

巴西绿蜂胶胶囊总黄酮的测定

李跃彬*, 俞金标, 吴斯燕, 植爱萍

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立以石油醚洗脱杂质测定巴西绿蜂胶胶囊中总黄酮的方法。**方法** 样品经乙醇提取, 用聚酰胺粉吸附, 分别用石油醚、苯不同溶剂洗去杂质; 经甲醇洗脱后, 在波长 360 nm 处, 用分光光度法测定巴西绿蜂胶中总黄酮的含量。**结果** 采用石油醚作为洗脱剂, 总黄酮含量在 1.9897 ~ 23.8761 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 与吸光度值呈良好的线性关系, 浓度-吸光度回归方程为 $Y=0.02976X-0.00741$, 相关系数 $r^2=0.99954$ 。方法精密密度为 1.0%, 平均回收率为 96.5%。与用苯洗脱杂质结果比较, 两者无显著性差异。**结论** 该方法操作简便, 重现性及稳定性好, 线性范围宽, 减少了苯对检测人员和环境的污染, 可用于保健食品中总黄酮的测定。

关键词: 总黄酮; 苯; 石油醚(30~60°)

Determination of total flavonoids in Brazil green propolis capsule

LI Yue-Bin, YU Jin-Biao, WU Si-Yan, ZHI Ai-Ping

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determining flavonoids in Brazil green propolis capsule. **Methods** The total flavonoids in Brazil green propolis capsule were determined by spectrophotometry after the samples were distilled by methanol and purified by petroleum ether. The detection wavelength was 360 nm. **Results** The calibration curve of flavonoids content and absorbance had a good linearity in the range of 1.9897 ~ 23.8761 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r^2=99954$). The relative standard deviations were 1.0%, and the recoveries were 96.5%. The results had no obvious difference which purified by petroleum ether instead of benzene. **Conclusion** The method is simple, stable and accurate, and it can be applied successfully to determine flavonoids in health food.

KEY WORDS: total flavonoids; benzene; petroleum ether(30 ~ 60°)

1 引言

自然界中发现的黄酮类化合物有 2700 多种。这些物质都是以 C6-C3-C6 为基本骨架, 或与醇、糖结合, 或以游离形态存在。根据中间碳原子的成环及氧化取代的不同, 它们可分为黄酮类化合物、异黄酮类、类黄酮三类, 总称总黄酮。现在很多蜂胶产品进行质量控制的就

是总黄酮的总量^[1]。通常方法有硝酸铝比色法和直接紫外测定法。汤臣倍健的蜂胶软胶囊采用巴西进口原料——巴西绿蜂胶, 选择直接紫外测定法——《保健食品检验与评价技术规范》^[2], 但是, 该测定方法中需用苯洗脱杂质, 苯的毒性很强, 对环境极易造成污染, 并对实验者造成永久性伤害。因此本文用石油醚替代苯, 实验结果与用苯洗脱得到的结果无显著性差异。

*通讯作者: 李跃彬, 高级食品检验员, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 1028747253@qq.com

*Corresponding author: LI Yue-Bin, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 1028747253@qq.com

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

芦丁对照品(纯度: 92.6%, 来源: 中国食品药品检定研究院, 批号: 100080-201409); 95%乙醇(分析纯, 广州化学试剂厂); 甲醇(分析纯, 广州化学试剂厂); 石油醚(沸程: 30 °C ~ 60 °C, 分析纯, 广州化学试剂厂; 20140801-2); 苯(分析纯, 广州化学试剂厂); 聚酰胺粉(国药集团化学试剂有限公司)。

UV-2450 型紫外分光光度计(岛津(中国)有限公司); XA-204 分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); 层析柱(0.9 cm×30 cm)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准曲线绘制

总黄酮(以芦丁计)标准溶液: 称取 5.0 mg 芦丁, 加甲醇溶解并定容至 100 mL, 即得 50 μg/mL。吸取芦丁标准溶液: 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 于 360 nm 比色, 计算回归方程。

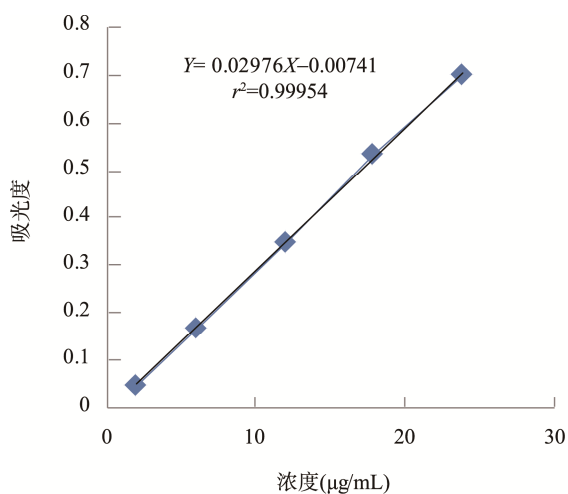


图 1 标准曲线图

Fig. 1 The standard curve

由图 1 可以看出, 溶液中总黄酮在 1.9897 ~ 23.8761 μg/mL 之间呈良好的线性关系, 浓度-吸光度回归方程 $Y=0.02976X-0.00741$, 相关系数 $r^2=0.99954$ 。

2.2.2 样品制备与测定

称取 0.5 g 样品内容物至 50 mL 量瓶中, 加乙醇约 40 mL, 60 °C 超声 2 h 至样品完全松散, 充分提取; 冷却, 定容至刻度, 摇匀并离心后吸取澄清液 1.0 mL,

加入称有 1 g 聚酰胺粉的蒸发皿中吸附, 105 °C 挥干乙醇, 然后转入层析柱。用 20 mL 石油醚进行洗脱, 用甲醇洗脱并收集洗脱液, 定容至 50 mL。在波长 360 nm 处测定吸收值计算回归方程, 计算样品中总黄酮含量。

3 结果与分析

3.1 不同实验方法对结果的影响

根据 2.2.2, 分别验证不同洗脱剂、不同洗脱体积、不同超声时间对蜂胶黄酮含量的影响, 以得出最安全有效提取黄酮含量的方法。

3.1.1 不同洗脱剂对实验结果的影响

由表 1 结果表明, 分别用石油醚和苯作为洗脱剂洗脱杂质, 以石油醚作洗脱剂, 总黄酮含量为 2.67%; 以苯作洗脱剂, 总黄酮含量为 2.67%, 通过 t 检验、 F 检验, $t=0$, 所以以石油醚、苯作为洗脱剂洗脱杂质结果没有显著性差异, 因此可以用石油醚代替苯洗脱杂质。

表 1 不同洗脱剂对实验结果的影响($n=6$)

Table 1 Effect of different elution agents on the experimental result ($n=6$)

	1	2	3	4	5	6	RSD%
石油醚	2.65	2.65	2.63	2.71	2.66	2.70	1.2
苯	2.66	2.70	2.71	2.68	2.64	2.65	1.1

3.1.2 不同体积洗脱剂对实验结果的影响

样品总黄酮的理论含量为: 2.7%~2.8%, 由表 2 结果表明, 用 50 mL 体积甲醇洗脱, 总黄酮含量为 2.7%, 接近理论值; 25 mL 体积甲醇洗脱, 总黄酮含量为 2.3%, 明显低于理论含量; 100 mL 体积甲醇洗脱, 总黄酮含量为 2.7%, 与 50 mL 体积甲醇洗脱效果一致, 所以 50 mL 体积洗脱较为合理。

表 2 不同体积洗脱对实验结果的影响($n=6$)

Table 2 Effect of different volume elution on the experimental result ($n=6$)

	1	2	3	4	5	6	平均值
50 mL	2.71	2.68	2.65	2.72	2.64	2.69	2.7±0.03
25 mL	2.32	2.28	2.31	2.26	2.41	2.40	2.3±0.06
100 mL	2.72	2.69	2.66	2.70	2.65	2.67	2.7±0.03

3.1.3 不同超声时间对实验结果的影响

由表3结果表明,样品超声1 h、1.5 h,总黄酮含量分别为:2.3%、2.6%,均低于理论含量2.7%~2.8%;超声2 h、3 h,总黄酮含量均为2.8%,结果接近理论值;为提高检验效率,样品的超声时间确定为2 h,既可以使样品充分被提取出来,又可以节省检验时间。

表3 不同超声时间对总黄酮的影响

Table 3 Effect of different ultrasonic time on total flavonoids

时间(h)	测定结果(%)			平均值
1	2.32	2.31	2.29	2.3±0.02
1.5	2.60	2.62	2.61	2.6±0.01
2	2.82	2.81	2.79	2.8±0.02
3	2.83	2.80	2.82	2.8±0.02

3.2 方法学验证

3.2.1 精密度实验

平行称取6份样品,按样品的制备与测定方法测定样品中总黄酮的含量,见表4。

表4 精密度实验(n=6)

Table 4 The precision of the experiment (n=6)

称样量(g)	测定结果(%)	平均值(%)	RSD(%)
0.5794	2.76	2.7	1.0
0.5652	2.75		
0.6032	2.74		
0.6031	2.71		
0.6544	2.70		
0.5991	2.70		

由表4可以看出,总黄酮的平均含量为2.7%,相对标准偏差:RSD=1.0%,说明实验结果的重复性良好。

3.2.2 回收率实验

向样品分别添加80%、100%、120%不同量的芦丁标准品,且每个加标梯度进行3次平行样实验,按样品的制备与测定方法测定加标样品中总黄酮的含量,计算回收率,见表5。本方法的回收率为96.5%,RSD为0.7%,说明本方法具有良好的准确度。

表5 回收率实验

Table 5 The standard addition recovery of the experiment (n=9)

加标量(μg)	测得加标量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
4.5917	4.4589	97.10	96.5	0.7
4.5917	4.4753	97.46		
4.5917	4.4101	96.04		
5.1319	4.9012	95.50		
5.1319	4.9756	96.95		
5.1319	4.9472	96.40		
6.1568	5.9178	96.11		
6.1568	5.9541	96.70		
6.1568	5.9453	96.56		

4 讨论

4.1 波长选择

黄酮类化合物是母体结构为二苯基色酮的一类化合物的总称,包括:黄酮、黄酮醇、脱氢黄酮、异黄酮和查耳酮等,这一类化合物有两个紫外吸收区,即240~280 nm和300~400 nm,本方法测定的是在300~400 nm有吸收的,在360 nm处有最大吸收峰,并且吸光度相对稳定,所以选择了360 nm的吸收波长。

4.2 溶剂选择

包括甙和甙原形式的黄酮化合物都有较强的极性,易溶于甲醇、乙醇等溶剂。因为甲醇对人体有较大的伤害,出于对身体健康及对环境的考虑,选择乙醇作为提取液,在60℃水浴提取2 h可提取完全。

5 结论

本研究建立了以石油醚洗脱杂质测定巴西绿蜂胶胶囊中总黄酮的方法,该方法操作简便,重现性及稳定性好,线性范围宽,减少了苯对检测人员和环境的污染,测定结果与《保健食品检验与评价技术规范》所载方法无显著性差异,可用于保健食品中总黄酮的测定。

参考文献

- [1] 肖香兰,罗仁才,张楠,保健食品中总黄酮的测定方法[J].中

- 国卫生检验杂志, 2007, 17(6): 1037.
- Xiao XL, Luo RC, Zhang N. Determination of total flavonoids in health food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(6): 1037.
- [2] 保健食品检验与评价技术规范[Z]. 中华人民共和国卫生部, 2003.
- Technical specification for inspection and evaluation of health food [Z]. The ministry of Health of the People's Republic of China, 2003.
- [3] 雷树明, 张燕新, 杨娟, 等. 不同蜂胶制品的品质和总黄酮含量分析[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(4): 72-74.
- Lei SM, Zhang YX, Yang J, *et al.* Analysis on the quality and the content of flavonoids in different propolis products [J]. Food Res Dev, 2014, 35(4): 72-74.
- [4] 刘江(鸟), 周荣琪. 竹叶提取物总黄酮含量测定方法的改进[J]. 食品科技, 2005, (7): 76-78.
- Liu JC, Zhou RQ. The improvement of bamboo leaves flavonoid extract containing [J]. Food Technol, 2005, (7): 76-78.
- [5] 范婷婷, 文萍, 姚剑平, 等. 蜂胶总黄酮含量测定方法的探讨[J]. 中国医药指南, 2013, 11(13): 69-70.
- Fan TT, Wen P, Yao JP, *et al.* Discussion on determination method of total flavonoids of propolis [J]. Chin Med Guid, 2013, 11(13): 69-70.
- [6] 石会丽, 肖会玲, 孟婷. 盛力胶囊中总黄酮含量测定[J]. 陕西中医, 2003, 24(5): 476.
- Shi HL, Xiao HL, Meng T. Determination of total flavonoids in Sheng Li capsule [J]. Shaanxi TCM, 2003, 24(5): 476.
- [7] 赵静, 李熠, 薛晓锋, 等. 蜂胶高生物活性 黄酮组分的研究[J]. 中国养蜂, 2005, 56(3): 9-10.
- Zhao J, Li Y, Xue XF, *et al.* Research on biological activity of propolis high brass components [J]. Chin Bee, 2005, 56(3): 9-10.
- [8] 玄红专, 顾美儿. 蜂胶口服液的制备及其黄酮类化合物的测定[J]. 食品研究与开发, 2006, 56(3): 55-56.
- Xuan HZ, Gu ME. The preparation of propolis oral liquid and determination of flavonoids [J]. Food Res Dev, 2006, 56(3): 55-56.
- [9] 王浩, 刘德秀, 杨巍. 吸光光度法检测保健食品蜂胶中总黄酮[J]. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(2): 67.
- Wang H, Liu DX, Yang W. Determination of total flavonoids in health food propolis by absorption spectrophotometric method [J]. Public Health Pre Med, 2006, 17(2): 67.
- [10] 张敬哲. 蜂胶的研究利用概况[J]. 特种经济动植物, 2006, (2): 13-14.
- Zhang JZ. Research and utilization of propolis [J]. Spec Classics Econ Plants, 2006, (2): 13-14.
- [11] 郭芳彬. 蜂产品中黄酮类化合物的保健作用[J]. 养蜂科技, 2005, (2): 28-31.
- Guo FB. Health care for Flavonoids in bee products [J]. Beekeeping Technol, 2005, (2): 28-31.
- [12] 曲文娟, 王然然, 刘书元, 等. 不同方法萃取蜂胶的总黄酮含量及地区化差异 [J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(5): 246-251.
- Qu WJ, Wang RR, Liu SY, *et al.* Different methods of extraction of propolis flavonoids content and regional difference [J]. Food Ferment Ind, 2014, 40(5): 246-251.
- [13] 葛英, 高洪学, 于殿华, 等. 蜂巢中总黄酮测试方法的探讨[J]. 吉林畜牧兽医, 2007, (4): 8-9.
- Ge Y, Gao HX, Yu DH, *et al.* The study of total flavonoids hive test method [J]. Jilin Anim Husb Vet, 2007, (4): 8-9.
- [14] 郑洁, 连会, 彭奇均. 树脂法富集分离蜂胶总黄酮[J]. 化工进展, 2007, 26(8): 1148-1154.
- Zheng J, Lian H, Peng QJ. Separation of propolis by resin method progress of total flavonoids [J]. Chem Ind, 2007, 26(8): 1148-1154.
- [15] 陈刚, 陆阳, 丁红梅, 等. 蜂胶中总黄酮测定的处理方法比较[J]. 粮食与食品工业, 2013, 20(03): 69-71.
- Chen G, Lu Y, Ding HM, *et al.* Comparison of methods for determination of total flavonoids in propolis [J]. Cereal Food Ind, 2013, 20(03): 69-71.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



李跃彬, 高级食品检验员, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 1028747253@qq.com