

分光光度法测定柚皮中黄酮类化合物

钟世安 李维 乔蓉 袁周率

(中南大学化学化工学院 长沙市麓山南路 410083)

摘 要 利用紫外-可见分光光度计扫描, 对比了氯化铝、硝酸铝、氢氧化钾作为显色剂在测定柚皮提取物中黄酮的特征吸收峰, 其中 $Al(NO_3)_3$, KOH 显色法均适合柚皮提取物中黄酮含量的测定, 本文采用 KOH 作为显色剂, 结果表明: 在波长 410nm 处, 以扣除底物空白的方法消除干扰, 测得柚皮苷标准品溶液校准曲线: $y = -0.0015 + 51.964x$, 柚皮苷含量在 0.0028—0.014mg/mL 呈良好线性, $r = 0.99977$, 平均加标回收率 99.43%, $RSD = 2.8\%$ ($n = 5$)。

关键词 柚皮苷, 黄酮, 柚, 分光光度法

中图分类号: 657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2007)04-0597-05

1 引言

柚, 释名: 名条、壶柑、自橙、朱栾, 据《本草纲目》载: 柚具有化痰止咳、清闷等功效。地处江南的湖南江永、广西恭城、广西容县等地, “寒不侵肤, 暑不炼骨”, 山清水秀, 水质极佳, 无环境污染, 是中国长江以南柑桔类水果最适宜生长地带, 自古以来, 以盛产香柚而闻名于九州。

香柚的皮和肉大概比例为 4:6, 当人们在品尝香柚的时候, 大部分的皮被当做垃圾给处理掉, 而柚皮中有丰富的柚皮黄酮(主要为柚皮苷), 果胶, 膳食纤维等^[1], 如能将其充分利用, 不仅减轻环境压力, 还能造福于人类, 现代药理学研究发现, 柚皮黄酮具有多种生理活性: 可调节毛细血管的脆性与渗透性, 保护心脏, 有抗溃疡、解毒、利尿、抗菌、消炎清热等功效, 也是一种高效的天然抗氧化剂, 是一种天然的保健产品^[2]。因此柚皮的深加工将大幅提高果农的收入, 提高柚子的附加值, 减少环境污染等。

常见的柚皮黄酮定性检测有 HClMg 粉或 Zn 粉反应, 硼氢化钠还原, 五氯化锑反应, 醋酸镁和三氯化铝反应, 锆-柠檬酸反应, 三氯化铁反应等^[3]。《中国药典》上有薄层色谱法和高效液相色谱法^[4,5], 但在工业生产中, 采用高效液相色谱, 仪器设备维护困难, 处理样品麻烦等问题, 在线实时检测的时候, 要求设备简单, 方法简便, 材料易得, 本文用 KOH 显色, 尚未见文献报道, 且方法简便、可靠, 对设备要求不高, 对样品处理要求简单, 适合工业化生产中的应用。本文用柚皮苷(4,5-二羟基黄酮-7-鼠李葡萄糖苷)作标准品, 利用二氢黄酮在碱性条件下转化为查尔酮显色的特性, 摸索了不同显色方法, 建立了一种简便、可靠的检测柚皮黄酮含量的方法。

基金项目: 湖南省自然科学基金 06JJ4117

联系人, 电话: (0731)8167588; E-mail: zhongshian@yahoo.com

作者简介: 钟世安(1972—), 男, 长沙市人, 博士, 副教授, 从事天然产物开发与研究工作。

收稿日期: 2007-02-07; 接受日期: 2007-03-14

2 实验部分

2.1 仪器、试剂和样品

2.1.1 仪器

GSY-II 恒温水浴锅(北京医疗设备厂), KDM 型调温电热套(山东鄄城华鲁电热仪器有限公司), UV-V is-756MC 紫外分光光度仪(上海精密科学仪器有限公司), 6SM-4A 型磨浆粉碎机(温岭市牧屿腾飞食品机械厂)。

2.1.2 试剂

柚皮苷($C_{27}H_{32}O_{14}$) (标准品)(中国生物药品检验所), $AlCl_3$, $NaNO_2$, $Al(NO_3)_3$, KOH , $NaOH$, 乙醇(95%) 等均为分析纯。实验用水为自制二次蒸馏水。

2.1.3 样品

香柚(由湖南江永香柚生产基地提供)。

2.2 柚皮提取液的制备

取新鲜的柚皮烘干至恒重, 粉碎, 未过筛, 用热水浸提^[6], 趁热过滤, 收集滤液, 备用。定性检测柚皮黄酮的存在, $HClMg$ 粉反应上升的泡沫呈洋红色, 氯化铝, 硝酸铝与黄酮类化合物生成黄色络合物^[7], 初步确定提取液中柚皮黄酮的存在。

2.3 柚皮苷标准对照液的配制

取干燥后的柚皮苷标准品 0.0114g, 70% 乙醇定容至刻度, 配制浓度为 1.14mg/mL 的柚皮苷标准溶液, 备用。

2.4 测定方法^[8]

(1) 分别取 0.5mL 柚皮苷标准液和 0.5mL 柚皮提取液各 3 份, 一份扫描原液; 一份加显色剂 1% $AlCl_3$ 1mL、10% $NaOH$ 1mL 得黄色溶液, 测定其吸收峰; 再取一份用 $Al(NO_3)_3$ 作为显色剂^[9], 分别取 0.5mL 柚皮苷标准液和 0.5mL 柚皮提取液, 加入 1mL 5% $NaNO_2$ 溶液, 6min 后加入 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液 1mL, 再过 6min 后加入 4% 的 $NaOH$ 溶液 5mL, 再用 70% 乙醇定容至 10mL, 15min 后测定。

(2) 10% KOH 显色, 分别取 0.1mL 柚皮苷标准液和 0.1mL 柚皮提取液, 各加入 10% KOH 1mL, 70% 乙醇定容至 10mL, 显色, 40℃ 水浴, 60min 后测定^[10]。以上配制溶液在 200—500nm 间进行扫描, 绘制特征吸收曲线。

3 结果与讨论

3.1 柚皮黄酮提取液吸收光谱

(1) 图 1 为柚皮苷和提取液的紫外可见光谱扫描图, 由图可知, 未加显色剂的柚皮苷在 280nm, 340nm 均有较高吸收, 柚皮提取液也在此有较大吸收, 但热水提取的柚皮提取液有色素的干扰, 因此, 选用显色剂与扣掉空白的方法测定提取液的含量。

(2) 用低浓度 $AlCl_3$ 显色, 见图 2 柚皮苷和柚皮提取液的显色, 吸收峰不明显, 不适合作为柚皮苷的含量测定。

(3) $Al(NO_3)_3$ 显色, 见图 3, 加硝酸铝显色后的柚皮苷和柚皮提取物在 360nm 处有明显的吸收峰, 且与柚皮苷和提取液自身的吸收在 360nm 处很小, 显色后柚皮苷和柚皮提取液峰形基本一

致,由此可见,A1(NO₃)₃显色法可以作为柚皮黄酮(柚皮苷)的检测方法。

(4) 10% KOH 显色^[10],见图 4,氢氧化钾与柚皮苷及柚皮提取液在 410nm 处较明显的吸收,为显色后吸收峰,故取 410nm 作为测定波长。氢氧化钾作为显色剂时,显色在 60min 后趋于稳定。

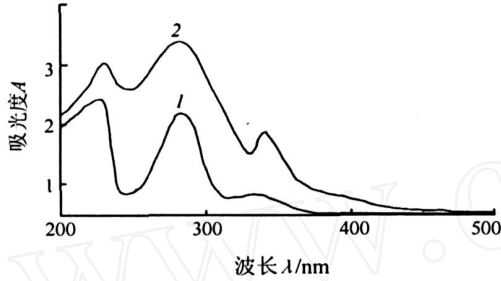


图 1 柚皮苷和柚皮提取液紫外吸收图
1——柚皮苷标准品原液; 2——样品原液。

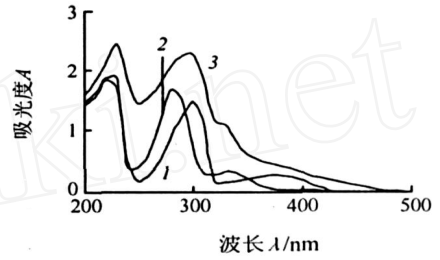


图 2 氯化铝显色柚皮苷和柚皮提取液的紫外吸收图
1——柚皮苷标准品原液; 2——样品液+ 显色剂;
3——柚皮苷标准液+ 显色剂。

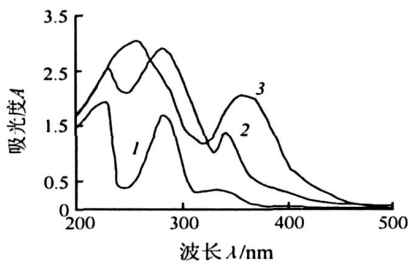


图 3 硝酸铝显色法的柚皮苷和柚皮提取液紫外吸收图
1——柚皮苷标准品原; 2——柚皮苷+ 显色剂;
3——样品液+ 显色剂。

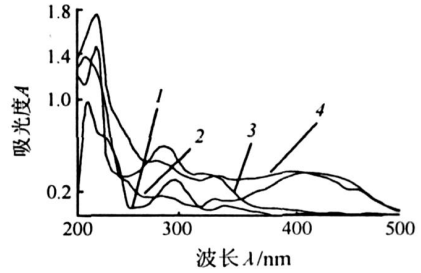


图 4 氢氧化钾显色的柚皮苷和柚皮提取液紫外吸收图
1——柚皮苷标准品原液; 2——柚皮苷+ 显色剂;
3——样品原液; 4——样品液+ 显色剂。

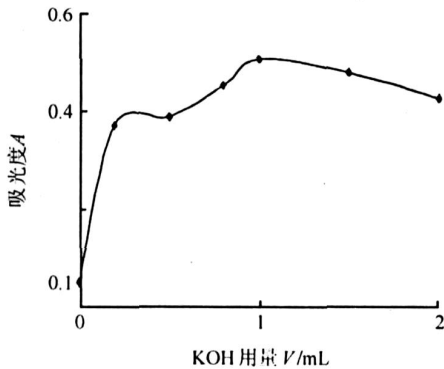


图 5 KOH 用量的确定

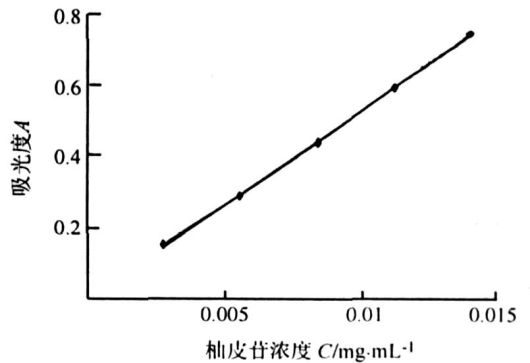


图 6 KOH 显色校准曲线

图 5 中可见,显色剂用量在 1.0mL 之后,吸光度值呈下降趋势,可能是在空气中强碱性条件下,黄酮类化合物很易被氧化,随着时间的延长吸光度下降严重,引起的不稳定现象,因此,显色剂用量选择用 1.0mL。

3.2 KOH 显色方法的建立

3.2.1 校准曲线及线性范围

在 2.4(2) 方法中, 柚皮苷标准液与 KOH 显色, 建立其校准曲线见表 1。

表 1 柚皮苷标准液与 KOH 显色校准曲线及线性范围

样品	线性范围	回归方程	相关系数
水提液	0.0028—0.014 mg/mL	$y = -0.0015 + 51.9643x$	0.9998

3.2.2 方法的精密度

在 2.4(2) 方法条件下, 在同一对照品溶液平行测定 5 次, 测得吸光度的 RSD 为 2.8% ($n=5$)。

3.2.3 方法的回收率

取样品溶液 0.05、0.1、0.2 mL, 以浓度高中低 3 个水平分别加入标准品溶液, 再加入 1.0 mL 10% 的 KOH, 以不加显色剂的溶液为空白, 70% 乙醇稀释到 10 mL, 平行样品 5 个, 40 °C 水浴, 60 min 后测定。

3.2.4 加标回收试验结果

见表 2。

表 2 加标回收实验

样品液	原测定值 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
1	0.00438	0.0112	0.01524	97	2.8
2	0.00875	0.0223	0.03108	100.1	
3	0.01750	0.0446	0.06264	101.2	

3.2.5 实际样品的测定

结果见表 3。

1 为料液比 1:20, 乙醇超声 30 min 提取液, 2 为料液比 1:20, 100 °C 水浴浸提 4 h 提取液。

表 3 实际样品测定

样品	测定值 (w/%)	平均值 (w/%)	RSD (%)
1	2.25 2.33 2.38	2.32	3.25
2	1.78 1.85 1.76	1.80	2.64

4 结论

本文采用氢氧化钾显色法测定试样的柚皮黄酮(柚皮苷)的含量, 该显色法方便, 可靠, 以柚皮苷标准品为对照品得校准曲线: $y = -0.0015 + 51.964x$, 柚皮苷含量在 0.0028—0.014 mg/mL 呈良好线性, $r = 0.9998$, $P < 0.0001$, 平均加标回收率是 99.43%, $RSD = 2.8%$ ($n=5$)。适合应用在工业生产中检测提取液的浓度。

参考文献

- [1] 贾冬英, 姚开, 谭敏等. 柚果皮中生理活性成分研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(11): 74—78
- [2] Rajadurai M, Stanely P, Prince M. Preventive Effect of Naringin on Lipid Peroxides and Antioxidants in Isoproterenol-Induced Cardio-toxicity in Wistar rats: Biochemical and Histopathological Evidences[J]. Toxicology, 2006, 228(2—3): 259—268
- [3] 中国科学院上海药物研究所植物化学研究室. 黄酮体化合物鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- [4] 卫生部药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [5] 董朝青, 钟世安, 周春山. 反相高效液相色谱法同时测定柚皮中柚皮苷和橙皮苷的含量[J]. 理化检验(化学分册), 2005, 41(1):

44—46

- [6] 刘湘, 汪秋安. 天然产物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [7] 张志红, 黄毅. 银杏叶提取物中黄酮类化合物的分光光度分析研究[J]. 分析试验室, 2005, 24(6): 17—19.
- [8] 田金河, 曾庆孝, 杨程芳. 不同显色方法测定绿豆壳中黄酮含量的比较研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2003, 11: 60—62.
- [9] 杨小凤, 朱一力, 戴歌心. 瓯柑果皮中总黄酮的提取及含量的测定[J]. 光谱实验室, 2006, 23(4): 810—814.
- [10] 伍蔚萍, 孙文基, 阎宏涛等. 分光光度法测定甘草中总黄酮的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 469—472.

Detem nation of Naringin Extracted from Pomelo Peel by UV-V is Spectrophotometry

ZHONG ShiAn LIWei QIAO Rong YUAN ZhouLv

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, P. R. China)

Abstract The developers were selected from AlCl_3 , $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, and KOH , and compared with standard substance of naringin. The flavonoids extracted from pomelo peel was developed with KOH and detemined by Ultraviolet-V is spectrophotometry at 410nm. The substrate disturbance was eliminated by deduction of blank solution. The standard curve is $y = -0.0015 + 51.964x$ in the concentration range of 0.0028—0.014mg/mL, $r = 0.99977$, the average recovery of the standard substance is 99.43%, $\text{RSD} = 2.8\%$ ($n = 5$).

Key words Naringin, Flavonoid, Pomelo, UV-V is Spectrophotometry.

封四: “保质、高效——《光谱实验室》主要特色”的附件 3

不当挂名院士

1922年2月23日,苏联社会主义社会科学院主席团给列宁发了一个通知书,说1922年2月5日列宁被选为研究院院士。列宁看了这个通知书,并在下面写了复函,还注明:“誊在公文纸上,交我签字。”

列宁复函写道:“非常感谢,遗憾的是,我因病根本无法履行社会主义研究院院士的哪怕最微小的职责。挂名的院士,我不想当。因此,请把我从院士名单中勾掉或不要列入名单。”

列宁的复函,言简意赅,发人深思。列宁具有渊博的知识,授予院士头衔是当之无愧的,可是,列宁不这样看。他考虑到自己无法履行院士的职责,便毅然拒绝当挂名院士。

不当挂名院士,只是一件小事,但是,列宁这种革命责任心和谦虚谨慎的科学态度,实在令人敬佩。

(原载 1981年1月17日《北京晚报》,作者:郭熙)

本刊主编点评:我也曾请卢嘉锡先生任《光谱实验室》主编,但卢先生谢绝了。他说,请我任主编,抬举我,表示感谢。但是我年老多病,体弱事多,又不是学光谱专业的,别人当面不说什么,但背后是有议论的,也会说你拉大旗作虎皮,对刊物不利。