

基于直接紫外法和 HPLC 研究南蛇藤果总黄酮含量和纯度

齐艺彤 王瑞鑫 李洪福 刘洋露 周晶晶*

华北理工大学, 河北唐山, 063210;

摘要: 目的: 研究南蛇藤果不同洗脱部位的总黄酮含量, 并测定其纯度。方法: 本文旨在用南蛇藤果中山萘苷为标准品, 超声溶解各种待测样品, 采用紫外分光光度法中的直接紫外法在 347 nm 处检测南蛇藤果不同洗脱部位总黄酮含量; 采用面积归一化法分析得到各样品总黄酮纯度。结果: 直接紫外法测定总黄酮在 50–250 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 测得 30%乙醇洗脱部分含量和纯度分别为 39.39%、67.41%, 70%洗脱部位含量和纯度分别为 55.32%、87.67%, NST-TF 含量和纯度分别为 75.12%、91.58%。结论: 直接紫外法和面积归一化法简便、准确, 为后续南蛇藤果总黄酮的药理活性研究奠定物质基础。

关键词: 南蛇藤果; 总黄酮测定; 面积归一化法; 直接紫外法

DOI: 10.69979/3029-2808.25.05.036

南蛇藤果, 为卫矛科植物南蛇藤的干燥果实。味甘微苦性平, 具有养心安神, 和血止痛之功效^[1]。南蛇藤果具有脂肪油、黄酮类、萜类、生物碱等^[2]多种化学成分, 其中黄酮类成分是南蛇藤果中含量较多的活性成分, 本课题组前期研究发现南蛇藤果抗血栓活性的主要有效成分为黄酮类成分^[3]。现代药理研究发现其在抗肿瘤、降血糖、抗炎^[4]方面有显著作用, 具有很大的开发利用价值。

黄酮类化合物主要存在于南蛇藤属植物的叶、果实等部位^[5], 是抗炎、抗氧化^[6]活性成分。总黄酮测定方法有紫外分光光度法^[7], 荧光分光光度法^[8], 高效液相色谱法^[9]等。高效液相色谱法用于定量分析时需要的对照品较多, 色谱分离条件很难确定; 荧光分光光度法的荧光光强不高、荧光维持时间短。分光光度法是目前应用较多的食品药品分析方法^[10]。目前对南蛇藤果的黄酮类成分的研究较少, 因此本课题针对南蛇藤果黄酮类含量和纯度的研究具有很好的应用价值。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂

分析纯乙醇购自津东天正公司。色谱纯乙腈、甲醇购自津东天正公司。芦丁标准品购自麦克林生物有限公司。

1.1.2 实验仪器

LC-20AT 液相色谱仪购自日本岛津公司。SP ODS-A Q C18 反相色谱柱反相色谱柱购自北京慧德易科技有限

公司。TU-1810 型紫外可见分光光度计购自南京菲奇工贸有限公司。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液制备

精密称量 50.01 mg 的山萘苷样品, 70%乙醇溶解, 并定容至 25.00 mL 容量瓶中, 得到山萘苷储备液, 将其稀释成 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL 的标准溶液, 于 347 nm 测得吸光度,

1.2.2 不同洗脱部位的样品溶液制备

精密称取 30%洗脱部分 (NST-30%) 10.06 mg, 70%洗脱部分 (NST-70%) 10.05mg, 总黄酮 (NST-TF) 部分 10.06 mg, 分别加 70%乙醇溶解并定容至 100.00 mL, 配制为 0.10 mg/mL 溶液。

1.2.3 总黄酮含量测定方法

精密吸取 1.00 mL 0.10 mg/mL 的 NST-30%、NST-70%、NST-TF 和山萘苷溶液, 用 70%乙醇定容至 10.00 mL 容量瓶中。用 70%乙醇做空白基线, 于 347 nm 测得吸光度, 计算总黄酮含量。

1.2.4 总黄酮纯度测定方法

采用面积归一化法^[11], 分别称取 10.00 mg 山萘苷、NST-30%、NST-70%、NST-TF, 用甲醇溶解并定容至 100.00 mL 配制为 0.10 mg/mL 溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 作为样品溶液。

1.2.5 色谱条件

通过 HPLC 面积归一化法进行纯度测定实验, 检测波长为 360 nm, 流速为 1.00 mL/min, 进样量 10.00

μL 。流动相为乙腈 (A) -0.1% 的甲酸水 (B)，洗脱程序为：0~15 min, A 相 18%; 15~25 min, A 相 25%; 25~30 min, A 相 30%; 30~40 min, A 相 45%; 40~60min, A 相 100%。

2 结果与分析

2.1 直接紫外法测定不同洗脱部位的总黄酮含量的结果

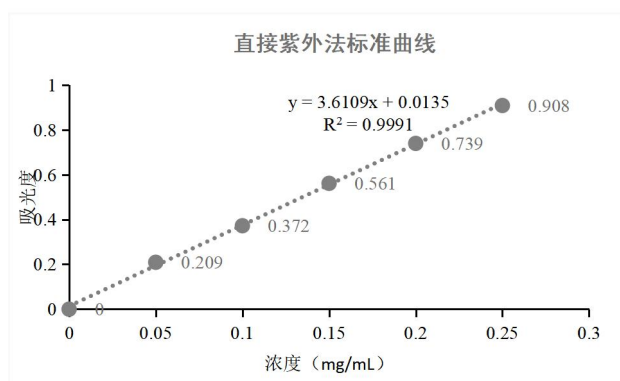


图 1 直接紫外法标准曲线

山萘苷的标准曲线如图 1 所示,标准曲线方程 $A=3.6109C+0.0135$, $R^2=0.9991$, 表明山萘苷在 50~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好, 适用于后续样品中山萘苷含量的测定。各样品测定结果见表 1。

表 1 各洗脱部位总黄酮含量和吸光度结果

样品	含量 (%)	吸光度
NST-30%	39.39	0.298
NST-70%	55.32	0.413
NST-TF	75.12	0.556

由表 1 可知: 随着洗脱溶剂极性降低, 总黄酮含量显著提高, NST-70% 总黄酮含量较初始提取物增幅约为 40.44%; NST-TF 富集效果最佳, 较初始提取物提高约 90.71%。

2.2 不同洗脱部位总黄酮的纯度测定结果

进行色谱分析得到如图 2-6 所示的结果:

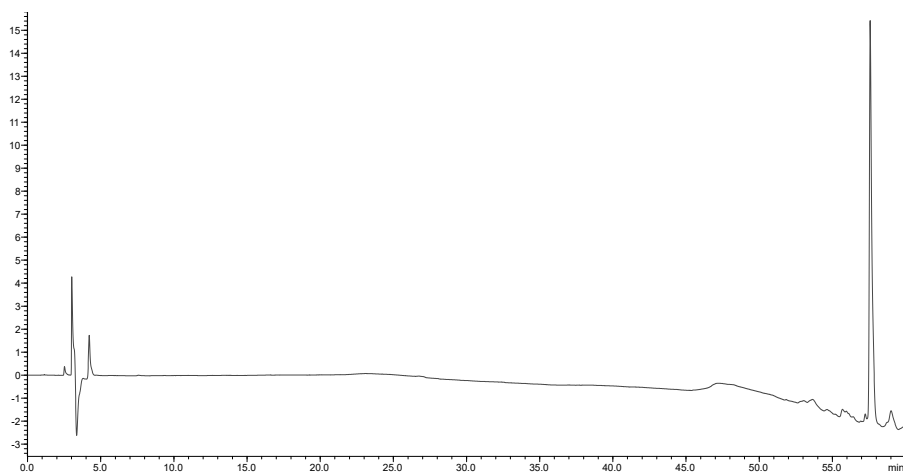


图 2 空白甲醇液相色谱图

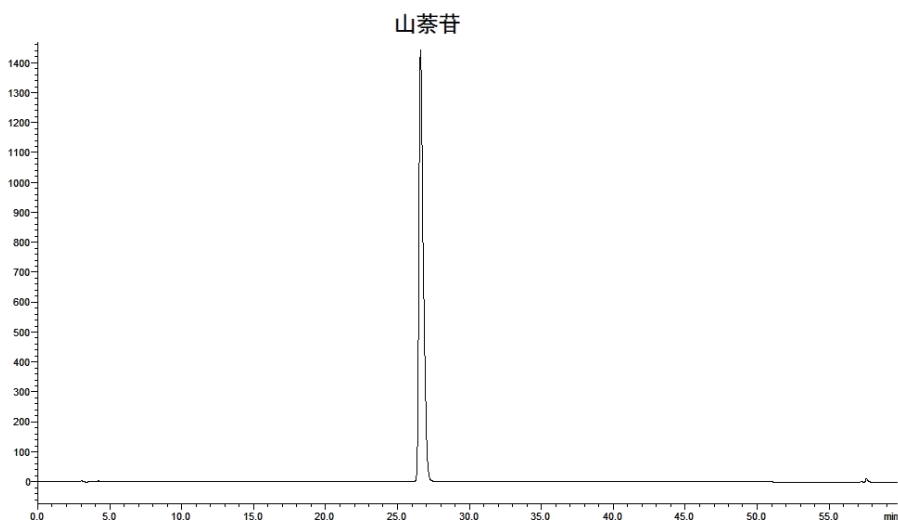


图 3 山萘苷对照品的色谱图

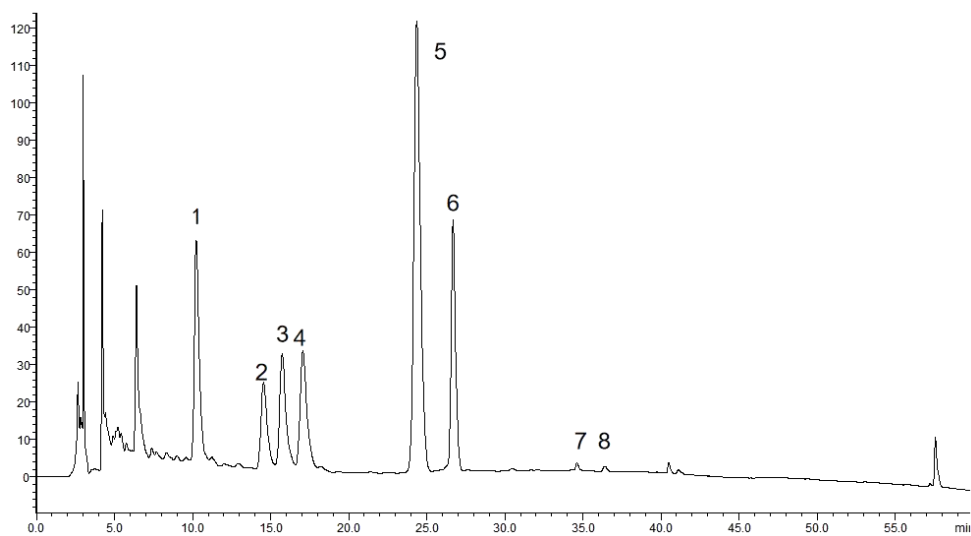


图 4 30%乙醇洗脱部分液相色谱图

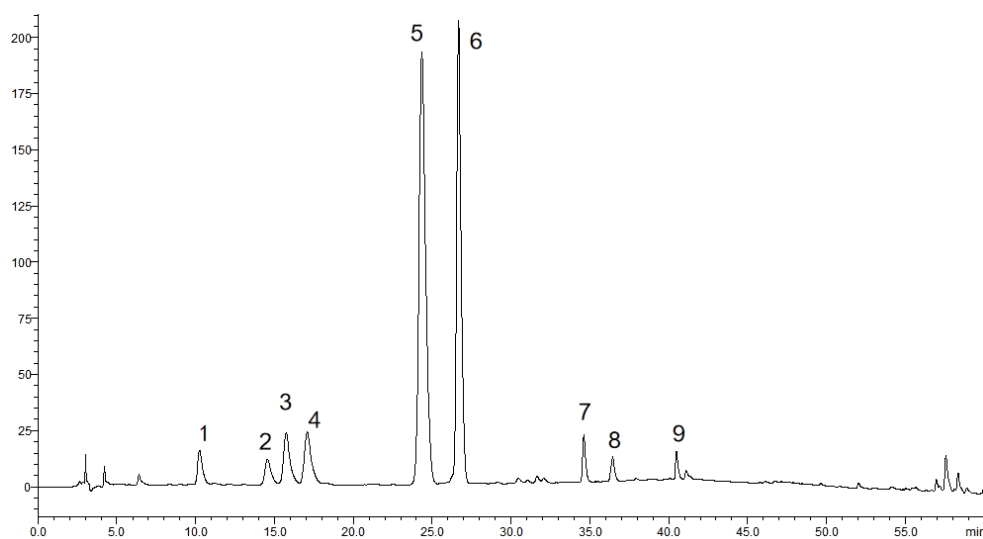


图 5 70%乙醇洗脱部分液相色谱图

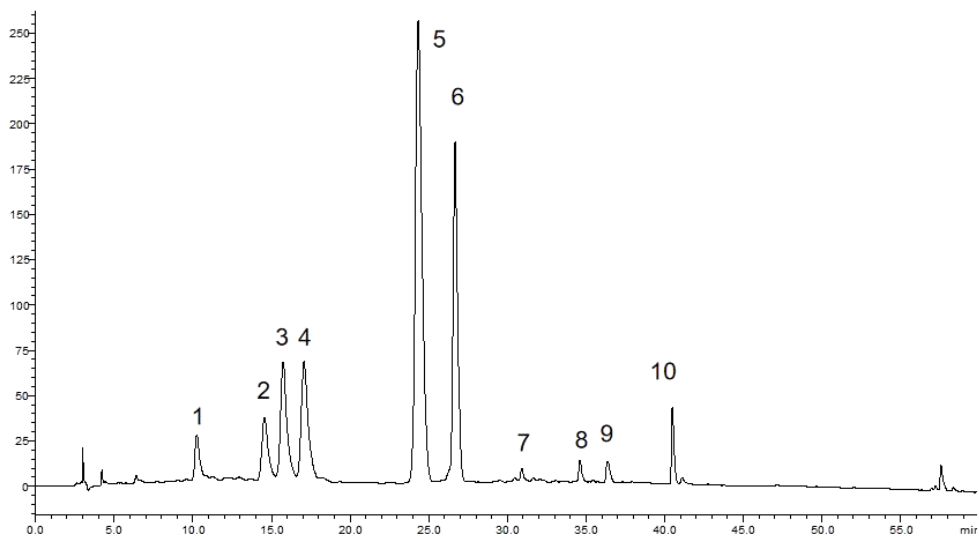


图 6 总黄酮部分液相色谱图

表 2 山奈苷及各洗脱部位总黄酮纯度

	黄酮成分峰面积总和	色谱图峰面积总和	纯度 (%)
山奈苷	30879116	31328519	99.91
NST-30%	9090710	13485946	67.41
NST-70%	12500278	14258993	87.67
NST-TF	18112755	19777309	91.58

由表 2 可见, NST-70%较 NST-30%样品的纯度提了 3 0.05%, 而 NST-TF 较 NST-70%又提高了 4.46%, 随着成分富集, 总黄酮的纯度逐步递增, 为后续南蛇藤果总黄酮的药理活性研究奠定物质基础。

3 讨论

本研究通过直接紫外法和 HPLC 对南蛇藤果不同洗脱部位的总黄酮含量及纯度进行了系统分析, 揭示了其黄酮类成分的分布特征, 并验证了方法的适用性。

实验结果表明, 直接紫外法在测定南蛇藤果总黄酮含量时优势显著: 无需复杂显色步骤, 操作简便且耗时短。标准曲线显示, 山奈苷在 50 - 250 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 适用于快速批量检测。

在纯度测定中, 采用高效液相色谱法的面积归一化法对总黄酮纯度进行了测定, 测得 NST-30%、NST-70%样和 NST-TF 纯度为 67.41%、87.67%和 91.58%, 为后续南蛇藤果总黄酮的药理活性研究奠定物质基础。

4 结论

本实验建立了直接紫外法和面积归一化法测定南蛇藤果各洗脱部位总黄酮含量和纯度的方法, 确保南蛇藤果总黄酮的药效成分, 该研究为南蛇藤果总黄酮的体内、外抗血栓、抗肿瘤、降血糖等药理活性提供物质基础。

参考文献

[1] 罗堃, 王元清, 严建业, 等. 药用植物南蛇藤的应用及研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育 2013, 11 (14): 160-164.
[2] 回瑞华, 侯冬岩, 李铁纯, 等. 南蛇藤果和果壳挥发油的化学成分分析[J]. 鞍山师范学院学报, 2022, 2

4(06): 24-27.

[3] Jingjing Z, Jianxiu Z, Wenlin Z, et al. The antithrombotic activity of the active fractions from the fruits of *Celastrus orbiculatus* Thunb through anti-coagulation, anti-platelet activation and anti-fibrinolysis pathways[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 241: 111974.
[4] 郭远强. 南蛇藤果实化学成分和药理活性研究[D]. 沈阳药科大学, 2004.
[5] 杨蒙蒙, 佟丽, 陈育尧. 南蛇藤不同提取部位的抗炎作用实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2004(04): 241-243.
[6] 陈超, 任超翔, 鲜彬, 等. 中药黄酮类成分生物合成分子调控研究进展[J]. 中药材, 2023, (12): 3163-3170.
[7] 莫梓轩, 常国欣, 袁玥, 等. 益母草属植物黄酮类化学成分、含量测定及药理作用的研究进展[J/OL]. 云南民族大学学报(自然科学版), 1-18.
[8] 罗喜荣, 黄静, 杨军, 等. 荧光分光光度法测定瑞香狼毒中总黄酮的含量[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(17): 9260-9261.
[9] 胡倩莲, 张婕妤, 梅格格, 等. 高效液相色谱法测定半枝莲不同富集方法所得总黄酮的含量[J]. 中南药学, 2021, 19(04): 714-718.
[10] 包强, 刘丽梅, 王延玲, 等. 中药材有效部位总黄酮含量测定方法研究概述[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(04): 136-140.
[11] 张启明, 李慧义. 色谱分析中面积归一化法测定有关物质的弊与利[J]. 中国药品标准, 2005, (04): 45-46.

基金项目: 河北省自然科学基金 (H2022209053), 河北省大学生创新创业计划 (S202410081141)
第一作者: 齐艺彤 (2006—), 女 (汉), 本科生, 研究方向: 天然产物的提取与活性评价。
通讯作者: 周晶晶 (1985—), 女 (汉), 讲师, 博士, 研究方向: 中药药效物质基础的研究。