

曲正义,金银萍,侯 微,等.紫外分光光度法测定向日葵列当中苯乙醇总苷的含量[J].江苏农业科学,2014,42(9):282-284.

紫外分光光度法测定向日葵列当中苯乙醇总苷的含量

曲正义,金银萍,侯 微,姚春林,王英平

(中国农业科学院特产研究所,吉林长春 130112)

摘要:比较了超声波提取法、渗滤提取法、热回流提取法等不同提取方法对向日葵列当中苯乙醇总苷的提取效果,结果表明,以热回流方法为佳,80%乙醇回流法提取效果最好,在 5.5~27.5 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,回收率为 100.4%,*RSD* 值为 2.48% ($n=5$),向日葵列当中苯乙醇总苷平均含量为 1.97%。

关键词:向日葵列当;苯乙醇总苷;紫外分光光度法

中图分类号: O657.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0282-03

向日葵列当 (*Orobanche cumana* Wallr.) 别称毒根草、兔子拐棍,为列当科 (*Orobanchaceae*) 列当属 (*Orobanche*) 一年生寄生草本植物,在我国分布范围很广,主要分布于黑龙江省、吉林省、北京市、甘肃省、辽宁省、内蒙古自治区、河北省、山西省、陕西省、青海省、新疆维吾尔自治区等地区^[1-2]。在我国部分地区,列当属多种植物全草入药,具有强筋壮骨、补肾助阳、抗疲劳、改善脑组织循环、增强免疫力等作用,其主要活性成分为苯乙醇苷类^[3-5]。赵梦霞等对列当属植物向日葵列当进行了研究,分离得到 4 个苯乙醇苷类化合物,分别为 crenatoside、isocrenatoside、类叶升麻苷、3-*O*-methyl-crenatoside。其中 crenatoside 含量较高,crenatoside 具有清除自由基、抗氧化、抗菌、抗衰老等作用^[6-7]。目前,国内外对向日葵列当的研究主要以防治、根除为主,对其化学成分及药理活性研究较少,未建立有效的药材质量控制标准^[8-10]。为了更好地开发利用向日葵列当资源,缓解素有沙漠“人参”之称的同科植物肉苁蓉资源日益紧缺的局面,笔者采用紫外分光光度法测定向日葵列当中苯乙醇总苷的含量,旨在为进一步开发利用向日葵列当资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料 向日葵列当于 2013 年 9 月采于吉林省松原市长岭县,由中国农业科学院特产研究所姚春林研究员鉴定为向日葵列当的全草。样品经 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干粉碎后过 40 目筛,密封冷藏保存备用。

1.1.2 试剂 蒸馏水,甲醇、无水乙醇均为分析纯,crenatoside 对照品由笔者所在实验室分离纯化并鉴定其结构^[6],纯度 >98%。

1.1.3 仪器 TU-1810 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),HH-6 型数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司),N-1001 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有

限公司),CPA2250D 电子天平(德国 Sartorius 集团),DHG-9145A 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒仪器科学有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备 crenatoside 标准储备液:精密称取 5.50 mg 标准品,置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇使其溶解,稀释至刻度,摇匀,得 crenatoside 浓度为 0.55 mg/mL 的对照品贮备试液备用。

1.2.2 供试品溶液的制备

1.2.2.1 超声波提取法 精密称取向日葵列当干样 50.0 g,粉碎并过 40 目筛,置于圆底烧瓶中,以 80% 乙醇为提取溶剂,溶剂用量为 600 mL,超声提取 3 次,每次 50 min,过滤,合并回收浓缩滤液,定容于 100 mL 容量瓶中。精密吸取 1 mL 供试品溶液定容至 10 mL 容量瓶中备用,平行提取 3 次。

1.2.2.2 渗滤提取法 精密称取向日葵列当干样 50.0 g,粉碎并过 40 目筛,以 80% 乙醇为渗滤溶剂(用量为药材干质量的 12 倍),以 1.0 mL/min 的流量渗滤 24 h,过滤,合并回收浓缩滤液,定容于 100 mL 供试品溶液容量瓶中。精密吸取 1 mL 供试品溶液定容至 10 mL 容量瓶中备用,平行提取 3 次。

1.2.2.3 热回流提取法 精密称取向日葵列当干样 50.0 g,粉碎并过 40 目筛,置于圆底烧瓶中,加 80% 乙醇 600 mL,加热回流提取 3 次,每次 1 h,过滤,合并回收浓缩滤液,定容于 100 mL 容量瓶中。精密吸取 1 mL 供试品溶液定容至 10 mL 容量瓶中备用,平行提取 3 次。根据含量结果,选择提取苯乙醇苷含量高的方法进行供试品溶液制备。

1.2.3 最大吸收波长 精密吸取对照品、样品溶液各 0.4 mL 置于 20 mL 磨口带塞试管中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,在 230~400 nm 处进行紫外扫描,对照品、样品溶液均在 333 nm 处有最大吸收,因此确定最大吸收波长为 333 nm(图 1)。

1.2.4 标准曲线绘制 精密吸取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于 20 mL 磨口带塞试管中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,在最大吸收波长下,以甲醇为空白,测定吸光度,以吸光度为横坐标,以 crenatoside 浓度为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $y = 28.709x + 0.9953$ ($r = 0.9990$),表明在 5.5~27.5 $\mu\text{g/mL}$ 范围内 crenatoside 浓度与吸光度有良好的线性关系(图 2)。

收稿日期:2013-11-28

基金项目:吉林省吉林市科技计划(编号:201162512)。

作者简介:曲正义(1984—),男,硕士,助理研究员,从事药效质量评价研究。E-mail:qzy209@163.com

通信作者:王英平。E-mail:lyingpingw@126.com。

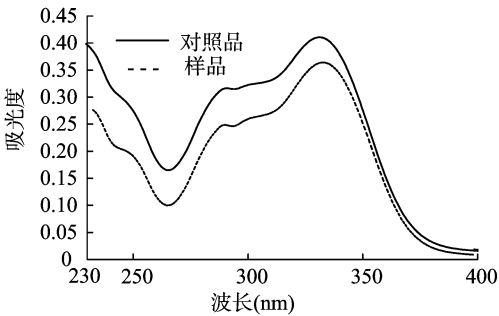


图1 对照品、供试品在230~400 nm的扫描光谱

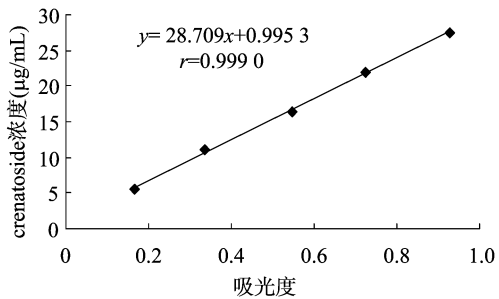


图2 crenatoside对照品标准曲线示意图

1.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 0.4 mL 置于 20 mL 磨口带塞试管中,共 6 份,按“1.2.4”节方法测定吸光度,连续测定 6 次。

1.2.6 稳定性试验 精密吸取样品溶液 0.4 mL 置于 20 mL 磨口带塞试管中,按“1.2.4”节方法测定吸光度,每隔 2 h 测定 1 次,共测 6 次。

1.2.7 重复性试验 精确称取药材粉末 5 份,每份 50.0 g,按照“1.2.2”方法,平行制备样品溶液,各吸取 0.4 mL 样品溶液置于 5 个 20 mL 具塞试管中,按“1.2.4”节方法测定吸光度。

1.2.8 加样回收试验 精确吸取 5 份已知含量样品溶液 0.4 mL,定容于 5 个 20 mL 具塞试管中,分别加入 0.55 mg/mL crenatoside 对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL,按“1.2.4”节方法显色测定吸光度,计算回收率和相对标准偏差 *RSD* 值。

1.2.9 样品的测定 精密吸取 3 份“1.2.2”节中样品溶液各 0.4 mL,分别定容于 3 个 20 mL 磨口带塞试管中,按“1.2.4”节方法显色测定吸光度,重复测定 3 次,取其平均值,向日葵列当中苯乙醇总苷含量计算公式如下:

苯乙醇总苷含量 = 稀释倍数 × *C* × 20 × 10⁻⁶ × 100 × 100% / *m*。(1)

式中:*C* 为样品溶液中苯乙醇总苷的含量;*m* 为向日葵列当样品的干质量。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法的苯乙醇总苷含量

由表 1 可知,热回流提取苯乙醇总苷含量明显高于超声波提取法、渗滤提取法,因此本研究采用热回流提取法。与热回流相比,超声波提取法、渗滤提取法具有提取时间短、无需加热等优点,但向日葵列当中苯乙醇总苷提取率不高,这可能与苯乙醇苷类化合物的种类与结构有关。

表 1 不同提取方法的苯乙醇总苷含量

处理号	苯乙醇总苷含量(μg/mL)		
	超声波提取法	渗滤提取法	热回流提取法
1	12.97	15.47	19.59
2	12.78	15.38	20.11
3	12.91	15.14	20.12
平均值	12.89	15.33	19.94
<i>RSD</i> 值	0.75%	1.11%	1.52%

由表 2 可知,6 个平行测定结果的相对标准偏差为 0.02%,说明仪器精密度很好。

表 2 精密度试验

序号	吸光度
1	0.336 3
2	0.336 3
3	0.336 4
4	0.336 3
5	0.336 2
6	0.336 3
平均值	0.336 3
<i>RSD</i> 值	0.02%

由表 3 可知,样品在 12 h 内的吸光度相对标准偏差为 0.13%,说明热回流提取的样品溶液稳定性较好。

表 3 稳定性试验

序号	吸光度
1	0.660 3
2	0.660 8
3	0.661 3
4	0.662 0
5	0.662 2
6	0.662 6
平均值	0.661 5
<i>RSD</i> 值	0.13%

由表 4 可知,6 次重复试验结果的相对标准偏差为 0.49%,说明热回流提取的样品液重现性良好。

表 4 重复性试验

序号	吸光度
1	0.663 4
2	0.663 3
3	0.661 9
4	0.660 0
5	0.655 0
6	0.658 3
平均值	0.660 3
<i>RSD</i> 值	0.49%

由表 5 可知,5 个回收率试验结果的平均值为 100.4%,相对标准偏差为 2.48% (*n* = 5),说明此方法可以应用于向日葵列当中苯乙醇总苷含量的测定。

2.2 样品中苯乙醇总苷含量的测定

由表 6 可知,采用热回流法提取的苯乙醇总苷平均含量为 1.97%,说明向日葵列当中苯乙醇总苷含量较高。

表 5 回收率试验

序号	样品苯乙醇 总苷量 (mg)	标准品加入量 (mg)	实际测得值 (mg)	回收率 (%)
1	0.398 0	0.055 0	0.453 8	101.5
2	0.398 0	0.110 0	0.512 2	103.8
3	0.398 0	0.165 0	0.563 5	100.3
4	0.398 0	0.220 0	0.611 5	97.1
5	0.398 0	0.275 0	0.671 1	99.3

表 6 向日葵列当中苯乙醇总苷含量

样品批次	苯乙醇总苷含量 (%)	RSD 值 (%)
20130923	1.94	
20130928	1.98	
20131012	1.99	
平均	1.97	1.34

3 结论

本研究比较了超声波提取法、渗滤提取法、热回流提取法等不同提取方法对向日葵列当中苯乙醇总苷进行提取,结果表明,以热回流方法为佳,80% 乙醇回流法提取效果最好,在 5.5 ~ 27.5 μg/mL 范围内线性关系良好,回收率为 100.4%,RSD 值为 2.48% (n=5),向日葵列当中苯乙醇总苷平均含量为 1.97%。

(上接第 255 页)

1 000 CFU/g 范围内。本研究确定月饼的辐照杀菌剂量为:最低有效剂量为 3 kGy,最高耐受剂量为 6 kGy,可使辐照后的月饼符合有关国家标准规定的卫生要求。

3.2 讨论

刚烤制的月饼一般可认为是无菌的。月饼存放期间发霉变质的原因主要有以下几种:馅料炼制过程中冷却时间过长,微生物极易生长,造成月饼霉菌超标;烘烤过程中,中心温度达不到 85 ℃,微生物灭菌不彻底容易产生霉变;在包装过程中,未彻底冷却即包装或冷却后未及时包装,都容易导致表面受污染从而产生霉变;从业人员、工具、包装材料等均是微生物污染源,运输过程中因破损等原因也易受微生物污染。可见,二次污染是月饼储藏过程中霉变的主要原因。因此,控制辐照前月饼霉菌等含量,使其符合本研究设定的初始卫生标准,可以从上述环节或途径采取措施。月饼辐照时机可选择在刚生产包装完毕立即进行,此时感染的霉菌等微生物最少。

本研究选用的月饼均是常温下贮藏的月饼,对于冰月饼或雪月饼等低温贮藏产品,没有进一步研究,因此本研究确定的辐照杀菌剂量仅限于常温储藏月饼产品。

从 20 世纪 90 年代开始,南京辐照中心就开始开展辐照月饼试验和研究。笔者在与部分月饼生产企业的合作研究中,发现 3 kGy 剂量辐照处理的月饼在卫生、感官、品质上均能达到厂商要求。近年来笔者采用 3 ~ 6 kGy 剂量辐照处理月饼原料的小试研究和中试生产,客户反映效果也较好。因此,采用该工艺辐照月饼成品也是可行的。

参考文献:

[1] 4 种月饼存在严重质量问题 [EB/OL]. [2014 - 04 - 22].

参考文献:

[1] 汪劲式. 列当王国探奇[J]. 植物杂志,1995(1):29 - 31.
[2] 刘颖,齐艳春,任丽梅. 向日葵列当发生特点及防除对策[J]. 上海农业科技,2007(1):102.
[3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:8541.
[4] 刘晓林,赵秀香,魏颖颖,等. 向日葵列当粗提物对植物病原真菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学,2008(3):104 - 105.
[5] 高昂,姚默,崔超,等. 列当属药理学研究概况[J]. 安徽农业科学,2011,39(33):20394 - 20395.
[6] 赵梦霞. 向日葵列当化学成分及其活性研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2012.
[7] 曲正义,侯微,金银萍,等. 向日葵列当抗氧化活性研究[J]. 中药材,2010,33(11):1780 - 1782.
[8] 黄长权. 向日葵列当寄生机理的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2012.
[9] Sauerborn J, Buschmann H, Ghiasi K G, et al. Benzothiadiazole activates resistance in sunflower (*Helianthus annuus*) to the root - parasitic weed orobanche cuman[J]. Phytopathology, 2002, 92(1):59 - 64.
[10] de Zelicourt A, Letousey P, Thoiron S, et al. Ha - DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants[J]. Planta, 2007, 226(3):591 - 600.
<http://www.foods1.com/content/65230/>.
[2] 张凤娇,陈斌,郭亚萍,等. 辐照对月饼卫生和品质的影响[J]. 核农学报,2007,21(1):52 - 55.
[3] 蒋予箭,卫雅芳. 广式月饼的辐照保鲜[J]. 食品工业,2001(6):21 - 23.
[4] 邹伟民,郑世火,曹静,等. 广式月饼辐照防霉变质研究[J]. 核农学报,1999,13(2):48 - 50.
[5] 王艳燕,周登仁,庄子慧. 2001—2008 年海口市月饼微生物学检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(9):2303 - 2304.
[6] 刘惠敏,李军,周奉昌. 月饼中霉菌污染状况及菌相分布[J]. 海峡预防医学杂志,2001,7(6):59 - 60.
[7] 刘咏红,张群. 湖南省月饼卫生质量现状分析及其应对措施[J]. 湖南农业科学,2009(1):92 - 94.
[8] 张建华. 郑州市月饼卫生检测 5 年结果分析[J]. 现代预防医学,2011,38(3):574 - 575.
[9] 丁鹏. 2010 年赣州市月饼中甜味剂、防腐剂检测结果的分析[J]. 化学工程与装备,2010(12):153 - 154.
[10] 张冠峰,林海,曹舜珊. 中山市中秋月饼卫生质量评价[J]. 职业与健康,2010,26(9):1010 - 1011.
[11] 王宁,孙婷,李世凯,等. 2010 年山东省部分地区销售的月饼卫生状况调查[J]. 预防医学论坛,2011,17(9):829 - 831.
[12] Taipina M S, Garbelotti M L, Lamardo L C, et al. The effect of gamma irradiation on the nutritional properties of sunflower whole grain cookies[J]. Procedia Food Science, 2011, 1(1):1992 - 1996.
[13] Galón I, García M L, Selgas M D. Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid[J]. Meat Science, 2010, 84(3):437 - 443.
[14] 严建民,朱佳廷,冯敏,等. ⁶⁰Co - γ 辐照装置食品加工剂量监测规范[J]. 江苏农业科学,2012,40(11):264 - 266.