

# 紫外可见分光光度法测定无花果叶提取物中总黄酮的含量<sup>Δ</sup>

罗晓梅\*, 张 吟#, 黄丹丹, 张淑芬, 许秋霞(福建医科大学附属第二医院药学部临床药理学室, 福建泉州 362000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)15-2111-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.15.35

**摘要** 目的:建立测定无花果叶提取物中总黄酮含量的方法。方法:采用紫外可见分光光度法,以芦丁为对照品,采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法,在510 nm波长处对无花果叶提取物的总黄酮含量进行测定。结果:芦丁质量浓度在0.05~0.50 mg/ml范围内与吸光度呈良好的线性关系( $r=0.999\ 9$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD均 $<2\%$ ;平均加样回收率为98.68%,RSD=1.50%( $n=9$ )。无花果叶黄酮提取物的总黄酮含量均值为9.47%。结论:该方法操作简便、准确,稳定性和重复性良好,适用于无花果叶提取物中总黄酮的含量测定。

**关键词** 无花果叶;总黄酮;紫外可见分光光度法

## Content Determination of Total Flavonoids in Extracts from *Ficus Carica* Leaves by UV-visible Spectrophotometry

LUO Xiao-mei, ZHANG Yin, HUANG Dan-dan, ZHANG Shu-fen, XU Qiu-xia (Clinical Pharmaceutics Room, Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian Quanzhou 362000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of total flavonoids in extracts from *ficus carica* leaves. METHODS: The content of total flavonoids in extract from *ficus carica* was determined by UV-visible spectrophotometry with Al (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaNO<sub>2</sub>-NaOH color-test at the wavelength of 510 nm with the reference of rutin. RESULTS: There was a good linear relationship between the quality concentration of rutin and the absorbance in the range of 0.05-0.50 mg/ml ( $r=0.999\ 9$ ). The RSDs of precision, stability and reputability test were less than 2% and the average recovery was 98.68% (RSD=1.50%,  $n=9$ ). The average content of total flavonoids in extract from *ficus carica* leaves was 9.47%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reproducible and stable, and can be used for the content determination of total flavonoids in extract from *ficus carica* leaves.

**KEYWORDS** *Ficus carica* leaves; Total flavonoids; UV-visible spectrophotometry

析,因此确定乙腈-水-磷酸作为本研究的流动相<sup>⑤</sup>。随后又分别考察了25、30、35℃3个检测柱温,结果表明色谱柱检测温度在35℃时,分离度最好、峰形较好。故选择柱温为35℃条件下进行茯苓皮药材HPLC指纹图谱检测。

### 3.3 检测波长的选择

使用DAD检测器进行紫外区全波长扫描,在210 nm波长下,色谱图基线噪音较低,特征峰响应较高,色谱峰信息较完全。综合比较后,选择210 nm作为本研究的检测波长。

综上所述,本试验建立了茯苓皮药材的HPLC指纹图谱,并采用不同分析方式将18批茯苓皮药材分为两大类<sup>⑥</sup>。虽然上述两大类茯苓皮HPLC指纹图谱十分相似,但3、6、9、14批茯苓皮样品的各成分质量分数低于其他批号茯苓皮样品,表明3、6、9、14批茯苓皮样品质量次于其他批号的茯苓皮样品。

<sup>Δ</sup> 基金项目:福建省科技计划资助项目(No.2012Y0025);国家卫生计生委共建科学研究基金(No.WKJ-FJ-13);福建省教育厅科技计划项目(No.JA12160)

\* 药师。研究方向:临床药理学。电话:0595-22792100。E-mail: 237389379@qq.com

# 通信作者:副主任药师,博士。研究方向:临床药理学。E-mail: zyin1973@163.com

由此提示茯苓皮药材的质量与土壤类型、盖土厚度、海拔、纬度、气候条件、菌种、种植方法等密切相关,其具体原因有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:224.
- [2] 张怡莎,陈华国,周欣,等.不同产地茯苓及茯苓皮中多糖成分的研究[J].贵州师范大学学报:自然科学版,2010,28(3):101.
- [3] 於小波,管俊峰,王金波,等.我国茯苓药材主要产区资源调查[J].时珍国医国药,2011,22(3):714.
- [4] 张琦,王振中,萧伟,等.茯苓UPLC特征指纹图谱[J].中国中药杂志,2012,37(7):966.
- [5] 曾超,陆东,段伟昌,等.肉桂配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2014,25(7):635.
- [6] 陈蓉,沈蓓,吴启南.基于主成分分析和聚类判别模式对不同产地茯苓HPLC指纹图谱研究[J].中成药,2012,34(5):781.

(收稿日期:2014-08-19 修回日期:2014-11-09)

(编辑:余庆华)

无花果叶为桑科榕属植物无花果(*Ficus carica* L.)的叶。无花果在全国各地广有栽培,主要分布于新疆、江苏、山东、广西、浙江、福建、上海、四川、陕西、甘肃、江西、广东、河南等省<sup>[1-3]</sup>。近年来研究发现,无花果叶具有降血脂、降血糖、抗氧化活性及镇静催眠等作用<sup>[4-5]</sup>,其所含化学成分有香豆素类物质、黄酮类物质、苯甲醛、糖类、微量元素、维生素C等<sup>[6]</sup>,是一种具有开发应用前景的药用资源。本课题组的前期研究表明,无花果叶提取物含有一定量的黄酮类化合物、补骨脂素、佛手苷内酯<sup>[7]</sup>。目前,对黄酮类化合物的含量测定主要有紫外分光光度法和高效液相色谱(HPLC)法<sup>[8-10]</sup>。在实际生产和科研过程中,对于黄酮单体的定量,常采用HPLC法;而对总黄酮的含量测定,考虑到方法的简便、快捷以及可行性,多采用紫外分光光度法,其基本原理为这类化合物在亚硝酸钠碱性溶液中能与铝离子( $Al^{3+}$ )产生高灵敏度的橙红色配合物<sup>[11]</sup>。目前,紫外分光光度法主要有直接测定法、亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法、三氯化铝显色法。本课题组选取亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法对无花果叶提取物中的总黄酮进行了含量测定,以期对无花果叶黄酮提取物的质量控制提供可靠依据。

## 1 材料

UV-vis8453型紫外可见分光光度计(美国Agilent公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司);EYE-LA旋转蒸发器(日本东京理化株式会社);SHZ-D型台式循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);FD-1型冷冻干燥机(上海市英峪仪器厂);Mili-Q Academic超纯水系统(美国Millipore公司)。

芦丁标准品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707);氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、三氯化铝、无水乙醇为分析纯,水为超纯水。

无花果叶采自福建省莆田市绿阳农业开发有限公司林山无花果基地。

## 2 方法与结果

### 2.1 无花果叶提取物制备

无花果叶采摘后,用清水洗去表面的灰尘和杂质,晒干,粉碎脱脂。称取无花果叶粉末,用5倍量石油醚超声(功率:400 W,频率:40 kHz)振荡脱脂10 min,重复脱脂3次,自然阴干备用,称取脱脂后的无花果叶粉末80 g,加入40%乙醇4 000 ml,浸泡过夜,超声(功率:400 W,频率:40 kHz)处理30 min,提取温度为70℃。所得提取液置于旋转蒸发器中浓缩得浓缩液,再经冷冻干燥后得灰黑色粉末状提取物<sup>[12]</sup>。

### 2.2 样品溶液的制备

精密称取无花果叶黄酮提取物干燥粉末约0.70 g,置于100 ml量瓶中,用40%乙醇定容,摇匀,即得样品溶液。

### 2.3 对照品溶液的制备

精密称取芦丁标准品50.0 mg,置于50 ml量瓶中,用40%乙醇定容,摇匀,即得对照品溶液。

### 2.4 最大吸收峰的确定

精密吸取芦丁对照品溶液3 ml、样品溶液0.5 ml,分别置于10 ml量瓶中,加入40%乙醇至5.0 ml,摇匀;加5%亚硝酸钠溶液0.3 ml,摇匀,放置6 min;加10%硝酸铝溶液0.3 ml,摇匀,放置6 min;加1.0 mol/ml氢氧化钠溶液4.0 ml,再加40%乙醇定容至刻度,摇匀,放置15 min。用紫外分光光度计在200~600 nm波长范围进行全波长扫描。另取相应体积样品溶液用40%乙醇定容至10 ml作为空白液,记录扫描图谱。通过比较芦丁对照品溶液与样品溶液的扫描图谱,发现两者在510 nm处有共同最大吸收。

### 2.5 线性关系考察

精密吸取芦丁对照品溶液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,按“2.4”项下亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法进行芦丁的显色反应,在510 nm波长处分别测定吸光度。以质量浓度( $x$ , mg/ml)为横坐标、吸光度( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得芦丁的回归方程为 $y=11.351x+0.0065$ ( $r=0.9999$ )。结果表明,芦丁质量浓度在0.05~0.50 mg/ml范围内与吸光度呈良好的线性关系。

### 2.6 精密度试验

精密吸取样品溶液0.6 ml,置于10 ml量瓶中,按“2.4”项下亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法操作,并于510 nm波长处连续测定6次。结果, $RSD=0.22\%$ ( $n=6$ ),表明该方法精密度良好。

### 2.7 显色稳定性试验

精密量取芦丁对照品溶液2 ml,置于10 ml量瓶中,按“2.4”项下亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法操作,并于510 nm波长处,每隔10 min测1次,共重复测定6次吸光度。结果, $RSD=0.47\%$ ( $n=6$ ),表明芦丁对照品溶液在60 min内显色试验结果稳定。

### 2.8 样品溶液稳定性试验

取样品溶液1份,分别在0、1、2、6、12、24、48 h(隔夜放4℃冰箱中保存)精密量取1 ml,置于10 ml量瓶中,按“2.4”项下亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法操作,并于510 nm波长处测定吸光度。结果,总黄酮的吸光度均值为0.471, $RSD=0.19\%$ ( $n=6$ ),表明样品溶液在48 h内基本稳定。

### 2.9 重复性试验

精密吸取样品溶液0.6 ml,置于10 ml量瓶中,共6份,按“2.4”项下亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法操作,并于510 nm波长处测定吸光度。结果, $RSD=0.43\%$ ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

### 2.10 加样回收率试验

称取同一批次的无花果叶提取物9份,按“2.2”项下方法制备样品溶液,取适量分别置于10 ml量瓶中,加入0.5、2.0、4.0 ml的芦丁对照品溶液,每组各3份,按“2.4”项下亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法操作,并于510 nm波长处测定吸光

度,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)

称样量,g	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.701 3	0.478	0.510	0.970	96.47		
0.703 5	0.482	0.510	0.975	96.67		
0.702 0	0.480	0.510	0.978	97.65		
0.701 5	0.475	2.020	2.490	99.75		
0.703 3	0.482	2.020	2.500	99.90	98.68	1.50
0.702 4	0.481	2.020	2.480	98.96		
0.703 2	0.485	4.080	4.560	99.88		
0.702 6	0.479	4.080	4.580	100.51		
0.703 2	0.488	4.080	4.500	98.33		

### 2.11 样品含量测定

精密吸取样品溶液0.6 ml,共3份,分别置于10 ml量瓶中,按“2.4”项下亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法操作,并于510 nm波长处测定吸光度,将吸光度代入标准曲线方程,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Result of content determination(n=3)

样品编号	吸光度	总黄酮含量,%	总黄酮含量均值,%
1	0.459	9.50	
2	0.456	9.43	9.47
3	0.458	9.48	

## 3 讨论

黄酮类化合物作为重要的药效组分,在无花果叶提取物中含量较高,因此选择合适的测定方法有助于为无花果叶提取物的质量评价提供可靠的技术支持。由于各种不同来源植物的总黄酮成分各不相同,对不同的显色方法的适用性也因其成分的不同而不同,所以有必要为无花果叶提取物中总黄酮的测定选择一种准确可靠的方法。

笔者比较了直接测定法、亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法、三氯化铝显色法这3种紫外分光光度法在200~600 nm波长范围内的扫描图谱。结果显示,采用直接测定法,样品溶液在210 nm波长处有最大吸收,与芦丁对照品最大吸收峰吻合。由于共轭双键中共轭跃迁引起的吸收峰在200 nm波长附近,芳香族化合物在200 nm波长附近也有特征吸收,在此波长下检测,溶剂乙醇、香豆素类化合物、苯甲醛等均会对测定结果产生干扰,因此不选择该方法检测。而三氯化铝显色方法波长扫描结果显示,芦丁对照品溶液与样品溶液最大吸收峰不吻合,此方法可导致测定结果不准确、与真实值偏离,也不可取。而采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法,芦丁对照品和无花果叶黄酮提取物均在510 nm波长处有最大吸收。其基本原理为黄酮类化合物的紫外光谱图上主要有2个吸收带:环肉桂酰系统引起的吸收带 I (300~550 nm)和环苯酰系统引起的吸收带 II (240~280 nm)。若加入铝盐,则Al<sup>3+</sup>与黄酮化

合物形成稳定的配合物,吸收带 II 会明显向长波长方向移动(红移);黄酮类化合物在中性或弱碱性条件下能够与铝盐形成黄色络合物,继续加入氢氧化钠会生成桔红色有机物,在可见光区510 nm波长附近产生最大吸收<sup>[13]</sup>,从而为紫外分光光度法测定提供了可靠的依据。故本研究选择该方法作为无花果叶提取物中总黄酮含量的检测方法。

综上所述,该方法操作简便、准确,重复性和稳定性良好,适用于无花果叶提取物中总黄酮的含量测定。

## 参考文献

- [1] 张慧婧,胡志利.无花果叶研究进展[J].齐鲁药事,2011,30(12):715.
- [2] 庄奕筠,张吟.无花果叶的药用研究进展[J].海峡药学,2011,23(12):1.
- [3] 左勇,刘利平,鞠帅.无花果酒发酵条件的优化[J].食品科技,2014,39(1):95.
- [4] Pèrez C, Canal JR, Torres MD. Experimental diabetes treated with ficus carica extract: effect on oxidative stress parameters [J]. *Acta Diabetol*, 2003, 40(1):3.
- [5] Fatemi A, Rasouli A, Asadi F. Effect of fig (ficus carica) leaf extract on the secretion and content of cholesterol in hepg-2 cell [J]. *Am J Animal Vet Sci*, 2007, 2(4):104.
- [6] 彭珊珊,肖峰.无花果叶、番石榴叶中黄酮类化合物的提取与测定[J].食品科学,2005,26(9):300.
- [7] 张吟,陈一农,许秋霞,等.气质联用色谱法和超高效液相色谱法检测无花果叶提取物的化学成分[J].福建医科大学学报,2011,45(6):423.
- [8] 陈思妮,张振秋.紫外分光光度法测定广金钱草中总黄酮的含量[J].中华中医药学刊,2007,25(12):2 636.
- [9] 郭雪峰,岳永德.黄酮类化合物的提取分离纯化和含量测定方法的研究进展[J].安徽农业科学,2007,35(26):8 083.
- [10] 郑媛媛,李辰,封士兰,等.油橄榄叶中总黄酮含量测定方法探讨[J].光谱学与光谱分析,2011,31(2):547.
- [11] 王肖,吴国成,李赛颖,等.对2010年版《中国药典》山楂叶中总黄酮含量测定方法的商榷[J].中国药房,2013,24(35):3 309.
- [12] 庄奕筠,张吟,许秋霞,等.超声波辅助提取无花果叶中总黄酮的工艺研究[J].中国药学杂志,2012,47(12):1 003.
- [13] 库咏峰.肉桂总黄酮提取分离分析及抗氧化活性研究[D].南宁:广西大学,2012.

(收稿日期:2015-02-03 修回日期:2015-03-23)

(编辑:余庆华)