

光果甘草叶总黄酮测定方法

董 怡, 林恋竹, 赵谋明*

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘 要: 选用4种常用的黄酮显色方法, 通过波长扫描分别确定3种标准对照品(芦丁、槲皮素、甘草苷)及新疆光果甘草叶80%乙醇提取物在各显色方法下的两个吸收波长, 并分别建立标准曲线。按照建立标准曲线的方法测定新疆光果甘草叶80%乙醇提取物中总黄酮含量, 并对各测定方法的精密度、稳定性、重现性及加样回收率进行测定。通过对比实验结果最终确定光果甘草叶总黄酮测定方法为: 以槲皮素为对照品, $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$ 显色法, 检测波长为314nm; 在此条件下, 该方法的精密度、重现性、稳定性及加样回收率的相对标准偏差(RSD)分别为0.92%、2.15%、0.87%和(105.02±1.11)%。

关键词: 光果甘草; 总黄酮; 槲皮素

Determination of Total Flavonoids in Leaves of *Glycyrrhiza glabra* L. by Spectrophotometry

DONG Yi, LIN Lian-zhu, ZHAO Mou-ming*

(College of Light Industry and Food, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Four coloration methods were applied for the determination of total flavonoids in leaves of *Glycyrrhiza glabra* L. from Xinjiang. Two absorption wavelengths were selected in terms of wavelength scanning of 80% ethanol extract from the leaves and standard controls including rutin, quercetin and liquiritin. Standard curves for three standard controls by four coloration methods were established. The accuracy, stability, repeatability and recovery rates of four coloration methods were also determined. The content of total flavonoids were determined using $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$ coloration at 314 nm and quercetin as the control. The RSD for accuracy, stability, repeatability and recovery rate were 0.92%, 0.87%, 2.15% and (105.02 ± 1.11)%, respectively.

Key words: *Glycyrrhiza glabra* L.; total flavonoids; quercetin

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)06-0195-04

甘草(*Glycyrrhiza*)又名美草、国老、甜草, 属被子植物门、双子叶植物纲、豆目、豆科蝶形花亚科、山羊豆族、甘草属, 是一种多年生的草本植物。甘草是一种临床最常用的药品, 研究表明生甘草能解毒清热、润肺止咳、调和诸药性^[1]; 炙甘草能补脾益气。甘草因富含甜味为蔗糖的百倍的甘草甜素而被广泛用作食品甜味剂, 因其富含萜类和黄酮类等多种活性成分^[2-4]而被用于医药、保健品及化妆品行业。

通常所说的甘草是指甘草植株的根或者根状茎, 也是其主要药用部分^[5]; 而甘草的地上部分茎叶一直被当做优质的畜牧饲料来利用^[6]。目前国内外集中于研究甘草根的活性成分的提取、分离纯化及各种生理活性评价, 研究结果表明甘草根中的活性物质主要为以甘草素及异甘草素为主的3萜皂苷类物质, 以及多种黄酮类物质和甘草多糖, 并证实了甘草根中物质具有良好的抗炎、抗肿瘤^[7]、

抗变态、抗菌^[8]、预防病毒性肝炎及抗HIV活性。甘草叶中也含有丰富的黄酮类物质^[1,6], 但国内外对其研究很少。甘草叶总黄酮的分析测定方法还鲜有报道。

目前植物中黄酮测定方法主要为分光光度法和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[9]法, 而甘草黄酮测定一般选用芦丁、槲皮素、甘草苷^[10]或柚皮苷等为标准对照品, 显色方法主要采用直接测定法、KOH显色法、硝酸铝盐显色法、 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$ 显色法^[11]等。国内外研究一般为单独采用一种标准对照品, 或者多种对照品一种显色方法来建立黄酮测定方法, 由于选定的方法或标准对照品的偏一性, 可能会造成真实值与测定值之间的误差。

本实验选用芦丁、槲皮素、甘草苷为标准对照品, 筛选4种显色方法及各自的检测波长, 并以精密度、稳定性、重现性及加样回收率为指标进行方法学验证, 拟确

收稿日期: 2011-12-20

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B011300004); 广东省产学研项目(2010A090200041)

作者简介: 董怡(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: waydongyi2501779@163.com

*通信作者: 赵谋明(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: femmzhao@scut.edu.cn

定出一种简单快速的测定新疆光果甘草叶黄酮的方法,为后续研究提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新疆光果甘草叶,由新疆天山制药工业有限公司巴楚分公司提供,于2011年7月采自新疆喀什区;晒干粉碎过80目筛。

无水乙醇、甲醇、氢氧化钾、氢氧化钠、无水三氯化铝、亚硝酸钠、硝酸铝均为分析纯;芦丁(产品ID44440,编号A0103)、槲皮素(产品ID106507,编号6151-25-3)、甘草苷(产品ID44376,编号A0040)均为色谱纯(纯度 $\geq 98\%$)。北京恒元启天化工技术研究院与北京世纪奥科生物技术有限公司联合研制。

1.2 仪器与设备

AL204型电子天平 瑞士Mettler Toledo公司;DFT-200型手提式高速万能粉碎机 温岭市林大机械有限公司;微型旋涡混合仪 沪西分析仪器厂;KQ5200D超声清洗器 东莞市科桥超声设备有限公司;UV-2000型紫外-可见分光光度计 尤尼科仪器有限公司;紫外-可见分光光度计 日本Shimadzu公司。

1.3 方法

1.3.1 光果甘草叶黄酮提取液的制备

精确称量5g光果甘草叶粉末,加入50mL 80%乙醇溶液,70℃条件超声提取90min,提取功率800W,过滤、收集滤液,80%乙醇溶液补足50mL;准确吸取1mL提取原液,80%乙醇溶液稀释20倍备用。

1.3.2 显色方法

直接测定法:准确吸取样品稀释液0.25mL,以80%乙醇溶液定容至5mL,充分混匀后,静置稳定5min后测定吸光度; $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{O}$ 显色法^[12]:准确吸取样品稀释液0.25mL,以0.01mol/L三氯化铝甲醇溶液定容至5mL,充分混匀后,静置显色10min后测定吸光度;KOH显色法^[10]:准确吸取样品稀释液0.25mL,加入80%乙醇溶液1mL,10%氢氧化钾溶液0.25mL,充分混匀,静置显色5min后以80%乙醇溶液定容至5mL,测定吸光度; $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色法^[13]:准确吸取样品稀释液0.25mL,加入蒸馏水1.25mL,混匀后加入5%亚硝酸钠溶液0.25mL,混匀,反应6min后加入10%硝酸铝溶液0.25mL,混匀,6min后加入5%氢氧化钠溶液1.25mL,混匀静置显色15min后以蒸馏水定容至5mL,测定其吸光度。

1.3.3 最大吸收波长确定

将样品稀释液和标准对照品分别按1.3.2节中4种显色方法显色后,分别在200~800nm条件进行扫描,根据扫描图谱,每种方法分别在合适的波长范围内确定两个待测吸收波长。

1.3.4 标准曲线的建立

按照1.3.2节显色方法,分别以建立3种对照品在4种显色方法下的标准曲线。

1.3.5 显色方法精密度测定

准确吸取将样品稀释液5份,按照4种显色方法显色,并在各显色方法选定的吸收波长处测定样品显色后的吸光度,计算各显色方法测定结果的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值。

1.3.6 显色方法重复性测定

准确称取5g光果甘草叶粉末5份,按照1.3.1节方法制备样品液。分别按4种显色方法对5份样品液进行显色,并在各显色方法选定的吸收波长下测定样品显色后的吸光度,计算各显色方法测定结果的RSD值。

1.3.7 显色方法稳定性测定

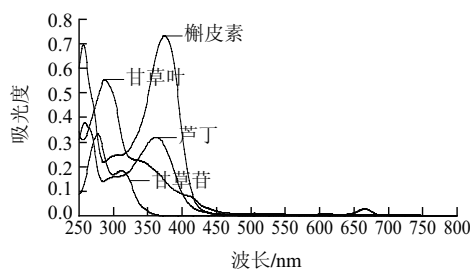
准确吸取将样品稀释液,按照4种显色方法显色,并在各显色方法选定的吸收波长下测定样品显色后的吸光度,每隔1h测定1次,共测定5次,计算各显色方法测定结果的RSD值,实验重复3次。

1.3.8 显色方法加样回收率测定

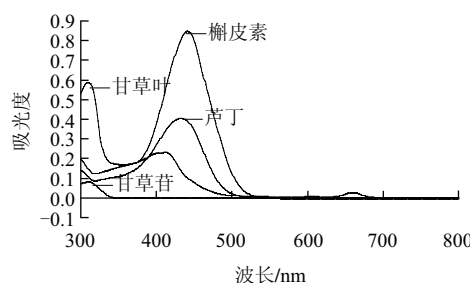
分别以80%乙醇溶液配制0.2mg/mL芦丁、0.2mg/mL槲皮素和0.1mg/mL甘草苷溶液,并测定各显色方法的加样回收率。以0.15mL样品稀释液加0.1mL对照品代替1.3.2节中0.25mL样品稀释液,按照4种显色方法显色,并在各显色方法选定的吸收波长下测定样品显色后的吸光度,计算各显色方法测定结果的加样回收率。

2 结果与分析

2.1 光果甘草叶黄酮提取液及标准对照品不同显色方法下最大吸收波长的确定



A. 直接测定法



B. $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{O}$ 法

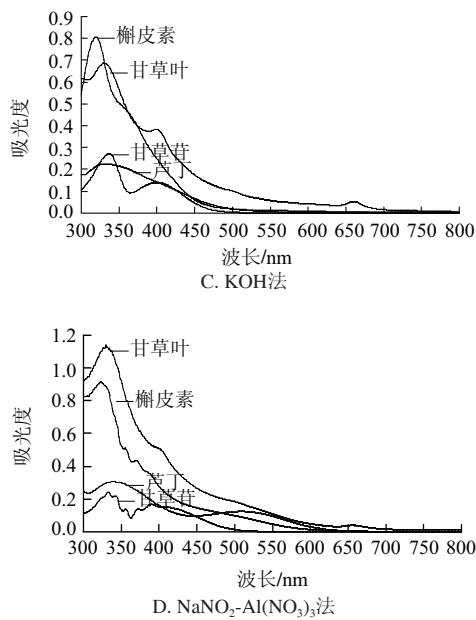


图1 4种显色方法下对照品及光果甘草叶80%乙醇提取物波长扫描结果
Fig.1 Wavelength scanning results of standard controls and 80% ethanol extract from the leaves of *Glycyrrhiza glabra* L. from Xinjiang through four coloration methods

3种对照品及光果甘草叶80%乙醇提取物分别经过4种显色方法显色后,波长扫描结果如图1所示。由于选用的标准对照品与样品中黄酮种类有一定差异性,为减少最终测定误差,以光果甘草叶80%乙醇提取物显色后扫描数据为主,参考3种标准对照品扫描数据做一定修正,最终确定4种显色方法下的8个待验证吸收波长。

综合光果甘草叶80%乙醇提取物并考虑3种标准品的扫描数据结果分析可得,不加显色剂的直接测定法得到的扫描曲线在200~250nm波段内扫描曲线波动,无法确定合适的吸收波长,因而在250~800nm波段内选取两个吸收波长,即直接测定法:280nm和310nm;而经过 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{O}$ 显色法、KOH显色法和 $\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3$ 显色法3种方法显色后的光果甘草叶80%乙醇提取物在200~300nm波段内扫描曲线波动,无法找到合适的吸收波长,因而在300~800nm波段内(这与大多研究结果一致^[10,12,14])各选择两个吸收波长,分别为: $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{O}$ 显色法:314nm和400nm,KOH显色法:333nm和400nm, $\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3$ 显色法:333nm和400nm。在各显色方法下选定的波长条件下,进行标准曲线的建立和各方法得方法学验证实验。

2.2 4种显色方法下3种对照品标准曲线的建立

根据1.3.3节与1.3.4节结果,建立3种对照品在4种显色方法下各自的标准曲线如表1所示。由表1可知,3种对照品分别在4种显色方法下得到的标准曲线均有很好的线性关系,相关系数(R^2)均达到0.99以上,则标准曲线方程均有效、可靠,由标准曲线计算出的值可行性高。由表1

数据可知,芦丁和槲皮素在4种显色方法选定的测定波长下均有吸光度,且均能建立良好的标准曲线;而根据波长扫描结果可知:甘草苷在 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{O}$ 显色方法下,在400nm波长处测定值为0,因而无法建立标准曲线。

表1 3种对照品4种显色方法下的标准曲线
Table 1 Standard curves of three kinds of standard controls determined by four coloration methods

	显色方法	检测波长/nm	标准曲线方程	相关系数(R^2)
芦丁	直接测定法	280	$Y=0.0153X+0.0207$	0.9994
		310	$Y=0.0158X+0.0128$	0.9998
	$\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{O}$	314	$Y=0.0095X-0.0053$	0.9998
		400	$Y=0.0296X-0.0027$	1
	KOH	333	$Y=0.0209X-0.0004$	0.9998
		400	$Y=0.0158X+0.0207$	0.9987
	$\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3$	333	$Y=0.0212X-0.0201$	0.995
		400	$Y=0.0145X-0.0002$	0.9997
槲皮素	直接测定法	280	$Y=0.024X+0.0096$	1
		310	$Y=0.0243X+0.0069$	0.9999
	$\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{O}$	314	$Y=0.0122X-0.0023$	1
		400	$Y=0.0476X-0.0702$	0.9991
	KOH	333	$Y=0.0549X+0.0047$	0.9985
		400	$Y=0.0206X+0.0164$	0.9979
	$\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3$	333	$Y=0.0619X+0.0357$	0.9986
		400	$Y=0.0214X+0.0302$	0.9915
甘草苷	直接测定法	280	$Y=0.031X+0.0042$	1
		310	$Y=0.0189X+0.0012$	0.9999
	$\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{O}$	314	$Y=0.0156X-0.0002$	0.9992
		400	—	—
	KOH	333	$Y=0.0607X+0.0025$	0.9996
		400	$Y=0.0223X+0.0341$	0.9972
	$\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3$	333	$Y=0.0295X+0.0174$	0.9919
		400	$Y=0.03X+0.0075$	0.9998

2.3 新疆光果甘草叶黄酮提取液4种显色方法的方法学验证

表2 光果甘草叶黄酮提取液4种显色方法的方法学验证结果
Table 2 Validation for the experimental results of 80% ethanol extract from the leaves of *Glycyrrhiza glabra* L. from Xinjiang determined by four coloration methods

方法	检测波长/nm	精密性 RSD/%	重现性 RSD/%	稳定性 RSD/%	回收率/%		
					芦丁	槲皮素	甘草苷
直接测定	280	0.64	2.58	0.56	93.23±1.83	92.31±1.33	92.19±8.33
	310	0.69	2.46	0.61	91.62±3.40	94.86±0.94	98.07±8.60
$\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{O}$	314	0.92	2.15	0.87	92.82±11.36	105.02±1.11	117.78±9.94
	400	1.55	4.54	1.45	97.41±5.69	115.33±4.16	—
KOH	333	0.81	4.37	4.94	104.24±7.88	112.13±8.12	106±9.68
	400	1.07	4.81	3.52	100±6.19	106.5±9.07	104.34±9.72
$\text{NaNO}_2\text{-Al(NO}_3)_3$	333	0.69	3.21	5.32	97.5±7.92	98.22±5.10	96.59±11.36
	400	1.07	3.82	4.26	90.93±3.27	90.14±1.03	92.79±4.84

由表2可知,直接测定法的精密性、重现性、稳定性的RSD值均为4种方法中相对最低,但3种标准对照品的加样回收率均偏低,即该方法得到的测定值偏低;与直

接测定法相比, KOH显色法精密度较好, 稳定性和重现性虽然均在可接受的误差范围内, 但较直接测定法差, 加样回收率相对较好; $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色法精密度、重现性、稳定性及加样回收率均为4种显色方法中最差的; 而 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{CO}$ 显色法在314nm波长处测定, 以槲皮素为参照得到的测定方法则最佳。

$\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{CO}$ 显色法检测新疆光果甘草叶中黄酮类化合物含量的精密度、重现性、稳定性的相对标准偏差(RSD)分别为0.92%、2.15%和0.87%, 相对标准偏差值均小于3, 在误差范围内, 且以槲皮素为标准对照品的加样回收率最好, 为 $(105.02 \pm 1.11)\%$ 。结果表明以槲皮素为对照品, 三氯化铝显色法, 检测波长为314nm下对于测定新疆光果甘草叶中黄酮类化合物含量具有很好的精密度, 且操作简单, 检测准确, 能够满足实验需要。

3 讨论

本实验选用3种标准对照品芦丁、槲皮素和甘草苷用作筛选新疆光果甘草叶总黄酮测定的最佳对照品。其中芦丁为多种植物提取物中总黄酮测定的标准对照品, 但目前国内外研究中并未见从甘草中分离出芦丁的报道, 有学者指出由以芦丁为对照品, 测定结果与实际总黄酮含量有差别, 不能准确定量^[15]。甘草苷作为甘草中的重要黄酮类成分^[16], 由于其价格昂贵而未能广泛用于常用的分光光度法测定甘草中黄酮含量; 槲皮素也是一种存在于多种植物中的黄酮类物质, 也有相关研究证明甘草中存在一定含量的槲皮素^[17], 但将其用作甘草总黄酮的测定鲜见报道。

HPLC通过样品与标准对照品的保留时间可以精确对样品中的物质进行定性, 而通过峰面积可以对物质准确定量, 使用HPLC对甘草中的黄酮类物质进行定量及定性研究也有很多报道, 但这种方法与分光光度法相比, 需要多种标准对照品; 分光光度法根据同类物质经显色后在同一波长下具有共同吸收来测定样品中物质的含量, 只需要一种对照品, 通过将样品显色后测定的吸光度值带入同种方法下建立的标准曲线, 即可算出样品中总黄酮的含量, 简单快速, 耗费低, 缺点是测定值与真实值有一定偏差。

本研究采用分光光度法, 综合选用3种对照品, 在4种显色方法下, 通过全波长扫描确定各显色方法的测定波长, 并通过对各方法的方法学验证, 最终建立了一种快速简便的测定新疆光果甘草叶总黄酮的方法, 为中草药中黄酮类物质更准确的测定提供方法指导。

参考文献:

- [1] 贾国惠, 贾世山. 甘草中黄酮的药理作用研究进展[J]. 中国药杂志, 1998, 33(9): 513-516.
- [2] LI Wei, YOSHIKAWA T, ASADA Y. Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root culture[J]. Journal of Phytochemistry, 2000, 55(5): 447-456.
- [3] FU Boqian, LI Huan, WANG Xiaoru, et al. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(19): 7408-7414.
- [4] NERYA O, VAYA J, MUSA R, et al. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(5): 1201-1207.
- [5] 张继, 吴建, 曾家豫, 等. 光果甘草茎叶营养成分的分析研究[J]. 中国医学生物技术应用杂志, 2002(2): 51-53.
- [6] 曾小英. 新疆胀果甘草叶化学成分研究及湖北省不同生态区烟草质量评价[D]. 武汉: 中南民族大学, 2010.
- [7] RAFI M M, VASTANO B C, ZHU Nanquan, et al. Novel polyphenol molecule isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) induces apoptosis, G2/M Cell Cycle arrest, and Bcl-2 phosphorylation in tumor cell lines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(4): 677-684.
- [8] HE Jian, CHEN Li, DAVID H, et al. Antibacterial compounds from *Glycyrrhiza uralensis*[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(1): 121-124.
- [9] XIE Junbo, ZHANG Yanqing, WANG Wenquan. HPLC analysis of glycyrrhizin and licochalcone A in *Glycyrrhiza inflata* from Xinjiang (China)[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2010, 46(1): 148-151.
- [10] 马玲, 安瑜, 王坤, 等. 甘草中总黄酮含量测定的方法学研究[J]. 宁夏医学杂志, 2010, 32(5): 428-429.
- [11] 颜仁梁, 刘志刚. 中草药、中药制剂中总黄酮类化合物含量测定方法综述[J]. 广州医药, 2005, 36(6): 6-10.
- [12] 刘军. 玉米须黄酮类化合物制备及抗氧化活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [13] 刘晓凤, 相炎红, 张百刚, 等. 甘草黄酮的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(6): 2542-2543.
- [14] 吕国红, 钟晓凌, 李良, 等. 枳椇子总黄酮测定方法的比较分析[J]. 湖北工业大学学报, 2009, 24(1): 9-12.
- [15] 吴亮亮, 石雪萍, 张卫明. 花椒总黄酮测定方法研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 372-374.
- [16] 丛景香, 唐晓丹, 王绍艳, 等. 甘草黄酮类活性成分的化学转化研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(11): 2321-2325.
- [17] 贾世山, 马超美, 王建民. 甘草叶中黄酮类成分的化学研究[J]. 药学报, 1990, 25(10): 758-762.