品测定值与对照品测定值比较计算浓度。

2 实验与讨论

2.1 分光光度法

2.1.1 芦丁标样的线性关系: 准确量取芦丁标准液, 含量分别为 30, 60, 120, 180, 240 μg , 按上述检测方法测定吸光度, 测定结果用最小二乘法作回归, 得芦丁浓度 Y (g/L) 与吸光度 A 的关系为:

$Y = 0.08994A + 0.004886$, $r = 0.9995$, 吸光度线性范围 0.1~0.6

2.1.2 重复性试验: 吸取一定量按浸提方法中所得浸提液, 测定吸光度, 重复测定 6 次, 得荷叶芦丁含量为 10.2%, 折换成槲皮素含量为 4.43%, RSD 为

* 收稿日期: 2001-03-04

基金项目: 扬州市科委 (Y29850, Y20035) 及扬州大学研究基金资助项目。

* 扬州大学农学院 ** 扬州大学测试中心

1. 24%。
 2. 1. 3 样品回收率试验: 对已知样品添加一定标准芦丁, 测得回收率数据如表 1 所示, 当添加量小于 25% 时, 回收率接近 100%; 随着标样加量的增加, 荷叶中杂质干扰加剧, 回收率升高。

表 1 不同标样下回收率的变化

样品体积 (mL)	标样量		吸光率 A	回收率 (%)
	(mL)	增加 (%)		
0.8	0.0		0.344	
0.8	0.4	12.7	0.388	100.0
0.8	0.8	25.3	0.439	101.4
0.8	1.2	38.1	0.515	109.0
0.8	1.6	50.8	0.608	118.0
0.0	1.0		0.109	

2. 1. 4 样品稳定性试验: 将反应体系放置 10 min 至 150 min 后测定其样品吸光度的变化。在 10~40 min 范围内, 其吸光度值变化小于 5%, 相对稳定, 特别是在 30 min 内基本无变化。

2. 1. 5 讨论: ① 芦丁标样的最大波长在 490~520 nm 之间几乎不变, 吸光度变化小于 20%, 而荷叶浸提液在 500 nm 左右有最大吸收峰, 故选择波长 500 nm

② 标准曲线中 NaNO_3 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 NaOH 用量对标准曲线的影响: 试验发现其用量在目前确定的用量基础上变化在 50%~150% 之间对曲线的线性关系无影响, 对灵敏度稍有影响, 因此分析时只要采用某一固定的用量, 标准一致, 对样品分析不会有显著影响。

③ 石油醚进行预处理是常用的去除脂溶性杂质如蜡质、叶绿素等的有效方法, 试验发现浸提液石油醚处理前后吸光度基本不变, 溶媒相吸光度趋于零, 说明石油醚萃取处理对荷叶黄酮吸光法的分析影响不大。

④ 回收率试验中可以看出, 随着芦丁含量的增加, 吸光度显著增加, 说明荷叶中杂质与黄酮类化合物的结合物增加了测定的吸光度, 使化学吸光法测得的荷叶浸提物黄酮化合物含量偏高; 这种误差程序与测定对象的组成关系很大, 对组成相对稳定的体系, 作为简便、快捷的量性分析手段是可行的, 精确的定量分析仍要采用高效液相色谱法。

2. 2 高效液相色谱法

2. 2. 1 槲皮素标样的线性关系: 以槲皮素的峰面积 A 对浓度 C 进行回归, 得回归方程为:

$$A = 4.03 \times 10^5 C + 3.77 \times 10^4, r = 0.998$$

峰面积与浓度的线性范围为: 5~50 mg/mL。

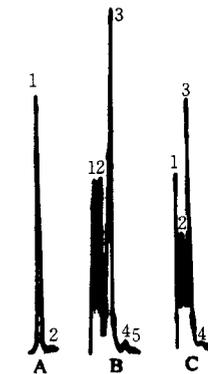
2. 2. 2 荷叶黄酮含量分析: 干荷叶浸提按样品酸解方法处理后进行色谱分析, 3 次测定平均得干荷叶黄酮含量为 1.183%。

2. 2. 3 回收率试验: 精密量取一定已知含量的浸提液, 加入一定量的槲皮素对照品, 按样品测定方法处理进行测定, 计算回收率, 平均回收率为 98.12%, $RSD = 1.12\%$ ($n = 5$)。

2. 2. 4 精密性试验: 对于同一槲皮素对照品, 连续进样 5 次, 结果求得 RSD 为 0.383%。

2. 2. 5 稳定性试验: 在室温条件下, 样品酸解液每间隔 1 h 测定一次溶液的浓度, 求算其含量, 以第一次测得的含量为 100% 计, 其余与此比较计算百分率。结果 4 h 的相对含量为 99.17%, 可见在 4 h 内溶液的含量基本不变。

2. 2. 6 讨论: ① 由 RP-HPLC 分析可见, 荷叶浸提液水解的黄酮化合物以 3 号主峰物质为主, 其保留时间为 4.03 min, 是槲皮素, 故以槲皮素为标样的高效液相色谱法来分析荷叶黄酮含量有代表性, 在主峰后面的 4、5 号次峰保留时间分别为 9.06 min 和 10.28 min, 参照文献可能是山萘素和异鼠李素, 因缺少标样, 有待进一步验证。



A 槲皮素对照品
 B 甲醇为流动相的浸提液
 C 乙醇为流动相的浸提液

图 1 槲皮素对照品及荷叶浸提液的色谱图

② 图 1(C) 为用乙醇取代甲醇为流动相的色谱图, 对比可见, 乙醇的峰形分辨率低, 拖尾严重, 不如甲醇做流动相好。

③ 酸解时间比较 90 min 和 120 min 的数据, 结果无显著差异, 说明 90 min 的酸解时间可保证黄酮苷的充分水解。

④ 将浸提液的乙醇水溶液蒸干, 浓缩去除大部分乙醇, 补加甲醇后酸解, 与乙醇水溶液直接酸解对高效液相色谱含量的影响不大。

⑤ 分光光度法含量分析比 HPLC 分析数据明显高, 一方面是分光光度法杂质干扰, 另一方面是 HPLC 分析是单组份分析对照, 不能全面反映总黄酮含量, 有待对组成结构进行进一步分析。

⑥ 用本法测定银杏黄酮含量为 0.331%, 黄酮含量丰富的菊花为 1.28% 左右, 对比可见荷叶黄酮含量丰富, 其功能有待进一步研究。

3 小结

3.1 用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 体系与黄酮形成络合物的化学吸光分析法,线性关系好,简便快捷,条件一致时,可比性强,结合 HPLC分析数据进行修正可作为定量分析用,为探索最佳提取工艺和中间指标控制提供了有效评价方法。

3.2 反相高效色谱法以槲皮素为标样定量测定荷叶酸解液的总黄酮含量分析,线性关系、重复性、稳定性好,回收率高。

3.3 高效液相色谱法以槲皮素为标样分析黄酮得率 1.183%,分光光度法黄酮得率 4.43%。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [2] 吴吉茂, 毛维伦, 江向东, 等. 荷叶对家兔食饵性高胆固醇血症和动脉粥样硬化影响 [J]. 江西医学院学报, 1987, 27(3): 5-8.
- [3] 王宇辉. 中药降脂研究进展 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(3): 184-186.
- [4] 黄阿根, 钱建亚, 谭道经. 荷叶黄酮提取工艺的研究 [J]. 食品与机械, 2000, 5: 14-18.

大孔吸附树脂在延胡索生物碱提取分离中的应用

刘俊红, 魏峻峰, 王洪志, 伍孝先*

(天津市中西医结合急腹症研究所, 天津 300100)

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)01-0037-02

延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 含有多种生物碱, 以延胡索乙素(四氢巴马汀)为主, 具有明显的镇痛、催眠和镇静作用。近年来大孔树脂在药物提取分离, 尤其是水溶性成分的分离中, 显示着越来越重要的作用。本实验将 3 种大孔吸附树脂应用于延胡索生物碱的提取分离, 对于优化生产工艺具有一定的参考价值。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂: 三用紫外灯, 日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, 美国 SSI 色谱工作站; 大孔吸附树脂 D-101、DA-201 为天津农药厂产品, WLD-III 为四川中药研究所提供; 薄层板: 自制含 1% NaOH 溶液的硅胶 G 板, 10 cm × 20 cm 延胡索乙素对照品购自中国药品生物制品检定所; 甲醇为色谱纯, 其它试剂均为分析纯。

1.2 树脂的预处理及再生: 称取大孔树脂 30 g, 湿法装柱。用 4% 盐酸-乙醇液清洗至流出液加等量水无混浊, 然后用自来水冲洗至中性。用过的树脂, 用水洗去溶剂后, 即再生, 可用于同类植物的分离。经反复使用后, 或用于不同品种的分选, 可用稀酸或稀碱浸泡、洗涤, 水洗中性即可。

1.3 吸附容量的测定: 分别取延胡索提取液 (以 mg/mL 计算) 若干毫升通过 3 种已处理的树脂柱, 收集与重量相对应流出液体积的后 15 mL, 用氨水

调 pH=12, 再用乙醚 20 mL 萃取 1 次, 取乙醚液置于蒸发皿上, 吹风机冷风吹干, 1 mL 甲醇溶解, 作为吸附不同重量时的样品液。按 2000 年版《中国药典》一部延胡索薄层鉴别方法鉴定。确定树脂吸附容量 (树脂: 生药, g/g) 分别为 D-101 (1: 1), WLD-III (1: 1), DA-201 (5: 1)。

1.4 洗脱剂的确定: 分别按吸附容量将延胡索水提取液通过 3 种已处理的树脂柱, 用水洗至流出液无色, 然后分别用 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 乙醇依次洗脱, 收集各段洗脱液, 同 1.3 薄层鉴别方法。除 30%、40% 乙醇外, 其他乙醇浓度在延胡索乙素对应位置均有明显斑点, 因此选择 95% 乙醇为洗脱剂。

1.5 延胡索乙素的含量^[1]测定

1.5.1 色谱条件: 色谱柱: phenomenex ODS (4.6 mm × 250 mm), 流动相: 甲醇-2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7.2) (75: 25), 检测波长: 280 nm, 流速: 0.8 mL/min。

1.5.2 样品液的制备: 分别按吸附容量将延胡索水提取液通过 3 种已处理的树脂柱 (树脂 30 g), 用水洗至流出液无色, 先用 40% 乙醇洗脱, 弃去, 再用 95% 乙醇洗脱, 以每 5 毫升逐段收集洗脱液, 分别用乙醇稀释不同的倍数, 过膜, 作为样品液备用。

1.5.3 标准曲线的制备: 精密称取延胡索乙素对照品 5.7 mg, 用甲醇溶解, 定容于 10 mL 容量瓶, 从中