

# 酸化处理的聚酰胺粉方法测定巴西绿蜂胶粉中总黄酮

杨祖伟, 黄进丽, 苏杜威, 李 珍, 叶少文, 苏昭仑, 魏鲜娥, 陈绮梦\*

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要:** **目的** 建立以酸化聚酰胺粉吸附黄酮测定巴西绿蜂胶粉中总黄酮的方法。**方法** 将酸化聚酰胺粉吸附总黄酮, 经甲醇洗脱, 用经酸化的标准溶液制备标准曲线, 测定样品中的总黄酮。**结果** 采用酸化聚酰胺粉吸附黄酮, 总黄酮在 2.137~21.370  $\mu\text{g/mL}$  ( $r=0.99956$ ) 范围内具有良好的线性关系, 平均加标回收率为 98.9% ( $\text{RSD}=0.7\%$ ,  $n=9$ )。**结论** 该方法有效提高总黄酮的洗脱效率, 回收率良好, 能够提升检测结果的准确性。

**关键词:** 聚酰胺粉; 总黄酮; 巴西绿蜂胶粉

## Determination of total flavonoids in Brazilian green propolis powder by acidified polyamide powder

YANG Zu-Wei, HUANG Jin-Li, SU Du-Wei, LI Zhen, YE Shao-Wen, SU Zhao-Lun,  
WEI Xian-E, CHEN Qi-Meng\*

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

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of total flavonoids in Brazilian green propolis powder by acidizing polyamide powder washing. **Methods** In the method, the acidizing polyamide powder is acidified to adsorb the total flavonoids, and then eluted with methanol. Prepare standard curve with acidified standard solution to determine the total flavonoids in the sample. **Results** The total flavonoid had a good linear relationship in the range of 2.137 to 21.370  $\mu\text{g/mL}$  ( $r=0.99956$ ), and the average recovery was 98.9% ( $\text{RSD}=0.7\%$ ,  $n=9$ ). **Conclusion** The method can improve the elution efficiency and recovery rate of total flavonoids, it can improve the accuracy of the test results.

**KEY WORDS:** polyamide powder; total flavonoids; Brazil green propolis powder

## 1 引言

巴西绿蜂胶属酒神菊属植物蜂胶, 被誉为“巴西国宝”、“绿色黄金”, 具有提升机体免疫力、抗菌、消炎、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、降血糖等功效<sup>[1-6]</sup>。巴西绿蜂胶含有丰富的生物类黄酮, 总黄酮为其标志性成分之一<sup>[7]</sup>。总黄酮化合物包括黄酮、黄酮醇、二氢黄酮、二氢黄酮醇、查耳酮、异黄酮类等化合物<sup>[8]</sup>。目前总黄酮的测定方法有

高效液相色谱法、紫外分光光度法、薄层色谱法、荧光光度法、毛细管电泳法等<sup>[9-13]</sup>。紫外分光光度法有简便、准确度高<sup>[14]</sup>、重现性好和仪器简单<sup>[15]</sup>等优点, 但该测定方法中使用未经处理的聚酰胺粉对黄酮吸附效率低, 导致检测结果偏低, 本研究通过改变聚酰胺粉的酸碱度, 用甲醇洗脱总黄酮, 以期得到洗脱效率高、结果更准确的测定巴西绿蜂胶粉中总黄酮的方法, 为巴西绿蜂胶的质量监测提供科学参考。

\*通讯作者: 陈绮梦, 工程师, 主要研究方向为保健食品的功效检测。E-mail: 3121435517@qq.com

\*Corresponding author: CHEN Qi-Meng, Engineer, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 3121435517@qq.com

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

UV-2450 可见光-紫外分光光度计[岛津(中国)有限公司]; XA204 电子天平[220 g, 梅特勒-托力多仪器(上海)有限公司]; TCL-10C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); P180H 超声波清洗器(德国艾尔玛 Plmasonic P 公司)。

95%乙醇、苯、甲醇、盐酸、氢氧化钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 聚酰胺粉(100~200 目, 国药集团化学试剂有限公司); 芦丁标准品(含量 92.6%, 中国食品药品检定研究院); 玻璃层析柱四氟活塞砂芯层析柱(1.5 cm×25 cm)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 标准曲线绘制

精密称取芦丁标准品 20 mg, 加甲醇溶解并定容至 100 mL, 即得 0.2 mg/mL。吸取芦丁标准溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 并分别加入 50  $\mu$ L 稀盐酸, 加甲醇至刻度, 摇匀, 于 360 nm 吸光度。以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。该标准曲线的线性回归方程为  $Y=0.03097X-0.00101$ ,  $r^2$  为 0.99956, 其在 2.137~21.370  $\mu$ g/mL 之间呈现良好的线性。

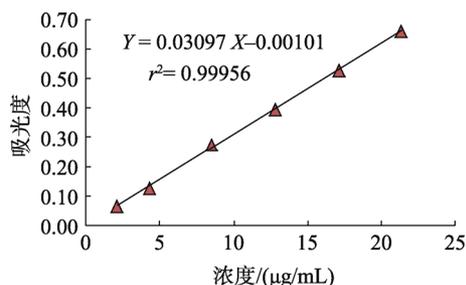


图1 标准曲线图

Fig.1 Standard curve

#### 2.2.2 样品制备与测定

取 1 g 聚酰胺粉至蒸发皿中, 分别加入 50 mg 研磨成细粉的柠檬酸和无水碳酸钠, 充分混合均匀, 备用。称取定量的样品至 50 mL 容量瓶中, 加乙醇适量溶解, 超声 20 min 至样品完全松散, 充分提取; 放至室温, 定容至刻度, 摇匀并离心。吸取上清液 1.0 mL, 分别于经预先处理好的聚酰胺粉中吸附, 并在水浴中挥去乙醇, 然后转入层析柱。先用 20 mL 苯淋洗, 弃去苯液, 再用 50 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液用甲醇定容至 50 mL。以甲醇为空白, 于波长 360 nm 测定吸光度, 根据标准曲线, 计算样品中总黄酮含量。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同实验方法对总黄酮检测的影响

根据 2.2.2 分别验证溶液的酸碱性、聚酰胺粉的酸碱性、不同洗脱体积、不同厂家的聚酰胺粉对巴西绿蜂胶粉

中总黄酮检测的影响

#### 3.1.1 溶液的酸碱性对吸光度的影响

按 2.2.2 的方法, 用未经处理过的聚酰胺粉吸附总黄酮, 洗脱, 得中性样品溶液。分别用氢氧化钠溶液和盐酸溶液将中性样品溶液和芦丁标准溶液调成不同 pH 值的溶液, 测定吸光度值, 见图 1。并在酸性、中性、碱性环境下对相同浓度的芦丁标准溶液在 300~500 nm 区间进行光谱扫描, 见图 2。由图 1 中可见, 标准溶液和样品溶液在酸性区间吸光度稳定, 在碱性区间吸光度出现明显的偏离; 由图 2 可明显看出, 在酸性环境下, 标准溶液的吸收峰要比在中性环境下尖锐, 在碱性环境下, 吸收峰明显发生位移, 这是由于黄酮能与碱发生反应, 引起吸收峰位移, 导致标准溶液的吸光值在碱性环境下偏低; 由于样品溶液中的总黄酮为多个黄酮的混合物, 不同的黄酮在碱性环境下峰的位移不同, 所以在碱性环境下, 样品溶液的吸光度的变化趋势与芦丁溶液不相同。因此, 在酸性环境下测定溶液的吸光度更准确。

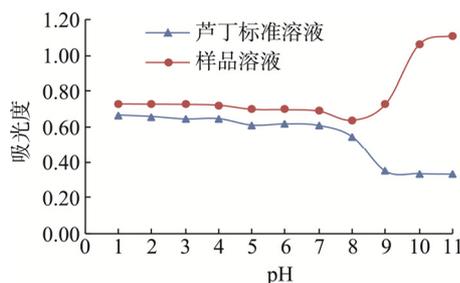


图2 溶液的酸碱性对吸光度的影响

Fig.2 Effect of acidity and alkalinity of solution on absorbency

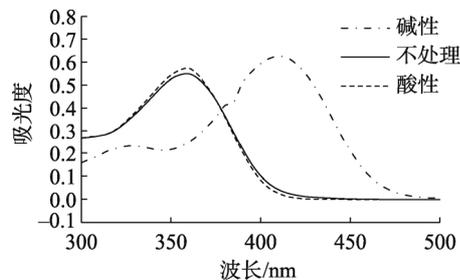


图3 芦丁标准溶液光谱扫描

Fig.3 Spectral scanning of rutin standard solution

#### 3.1.2 聚酰胺粉的酸碱性对芦丁回收率的影响

本实验对聚酰胺粉进行酸化和碱化处理, 发现酸化、不处理、碱化处理的聚酰胺粉对芦丁的回收率分别为 99.5%、91.3%、83.1%, 回收率差异明显, 表明酸化的聚酰胺粉能够提高总黄酮的洗脱效果。

#### 3.1.3 不同洗脱体积对实验结果的影响

本实验对样品进行 25、50、100 mL 洗脱体积进行洗脱, 发现洗脱体积为 50 mL 时, 可将巴西蜂胶中的总黄酮

洗脱效率最高, 具体见表 2。

**表 1 聚酰胺粉的酸碱性对芦丁回收率的影响**  
**Table 1 Effect of the acidity and basicity of polyamide powder on the recovery rate of rutin**

处理方式	回收率/%
酸化	99.5
碱化	91.3
不处理	83.1

**表 2 不同洗脱体积对实验结果的影响**  
**Table 2 Effect of different eluting volumes on determination of total flavonoids**

洗脱体积/mL	总黄酮/%
25	8.56
50	10.18
100	10.15

3.1.4 不同厂家聚酰胺粉对实验结果的影响

本实验选取 3 个不同厂家的聚酰胺粉, 采用未处理的聚酰胺粉和酸化处理的聚酰胺粉吸附总黄酮的方法检测同一样品, 其中未处理的聚酰胺粉吸附总黄酮的方法测定总

黄酮含量为 8.1%~9.2%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 6.4%。酸化的聚酰胺粉吸附总黄酮的方法测定总黄酮含量为 10.0%~10.3%, RSD 为 1.6%, 见表 3, 表明未经处理的聚酰胺粉检测总黄酮偏低, 结果差异明显, 经酸化处理的聚酰胺粉吸附总黄酮的方法能够有效提高总黄酮的洗脱效率, 减少不同厂家聚酰胺粉之间的差异。

**表 3 不同厂家聚酰胺粉对总黄酮测定的影响**  
**Table 3 Effect of polyamide powder from different manufacturers on determination of total flavonoids**

	未处理/%	酸化处理/%
聚酰胺粉厂家 1	8.7	10.1
聚酰胺粉厂家 2	8.1	10.0
聚酰胺粉厂家 3	9.2	10.3
RSD/%	6.4	1.6

3.2 方法学验证

3.2.1 精密度实验

取 3 批次巴西绿蜂胶, 按 2.2.2 的方法测定样品中的总黄酮含量, 结果总黄酮的 RSD%为 1.4%~2.2%, 精密度良好。

**表 4 精密度实验(n=6)**  
**Table 4 The precision of the experiment (n=6)**

序号	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
1	9.91	10.13	10.21	10.34	10.13	10.18	10.2	1.4
2	11.89	11.54	11.36	11.47	11.22	11.58	11.5	2.0
3	10.55	10.38	10.72	10.67	10.26	10.88	10.6	2.2

3.2.2 回收率实验

取 9 份样品, 分别加入芦丁标准溶液, 按 2.2.2 测定, 计算回收率。平均回收率为 98.9%, RSD 为 0.7%, 回收率良好。

**表 5 总黄酮加标回收试验结果(n=9)**  
**Table 5 Total flavonoids plus standard recovery test results (n=9)**

加标量/mg	测得加标量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
20.15	20.05	99.50		
21.22	20.75	97.78		
20.63	20.42	98.98		
27.41	26.94	98.28		
28.65	28.31	98.81	98.9	0.7
28.01	27.64	98.67		
36.53	36.13	98.90		
35.35	35.05	99.15		
35.14	35.19	100.14		

4 结论与讨论

本研究采用酸化处理的聚酰胺粉方法测定巴西绿蜂胶粉中总黄酮的测定, 总黄酮在 2.137~21.370  $\mu\text{g/mL}$ ( $r=0.99956$ ) 范围内具有良好的线性关系, 平均加标回收率为 98.9%(RSD=0.7%,  $n=9$ )。该方法有效提高总黄酮的洗脱效率, 回收率良好, 能够提升检测结果的准确性。

参考文献

[1] 李淑华, 于晓红, 于英君, 等. 蜂胶对免疫功能低下模型鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中医学报, 2001, 29(3): 38-39.  
Li SH, Yu XH, Yu YJ, et al. Effects of propolis on cellular immune function in immunocompromised mice [J]. J Tradit Chin Med, 2001, 29(3): 38-39.

[2] 周先汉, 张秀喜, 朱稀檀, 等. 蜂胶提取物抑菌活性及其抑菌机理的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(5): 233-236.  
Zhou XH, Zhang XX, Zhu XL, et al. Preliminary study on the antimicrobial activity and mechanism of propolis [J]. Food Sci Technol,

- 2009, 34(5): 233–236.
- [3] 王南舟. 复合蜂胶制剂调节肠道功能的体外实验研究[J]. 营养卫生, 2003, 24(3): 119–22.  
Wang NZ. In vitro experimental study on intestinal function regulated by compound propolis preparation [J]. Nutr Hygi, 2003, 24(3): 119–22.
- [4] 乞永艳, 骆尚骅, 刘富海, 等. 蜂胶抗氧化作用研究[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(4): 18–21.  
Qi YY, Luo SH, Liu FH, *et al.* Antioxidant effect of propolis [J]. J Chin Cere Oil, 2001, 16(4): 18–21.
- [5] 王晓梅, 曹稳根. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 宿州学院学报, 2007, 22(1): 105–107.  
Wang XM, Cao WG. A progress in pharmacological research of flavonoids [J]. J Suzhou College, 2007, 22(1): 105–107.
- [6] 王亚群, 任永新. 蜂胶的化学成分及其保健作用[J]. 食品与药品, 2006, 8(12): 75–76.  
Wang YQ, Ren YX. Chemical constituents of propolis and its health care function [J]. Food and Drugs, 2006, 8(12): 75–76.
- [7] 冯涛, 庄海宁. 黄酮类化合物结构特征与抗氧化性关系研究进展[J]. 粮食与油脂, 2008, (10): 8–11.  
Feng T, Zhuang HN. Research review between structure and antioxidation of flavonoids compounds [J]. Grain Oil, 2008, (10): 8–11.
- [8] 刘莉华, 宛晓春, 李大祥. 黄酮类化合物抗氧化活性构效关系的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(3): 265–270.  
Liu LH, Wan XC, Li DX. Research progress on structure-activity relationship of antioxidant activities of flavonoids [J]. J Anhui Agri Univ, 2002, 29 (3): 265–270.
- [9] GB/T 20574-2006 蜂胶中总黄酮含量的测定方法 分光光度比色法[S]. GB/T 20574-2006 Method for the determination of total flavonoids in propolis-Spectrophotometric colorimetry [S].
- [10] GB/T 19427-2003 蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、灰菲醇、芹菜素、松属素、萜因、高良姜素含量的测定方法 液相色谱-串联质谱检测法和液相色谱-紫外检测法[S].  
GB/T 19427-2003 Methods for the determination of rutin, myricetin, apigenin, pine, caustic and galangin in propolis-LC-MS and LC-UV methods [S].
- [11] 夏稼红, 陶冉, 范乃兵, 等. 紫外分光光度法测定莲子心总黄酮的含量[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(2): 116–118.  
Xia JH, Tao R, Fan NB, *et al.* Determination of total flavonoids in lotus seed heart by ultraviolet spectrophotometry [J]. J Nanjing TCM Univ, 2008, 24(2):116–118.
- [12] 陈春. 沙棘黄酮检测方法概述[J]. 山西林业科技, 2018, 47(3): 14–17.  
Chen C. Detection methods of flavonoids in hippophae rhamnoides linn [J]. Shanxi Fore Sci Technol, 2018, 47(3): 14–17.
- [13] 庄晓明, 庄会荣. 高效毛细管电泳法测定侧柏中槲皮素的研究[J]. 临沂师范学院学报, 2007, 29(6): 57–61.  
Zhuang XM, Zhuang HR. Study on the determination of quercetin in platycladus orientalis by high performance capillary electrophoresis [J]. J Linyi Norm Univ, 2007, 29(6): 57–61.
- [14] 姚剑平, 文萍, 范婷婷, 等. 蜂胶提取物总黄酮含量测定方法研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(11): 2414–2416.  
Yao JP, Wen P, Fan TT, *et al.* Propolis extract total flavones content determination method research [J]. J Chin Tradit Med, 2013, 31(11): 2414–2416.
- [15] 陈静, 梅广, 符昌雨. 分光光度法测定总黄酮含量中存在的问题的研究[J]. 食品科技, 2007, (3): 230–232.  
Chen J, Mei G, Fu CY. Study on the Problems in Determination of Total Flavonoids by Spectrophotometry[J]. Food Sci, 2007(3): 230–232.

(责任编辑: 于梦娇)

## 作者简介



杨祖伟, 工程师, 主要研究方向为保健食品功效评价。

E-mail: yangzuwei@163.com



陈绮梦, 工程师, 主要研究方向为保健食品功效评价。

E-mail: 3121435517@qq.com