

本文引文格式:孙明雪,邹纯才,鄢海燕,等.基于抗氧化药效成分群测定瓜蒌提取物中总黄酮的含量[J].右江民族医学院学报,2022,44(3):346-350.

【论著与临床报道】

基于抗氧化药效成分群测定瓜蒌提取物中总黄酮的含量

孙明雪,邹纯才,鄢海燕,严国宇

(皖南医学院药学院,安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 基于抗氧化药效成分群测定瓜蒌提取物中总黄酮的含量。方法 以芦丁、木犀草素、芹菜素、异槲皮苷、山奈酚5种单体化合物按1:2:1:2:3(质量比)混合制备瓜蒌提取物的抗氧化药效成分群。采用紫外-可见分光光度法,以抗氧化药效成分群建立标准曲线并测定瓜蒌提取物中总黄酮的含量。结果 抗氧化药效成分群线性方程为: $A=0.2324C-0.0107$, $r=0.9995$,抗氧化药效成分群在0.18~1.45 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内线性关系良好,方法学验证符合要求。基于抗氧化药效成分群测定瓜蒌提取物中总黄酮的含量为0.0022%(RSD=0.05%),与采用芦丁等单一对照品建立标准曲线测定瓜蒌提取物中总黄酮的含量结果差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 基于抗氧化药效成分群测定瓜蒌提取物中总黄酮的含量,方法可靠、稳定,更能真实反映瓜蒌提取物中总黄酮的含量。

关键词:抗氧化药效成分群;瓜蒌提取物;总黄酮

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)03-0346-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.03.008

Determination of total flavonoids in extract of *Trichosanthes kirilowii* Maxim based on antioxidant active components

Sun Mingxue, Zou Chuncai, Yan Haiyan, Yan Guoyu

(School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To determine the content of total flavonoids in the extract of *Trichosanthes kirilowii* Maxim based on the antioxidant active components. **Methods** The antioxidant active components of the extract was prepared by mixing the five monomer compounds of rutin, luteolin, apigenin, isoquercetin and kaempferol at the mass ratio of 1:2:1:2:3. The standard curve was established by Ultraviolet-visible spectrophotometry, with antioxidant active components and the content of total flavonoids in the extract determined. **Results** The linear equation of antioxidant active components was $A=0.2324C-0.0107$, $r=0.9995$, the linear relationship was good in the range of 0.18~1.45 $\mu\text{g/mL}$, and the methodological verification met the requirements. The content of total flavonoids in the extract determined based on antioxidant active components was 0.0022% (RSD=0.05%), which was different from the content of total flavonoids in the extract of *Trichosanthes kirilowii* Maxim determined by standard curve established by using rutin and other single reference substances. And such difference is statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** The method for determining the content of total flavonoids in the extract of *Trichosanthes kirilowii* Maxim based on antioxidant active components is reliable and stable, and can more truly reflect the content of total flavonoids in this extract.

Key words: antioxidant active components; extract of *Trichosanthes kirilowii* Maxim; total flavonoids

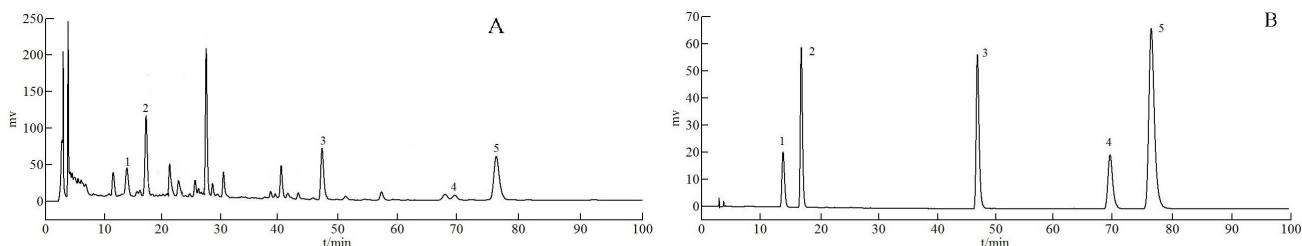
基金项目:2021年皖南医学院大学生科研资助项目(WK2021XS42)

第一作者简介:孙明雪(1996-),女,在读硕士研究生,研究方向:天然药物药理学,E-mail:904459959@qq.com

通讯作者简介:鄢海燕(1968-),女,教授,硕士研究生导师,研究方向:药物制剂及其质量标准研究,E-mail:phy0801@126.com

瓜蒌为葫芦科植物栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim.)或双边栝楼(*T. rosthornii* Harm)的干燥成熟果实,其种子和果皮分别作为瓜蒌子和瓜蒌皮入药^[1],黄酮类化合物是瓜蒌的主要化学成分之一^[2]。有研究报道^[3-5]黄酮类化合物具有保护胃黏膜、抗实验性胃溃疡等作用。有研究表明瓜蒌提取物(trichosanthes extract, TE)具有抗胃溃疡的作用^[6-8],而黄酮类化合物^[9-10]可能是 TE 抗胃溃疡的活性成分^[11]。课题组前期采用高效液相色谱法对 TE 的化学指纹图谱及 TE 中所含的芦丁(黄酮醇类)、木犀草素(黄酮醇类)、芹菜素(黄酮类)、异槲皮苷(黄酮醇类)和山奈酚(黄酮醇类)5 种成分进行研究,结果表明 TE 中芦丁:木犀

草素:芹菜素:异槲皮苷:山奈酚为 1:2:1:2:3 (质量比,以下简称芦丁等混合对照品),见图 1。并进一步考察了 TE 和芦丁等混合对照品的抗氧化活性^[12-13],通过谱效关系确定了 TE 抗氧化药效成分群。目前,有关总黄酮的含量测定,现有方法为选择某一单一对照品建立标准曲线并进行定量分析,由于单一对照品较难反映中药或中药提取物的药效,因此采用单一对照品测定总黄酮的含量与实际药效间缺少关联。为此,本文基于抗氧化药效成分群采用紫外-可见分光光度法测定 TE 总黄酮含量,以期总黄酮的含量测定提供一个新思路。



1. 芦丁;2. 异槲皮苷;3. 木犀草素;4. 芹菜素;5. 山奈酚。

图 1 TE(A)及混合对照品(B)HPLC 图

1 实验材料

1.1 实验仪器 UV5100 型紫外-可见分光光度计(日本日立公司);AUW-220D 型电子天平(日本岛津公司);Heidolph-LR4010/4011 旋转蒸发仪(德国海道尔夫公司);pHS-3C 型 pH 计(上海越平科学仪器有限公司)。

1.2 实验试剂 瓜蒌皮(批号:20171202)、瓜蒌子(批号:20201020)均购自河北安国御颜坊中药材有限公司;三氯化铝(批号:20150604,山东西亚化学工业有限公司);芦丁(批号:141208)、异槲皮苷(批号:140404)、山奈酚(批号:150929)(纯度 $\geq 98.0\%$)均购自成都普菲德公司;木犀草素(批号:MO2-140513)、芹菜素(批号:QO2-140512)(纯度 $\geq 98.0\%$)均购自中药固体制剂制造技术国家工程研究中心;其余试剂为分析纯;水为纯化水(自制)。

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 取三氯化铝 1.3335 g,精密称定,用 5 mL 水溶解并用无水乙醇定容至 100 mL 量瓶中,即得。

2.1.2 乙酸钠-乙酸缓冲液的配制 取乙酸钠 5.0012 g,精密称定,溶于 10 mL 水中,制得乙酸钠溶液,备用。精密量取 5 mL 冰乙酸于 50 mL 量瓶中,用水定容至刻度,制得 10%的冰乙酸,备用。用 10%冰乙酸

溶液滴定乙酸钠溶液,分别配制 pH = 4.50、pH = 5.00、pH = 5.50、pH = 6.00 和 pH = 6.50 的缓冲液,即得。

2.1.3 抗氧化药效成分群溶液 取芦丁 10.5 mg、木犀草素 10.4 mg、芹菜素 10.4 mg、异槲皮苷 10.6 mg、山奈酚 10.5 mg,精密称定,分别置于 50 mL 量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,分别制成浓度为 0.210 mg/mL、0.208 mg/mL、0.208 mg/mL、0.212 mg/mL、0.210 mg/mL 的芦丁、木犀草素、芹菜素、异槲皮苷、山奈酚混合对照品储备液;按芦丁等混合对照品的质量比,分别精密量取芦丁、木犀草素、芹菜素、异槲皮苷、山奈酚对照品储备液适量至 10 mL 量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,制得浓度为 36.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品(每 mL 含芦丁、木犀草素、芹菜素、异槲皮苷、山奈酚对照品的质量合计为 36.21 μg)稀释液,即抗氧化药效成分群溶液。

2.1.4 TE 的制备^[14] 参照课题组前期提取工艺,取瓜蒌(瓜蒌皮:瓜蒌子=2:3),精密称定,以 70%乙醇为提取溶剂,料液比为 1:10(g/mL),超声提取(功率 200 W,超声频率 40 Hz),提取温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,提取次数为 3 次,提取时间为 60 分钟/次,所得滤液合并后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 12 h,滤除沉淀并回收溶剂制备浸膏。所得浸膏冷冻干燥 48 h,得 TE 冻干粉。

2.1.5 TE 样品溶液 取 TE 冻干粉 10.0000 g,精密

称定,用20 mL蒸馏水溶解,等量乙酸乙酯超声萃取3次,每次20 min,合并乙酸乙酯层并回收溶剂,残渣用无水乙醇定容至50 mL量瓶,备用。

2.2 总黄酮含量测定方法的建立

2.2.1 检测波长的确定和乙酸缓冲液 pH 值的考察

取适量的“2.1.3”项下抗氧化药效成分群溶液及“2.1.5”项下 TE 样品溶液,分别以无水乙醇为参比,扫描抗氧化药效成分群溶液和 TE 溶液显色前的光谱图;取 20 μL 的抗氧化药效成分群溶液和 2 mL TE 溶液,分别加入 0.1 mol/L 三氯化铝溶液和不同 pH 下 (pH=4.50、5.00、5.50、6.00、6.50) 的乙酸钠-乙酸缓冲液 (V:V:V=1:2:1),室温显色 30 min,以同法处理的无水乙醇、0.1 mol/L 三氯化铝溶液和乙酸钠-乙酸缓冲液为参比,扫描抗氧化药效成分群溶液和 TE 溶液显色后的光谱图。比较抗氧化药效成分群溶液和 TE 溶液显色前、后的光谱图及抗氧化药效成分群溶液和 TE 溶液在不同 pH 下显色 30 min 和 1 h 的光谱图,确定乙酸缓冲液的最佳 pH 值和样品的检测波长。

2.2.2 标准曲线的建立 精密量取“2.1.3”项下的抗氧化药效成分群溶液 (36.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0.05 mL、0.10 mL、0.15 mL、0.20 mL、0.25 mL、0.30 mL、0.35 mL、0.40 mL 各两份,分别置于 10 mL 量瓶中。其中一份用无水乙醇定容至刻度,以无水乙醇为参比,在 420 nm 测定吸光度,记为 A1;另一份按“2.2.1”项下显色方法 (pH=5.3,显色 30 min) 处理并在 420 nm 处测定吸光度 A2;计算相同浓度抗氧化药效成分群溶液组的 ΔA 值 ($\Delta A = A_2 - A_1$)。以抗氧化药效成分群溶液的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标,以 ΔA 为纵坐标,采用最小二乘法建立标准曲线。参照抗氧化药效成分群溶液标准曲线的建立方法,建立芦丁等 5 个单独对照品的标准曲线,确定其相关系数和线性范围。

2.2.3 方法学验证

2.2.3.1 精密性试验 精密量取“2.1.5”项下 TE (批号:20210402) 样品溶液 1 mL 于 10 mL 的量瓶中,按“2.2.2”项下方法处理,平行测定 5 次,记录 ΔA 值。

2.2.3.2 重复性试验 取 TE (批号:20210402),按

“2.1.5”项下 TE 样品溶液方法制备溶液 5 份,按“2.2.2”项下方法处理,记录 ΔA 值。

2.2.3.3 稳定性试验 精密量取“2.1.5”项下 TE (批号:20210402) 样品溶液 1 mL 同一样品溶液于 10 mL 的量瓶中,按“2.2.2”项下方法处理,分别于 0 min、15 min、30 min、45 min、60 min 测定,记录 ΔA 值。

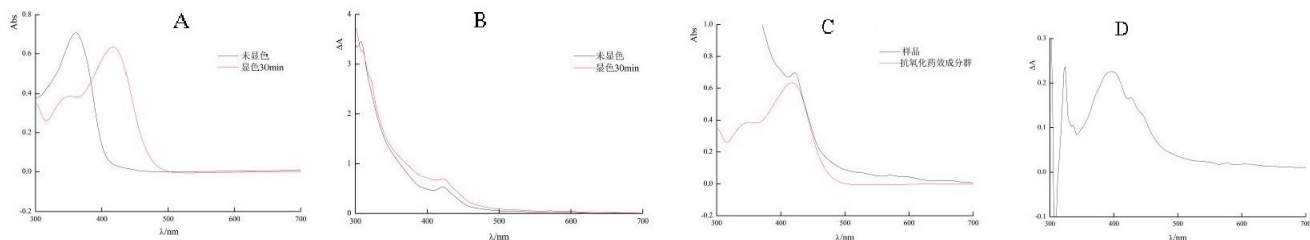
2.2.3.4 加样回收试验 精密吸取 1.0 mL 的已知总黄酮含量的 TE (批号:20210402) 样品溶液 9 份,分别精密量取适量的抗氧化药效成分群溶液置于样品溶液中 (抗氧化药效成分群质量分别为所取样品溶液中总黄酮质量的 80%、100% 和 120%,各 3 份),按“2.2.2”项下方法处理,平行测定 3 次,记录 ΔA 值,计算样品加样回收率。

2.3 TE 总黄酮的含量测定^[9,15] 取 TE (批号:20210402、20210403、20210405),按“2.1.5”项下方法制备 TE 样品溶液。精密量取 1.0 mL TE 样品溶液,置于 10 mL 量瓶中,按“2.2.2”项下方法处理,计算 TE 样品溶液 ΔA 值 ($\Delta A = A_2 - A_1$),采用抗氧化药效成分群标准曲线和芦丁等 5 个单独对照品的标准曲线,分别测定 TE 中总黄酮的含量。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

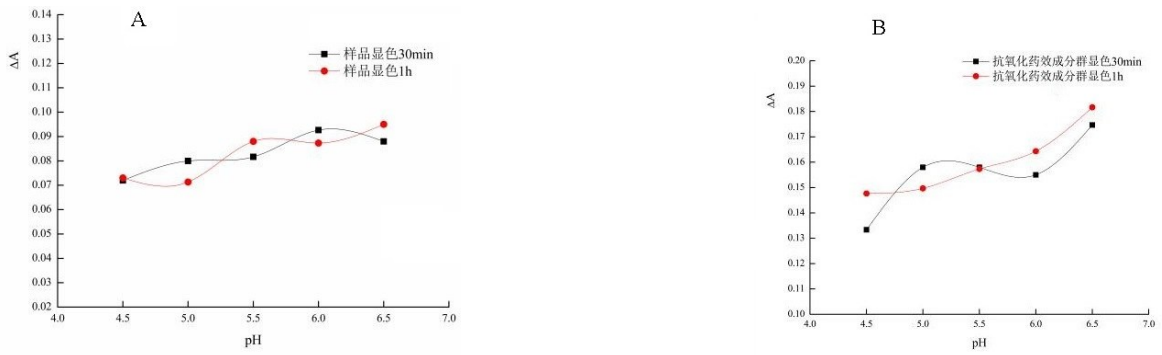
3 结果

3.1 检测波长的确定及缓冲液 pH 值的考察结果分析 按“2.2.1”项下方法,在不同 pH 值乙酸缓冲液下,通过扫描抗氧化药效成分群溶液和 TE 溶液在 300~700 nm 处的紫外-可见光谱图,发现抗氧化药效成分群和 TE 溶液显色后均在 420 nm 处存在最大吸收峰,故可确定测定波长为 420 nm。但 TE 显色前在 420 nm 波长也有吸收,因此不能采用紫外-可见分光光度法直接测定 TE 显色后的吸光度来计算总黄酮的含量^[14]。可采用差示分光光度法于 420 nm 波长处测定 TE 中的总黄酮含量,见图 2。同时研究还发现,TE 和抗氧化药效成分群显色前后的吸光度差值随 pH 值的增大而增大,见图 3。



A: 抗氧化药效成分群显色前后光谱图; B: TE 显色前后光谱图;
C: 样品和抗氧化药效成分群显色后光谱图; D: TE 差示光谱图。

图2 抗氧化药效成分群溶液和 TE 显色前后光谱图及差示光谱图



A: TE 在不同 pH 值下显色 30 min 和 1 h 的光谱图; B: 抗氧化药效成分群在不同 pH 值下显色 30 min 和 1 h 的光谱图。

图 3 TE 和抗氧化药效成分群在不同 pH 值下显色 30 min 和 1 h 的光谱图

由图 3 可知, TE 显色后放置 30 min 和 1 h 的曲线在 $\text{pH}=5.3$ 处有交点, 即 ΔA 值是相等的, 可消除放置时间波动对测定结果的影响; 同时在 $\text{pH}=5.3 \pm 0.2$ 范围内, 显色后放置 30 min 时, TE 和抗氧化药效成分群的 ΔA 值近似为一平行于横坐标的直线, 即在 $\text{pH}=5.3 \pm 0.2$ 范围, ΔA 值基本不变, 可消除因 pH 波动对测定结果的影响, 故选择 $\text{pH}=5.3$ 的乙酸缓冲液来控制显色后溶液的 pH。

3.2 标准曲线的确定结果分析 按“2.2.2”项下方法, 以 ΔA 为纵坐标, 抗氧化药效成分群溶液稀释液的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标建立标准曲线, 回归方程为 $\Delta A=0.2324C-0.0107$, $r=0.9995$, 结果表明抗氧化药效成分群在 $0.18 \sim 1.45 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内线性关系良好。

3.3 方法学验证结果

3.3.1 精密度 按“2.2.3.1”项下方法, 5 次测定 ΔA 值的 RSD 值为 0.3%, 表明方法精密度良好。

3.3.2 重复性 按“2.2.3.2”项下方法, 5 份溶液测定 ΔA 值的 RSD 值为 3.4%, 表明方法重复性良好。

3.3.3 稳定性 按“2.2.3.3”项下方法, 样品显色后分别放置 0 min、15 min、30 min、45 min、60 min 测定 ΔA 值的 RSD 值为 3.5%, 表明样品在显色后 60 min 内稳定。

3.3.4 回收率 按“2.2.3.4”项下方法, 计算回收率, 结果见表 1。由表 1 可知, 加样回收率试验 9 次测定结果的均值为 97.81%, RSD 为 1.68%, 表明方法准确度较好。

表 1 加样回收率结果

样品 含量/ μg	加样 量/ μg	测得 量/ μg	回收 率/%	$\bar{x}/\%$	RSD/%
5.667	4.53	10.228	100.68		
5.667	4.53	10.013	95.94		
5.667	4.53	10.056	96.89		
5.667	5.67	11.304	99.42		
5.667	5.67	11.218	97.90	97.81	1.68
5.667	5.67	11.175	97.14		
5.667	6.80	12.423	99.35		
5.667	6.80	12.207	96.18		
5.667	6.80	12.250	96.81		

3.4 TE 中总黄酮的含量测定 按“2.2”项下的方法测定 TE 中总黄酮的含量, 并与采用单独对照品(芦丁、木犀草素、芹菜素、异槲皮苷、山奈酚)建立标准曲线测定 TE 中总黄酮的含量结果作比较, 结果见表 2。由表 2 可知, 选择的对照品不同, 计算出的 TE 中总黄酮的含量也不同。与抗氧化药效成分群组相比较, 采用单一对照品如芦丁、木犀草素等测得的 TE 中总黄酮含量均较高且有显著性差异 ($P < 0.01$)。

表 2 不同对照品标准曲线测定的 TE 总黄酮含量测定结果

对照品	标准曲线	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	样品批次	含量/%	均值/%	RSD/%
抗氧化药效成分群	$\Delta A=0.2324C-0.0107$, $r=0.9995$	0.18~1.45	1	0.0023	0.0022	0.05
			2	0.0021		
			3	0.0022		
芦丁	$\Delta A=0.0381C-0.0127$, $r=0.9995$	1~9	1	0.014	0.0137 ^a	0.05
			2	0.013		
			3	0.014		
木犀草素	$\Delta A=0.0692C-0.0094$, $r=0.9990$	1~5	1	0.008	0.0077 ^a	0.08
			2	0.007		
			3	0.008		

表 2(续) 不同对照品标准曲线测定的 TE 总黄酮含量测定结果

对照品	标准曲线	线性范围/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	样品批次	含量/%	均值/%	RSD/%
芹菜素	$\Delta A = 0.0044C + 0.0088, r = 0.9994$	8~72	1	0.102	0.0997 ^a	0.04
			2	0.096		
			3	0.101		
异槲皮苷	$\Delta A = 0.0417C - 0.0223, r = 0.9993$	1~9	1	0.0138	0.0135 ^a	0.03
			2	0.0131		
			3	0.0136		
山奈酚	$\Delta A = 0.0482C - 0.0321, r = 0.9992$	1.4~8	1	0.0127	0.0125 ^a	0.03
			2	0.0121		
			3	0.0126		

注:①因对照品的选择不同,测定的总黄酮含量也不同,表 2 中 TE 的测定浓度均在各标准曲线的线性范围内;②与抗氧化药效成分群组比较,a: $P < 0.01$ 。

4 讨论

有关中药中总黄酮的含量测定,现有文献多以某一单一对照品如芦丁建立标准曲线并进一步计算总黄酮的含量。这种总黄酮含量测定的方法可能存在两个方面的不足:一是单一对照品并不能反映中药的整体生理活性,由此计算出来的总黄酮也不能代表中药的整体活性;二是选取的单一对照品不同,计算出来的总黄酮的含量也不同,如本文中用芦丁作为对照品计算 TE 中总黄酮的含量为 0.0137%,用木犀草素作为对照品计算 TE 中总黄酮的含量为 0.0077%。但无论是用哪种单一对照品,计算出来的总黄酮含量都不能和 TE 的生理活性间进行有效关联。鉴于目前总黄酮含量测定存在的不足,本研究提出了基于抗氧化药效成分群测定瓜蒌提取中的总黄酮含量。通过课题组前期研究结果确认了 TE 中芦丁、木犀草素、芹菜素、异槲皮苷及山奈酚 5 个已知化合物并进行了含量计算,由此确定了 TE 中芦丁等混合对照品的质量比例,通过对 TE 和芦丁等混合对照品高、中、低浓度 DPPH 和 O_2^- 清除能力的测定,综合分析,基本明确芦丁、木犀草素、芹菜素、异槲皮苷及山奈酚 5 种混合对照品为 TE 的抗氧化药效成分群。在此基础上,以芦丁等混合对照品单体化合物按质量比混合制备抗氧化药效成分群并建立标准曲线,计算 TE 中总黄酮含量,所计算的总黄酮含量和抗氧化间密切相关。同时发现,采用抗氧化药效成分群法和采用单一对照品法计算的 TE 总黄酮含量间存在显著差异。其原因为:从抗氧化药效成分群及各单独对照品的标准曲线看,抗氧化药效成分群的标准曲线斜率最大,为 0.2324,其它单独对照品的标准曲线的斜率在 0.0381~0.0692。斜率越大,浓度变化对应 ΔA 变化的灵敏度越高,即单位标准物质代表的总黄酮含量越大,在相同的待测样品 ΔA 下,由抗氧化药效成分群计算出的总黄酮含量就会低。这种基于抗氧化药效成分群测定瓜蒌提取中的总黄酮含量的方法可为其他总黄酮等的计算提供参考与借鉴。后期将进行 TE 和抗氧化药效成分群的药效学研究,为本课题的深入研究提供更多理论依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典·一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:116.
- [2] 和焕香,郭庆梅. 瓜蒌化学成分和药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4808-4820.
- [3] 周臻,李嘉俊. 龙须藤多甲氧基总黄酮对小鼠的急性毒性及抗胃溃疡作用研究[J]. 中草药, 2018, 49(12): 2942-2945.
- [4] 魏娜,谭银丰,魏晴,等. 高良姜不同提取部位对实验性胃溃疡的影响及作用机理研究[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(2): 158-160.
- [5] 安秀峰,索菲娅,卢帅. 孜然总黄酮抗实验性胃溃疡作用及机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(7): 1313-1316.
- [6] Takano T. 栝楼的抗溃疡作用[J]. 国外医药(植物药分册), 1991, 6(3): 133-134.
- [7] 张谈. 加味瓜蒌薤白汤治疗消化性溃疡 62 例临床观察[J]. 江苏中医药, 2007, 39(3): 24-25.
- [8] 杨林. 鲜瓜蒌皮治胃溃疡[J]. 浙江中医杂志, 1995, 30(6): 258.
- [9] 邹纯才,宗倩妮,张文芝,等. 瓜蒌及其蒸制品中总氨基酸、总黄酮和总皂苷的含量比较研究[J]. 大理大学学报, 2018, 3(6): 61-64.
- [10] 宗倩妮,王静,徐启祥,等. 瓜蒌及其炮制品红外光谱分析[J]. 大理大学学报, 2017, 2(2): 24-30.
- [11] 唐响彤,杜正彩,郝二伟,等. 基于栝楼不同药用部位化学成分和性效关系的质量标志物分析[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1617-1627.
- [12] 李卓,袁平川,王国栋,等. 甜叶菊根多糖提取工艺优化及其体外抗氧化活性的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2019, 41(3): 250-254, 267.
- [13] 黄比翼,陈石梅,黄锁义,等. 不同极性溶剂的草果提取物抗氧化活性研究[J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(1): 37-40.
- [14] 胡倩,钱婉菁,邹纯才,等. Box-Behnken 响应面法结合差示分光光度法优化瓜蒌中总黄酮提取工艺[J]. 海南医学院学报, 2021, 27(11): 834-839.
- [15] 鄢海燕,邹纯才. 瓜蒌薤白颗粒中总黄酮的含量测定[J]. 皖南医学院学报, 2012, 31(6): 444-446.

收稿日期: 2022-01-01; 修回日期: 2022-01-19