

瓯柑果皮中总黄酮的提取及含量的测定^①

杨小凤^② 朱一力^③ 戴歌心^③

(温州医学院药学院化学教研室 浙江省温州市 325035)

摘 要 为了进一步开发利用瓯柑的资源,研究了瓯柑果皮中总黄酮的提取条件及含量测定。结果表明,总黄酮提取的最佳条件是:用80%乙醇在60℃下超声波提取1h、固液比为1:18、提取3次。瓯柑果皮中总黄酮的含量为2.143%,平均回收率为99.80%,RSD=0.88%(n=6)。此结果为瓯柑药效功能的进一步研究和资源开发利用提供科学依据。

关键词 瓯柑,总黄酮,提取,分光光度法。

中图分类号:O657.32

文献标识码:B

文章编号:1004-8138(2006)04-0810-05

1 前言

瓯柑 *Citrus Suavissima Hort. et Tanaka* 是芸香科柑桔属的一个栽培变种,是浙江温州的传统特产,为浙南佳果之一。瓯柑果皮黄色,清甜汁多,略带苦味,营养价值较高,并具有祛热生津,化痰止咳,清凉解毒等功效。唐代以来曾列为贡品,成为温州最具代表性的水果。在温州民间素有“端午瓯柑似羚羊”之说,并广泛流传瓯柑可退烧、治咽喉炎、头痛等热性疾病。目前,瓯柑的肉汁供食用和食品工业外,果皮一般遗弃成为污染环境的废物。我们在对瓯柑的研究中发现:皮中的微量元素含量普遍高于果肉中的微量元素的含量^[1],为了有效利用废弃的瓯柑果皮和搞清瓯柑药效的物质基础,为瓯柑综合开发利用提供科学依据,我们对瓯柑果皮中总黄酮的提取条件及含量测定进行研究。

2 实验部分

2.1 仪器

UV-7502PC 紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);BS110S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);KQ-250DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);回流装置。

2.2 试剂

芦丁(中国药品生物制品检定所);其他试剂均为分析纯(上海试剂一厂);实验用水为二次蒸馏水。

2.3 样品

瓯柑于2005年3月购于温州茶山丁岙,由温州师范学院生物与环境科学系陈贤兴高级实验师鉴定,取皮、晒干、粉碎。准确称取样品,以1:20(g:mL)固液比加入石油醚,回流1h进行脱色脱脂处理,过滤,将滤渣中石油醚挥发干,备用。

① 温州市科技局科研基金项目,编号:Y2004A020

② 联系人,电话:(0577)86689984;E-mail: yangxiaofeng1965@yahoo.com.cn

③ 2005届本科毕业生

作者简介:杨小凤(1965—),女,浙江省平阳县人,副教授,主要从事天然产物化学与生物电分析的研究工作。

收稿日期:2006-03-16;接受日期:2006-04-10

3 结果与讨论

3.1 最佳提取条件的选择

3.1.1 提取方法的选择

准确称取处理过的样品4.0g, 加入80mL 70%乙醇溶液, 分别用回流提取, 索氏提取, 超声波提取等方法提取1h, 过滤, 滤液定容至100.00mL, 得供试品。再按3.2.6项操作, 分别测定总黄酮的含量。结果表明, 超声波提取总黄酮含量最高, 索氏提取总黄酮含量最低, 且超声波提取设备简易, 易操作和便于控制。因此, 本实验选择超声提取方法。

3.1.2 提取溶剂的选择

分别用乙醇、甲醇、丙酮、水作提取溶剂, 进行超声波提取, 按3.1.1项操作得供试品并测定总黄酮的含量。结果表明, 甲醇提取效果最佳, 乙醇次之, 丙酮最差。综合考虑毒性和提取效率, 本实验选择乙醇作提取溶剂。

3.1.3 提取温度的选择

用乙醇作提取溶剂, 分别在30、40、50、60、70、80℃等进行超声波提取, 按3.1.1项操作得供试品并测定总黄酮的含量, 结果见图1。结果表明, 温度在30—70℃总黄酮含量随着温度的升高显著增加, 当温度大于70℃时, 总黄酮含量又下降, 这是由于温度越高, 分子运动越剧烈, 渗透、扩散、溶解速度加快, 使黄酮类化合物容易转移到溶剂中, 因此, 随着温度的升高, 总黄酮提取率越高; 但温度过高可能引起黄酮类化合物结构被氧化破坏导致总黄酮提取效率下降。故为了使总黄酮有较高的提取效率, 并且保证活性成分不被破坏, 本实验选择60℃作为提取温度。

3.1.4 正交设计优化提取条件^[2]

按 $L_9(3^4)$ 正交设计表对提取的4个因素和3个水平进行试验, 各因素和水平见表1, 分析结果见表2。表2的分析结果表明, 影响超声波提取瓯

柑果皮中总黄酮的主次因素为 $D-A-C-B$ (因 $R_4R_1R_3R_2$), 即提取次数, 乙醇浓度, 固液比, 提取时间。最佳的提取条件组合为 $A_3B_2C_3D_3$ (据最大 K 值), 即80%乙醇在60℃下超声波提取1.0h、固液比1:18、提取3次。

表 1 考察的因素及水平

因素水平	乙醇浓度(%)	提取时间(h)	固液比(g:mL)	提取次数(次)
	A	B	C	D
1	60	0.5	1:14	1
2	70	1.0	1:16	2
3	80	1.5	1:18	3

表 2 试验方案及分析结果

序号	A	B	C	D	吸光度(A)	总黄酮含量(%)
1	1(60)	1(0.5)	1(1:14)	1(1)	0.409	1.745
2	1(60)	2(1.0)	2(1:16)	2(2)	0.286	1.803
3	1(60)	3(1.5)	3(1:18)	3(3)	0.391	2.090
4	2(70)	1(0.5)	2(1:16)	3(3)	0.312	2.050
5	2(70)	2(1.0)	3(1:18)	1(1)	0.436	1.958
6	2(70)	3(1.5)	1(1:14)	2(2)	0.494	1.890
7	3(80)	1(0.5)	3(1:18)	2(2)	0.360	1.960
8	3(80)	2(1.0)	1(1:14)	3(3)	0.440	2.035
9	3(80)	3(1.5)	2(1:16)	1(1)	0.429	1.995
K_1	5.638	5.755	5.670	5.698		
K_2	5.898	6.066	5.848	5.653		
K_3	5.990	5.975	6.008	6.175		
$\overline{K_1}$	1.879	1.918	1.890	1.899		
$\overline{K_2}$	1.966	2.022	1.949	1.884		
$\overline{K_3}$	1.997	1.992	2.003	2.058		
R	0.118	0.104	0.113	0.174		

3. 2 总黄酮含量测定^[3]

3. 2. 1 供试品溶液的制备

按正交试验得到的最佳提取方案, 准确称取经脱色脱脂处理过的样品 4. 0g(相当于原试样 5. 0g), 加入72mL 80% 乙醇溶液, 在 60℃ 下超声波提取 1. 0h、提取3 次。过滤, 适当浓缩, 再用80% 乙醇定容至 100mL 容量瓶中, 备用。

3. 2. 2 标准品溶液的制备

准确称取芦丁标准品 26. 4mg 于小烧杯中, 加少量 80% 乙醇, 超声溶解后, 定容至 100mL 容量瓶中, 摇匀, 得芦丁标准溶液, 浓度为 26. 4mg/ 100mL。

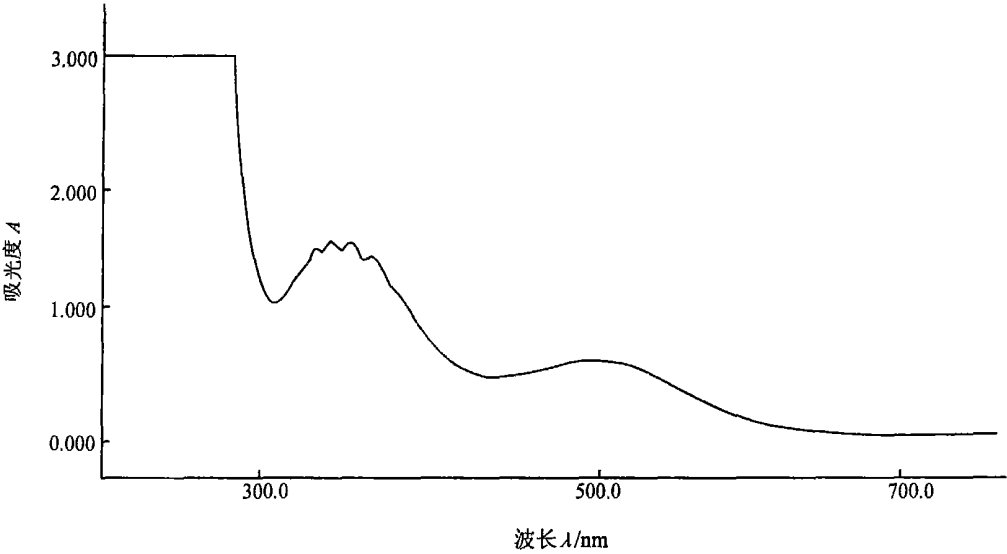


图 1 芦丁标准品的吸收曲线

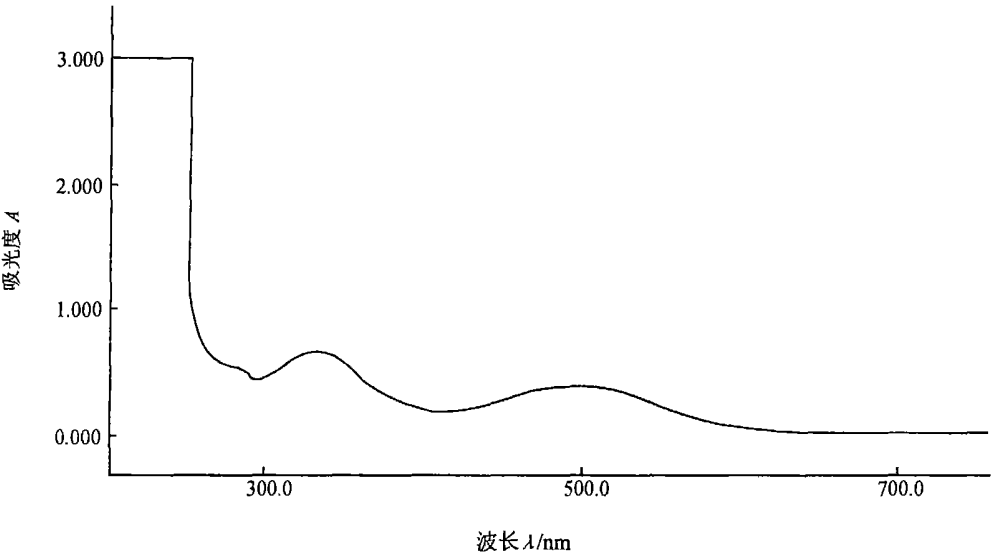


图 2 脐柑果皮的吸收曲线

3. 2. 3 测定波长的选择

分别精密量取芦丁标准溶液及供试品溶液0. 5mL 于10mL 刻度试管中, 用水稀释至4. 0mL, 各加入5%的亚硝酸钠溶液0. 4mL, 摇匀, 放置6min, 加10%的硝酸铝溶液0. 4mL, 摇匀, 放置6min 后, 加4%的氢氧化钠溶液4mL, 最后用水稀释至刻度, 摇匀, 放置15min。按波长扫描的操作方法分别对芦丁标准品及供试品进行波长扫描, 波长范围为 200—700nm, 扫描结果见图 1, 图 2。二者均在 500nm 处有最大吸收峰, 故选择 500nm 为测定波长。

3. 2. 4 校准曲线的制备

准确量取芦丁标准溶液0. 0、0. 4、0. 8、1. 2、1. 6、2. 0、2. 4、2. 8、3. 0mL 分别置于10mL 刻度试管中, 均用水稀释至 4. 0mL, 按 3. 2. 3 项操作, 配制各溶液。以 0 号试剂空白作参比, 在500nm 处分别测定吸收值(A), 以吸收值A 为纵坐标, 浓度C 为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $A = 0. 1167C - 0. 0144$, $r = 0. 9998$ ($n = 8$)。结果表明芦丁含量在 1. 056—7. 920mg/ 100mL 范围内与吸收值线性关系良好。

3. 2. 5 稳定性试验

准确量取芦丁标准溶液2. 0mL, 其余操作按 3. 2. 3 项操作, 配制溶液, 以试剂空白作参比, 在 500nm 处测定吸收值(A), 按时间扫描的操作方法对时间进行扫描, 结果表明在 5min—4h 内吸收值稳定。

表 3 总黄酮含量的测定结果

序号	吸光度 (A)	总黄酮含量 (%)	平均含量 (%)	RSD (%)
1	0. 481	2. 123	2. 143	0. 875
2	0. 479	2. 114		
3	0. 490	2. 161		
4	0. 485	2. 140		
5	0. 491	2. 165		
6	0. 488	2. 153		

3. 2. 6 样品测定

准确量取供试品 0. 4mL, 6 份, 按 3. 2. 3 项操作, 配制各溶液。以试样空白作参比, 在 500nm 处测定各吸收值, 并计算含量, 结果见表 3。

表 4 加标回收率

样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
0. 214	0. 132	0. 349	102. 3	99. 80
0. 214	0. 158	0. 371	99. 37	
0. 214	0. 185	0. 395	97. 84	
0. 214	0. 211	0. 426	100. 51	
0. 214	0. 238	0. 450	99. 16	
0. 214	0. 264	0. 477	99. 62	

3. 2. 7 回收率试验

分别准确量取瓯柑果皮供试品 0. 2mL 6 份, 分别加入 26. 4mg/ 100mL 芦丁标准 0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0mL, 按 3. 2. 6 项操作, 测定各吸收值A, 得样品的平均回收率 99. 80%, 结果见表 4。

4 结论

黄酮类化合物具有活血化淤、保肝抗炎、抗菌、抗病毒及泻下、解痉的多种药理作用。因此, 瓯柑果皮总黄酮的有效提取及含量测定, 是了解其药理作用和综合开发利用的重要基础工作。试验结果表明, 总黄酮提取的最佳条件是: 用 80% 乙醇在 60℃ 下超声波提取 1h、固液比为 1 : 18、提取 3 次。瓯柑果皮中总黄酮的含量为 2. 143%, 平均回收率为 99. 80%, RSD = 0. 88% ($n = 6$)。此结果为瓯柑果皮总黄酮的提取方法、药效功能的进一步研究及资源开发利用提供科学依据。

参考文献

- [1] 杨小凤, 仇佩虹, 叶筱琴. 瓯柑中微量元素的测定[J]. 广东微量元素科学, 2004, 11(9): 41—43.
[2] 孙荣恒. 应用数理统计[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 218—227.
[3] 杨小凤, 仇佩虹, 叶筱琴. 马蹄金中黄酮成分分析[J]. 光谱实验室, 2005, 22(6): 1211—1215.

Extraction and Determination of Total Flavone in *Citrus Suavissima Hort. et Tanaka*

YANG Xiao-Feng ZHU Yi-Li DAI Ge-Xin

(Department of Chemistry, Pharmaceutical College of Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325027, P. R. China)

Abstract The flavonoid in *Citrus Suavissima Hort. et Tanaka* was extracted with 80% ethanol at 60°C under supersonic wave for 1.0h in solid-liquid ratio 1:18 for three times, and determined by spectrophotometry as 2.143% with average recovery of 99.80% and the relative standard deviation of 0.88% ($n=6$), which offers a scientific evidence for the further studies of medicinal efficiency and comprehensive utilization of *Citrus Suavissima Hort. et Tanaka*.

Key words *Citrus Suavissima Hort. et Tanaka*, Total Flavonoids, Extraction, Spectrophotometry.

关于赠送作者样刊和发放稿酬的通知

各有关作者:

从2006年第1期起,本刊赠送作者发表自己论文的当期刊物(样刊),均按篇赠送2本样刊,用普通印刷品邮寄给作者联系人,遗失不补。若作者另有需要,请在发表之日起2个月之内汇款购买,逾期不再办理。

给作者发放的稿酬均邮寄给联系人,请各位联系人接到邮局通知后,务必及时到邮局领取。若2个月未领,被邮局退回,本刊不再补发。

特此通知

光谱实验室编辑部

汇款购买地址:北京市81信箱66分箱 刘建林,邮编:100095

关于征收报名费的通知

各有关作者:

从2006年1月1日起,本刊开始征收报名费,即:向本刊投稿的作者,请同时汇寄报名费(10元/篇)。由于款额较小,请作者务必用邮票支付,即将邮票10元/篇装入信封中,邮寄到本刊联络处,地址:北京市81信箱66分箱 刘建林,邮编:100095。

本刊继续免收审理费,但审理后录用又撤稿者,下次投稿时须交审理费。

特此通知

光谱实验室编辑部

2006年1月1日