

金银花中总黄酮的光谱分析及抗氧化性能测定

侯冬岩^{*1,2},回瑞华^{1,2},杨梅²,唐蕊²,刘晓媛¹,朱永强¹

(1. 鞍山师范学院化学系,鞍山 114005; 2. 辽宁师范大学化学系,大连 116029)

摘要:采用超声波法从金银花中提取黄酮类化合物,并建立了金银花中总黄酮的光谱分析方法。本法的回收率为98.0%~103.0%,RSD<0.62%。并用流动注射化学发光法研究了金银花的抗氧化性能,实验结果表明:金银花具有较强的抗氧化性能。

关键词:金银花;黄酮;光谱分析;流动注射化学发光;抗氧化性

中图分类号:O657.31

文献标识码:A

文章编号:1000-0720(2004)11-0052-04

金银花(*Lonicera Similis Hemsl.*),为忍冬科(Caprifoliaceae)忍冬属(*Lonicera L.*)植物的花蕾或初开的花^[1],生于山坡、路旁灌丛或疏林中。分布北起辽宁,西至陕西,南达广西北部,西南至贵州、云南省区^[2]。金银花具有清热解毒、凉散风热之功效。用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热血毒痢、风热感冒、温病发热等疾病^[3],金银花对大肠杆菌、伤寒杆菌、结核杆菌等亦有很强的抑制作用^[4,5]。近年来研究表明用金银花以及金银花和其它中草药合理配伍对预防和治疗病毒性疾病屡见报道^[6]。现代医学研究表明,黄酮类化合物具有降低心肌耗氧量,使冠脉、脑血管流量增加,抗心律不齐、软化血管、降血糖、血脂等作用,同时它还是一种天然的抗氧化剂,具有清除人体中超氧离子自由基抗衰老和增加机体免疫力的作用。本文采用超声波法从金银花中提取黄酮类化合物,并建立了金银花中总黄酮的光谱分析方法。利用流动注射化学发光法研究了金银花的抗氧化性能。实验结果表明,金银花能有效的抑制超氧阴离子自由基诱导的鲁米诺化学发光,并且随着发光体系中金银花浓度的升高,发光强度呈现下降趋势。该实验结果显示,金银花具有较强的抗氧化性能。这将为进一步开发利用金银花提供了科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

TU-1201紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),旋转蒸发仪 RE52CS型(上海亚荣生化仪器厂),IFFM-D型流动注射化学发光仪(西安瑞迈电子科技有限公司)。芦丁黄酮标准品(中国药品生物制品鉴定所)。

芦丁黄酮标准储备液(0.244 mg/mL):称取0.0244 g 芦丁标准品,置于100 mL的容量瓶中,加乙醇(95%)使其溶解稀释至刻度,备用。

金银花样品:于2002年5月采自岫岩、千山,鲜花经25℃自然干燥而成。邻苯三酚:用0.01 mol/L HCl配成0.01 mol/L 储备液,使用前用水稀释浓度为 5×10^{-5} mol/L; 0.01 mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲溶液:用前新鲜配制,pH用酸度计准确调至9.95; Luminal溶液:用0.05 mol/L NaOH溶液配成0.05 mol/L,在避光处保存。所用试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。

1.2 超声波法提取金银花中总黄酮

精密称粉碎(0.6 mm)后的金银花粉10.00 g,放入锥形瓶中,加入95%乙醇50 mL,在冰水浴中用超声波振荡器振荡20 min,将提取液过滤至100 mL容量瓶中,残渣再重复振荡提取两次,三次滤液合并,在水浴上减压蒸馏,得浸膏0.8550 g,然后用95%乙醇溶解,并用95%乙醇溶液定容至刻度,备

收稿日期:2003-11-15;修订日期:2004-02-02

基金项目:辽宁省教育厅科学技术基金资助课题(20331079)

作者简介:侯冬岩(1962-),男,教授

用^[7]。

1.3 吸收曲线的绘制及测定波长的确定

从金银花超声波法提取贮备液中,移取试液4 mL,置于25 mL的容量瓶中,加入50 g/L的NaNO₂溶液1 mL,摇匀,放置6 min,加入100 g/L的Al(NO₃)₃溶液1 mL,摇匀,放置6 min,加入40 g/L的NaOH溶液10 mL。然后用95%乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,放置15 min,以NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH的95%乙醇溶液为参比液,在400~800 nm范围内扫描,得到其吸收光谱,最大吸收波长为510 nm。

移取上述芦丁黄酮标准贮备液4 mL置于25 mL容量瓶中,加入50 g/L的NaNO₂溶液1 mL,摇匀,放置6 min,加入100 g/L的Al(NO₃)₃溶液1 mL,放置6 min,加入40 g/L的NaOH溶液10 mL。然后用95%乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,放置15 min,以NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH的95%乙醇溶液为参比液,在400~800 nm范围内扫描,得到其吸收光谱,最大吸收波长为510 nm。由以上实验可知,超声波法提取金银花中总黄酮可用芦丁作黄酮标准品,测定波长为510 nm。

1.4 邻苯三酚-碳酸盐缓冲溶液-Luminol发光体系及其测定

在比色管中分别加入 5×10^{-5} mol/L的邻苯三酚溶液、pH为9.95的碳酸盐缓冲溶液(含浓度为0.2 mmol/L的Luminol),启动IFFM-D型流动注射化学发光仪,按图1连接流路,流速均为2.5 mL/min,测出邻苯三酚-碳酸盐缓冲溶液-Luminol发光体系的发光,测3次,取峰值平均值进行定量。发光强度以计数表示。

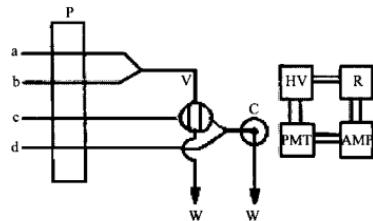


图1 流动注射化学发光分析流路图

Fig.1 Schematic diagram of flow-injection chemiluminescence
P—蠕动泵;V—进样阀;C—流通池;PMT—光电倍增管;AMP—放大器;HV—负高压:800 V;R—记录仪;W—废液;a—样品;b—邻苯三酚;c—H₂O;d—Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲溶液

1.5 抗氧化性测定及抑制率计算

按1.4所采用的发光体系,测定一系列浓度金银花抑制后的发光,分别测定3次,同样取峰值平均值进行定量。发光强度以计数表示。以邻苯三酚-碳酸盐缓冲溶液-Luminol发光体系的发光强度为空白发光峰值,可计算出加入金银花后抑制发光的程度。

$$\text{抑制率} \% = (\text{空白发光峰值} - \text{加金银花后的发光峰值}) / \text{空白发光峰值} \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

分别移取2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mL的芦丁标准储备液,于25 mL容量瓶中,按1.3步骤在其波长为λ=510 nm分别测定其吸光度并且给出A值。求得A与质量浓度关系的回归方程为:

$$A = 5.411 \times 10^{-3} \rho - 0.3938 \times 10^{-3}$$

根据A与浓度的关系可绘制出线性很好的标准曲线。求得相关系数r=0.9999,经查表得临界相关系数r_(99%, n-2)=0.9170,r>r_(99%, n-2),说明黄酮的质量浓度在19.5~117.1(μg/mL)范围内,A与质量浓度ρ之间呈良好的线性关系,可按标准曲线法进行定量分析。

2.2 稳定性实验

用与绘制吸收曲线相同的配制方法配制的样品进行稳定性实验,结果表明:样品放置3 h以上,测得其吸光度不变。

2.3 回收率及方法精密度

根据前面确定的测试条件,按上述实验方法制备6个不同质量浓度的样品,加入标准物,在测定波长下测定A,求得其平均回收率及RSD,结果分别列于表1和表2。

表1 方法精密度(n=9)

Tab.1 Precision of the method

编 号	取样质量浓度 $\rho / (\mu\text{g/mL})$	测量值 $\rho / (\mu\text{g/mL})$	平均值 $\rho / (\mu\text{g/mL})$	RSD /%
1	15.6	15.3~15.5	15.4	0.25
2	31.2	30.5~31.0	30.7	0.62
3	46.8	47.3~47.6	47.5	0.28
4	62.4	62.3~62.8	62.5	0.27
5	78.0	77.9~78.7	78.3	0.33
6	93.6	92.6~93.6	93.1	0.35

表2 方法回收率

Tab. 2 Recovery of the method

样品编号	加入前 $\rho/(\mu\text{g/mL})$	加入量 $\rho/(\mu\text{g/mL})$	实测值 $\rho/(\mu\text{g/mL})$	回收率/%
1	22.3	7.8	29.9	98.0
2	44.8	7.8	52.8	103
3	67.0	7.8	74.8	100

2.4 样品分析

精密称取金银花药材粉末2 g,按1.2、实验方法制备样品溶液,按操作条件,在测定波长 $\lambda = 510 \text{ nm}$ 处测其吸光度,分析结果列于表3。

表3 金银花样品中黄酮的分析结果

Tab. 3 Analytical results of flavonoids in *Ionicera similis hemsl*

样品编号	产地	提取方法	黄酮/w%
1	岫岩	超声波法	8.55
2	千山	超声波法	8.12

实验结果表明辽宁岫岩、千山的金银花中含有丰富的黄酮类化合物,提取方法对提取金银花中的黄酮有一定的影响,将加热回流法提取金银花中总黄酮与超声波法提取金银花中总黄酮进行了对比,结果表明超声波法提取金银花中的总黄酮产率要多,提高了原料的利用率,提取时间较短,而且方法的准确度和精密度较高,是一种值得采用的方法。

在黄酮类化合物的定量分析中,采用光谱分析方法可在特定的碱性条件下加入显色剂呈现特征颜色。进行测定时,可加入亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠,作为显色剂,可排除其它物质的干扰,从而提高测定准确度。

2.5 Luminol 浓度对抑制率的影响

移取浓度为 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的邻苯三酚溶液,pH 9.95的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液,抑制实验中的金银花质量浓度为2 mg/mL,改变Luminol的用量,分别取50、100、150、200、250、500 μL 、1 mL的Luminol用缓冲溶液将其稀释至25 mL进行实验。结果可以看出,Luminol的加入量对抑制率有一定的影响。当Luminol的浓度为0.2 mmol/L时金银花的抑制率达到最大值。因此本实验选Luminol的浓度为0.2 mmol/L。

2.6 缓冲溶液的pH值对抑制率的影响

移取浓度为 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的邻苯三酚溶液,浓度为0.2 mmol/L的Luminol溶液,抑制实验中金银花的质量浓度为2 mg/mL,仅改变 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液的pH进行实验。实验结果可以看出,pH对抑制率有一定的影响,当pH 9.62时抑制率达到最大值,但是其发光强度很低,灵敏度不好;当pH 10.58时,抑制率低;当pH 9.95时,抑制率和pH 9.62时的抑制率仅差2%,而且发光强度适宜,灵敏度也比较好,便于准确读数。故本实验选pH 9.95为适宜的测定条件。

2.7 邻苯三酚浓度对抑制率的影响

移取pH 9.95的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液,浓度为0.2 mmol/L的Luminol溶液,抑制实验中金银花的质量浓度为2 mg/mL,仅改变邻苯三酚的浓度,分别取浓度为0.01 mol/L、邻苯三酚0.25 mL、0.125 mL、0.1 mL、0.025 mL稀释至25 mL,即得浓度为 1×10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的3种邻苯三酚溶液进行实验。实验结果可知,邻苯三酚的浓度对抑制率也有一定的影响。可以看出当邻苯三酚的浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时芦荟的抑制率达到最大值。因此本实验选邻苯三酚浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

由以上实验可得出测定芦荟的抗氧化性能的最佳条件为:Luminol的浓度0.2 mmol/L,缓冲溶液的pH 9.95,邻苯三酚的浓度 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

2.8 金银花抗氧化性能的测定

在选定的最佳条件下,移取质量浓度为5 mg/mL金银花溶液配制成0.1、0.4、0.5、1.0、1.5、2.5、3.5 mg/mL一系列质量浓度的溶液进行实验。实验结果得图2。

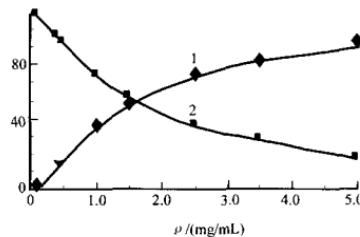


图2 金银花抗氧化性测定

Fig. 2 Determination of the antioxidation effect of *Ionicera similis hemsl*

1 - 抑制剂; 2 - 相对发光强度

由上图1可以看出,随着金银花质量浓度的逐渐增加,化学发光强度呈现逐渐降低的趋势,而抑制率则呈现逐渐增强的趋势,说明金银花具有较强的抗氧化性能,且呈现量效关系。金银花的 IC_{50} (抑制率为50%时的溶液的质量浓度)为1.56 mg/mL。

参考文献

- [1] 中国科学院北京植物研究所主编.中国高等植物图鉴(第四册).北京:科学出版社,1975,296:758
- [2] 石 铖,石任兵,陆蕴如.中国药学杂志,1999,34(11):724
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会编.中华人民共和国药典(1990年版.一部).北京:人民卫生出版社.化学工业出版社,U90:190
- [4] 苏新医学院编.中药大辞典.北京:人民卫生出版社,1977. 1289
- [5] 董杰德.山东中医学院学报,1993,17(4):46
- [6] 回瑞华,关崇新,侯冬岩.鞍山师范学院学报,2000,12(4):87

Determination of total flavonoids and the antioxidation effect of *Lonicera similis* Hemsl HOU Dong-yan, HUI Rui-hua, LIOU Xiao-yuan, ZHU Yong-qiang (Department of Chemistry, Anshan Normal University, Anshan 114005), HOU Dong-yan, HUI Rui-hua, YANG Mei and TANG Rui (Department of Chemistry, Liaoning Normal University, Dalian 116029), Fenxi Shiyanshi, 2004, 23(11): 52~55

Abstract: The ultrasonic method was used for extracting flavonoids in *Lonicera similis* Hemsl and the flavonoids were determined by spectrophotometry. The recovery is 98.0% ~ 103.0% and the coefficient of variation is less than 0.62%. The antioxidation effect of *Lonicera Similis* Hemsl was studied by flow-injection chemiluminescence. The results show that *Lonicera Similis* Hemsl has strong antioxidative effect.

Keywords: *Lonicera similis* Hemsl; Flavonoids; Spectrophotometry; Ultrasonic method; Flow-injection chemiluminescence method; Antioxidative effect