

文章编号:1673-0062(2016)02-0093-05

枳实总黄酮的提取及含量测定

徐小娜¹, 蒋军辉², 于军晖¹, 吕昌银^{1*}, 胡青芳¹

(1.南华大学 公共卫生学院,湖南 衡阳 421001;2.南华大学 化学化工学院,湖南 衡阳 421001)

摘要:利用超声波辅助法提取江枳实中的总黄酮,在单因素试验的基础采用正交试验获取最优提取工艺条件.以橙皮苷为标准品,在352 nm检测波长下,首次应用 $\text{NaNO}_2-\text{Al}(\text{NO}_3)_3-\text{NaOH}$ 体系作显色剂,对显色剂用量、显色时间和显色时的温度进行优化,采用紫外分光光度法在优化好的条件下测得江枳实总黄酮含量为6.29 mg/g. 所得结果可为枳实黄酮类成分的深入研究和开发利用提供参考.

关键词:枳实;总黄酮;紫外分光光度法;超声波辅助提取法

中图分类号:R927.2 **文献标识码:**B

Extraction of the Total Flavonoids of *Fructus Aurantii Immaturus* and its Content Analysis

XU Xiao-na¹, JIANG Jun-hui², YU Jun-hui¹, LV Chang-yin^{1*}, HU Qing-fang¹

(1.School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China;

2.School of Chemistry and Chemical Engineering, University of South China,

Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: The total flavonoids of *Fructus Aurantii Immaturus* (FAI) from Jiangxi province were extracted by ultrasonic assisted extraction method. The optimal extracting conditions were obtained by orthogonal test design based on single factor experiment. With Hesperidin as reference standard and 352 nm as the detection wavelength, the $\text{NaNO}_2-\text{Al}(\text{NO}_3)_3-\text{NaOH}$ solution system was first employed for color reagent in determination of the total flavonoids of FAI by UV spectrophotometric method. Meanwhile, the dosage of color reagents, coloration time and coloration temperature were optimized. At last, under the optimum conditions mentioned above, the content of total flavonoids of FAI was detected as 6.29 mg/g. The results achieved will do good to the further research of the total flavonoids of FAI and medicinal materials' exploitation.

收稿日期:2015-12-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81473021);湖南省教育科学研究基金资助项目(14A123;12C0334)

作者简介:徐小娜(1974-),女,湖南永州人,南华大学公共卫生学院副教授,博士.主要研究方向:食品药品分析.

* 通讯作者.

key words: *Fructus Aurantii Immaturus*; total flavonoids; UV spectrophotometric method; ultrasonic assisted extraction method

枳实为芸香科植物酸橙(*Citrus aurantium* L.)及其栽培变种或甜橙(*Citrus sinensis* Osbeck)的干燥幼果,药理作用十分广泛^[1-4].其化学成分主要包括生物碱类、黄酮类和挥发油类成分,其中黄酮类为最能体现枳实特征的成分之一^[5].现有的研究表明黄酮类物质具有广泛的药理活性,如清除自由基、抗炎、抗氧化、抗病毒、抗癌、保护心血管和肝脏、抑制酒精嗜好症和防止骨质疏松等作用^[6-9].近年来关于枳实黄酮类成分研究的报道不多,多是采用液相色谱法对其中的一种或几种黄酮类化合物进行定性定量分析^[10-13],较少关于枳实总黄酮的研究^[14].本文拟利用超声波辅助法提取江枳实总黄酮,在单因素试验的基础采用正交设计优化提取工艺条件;在枳实总黄酮的光度法研究中,首次应用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 体系作显色剂,并对显色剂用量、显色时间和显色温度进行优化,在最优波长352 nm处进行测定.所得结果可为枳实黄酮类成分的开发利用提供基础依据.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-2550 紫外-可见分光光度计(日本岛津仪器有限公司);Branson 超声波清洗仪(上海恒奇仪器公司);电子分析天平;FZ102 型微型植物试样粉碎机;PHSJ-3F pH 计(上海精密科学仪器有限公司);D1810C 自动双重纯水蒸馏器.

无水乙醇(天津市福晨化学试剂厂),氢氧化钠(天津博迪化工股份有限公司);硝酸铝(天津市化学试剂厂);亚硝酸钠(广州化学试剂厂),均为分析纯;蒸馏水,自制.

橙皮苷标准品,购于中国药品生物制品检定所,批号为 0721-9909;枳实药材,采自江西省靖安县,先将鲜果切片,再置于 45 °C 烘箱中烘干、粉碎.

1.2 溶液制备

1) 体积分数为 5% NaNO_2 溶液:准确称取无水 NaNO_2 5.0 g 于 100 mL 烧杯中,加入 30 mL 蒸馏水溶解后,转入 100 mL 棕色容量瓶中,加蒸馏水定容于刻度.

2) 体积分数为 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液:称取 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 10.0 g 于 100 mL 烧杯中,加入 40 mL 蒸馏水溶解后,转入 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容

于刻度.

3) 体积分数为 4% NaOH 溶液:称取 NaOH 4.0 g 于 100 mL 烧杯中,加入 30 mL 蒸馏水溶解后,转入 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容于刻度.

4) 体积分数为 70% 乙醇水溶液:量取无水乙醇 70 mL 于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容于刻度.

5) 橙皮苷标准品溶液:精密称取橙皮苷标准品 6.00 mg 于烧杯中,用 70% 乙醇溶解后定容于 25 mL 容量瓶中,得浓度为 0.240 0 mg/mL 的标准品溶液,置于 4 °C 冰箱保存,备用.

1.3 样品制备

枳实药材事先于 60 °C 下烘干,粉碎后过 80 目筛,保存于干燥器中^[12].精密称取干燥粉末样品 1.0 g 于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 70% 的乙醇 20 mL,浸泡 12 h,采用超声波辅助提取法提取 25 min(功率 500 W,频率 40 kHz),提取次数为 1 次,收集滤液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液 5.00 mL 于 100 mL 容量瓶,用蒸馏水定容,混匀,保存于 4 °C 冰箱,备用.

1.4 样品测定

取样品溶液 0.3 mL 于 10 mL 比色管中,在 25 °C 下依次加入 NaNO_2 溶液 0.6 mL(摇匀,放置 2 min)、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.6 mL(摇匀,放置 5 min)和 NaOH 溶液 5.0 mL(摇匀,放置 15 min),用蒸馏水定容,在波长 352 nm 处测定吸光度,按公式 1 计算总黄酮提取量(见“2.5”项下内容).

2 结果与讨论

2.1 波长的选择

精密量取标准溶液 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加 5% NaNO_2 溶液 0.6 mL、摇匀、放置 2 min,加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.6 mL、放置 5 min,然后加 4% NaOH 溶液 5.0 mL,用蒸馏水定容、混匀、显色 10 min,最后以试剂溶液作空白,在 200~700 nm 波长范围扫描,结果发现在 352 nm 处吸光度值最大.实验选择检测波长为 352 nm.

2.2 单因素实验

2.2.1 提取溶剂的选择

实验对三种常用溶剂水、甲醇和乙醇进行了比较分析.称取枳实干燥样品三份,每份 1.0 g,分别置于具塞锥形瓶中,按料液比 1:20 的质量体积比,加入 70% 乙醇 20 mL,浸泡 12 h,然后在室温

下进行超声提取,提取时间为 25 min,收集滤液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 5.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容、摇匀、备测.准确移取以上三种提取液适量,置于 10 mL 比色管中,按“1.4”项下方法操作,所得结果如图 1.

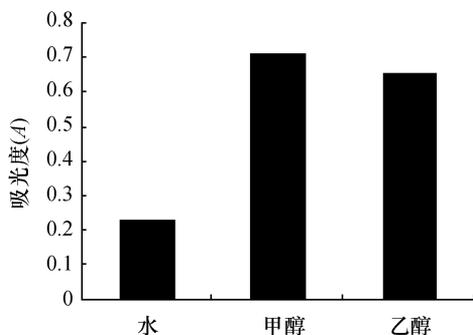


图 1 提取溶剂的影响

Fig.1 Influence of extraction solvents

从图 1 可知,以吸光度值作为考察指标,甲醇提取物的效果最佳,其次是乙醇,水提取物的效果最差.但是,甲醇有毒,实验选择乙醇作提取溶剂.

2.2.2 乙醇浓度的选择

实验测定了乙醇溶液浓度分别为 50%、60%、70%、80% 和 90% 时所获提取物的吸光度,结果发现吸光度值随乙醇浓度的增加呈先升高后降低的趋势,用 70% 的乙醇做提取剂时所得的吸光度值最大,实验选择 70% 的乙醇溶液作提取剂.

2.2.3 料液比的选择

实验测定了料液比分别为 1:15、1:20、1:25、1:30 和 1:35 时所获提取物的吸光度,结果发现随着料液比的增加,吸光度值呈先升高后降低的趋势.当料液比为 1:25 时吸光度值最大,实验选择料液比为 1:25.

2.2.4 提取时间的选择

实验测定了提取时间分别为 15 min、25 min、35 min、45 min 和 60 min 时所获提取物的吸光度,结果发现随着提取时间的延长,吸光度值在 25 min 前逐渐增加,之后逐渐减少,当提取时间为 25 min 时,样品的吸光度值最大.实验确定样品的提取时间为 25 min.

2.2.5 提取次数的选择

按上述优化好的条件,在室温下提取样品,在 352 nm 下测定样品的吸光度值,考察提取次数对枳实总黄酮吸光度值的影响.结果发现,当提取次数由 1 次、2 次增加到 3 次时,吸光度值会有所增

加,但增加的程度非常小.考虑到试剂用量和实验效率,确定样品的提取次数为 1 次.

2.3 正交试验

选择乙醇浓度(A)、料液比(B)和提取时间(C)3个因素,每个因素选择3个水平进行 L₉(3)³ 正交设计,上述三因素的水平分别为 50%、70% 和 90%,1:20、1:25 和 1:30 (m/V),20 min、25 min 和 30 min.所得结果见表 1.

表 1 正交试验结果

Table 1 Results of the orthogonal test

因素	A	B	C	吸光度	总黄酮提取量/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	2.166	5.17
2	1	2	2	1.499	3.57
3	1	3	3	1.216	2.89
4	2	1	2	2.653	6.34
5	2	2	3	1.568	3.73
6	2	3	1	1.132	2.69
7	3	1	3	1.346	3.20
8	3	2	1	0.878	2.07
9	3	3	2	0.866	2.00
K ₁	1.627	2.055	1.392		
K ₂	1.784	1.315	1.673		
K ₃	0.697	1.071	1.377		
R	1.087	0.984	0.296		
因素主次	A>B>C				
优组合	A ₂ B ₁ C ₂				

由表 1 知,在检测波长为 352 nm、提取次数为 1 次的前提下,样品在室温下的最优超声提取工艺条件为 A₂B₁C₂,即乙醇浓度为 70%、料液比为 1:20、提取时间为 25 min.

2.4 显色条件

2.4.1 显色时间的选择

精密吸取样品溶液 0.3 mL 于 10 mL 比色管中,每次只改变一个时间因素或水平,按“1.4”项下方法操作,测定吸光度值,结果见表 2.

由表 2 知,加入 NaNO₂ 溶液后溶液放置的时间对实验结果影响不大,实验选择加入 NaNO₂ 溶液后放置 2 min,接着加入 Al(NO₃)₃ 溶液;加入 Al(NO₃)₃ 溶液后溶液放置的时间对实验结果的影响较大,可能是铝离子和黄酮类物质形成配合物需要一定的时间才能稳定,实验选择加入 Al(NO₃)₃ 溶液后放置 5 min,再加入 NaOH 溶液;加入 NaOH 溶液后,显色的时间对实验结果的影响较小,实验选择显色时间为 15 min.

表2 显色时间的影响

Table 2 Influence of color time

加入试剂名称	放置时间/min	吸光度值(A)
亚硝酸钠溶液	0	0.332
	2	0.336
	5	0.337
	8	0.336
硝酸铝溶液	0	0.391
	3	0.395
	5	0.402
	6	0.404
	7	0.389
	9	0.367
* 氢氧化钠溶液	5	0.301
	10	0.344
	15	0.346
	20	0.344
	25	0.345
	30	0.329

注: * 表示加入氢氧化钠溶液为显色时间

2.4.2 显色剂用量的选择

精密吸取样品溶液 0.3 mL 于 10 mL 比色管

中,每次只改变一个影响因素^[14],其余按“1.4”项下方法测定吸光度值,所得结果如图2.

由图2a、b和c知,当加入0.6 mL的NaNO₂、0.6 mL的Al(NO₃)₃和5.0 mL的NaOH溶液时,样品的吸光度值最大,故此三种溶液选用上述体积进行实验.

2.4.3 显色温度的选择

试验了15℃、20℃、25℃、30℃和35℃五个温度对实验结果的影响,发现上述五个显色温度下所获样品的吸光度值相互比较接近,表明显色温度的影响较小,实验选择在25℃下进行显色反应.

2.5 标准曲线绘制

精确吸取橙皮苷标准溶液(0.24 mg/mL) 0.00 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.30 mL、0.40 mL和0.50 mL分别于10 mL比色管中,加蒸馏水至3.0 mL,依次加入5%亚硝酸钠溶液0.6 mL,混匀,放置2 min,再加入10%硝酸铝溶液0.6 mL,混匀,放置5 min,最后加4%氢氧化钠溶液5.0 mL,用蒸馏水定容,摇匀,显色10 min后,在352 nm波长处测定吸光度,结果见表3.

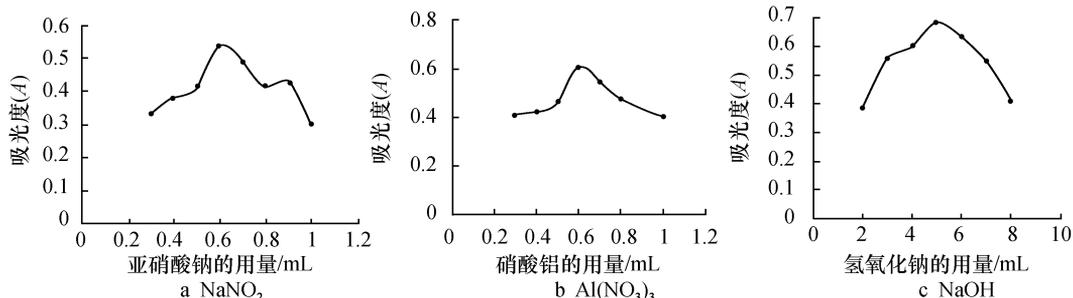


图2 显色剂用量的影响

Fig.2 Influence of the dosages of color reagents

表3 橙皮苷标准品浓度及吸光度值

Table 3 Determination of hesperidin standard solution

标准品浓度 /(mg · mL ⁻¹)	0.0024	0.0048	0.0072	0.0096	0.0120
吸光度	0.212	0.423	0.639	0.823	0.988

以橙皮苷标准溶液的浓度(mg/mL)为横坐标,以吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为 $Y=0.0832X+0.0150$,相关系数 $r=0.9986$,线性范围:0.002~0.012 mg/mL,检出限为0.0008 mg/mL.总黄酮提取含量按如下公式计算:

$$Y = \frac{c \times V_1 \times V_3}{V_2 \times m \times 1000} \quad (1)$$

其中, Y 是总黄酮提取量(mg/g), c 是移取液黄酮浓度(mg/mL), V_1 为移取液定容体积(mL), V_2 为移取液体积(mL), V_3 为药材提取液定容的体积(mL), m 为药材重量(g).

2.6 方法学考察

2.6.1 稳定性试验

取枳实药材1.0 g,按“1.3”项下方法制备样品,每隔0.5 h测定一次吸光度,共测定6次,所得吸光度值的相对标准偏差(RSD)为0.7%,表明样品在3 h内稳定性良好.

2.6.2 精密度试验

测得6次样品吸光度的RSD值为0.6%,表

明仪器精密度良好,枳实总黄酮含量测定结果可靠。

2.6.3 加标回收率试验

精密称取9份枳实药材,每份1.0g,按“1.3”项下方法制备样品,分别按高、中、低三种剂量加入橙皮苷标准品溶液,按“1.4”项下方法测定吸光度,按公式(1)计算总黄酮含量,获得加标回收率结果均在98.0%~102.0%之间,RSD均值为5.17%,说明本次实验所测定的数据准确、可靠。

2.7 枳实总黄酮含量测定

准确称取干燥至恒重的枳实药材1.0g,按“1.3”项下方法制备样品,按“1.4”测定吸光度,按公式(1)计算总黄酮含量,测得江枳实总黄酮含量为6.29mg/g。

3 结论

本实验采用超声波辅助提取法提取枳实总黄酮,在单因素试验的基础上进行正交试验,以样品的吸光度值为考察指标,获得枳实总黄酮在室温下进行提取的最佳工艺条件为:乙醇浓度70%,料液比(m/V)为1:20,提取时间25min,提取次数1次。首次应用 $\text{NaNO}_2-\text{Al}(\text{NO}_3)_3-\text{NaOH}$ 体系作显色剂获得枳实总黄酮的最优紫外分光光度法测试条件,并对显色剂的用量、显色时间和显色温度进行优化,优化好的条件为:先加5%亚硝酸钠溶液0.6mL,混匀,放置2min,然后加10%硝酸铝溶液0.6mL,混匀,放置5min,最后加4%氢氧化钠溶液5mL,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,放置10min后进行测试。采用优化好的条件测得江枳实总黄酮含量为6.29mg/g。

参考文献:

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:230-231.
[2] 张霄潇,李正勇,马玉玲,等.中药枳实的研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(2):185-190.

[3] 唐明,杨秀丽,安朋朋,等.枳实对脑梗塞急性期大鼠胃动素、胃泌素的调节作用[J].中国中医药科技,2015,22(1):39-40.
[4] 郭迎喜,韩玉生,侯志涛,等.枳实薤白桂枝颗粒对异丙肾上腺素所致心肌缺血大鼠抗氧化作用的影响[J].哈尔滨医药,2015,35(1):65-66.
[5] 张鸥,王海峰,张晓丽,等.枳实化学成分的分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2015,32(1):22-25.
[6] Baptista F I, Henriques A G, Silva A M S, et al. Flavonoids as therapeutic compounds targeting key proteins involved in Alzheimer's disease[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2014, 5(2):83-92.
[7] Hwang S L, Shih P H, Yen G C. Neuroprotective effects of citrus flavonoids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(4):877-885.
[8] Lin S Y, Zhang G W, Liao Y J, et al. Dietary flavonoids as xanthine oxidase inhibitors: structure-affinity and structure-activity relationships[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(35):7784-7794.
[9] Noda S, Tanabe S, Suzuki T. Differential effects of flavonoids on barrier integrity in human intestinal Caco-2 cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(18):4628-4633.
[10] Xu X N, Jiang J H, Liang Y Z. Chemical fingerprint analysis for quality control of *Fructus Aurantii Immaturus* based on HPLC-DAD combined with chemometric methods[J]. Analytical Methods, 2010, 2(12):2002-2010.
[11] Xu X N, Jiang J H, Liang Y Z, et al. Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicine *Fructus Aurantii Immaturus* by HPLC-DAD and chemometric methods[J]. Journal of Central South University of Technology, 2011, 18(2):353-360.
[12] 陈建维,刘圆,刘晟楠,等.一测多评法测定枳实中4种黄酮类成分[J].中草药,2015,46(9):1374-1377.
[13] 刘圆,魏惠珍,龚建平,等.一测多评法测定健脾丸中4种黄酮类成分[J].中成药,2015,37(5):995-999.
[14] 马丽,陈家仪,陈稚,等.星点设计-响应面法优选枳实总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(8):33-36.