

槐米总黄酮提取物的热分析指纹图谱

张黎明* 赵希 张小利 王玲玲

(天津市工业微生物重点实验室,天津科技大学生物工程学院 天津 300222)

摘要 以芦丁标准品作对照,应用热重法(TG)和微商热重法(DTG)对不同提取方法(碱提酸沉法、乙醇回流法和超声辅助法)以及提取条件(碱提取液 pH 值、稳定剂种类)下制备的槐米总黄酮提取物进行热重分析及热特征图谱解析。结果表明,由于提取方法和条件不同,产品质量有明显区别,反映在 TG-DTG 曲线上,表现出不同峰形、峰位及失重情况。在碱提酸沉法提取中,碱提取液 pH=9,硼砂作稳定剂时,提取物的产率和含量均较高,而且其 TG-DTG 曲线特征与芦丁标准品比较接近。因此这些热分析图谱可以作为控制槐米总黄酮提取物质量的指纹图谱。

关键词 槐米,黄酮类化合物,芦丁,热重分析谱图

中图分类号:O641.2

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2007)10-1206-05

槐米是豆科植物槐树(*Sophora japonica* L.)的未开花蕾,含有丰富的芸香苷(rutin,芦丁),三萜皂苷等,具有凉血止痛、清肝泻火之功效;用于多种疾病的治疗,并可用于预防中风^[1]。药理学实验已经证实,芦丁不但具有维生素 P 的生理作用而且能够抗菌消炎,有防止血管脆性和止血作用。目前,已经有许多关于槐米总黄酮提取方法的报道,如碱提酸沉法、乙醇回流法、水提取法和超声辅助法等^[2,3],但是利用指纹图谱技术研究不同提取方法以及提取条件对槐米总黄酮提取物质量影响的报道却很少见。为建立中药提取生产质量管理规范(GEP),促进植物提取物质量标准化,发展多种快速、有效、操作简便、适于推广的质量控制检测方法十分必要。目前,高效液相色谱(HPLC)^[4]和薄层色谱(TLC)等方法已经用于中药提取物有效成分的测定。但是,HPLC 作为一种分离检测手段,耗时长,工作量大,需根据不同样品确定不同分离条件,使操作较为繁琐;薄层色谱以及薄层扫描也有耗时长,所获得结果不够精确等缺点;红外光谱(FTIR)^[5,6]测定的是物质中分子的吸收光谱,不同的物质会有其特征指纹的特性,现已用于中药材及其提取物的快速鉴别和质量控制上,是一种值得推广使用的研究中药指纹图谱的新方法。近年来,热分析技术在化学药品的鉴别、理化常数测定、纯度考察、稳定性以及晶型考察、中药材真伪鉴别、中药制剂质量分析等领域已经发挥出越来越重要的作用^[7,8]。本文在分析不同提取方法和提取条件所得槐米总黄酮含量的基础上,用热分析技术研究这些提取物的指纹图谱特征,为建立中药提取物的定量-定性指纹图谱数据提供参考依据。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Pyris/Diamond TG/DTA 型热重-差热分析仪(美国 Perkin-Elmer 公司);SP-2000UV 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);KQ3200DE 型数控超声波清洗器(上海精密仪器仪表有限公司);Helzad WB 型旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司)。芦丁标准品(中国药品生物制品检定所),槐米(天津市中药饮片厂)。氧化钙、硼砂、焦亚硫酸钠等均为分析纯试剂。

1.2 样品制备

芦丁属黄酮苷类化合物,虽然有一定的极性,但却难溶于酸性水,易溶于碱性水,故可用碱水提取。在提取过程中,为了避免芦丁氧化变质,常加入焦亚硫酸钠起抗氧化作用,加入硼砂起保护邻二酚羟基不被氧化破坏的作用^[9]。另外,芦丁溶于热乙醇(体积比为 1:30),根据相似相溶的原理,可以用乙醇作溶剂,回流提取^[10]。超声辐射用于槐米总黄酮的提取,主要是源于超声波的空化作用,能够有效粉碎槐

花米的细胞壁,加速黄酮在溶液中的溶解。另外,超声波的热效应和机械效应也有利于黄酮的溶出,提取可在室温下进行^[3]。

本文分别采用碱提酸沉法(提取液 pH=9,稳定剂选用 1.5 g 硼砂和 1.5 g 焦亚硫酸钠)、乙醇回流法和超声辅助法制备槐米总黄酮提取物。

当在不同 pH 值条件下制备槐米总黄酮时,用澄清石灰水调节相应 pH 值。

在不同种稳定剂下制备槐米总黄酮时,稳定剂选择 1.5 g 硼砂和 1.5 g 焦亚硫酸钠、1.5 g 硼砂和不加稳定剂 3 个水平。

1.3 槐米总黄酮提取物产率及含量的测定

以上每种提取工艺各制备 3 批平行样,所得提取物均于 65 ℃ 下真空干燥并称重,分别计算槐米总黄酮产率。

采用分光光度法,对以上不同提取方法和条件下制备的样品进行含量测定。芦丁是分析黄酮类化合物的常用标准品,也是槐米总黄酮的主要成分,所以本试验以芦丁为标准品制作标准曲线^[11],用最小二乘法得回归方程为: $c(\text{g/L}) = 0.083\,944 - 0.001\,32$,相关系数 $R^2 = 0.999\,6$ 。

将待测样品粉末于烘箱中 120 ℃ 活化 4 h,样品溶液的制备参考标准品溶液的制备。然后按标准曲线制备项下的方法在波长 510 nm 处依法测定各样品吸光度,每个样品平行测 3 次。通过标准曲线方程求出总黄酮浓度,计算不同提取方法和条件下所得产品中总黄酮的含量。

1.4 热重分析实验

热重分析实验的温度范围 25 ~ 800 ℃;升温速率 10 ℃/min;N₂ 气氛,流速 150 mL/min。实验时,将样品研磨成细粉,每个样品用量约 5 mg,置铂坩埚中,加盖。按实验条件程序升温,对样品进行热谱扫描,每一样品均重复 3 次,重现性好。本文使用芦丁标准品作对照,采用热重-微商热重法测定不同提取物的 TG-DTG 曲线。分别以样品失重百分率和质量变化百分率为纵坐标,温度为横坐标作图,即得到各样品的热重-微商热重(TG-DTG)曲线。

2 结果与讨论

将芦丁标准品的热分解反应分为 4 个阶段:(1)在 25 ~ 134 ℃,TG 曲线呈现脱失结晶水的失重台阶,DTG 曲线出现脱失结晶水的失重峰;(2)在 134 ~ 333 ℃,芦丁熔融同时分解,TG 曲线呈现一陡峭热分解失重台阶,DTG 曲线出现尖锐热分解强峰;(3)失重发生在 333 ~ 498 ℃,可能为样品挥发所致,对应 DTG 曲线出现一较缓失重峰;(4)在 498 ~ 800 ℃,样品逐步缓慢失重。

2.1 不同提取方法所得槐米总黄酮的热分析指纹图谱

不同提取方法所得槐米总黄酮的 TG-DTG 曲线如图 1 所示。图中可见,B 的 TG-DTG 曲线较其它 2 种方法更接近芦丁标准品;C 的 DTG 曲线,脱失结晶水失重峰峰顶温度与标准品有较大差异,可能是由于乙醇提取槐米总黄酮的过程中,其它醇溶性成分如白桦脂醇、槐二醇等也会随之溶出;D 的 TG-DTG 曲线与标品相差较远,说明在本文所述超声条件下提取总黄酮时,对提取物质量的影响较大。由 3 种方法所得槐米总黄酮提取物的产率和总黄酮含量测定结果(见表 1)表明,碱提酸沉法所得样品的产率和总黄酮含量最高,分别为 19.4% 和 82.5%;用乙醇提取槐米总黄酮的过程中,由于醇溶性杂质的溶出,导致提取物 C 纯度下降。在本文所述超声条件辅助提取时,可能导致有效成分发生降解,致使其产率和总黄酮含量结果偏低。

以芦丁为对照,对 3 种提取方法所得槐米总黄酮的 TG 曲线作进一步解析,计算不同阶段的失重率和总失重率,结果见表 1。由表 1 看出,第 1 阶段,各样品脱失结晶水的台阶失重率均略大于芦丁标准品,这可能是由于样品含有部分结合水或游离水;第 2 阶段,样品的 TG 曲线呈现陡峭的热分解失重台阶,其中,D 的质量损失仅为 23.64%,与标准品相差较大;对应 DTG 曲线,各样品热分解失重峰峰顶温度均较标准品稍提前,峰形不如标准品尖锐,D 在该阶段出现多重失重峰,这与超声提取物黄酮含量低有关;第 3、第 4 阶段,各样品失重率与标准品接近,只是失重峰峰顶温度较标准品略向左偏移。综合考虑各热分解反应阶段失重率及峰形、峰位置,说明提取物 B 的 TG-DTG 曲线特征与标准品最接近。

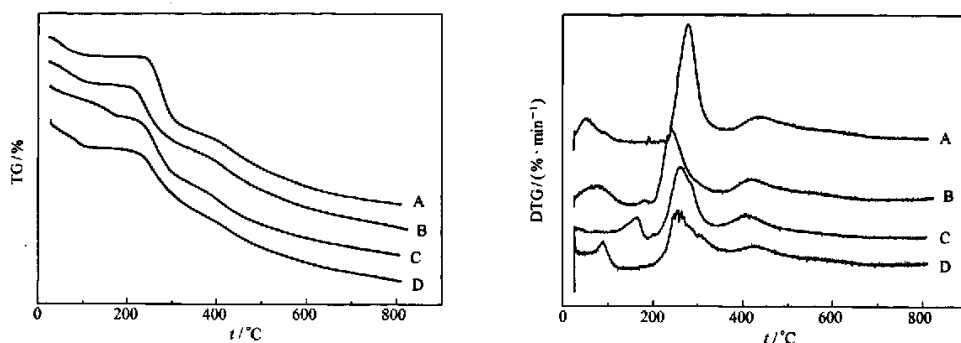


图 1 不同提取方法所得样品的 TG-DTG 曲线

Fig. 1 TG-DTG curves of samples extracted by different methods

A. standard rutin; B. extract by alkali dissolution of acid sedimentation;

C. extract by ethanol reflux; D. extract by ultrasonic-assisted method

表 1 不同提取方法所得样品的产率和总黄酮含量及热重曲线特征

Table 1 The yield, flavone content and thermogravimetric characteristics of the extracts by different methods

Entry *	Yield/%	Flavone content/%	Mass loss/(% (in each decomposition stage))				Total mass loss/%
			First 24 ~ 134 °C	Second 134 ~ 333 °C	Third 333 ~ 498 °C	Fourth 498 ~ 800 °C	
A	—	99.72 ± 0.26	7.74 ± 0.13	29.71 ± 0.18	16.29 ± 0.18	14.55 ± 0.11	68.26 ± 0.23
B	19.44 ± 0.32	82.53 ± 0.44	8.98 ± 0.09	26.21 ± 0.13	17.19 ± 0.21	15.37 ± 0.22	67.76 ± 0.32
C	18.23 ± 0.35	67.82 ± 0.50	7.77 ± 0.18	31.61 ± 0.22	17.40 ± 0.19	12.46 ± 0.16	69.24 ± 0.34
D	15.60 ± 0.27	59.01 ± 0.41	9.37 ± 0.11	23.64 ± 0.25	17.13 ± 0.14	13.73 ± 0.09	63.87 ± 0.29

* Entry A ~ D were as same as the note of Fig. 1; Data were reported in means ± standard deviation (n = 3).

2.2 不同碱提取液 pH 值所得槐米总黄酮的热分析指纹图谱

不同碱提取液 pH 值所得槐米总黄酮的 TG-DTG 曲线如图 2 所示。图中可见, F 的 TG-DTG 曲线最接近芦丁标准品; 对应 DTG 曲线, 各样品出现热分解失重强峰, 但峰顶温度较标准品稍提前, 且峰形不如标准品尖锐, 其中, E 出现失重双峰, 前一个峰较陡峭, 随后峰出现的较缓。通过测定不同碱提取液 pH 值所得槐米总黄酮提取物的产率和总黄酮含量 (结果见表 2)。由表中结果可知, 最佳碱提取液 pH = 9; 当 pH < 9 时, 可能由于提取液碱性较弱, 黄酮溶解不完全, 使得提取物产率和纯度下降; 但在强碱性下 (如 pH = 10), 尤其加热提取时会破坏黄酮母核, 导致含量下降。

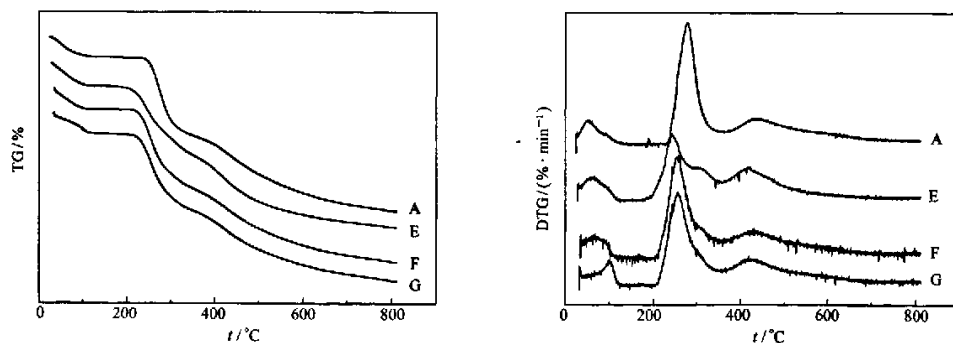


图 2 不同碱提取液 pH 值所得提取物的 TG-DTG 曲线

Fig. 2 TG-DTG curves of samples extracted at different pH

A. standard rutin; E. extract at pH = 8; F. extract at pH = 9; G. extract at pH = 10

以芦丁为对照, 对提取物 E、F 和 G 的 TG 曲线作进一步解析, 计算不同阶段的失重率和总失重率, 结果列于表 2。由表 2 看出, 第 1 阶段, E、F 和 G 脱失结晶水的台阶总失重略大于标准品, 其中 E 的结果

偏离芦丁标准品最大;第 2 阶段,E、F 和 G 的 TG 曲线呈现陡峭的热分解失重台阶,其中,F 的质量损失为 29.43%,与标准品最为接近,而 E 的失重率偏低;在第 3 个热分解反应过程中,E 的失重率偏高,对应 DTG 曲线较标准品尖锐。最后,3 种提取物缓慢失重,但 G 失重率略低。通过以上热谱图分析可知,当碱提取液 pH=9 时,提取物 F 的 TG-DTG 曲线特征最接近芦丁标准品。

表 2 不同碱提取液 pH 值所得样品的产率、总黄酮含量及热重曲线特征

Table 2 The yield, flavone content and thermogravimetric characteristics of extracts at different pH values							
Entry *	Yield/%	Flavone content/%	Mass loss/% (in each decomposition stage)				Total mass loss/%
			First 24 ~ 134 °C	Second 134 ~ 333 °C	Third 333 ~ 498 °C	Fourth 498 ~ 800 °C	
A	-	99.72 ± 0.26	7.74 ± 0.13	29.71 ± 0.18	16.29 ± 0.18	14.55 ± 0.11	68.26 ± 0.23
E	7.96 ± 0.30	50.51 ± 0.33	9.25 ± 0.12	25.32 ± 0.23	19.95 ± 0.15	10.19 ± 0.08	64.71 ± 0.32
F	18.81 ± 0.37	80.61 ± 0.45	8.40 ± 0.16	29.43 ± 0.24	17.24 ± 0.18	13.23 ± 0.13	68.30 ± 0.31
G	18.24 ± 0.24	54.64 ± 0.37	7.87 ± 0.11	28.90 ± 0.19	16.51 ± 0.20	12.49 ± 0.16	65.77 ± 0.23

* Entry A, E ~ G were as same as the note of Fig.2; Data were reported in means ± standard deviation(n=3).

2.3 不同稳定剂所得槐米总黄酮的热分析指纹图谱

碱提酸沉法提取槐米总黄酮时常用单一稳定剂硼砂或复合稳定剂硼砂加焦亚硫酸钠来保护黄酮母核。不同稳定剂及未加稳定剂所得槐米总黄酮的 TG-DTG 曲线如图 3 所示。图中可见,I 的 TG-DTG 曲线较其它 2 种方法更接近芦丁标准品;在提取过程中采用复合稳定剂反而造成 H 的 TG-DTG 曲线与标准品有明显差异,DTG 曲线出现失重双峰,而且失重峰峰顶温度较标准品明显提前,峰形也不如标准品尖锐;不加稳定剂的提取物 J,在第 3 个热分解阶段出现不明显失重双峰。表 3 中列出提取物 H、I 和 J 的产率和总黄酮含量结果,从中可以看出,提取物 I 的产率和总黄酮含量比提取物 H 要高;而提取物 J 由于部分黄酮结构被破坏使得产率和总黄酮含量显著降低。

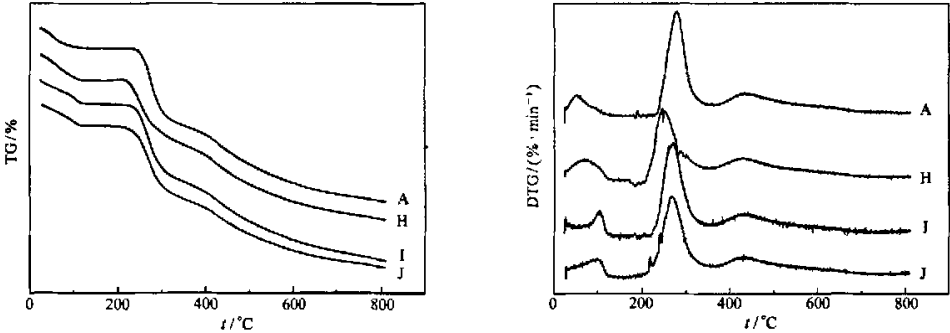


图 3 不同稳定剂所得样品的 TG-DTG 曲线

Fig.3 TG-DTG curves of samples extracted with different stabilizer

A. standard rutin; H. extract with borax and sodium metabisulfite as stabilizer; I. extract with borax as stabilizer; J. without stabilizer

以芦丁为对照,对提取物 H、I 和 J 的 TG 曲线进一步解析,计算不同阶段的失重率和总失重率,结果见表 3。由表 3 看出,第 1 阶段,提取物 H、I 和 J 脱失结晶水的台阶失重率略大于标准品;第 2 阶段,

表 3 不同稳定剂所得样品的产率和总黄酮含量及热重曲线特征

Table 3 The yield, flavone content and thermogravimetric characteristics of extracts with different stabilizer							
Entry *	Yield/%	Flavone content/%	Mass loss/% (in each decomposition stage)				Total mass loss/%
			First 24 ~ 134 °C	Second 134 ~ 333 °C	Third 333 ~ 498 °C	Fourth 498 ~ 800 °C	
A	-	99.72 ± 0.26	7.74 ± 0.13	29.71 ± 0.18	16.29 ± 0.18	14.55 ± 0.11	68.26 ± 0.23
H	19.03 ± 0.38	78.22 ± 0.49	9.23 ± 0.09	24.54 ± 0.20	16.72 ± 0.14	13.83 ± 0.17	64.31 ± 0.35
I	19.71 ± 0.26	97.23 ± 0.46	8.34 ± 0.19	29.93 ± 0.29	16.78 ± 0.17	15.47 ± 0.11	70.51 ± 0.38
J	14.92 ± 0.31	54.60 ± 0.38	8.33 ± 0.20	27.94 ± 0.14	15.06 ± 0.12	13.13 ± 0.23	64.45 ± 0.34

* Entry A, H ~ J were as same as the note of Fig.3; Data were reported in means ± standard deviation(n=3).

提取物迅速失重,提取物 I 与芦丁标准品最接近,提取物 H 热分解失重率最小(24.54%);第3阶段,提取物 I 和 H 与芦丁结果均相近,提取物 J 结果偏低。最后,3种提取物均缓慢失重至最大失重率。比较提取物 H 和 I 的 TG-DTG 曲线特征,提取物 I 更接近标准品。综合考虑这2种提取物产率和总黄酮含量,在提取槐米总黄酮的过程中,只加入一种稳定剂硼砂的提取效果要优于加入复合稳定剂或未使用稳定剂的效果。

参 考 文 献

- 1 CHENG Xiu-Min(程秀民),CHEN Xue-Lan(尘学兰),GAO Yan-Hui(高彦慧),REN Jian(任健). *Chinese Traditional Patent Medicine*(中成药)[J],2004,26(8):680
- 2 ZHANG Lai-Xin(张来新). *Shanxi Chem Ind*(山西化工)[J],2002,22(1):16
- 3 Paniwnyk L,Beaufoy E,Lorimer J P,Mason T J. *Ultrasonics Sonochemistry*[J],2001,8:299
- 4 LU Yu(陆豫),HUANG Zhi-Shu(黄志纾),MA Lin(马林),GU Lian-Quan(古练权). *Chinese J Appl Chem*(应用化学)[J],2004,21(5):433
- 5 ZHOU Qun(周群),LI Jing(李静),SUN Su-Qin(孙素琴),LIANG Xi-Yun(梁曦云). *Chinese J Anal Chem*(分析化学)[J],2003,31(3):292
- 6 HUANG Hao(黄昊),LI Jing(李静),QIN Zu(秦竹),ZHOU Qun(周群),SUN Su-Qin(孙素琴). *Chinese J Anal Chem*(分析化学)[J],2003,31(7):828
- 7 Li Z J, Zell M T, Munson E J. *J Pharm Sci*[J],1999,88(3):337
- 8 ZHANG Gui-Jun(张贵君)Chief-Edr(主编). *Identify the Physics Constant of Common Chinese Traditional Medicine*(常用中药物理常数鉴定)[M],Chapt. 8(第8章). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社),2005
- 9 SHU Xiao-Hong(舒晓宏),FENG Mei(冯梅),CHEN Hua(陈华). *J Dalian Medical Univ*(大连医科大学学报)[J],2005,27(2):91
- 10 LI Yu(李裕),LIU You-Zhi(刘有智),HUO Hong(霍红). *J North China Institute Tech*(华北工学院学报)[J],2002,23(2):130
- 11 CHEN Yong-Cheng(陈永城),LI Bao-Cai(李宝才),ZHANG Jian(张健). *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicines*(中医药学刊)[J],2004,22(11):2 060

Thermal Analysis Fingerprint of Flavonoids Extracted from Buds of *Sophora japonica* L.

ZHANG Li-Ming*, ZHAO Xi, ZHANG Xiao-Li, WANG Ling-Ling
(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222)

Abstract Flavonoids were extracted from the buds of *Sophora japonica* L. by different methods, such as alkali dissolution of acid sedimentation, ethanol reflux, and ultrasonic-assisted methods. The extraction conditions, including the pH of the base and the kind of stabilizer were researched as well. Furthermore, with rutin as a control, thermal characteristics of flavonoids from the buds of *Sophora japonica* L. were determined via the TG-DTG curves. The results showed that every sample had different mass loss, curve shape, and peak location related to different extraction technology. The TG-DTG characteristics of the products extracted by alkali dissolution of acid sedimentation with the extract adjusted to pH = 9 and borax as the stabilizer were similar to that of standard rutin. Meanwhile, the yield and purity of the products extracted by the above optimum extraction technology were higher than others. Therefore, the thermal analysis fingerprint could serve as a tool for quality control of flavonoids from the buds of *Sophora japonica* L.

Keywords buds of *Sophora japonica* L., flavonoids, rutin, thermogravimetry analysis fingerprint