

· 基础研究 ·

傣药人面果叶中总黄酮含量测定方法研究[△]刘慧¹, 钟芳芳², 谭雪³, 卢青秀¹, 杨光忠³, 陈玉^{1*}

(1. 中南民族大学 化学与材料科学学院, 湖北 武汉 430074;

2. 温州市洞头区产品质量监督检验所, 浙江 温州 325000;

3. 中南民族大学 民族药学国家级实验教学示范中心, 湖北 武汉 430074)

[摘要] 目的: 建立人面果叶总黄酮含量测定的方法。方法: 比较 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 和 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COO-Na/CH}_3\text{COOH}$ 两种显色方法测定人面果叶中总黄酮含量的差异。结果: 用 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ 显色的方法, 供试品和对照品 Fukugetin 在 415 nm 处显示有较强和稳定的吸收。结论: 采用 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ 比色法测定人面果叶总黄酮的含量, 并建立了该方法测定人面果叶总黄酮含量的最优条件。

[关键词] 人面果叶; 总黄酮; 含量测定; 紫外-可见分光光度法

Determination of Total Flavonoids from Leaves of *Garcinia xanthochymus*LIU Hui¹, ZHONG Fang-fang², TAN Xue³, LU Qing-xiu¹, YANG Guang-zhong³, CHEN Yu^{1*}

(1. College of Chemistry and Materials Science, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

2. Wenzhou Dongtou Product Quality Supervision and Testing Institute, Wenzhou 325000, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Ethnopharmacology Education, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of total flavonoids from the leaves of *Garcinia xanthochymus*. **Methods:** $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ and $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ colorimetry methods were compared to determine the total flavonoids from the leaves of *G. xanthochymus*. **Results:** Both the test sample and Fukugetin showed strong and stable absorptions at 415 nm by $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ colorimetry. **Conclusion:** It is reasonable to determine the total flavonoids by using $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ colorimetry, the optimum condition of this method was selected.

[Keywords] *Garcinia xanthochymus*; total flavonoids; content determination; UV-VIS spectrophotometry

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180314002

人面果 *Garcinia xanthochymus* 是藤黄科 Guttiferae 植物, 是我国传统傣药, 有驱虫、清热解毒、解食物中毒等功效^[1]。人面果果实、根部及树叶化学成分主要含有黄酮^[2-4], 三萜^[5]和呋喃^[6-8]等化合物, 树叶中含有大量的黄酮化合物, 其中双黄酮类化合物为其主要的结构类型, 如 Volkensiflavone、藤黄双黄酮、3, 8"-双柚皮素、白果素、Fukugiside、GB2a glucoside、Fukugetin 等^[9]。本研究前期已经发现人面果叶乙酸乙酯提取物有较好的抗糖尿病活性^[10], 双黄酮类化合物 Fukugetin (结构式如图 1) 作为人面果叶抗糖尿病的活性成分, 对 α -淀粉酶有较强的抑

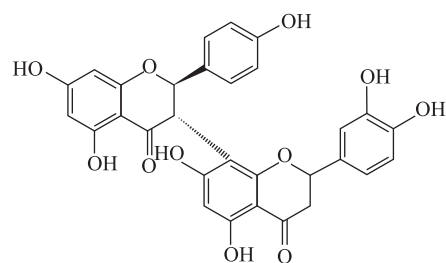


图 1 化合物 Fukugetin 的结构式

制作用, 并且是一种新的糖原合成酶 GSK-3 β 的抑制剂, 有降血糖的功效^[11-12], 可选 Fukugetin 作为人面果叶药材质量标准的指标性成分和总黄酮含量测定

[△] [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31370379); 国家重大新药创制科技重大专项(2017Z09301060)

* [通信作者] 陈玉, 教授, 研究方向: 天然药物化学; Tel: (027)67842752, E-mail: chenyuwh888@126.com

的对照品。

总黄酮的含量测定一般采用比色法、高效液相色谱法等方法^[12]。比色法是《中华人民共和国药典》中常见的总黄酮测定方法,其中以芦丁为对照品, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法最为常用^[13]。本实验将 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 与 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ 比色法进行对比,在以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法进行试验时发现样品显色后稳定性差,不宜作为测定方法,故对 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ 显色法进行研究,对显色前后的吸收峰(200~900 nm)进行比较,分析了以芦丁和 Fukugetin 为对照品的 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ 比色法测定人面果叶总黄酮的合理性,并对 pH 值,缓冲液浓度、显色温度等条件进行优化研究。因而建立叶中总黄酮含量的测定方法,对人面果叶制备工艺及质量标准的研究提供依据。

1 材料与仪器

美普达紫外分光光度计 UV1800C(上海美普达仪器有限公司); CP224C 万分之一电子天平(上海奥斯豪仪器有限公司); 岛津 AUW120D 十万分之一电子天平(岛津分析天平有限公司); 亚硝酸钠、九水硝酸铝、氢氧化钠、无水乙酸钠、冰醋酸、氯化铝、乙醇均为分析纯(购自国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水; 人面果叶采自云南西双版纳,经云南西双版纳民族医药研究所赵应红主任药师鉴定为藤黄科藤黄属植物人面果 *Garcinia xanthochymus* 叶; 对照品 Fukugetin 自制,纯度达到 98%,其结构经过 ^1H 、 ^{13}C -NMR 和 ESIMS 确定。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制

称量 4.61 mg Fukugetin 于 50 mL 容量瓶中,用乙醇溶解定容至刻度(浓度为 $92.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.2 供试品溶液的配制

精密称取干燥人面果叶粗粉 0.1 000 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,精密加入无水乙醇 25 mL,称重,水浴回流 0.5 h,提取液冷却,补足减失重量,过滤,取续滤液,即得。

2.3 两种显色方法的比较

2.3.1 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法(A)

2.3.1.1 显色方法 用移液管移取对照品溶液 1 mL

于 25 mL 具塞试管中,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,使混匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 4% 氢氧化钠试液 10 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应的试剂为空白。在 200~900 nm 范围内进行扫描,根据最大吸收峰确定测定波长,在 510 nm 附近有明显凸跃^[14-15](见图 2)。

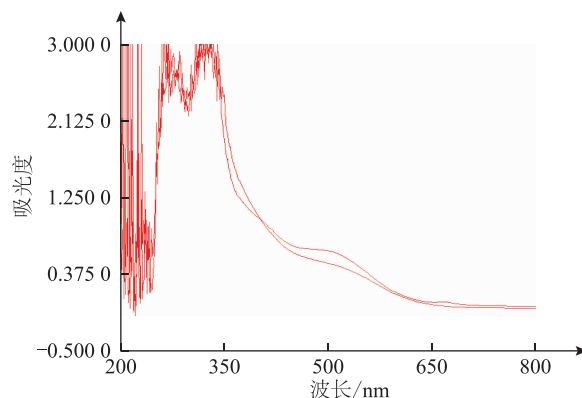


图2 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法全波长扫描

2.3.1.2 稳定性 精密吸取 Fukugetin 对照品溶液、芦丁对照品溶液、供试品溶液 各 1 mL,按照上述同样条件操作,显色后的溶液每隔 5 min 测定吸收度。发现芦丁在该条件下显色后的溶液在 1.5 h 内都比较稳定,而供试品和 Fukugetin 溶液则很不稳定(见图 3)。因此该方法不适合作为人面果叶总黄酮含量的测定方法。

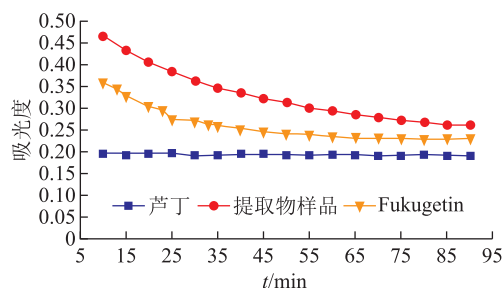


图3 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色方法的稳定性

2.3.2 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ 显色法(B)

2.3.2.1 显色方法 分别移取 Fukugetin 对照品溶液、芦丁对照品溶液、供试品溶液各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,依次加入 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AlCl}_3$ 2 mL、pH 5.2 的 $\text{CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ 缓冲液 3 mL,最终用乙醇定容至刻度,摇匀,室温下放置 15 min。在 200~500 nm 区间内进行波长扫描^[16],根据最大吸收峰确定测定波长(见图 4)。由图可见供试品和 Fukugetin

在 415 nm 处有最大吸收, 而芦丁则在 425 nm 处有最大吸收波长, 更宜选定 Fukugetin 作为对照品。

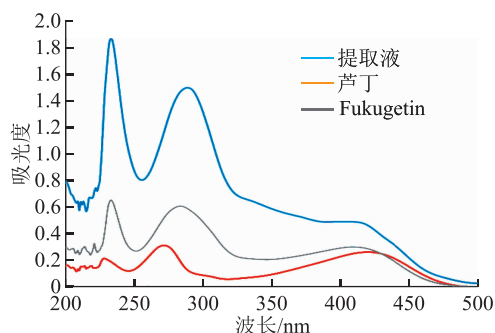


图4 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ 显色法
显色后全波长扫描

2.3.2.2 稳定性 精密吸取 Fukugetin 对照品溶液 1 mL, 供试品溶液 1 mL, 按照上述显色方法进行显色后, 每隔 5 min 测定其吸光度, 比较在一段时间内吸光度变化情况。在研究过程中发现醋酸钠浓度、缓冲液 pH、及缓冲液用量均对吸光度稳定性有影响, 于是对醋酸钠浓度、缓冲液 pH、及缓冲液用量进行考察, 选取最优的显色条件。

2.4 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ 显色法的优化

2.4.1 醋酸钠浓度考察 精密吸取对照品溶液 4 份各 1 mL, 按 2.3.2.1 项下显色方法操作, 分别采用 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠配制成的 pH 5.5 的缓冲溶液, 测定 415 nm 处吸光度, 结果显示 1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠吸收稳定性较好(表 1)。

2.4.2 缓冲液 pH 考察 精密吸取对照品溶液 4 份各 1 mL, 按 2.3.2.1 项下显色方法操作, 分别添加 pH 4.0、5.0、6.0、7.0 的缓冲溶液。分别测定 415 nm 处吸光度, 结果显示 pH 为 4.0 时在 415 nm 处未见明显最大吸收(见图 5)。随着缓冲液 pH 增加在 415 nm 处的吸光度逐渐增加, 但稳定性逐渐降低(表 2)。再比较 pH 5.1、5.2、5.3、5.4、5.5 时在 415 nm 处的吸光度稳定性, 发现在 pH 为 5.2 时的稳定性较好, 所以最终选取 pH 5.2 的缓冲液。

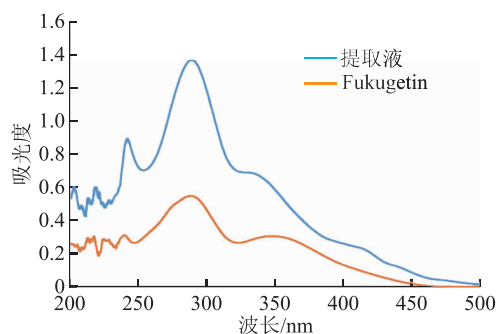


图5 pH 为 4 时 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$
显色法显色后全波长扫描

2.4.3 缓冲液用量考察 精密吸取对照品溶液 3 份各 1 mL, 按 2.3.2.1 项下操作, 分别采用 1、2、3 mL pH 5.2 的缓冲溶液, 测定 415 nm 处吸光度, 结果显示当加入 3 mL 缓冲液时吸光度值最大, 且具有较好的稳定性(表 3)。

表1 醋酸钠浓度对吸光度稳定性的影响

浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	t/min										RSD(%)
	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60	
0.5	0.8729	0.692 2	0.688 9	0.696 1	0.684 9	0.689 0	0.689 3	0.690 2	0.696 7	0.700 4	7.07
1.0	0.737 6	0.745 4	0.740 6	0.730 4	0.730 2	0.723 8	0.729 2	0.729 0	0.715 6	0.715 0	1.31
1.5	0.687 4	0.690 2	0.694 6	0.709 3	0.725 0	0.732 5	0.748 5	0.784 0	0.794 2	0.800 6	5.68
2.0	0.658 3	0.663 5	0.657 9	0.664 7	0.667 1	0.674 5	0.678 9	0.680 2	0.684 1	0.690 2	1.59

表2 缓冲液 pH 对吸光度稳定性的影响

浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	t/min										RSD(%)
	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60	
pH5.0	0.411 8	0.414 8	0.415 1	0.414 9	0.415 7	0.417 0	0.416 8	0.418 4	0.421 0	0.421 6	0.715
pH5.1	0.419 7	0.421 0	0.420 5	0.420 2	0.419 8	0.418 2	0.422 0	0.418 2	0.417 3	0.416 2	0.427
pH5.2	0.429 1	0.428 6	0.431 6	0.429 0	0.430 1	0.427 6	0.427 1	0.427 5	0.427 7	0.428 0	0.323
pH5.3	0.446 1	0.445 1	0.444 0	0.442 8	0.441 8	0.444 0	0.439 5	0.438 2	0.437 6	0.437 1	0.746
pH5.4	0.447 6	0.448 2	0.448 9	0.446 0	0.446 8	0.445 7	0.447 2	0.448 5	0.451 3	0.452 4	0.483
pH5.5	0.465 8	0.465 2	0.463 3	0.461 7	0.456 3	0.452 4	0.449 6	0.448 7	0.446 0	0.438 2	2.039
pH6.0	0.464 0	0.464 8	0.463 3	0.464 8	0.466 1	0.470 3	0.472 3	0.470 0	0.469 5	0.472 0	0.738
pH7.0	0.479 3	0.478 5	0.478 9	0.475 0	0.472 7	0.472 9	0.469 6	0.468 0	0.466 4	0.466 1	1.083

表3 缓冲液用量对吸光度的影响

缓冲液用量/mL	t/min						RSD(%)	
	0	5	10	15	20	25		30
1	0.361 6	0.353 4	0.344 0	0.347 0	0.343 4	0.341 2	0.338 2	2.32
2	0.355 6	0.361 7	0.360 4	0.370 9	0.361 4	0.361 4	0.361 8	1.25
3	0.374 7	0.378 2	0.372 6	0.383 0	0.376 2	0.375 8	0.374 5	0.90

综上所述,最终确定缓冲液测定的最佳条件为1.0 mol·L⁻¹的pH值为5.2的醋酸钠-醋酸缓冲液3 mL。

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线的制备 精密吸取对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL置于10 mL容量瓶中,浓度分别为0.046 1、0.092 2、0.138 3、0.184 4、0.230 5、0.276 6 mg·mL⁻¹。分别按照2.3.2.1项下显色方法测定415 nm处吸光度,吸光度分别为0.146 0、0.297 7、0.449 2、0.591 4、0.746 8、0.902 9。以对照品浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线,并进行线性回归,在不同的用量范围内分别呈线性,回归方程 $Y = 3.2687X - 0.0051$ ($r = 0.9998$),双黄酮Fukugetin在46.1~276.6 μg范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.5.2 精密度试验

2.5.2.1 仪器精密度试验 取同一份对照品溶液,在显色15 min后连续测定6次吸光度值,分别为0.544 1、0.544 2、0.544 2、0.545 0、0.545 0、0.545 1, RSD值为0.088%,表明仪器精密度良好。

2.5.2.2 方法精密度试验 对同一份供试品溶液分别取6份,显色15 min后分别测定415 nm吸光度值,分别为0.532 4、0.532 0、0.533 9、0.539 7、0.534 9、0.544 1, RSD值为0.89%,表明该显色方法精密度良好。

2.5.3 重复性试验 精密称取人面果叶粗粉0.1 g共6份,分别按2.2项下供试品溶液制备方法制备,按2.3.2.1项下显色方法测定415 nm处吸光度,并代入标准曲线计算含量,见表4。平均含量为4.07%, RSD为1.2%,表明该方法重复性较好。

2.5.4 显色稳定性试验 精密吸取Fukugetin对照品溶液1 mL,供试品溶液1 mL,按2.3.2.1项下显色方法测定415 nm处吸光度,每隔5 min测定其吸收度。结果表明,对照品在60 min内稳定,供试品在60 min内基本稳定。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取人面果叶粗粉约

0.1 g,分别置于6个圆底烧瓶中,依次加入4.01 mg·mL⁻¹对照品溶液各1.0 mL,无水乙醇24 mL,再按照2.2项下条件制备供试品,按2.3.2项下显色方法测定415 nm处吸光度,计算加样回收率,结果如表4。能够满足分析要求,方法准确度较高。

表4 Fukugetin的回收率(n=6)

称样量/g	理论值/mg	加入量/mg	实测值质量/mg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.100 8	4.10	4.01	8.07	99.00	98.75	1.76
0.100 3	4.08	4.01	8.04	98.75		
0.100 3	4.08	4.01	8.12	100.75		
0.100 8	4.10	4.01	8.08	99.25		
0.100 6	4.09	4.01	7.92	95.51		
0.100 0	4.07	4.01	8.05	99.25		

2.6 人面果叶中总黄酮的含量测定

精密称定人面果叶粗粉0.1000 g,置100 mL容量瓶中,精密加入无水乙醇25 mL称重,70℃水浴中回流30 min,冷却后称重,用无水乙醇补充损失的溶剂重量(精确至0.001 g),摇匀,滤过,初滤液弃去,续滤液作为供试品溶液。精密吸取续滤液1 mL,置10 mL容量瓶中,按2.3.2.1项下显色方法,按照紫外-可见分光光度法(《中华人民共和国药典》2015版四部通则0401),在415 nm波长处测定吸光度,从标准曲线上读出供试品溶液中总黄酮的浓度,进一步计算人面果叶中总黄酮平均含量为3.93%,结果见表5。

表5 人面果叶总黄酮含量

样品编号	称样量/mg	吸光度值	总黄酮含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
1	101.4	0.520 6	4.013	3.930	0.751%
2	100.9	0.514 9	3.969		
3	100.1	0.506 3	3.903		

3 讨论

本实验对比了《中华人民共和国药典》常用的方法:NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH和AlCl₃-CH₃COONa/

CH₃COOH 比色法,发现 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法在显色后样品稳定性较差,不适合作为人面果叶总黄酮含量的测定方法。在进行 AlCl₃-CH₃COONa/CH₃COOH 比色法研究过程中,分别比较了以芦丁和 Fukugetin 为对照品的显色情况,发现 Fukugetin 的最大吸收波长能更好地与供试品重合,且 Fukugetin 系从人面果叶中分离得到的双黄酮单体化合物,具有良好的降血糖作用,所以采用 Fukugetin 作为该法对照品,以提高方法的专属性。优化了 AlCl₃-CH₃COONa/CH₃COOH 比色法的显色条件,确立了人面果叶总黄酮含量测定方法,为后续人面果叶质量标准研究提供了依据。

参考文献

- [1] 林艳芳,依专,赵应红.中国傣医药彩色图谱[M].云南:云南民族出版社,2003:6.
- [2] Konoshima M, Ikeshiro Y, Miyahara S, et al. The constitution of biflavonoids from *Garcinia* plants[J]. Tetrahedron Lett. 1970, 48(11):4203-4206.
- [3] Baslas R K, Kumar P. Chemical examinaion of the fruits of *Garcinia xanthochymus*[J]. Curr Sci, 1979, 48:814-815.
- [4] Baslas R K, Kumar P. Isolation and characterisation of biflavanone and xanthenes in the fruits of *Garcinia xanthochymus*[J]. Acta Ciencia Indica, 1981, 7(5):31-34.
- [5] Singh M P, Parveen N, Khan N, et al. Constituents of *Garcinia xanthochymus*[J]. Fitoterapia, 1991, 62:286-289.
- [6] Chanmahasathien W, Li Y S, Satake M, et al. Prenylated xanthenes with NGF-potentiating activity from *Garcinia xanthochymus*[J]. Phytochemistry, 2003, 64(5):981-986.
- [7] Chanmahasathien W, Li Y S, Satake M, et al. Prenylated Xanthenes from *Garcinia xanthochymus*[J]. Chem. Pharm. Bull, 2003, 51(11):1332-1334.
- [8] Han Q B, Qiao C F, Song J Z, et al. Cytotoxic prenylated phenolic compounds from the twig bark of *Garcinia xanthochymus*[J]. Chem. & Biodivers, 2007, 4(5):940-946.
- [9] 刘流,李芸芳,甘飞,等.人面果叶的化学成分研究[J].中国中药杂志,2016,41(11):2098-2104.
- [10] 付蒙,胡鑫,徐婧,等.人面果叶、根部、果实提取物体外抗糖尿病活性成分研究[J].天然产物研究与开发, 2014, 26(2):255-259.
- [11] Li Y F, Chen Y, Xiao C Y, et al. Rapid screening and identification Of α -amylase inhibitors from *Garcinia xanthochymus* using enzyme-immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC and MS[J]. J. Chromatogr. B, 2014, 960:166-173.
- [12] Li Y F, Xu J, Chen Y, et al. Screening of inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β From traditional Chinese Medicines using enzyme-immobilized magnetic beads combined with high-performance liquid chromatography[J]. J. Chromatogr. A, 2015, 1425:8-16.
- [13] 郑健,陈焕文,刘宏伟,等.紫外可见分光光度法在药物分析中的应用[J].分析科学学报, 2002, 18(2):158-163.
- [14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:396-397.
- [15] 迟玉新,窦德强.楮实子与构树叶中总黄酮含量测定[J].中国现代中药,2008,10(11):16-17.

(收稿日期 2018-03-14)

(上接第1104页)

- [12] 肖娟,蔡萍,万丹,张水寒.不同粉体二妙丸 HPLC 指纹图谱对比研究[J].中国现代中药,2015,17(12):1331-1335.
- [13] 康馨元,刘睿,李春楠,等.山羊角药材的 HPLC 指纹图谱研究[J].中国现代中药,2015,17(5):453-457.
- [14] 李光,陈曦,李宜航,等.不同产地肾茶 HPLC 指纹图谱研究[J].中国现代中药,2013,15(6):448-451.
- [15] 宋健,王颖,石俊英.山东地产药材桔梗的 HPLC 指纹图谱研究[J].中国现代中药,2011,13(9):21-23.
- [16] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:蒙药分册[M].1998:25.

(收稿日期 2018-02-02)