

实验技术与方法

比色法测定决明茶中总蒽醌衍生物

刘智勇¹, 宋新², 解魁³

(1. 河南省鹤壁市卫生监督中心, 河南 鹤壁 458030; 2. 河南省鹤壁市疾病预防控制中心, 河南 鹤壁 458030; 3. 河南省疾病预防控制中心, 河南 郑州 450016)

摘要:目的 建立比色法测定决明茶中总蒽醌衍生物含量的方法。方法 样品用混合酸水解后,用乙醚提取,挥发后,利用蒽醌衍生物和醋酸镁甲醇溶液反应显色的原理,测定反应物在515 nm波长处光密度,比色法定量。结果 该方法检出限为0.40 μg/ml,线性范围为2~10 μg/ml,相对标准偏差为0.29%~3.87%,平均回收率为92.0%~103.0%。结论 该方法分析速度快,具有良好的稳定性,适用于决明茶中总蒽醌衍生物含量的测定。

关键词:总蒽醌衍生物;决明子;比色法;保健食品

中图分类号:R155.1 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)04-0338-03

Determination of total anthraquinones in Cassia Seed tea with colorimetry

Liu Zhiyong, Song Xin, Xie Kui

(Agency for Health Inspection, Hebi 458030, China)

Abstract: Objective To set up a colorimetric method for the determination of anthraquinones in Cassia Seed tea. **Methods** Anthraquinones were extracted by a mixture of acid and ether. The coloration of anthraquinones with magnesium acetate solution was detected at the maximum optical density wavelength of 515 nm. **Results** The detection limit of the method was 0.40 μg/ml, The RSDs were 0.29% - 3.87% (n = 6) for anthraquinones (2-10 μg/ml). The recoveries were 92.0% - 103.0%. **Conclusion** The method was good at adaptability and repeatability, and can be used for the determination of anthraquinones in Cassia Seed tea.

Key words: Total anthraquinones; Cassia Seed; colorimetry; fuction food

决明子,是豆科植物决明或者小决明的干燥成熟的种子,具有清热明目、润肠通便的作用^[1],其主要功效成分之一是蒽醌类衍生物,蒽醌类衍生物是苷类水解后的一类非糖化合物,不仅有调节血脂、提高免疫力作用^[2,3],而且有抗菌消炎、抗病毒和抗肿瘤^[4-6]等多方面的生物活性。

目前,测定蒽醌类衍生物的含量有多种方法,主要有比色法、色谱法和化学发光法^[7-9]等。目前我国尚没有蒽醌类衍生物测定的国家标准方法,不同方法测定结果的差异较大。本文对决明茶中总蒽醌类衍生物含量的比色测定法进行了研究,为决明茶中总蒽醌衍生物的含量测定提供了快速、简便准确的参考方法。

1 材料与方

1.1 实验原理

试样经酸分解,乙醚提取后,蒽醌类衍生物和

醋酸镁甲醇溶液反应生成红色物质,与标准系列比较定量。

1.2 仪器与试剂

岛津紫外可见分光光度计;水浴锅;电子分析天平;氮吹仪(N-EVAPTM112,美国)。

盐酸、冰乙酸、石油醚、氯仿、甲醇和无水硫酸钠均为分析纯,国产;混合酸溶液:25%盐酸溶液2 ml加冰乙酸18 ml。0.4%醋酸镁甲醇溶液:取1 g醋酸镁溶于100 ml甲醇中;1,8-二羟基蒽醌标准品(纯度99.0%,Sigma)。

1.3 标准溶液的配制

称取1,8-二羟基蒽醌标准品25 mg,用乙醚定容到50 ml。浓度为500 μg/ml。取标准溶液储备液用乙醚稀释成50 μg/ml标准使用溶液。

1.4 样品溶液的配制

称取0.2 g左右的样品,加入混合酸15 ml,沸水浴回流1 h,用乙醚80 ml分3次萃取,水洗乙醚层至中性,过无水硫酸钠层后定容至100 ml容量瓶中。吸取0.5 ml溶液于25 ml具塞比色管中,于氮吹仪上除去溶剂。残渣加入0.4%醋酸镁甲醇溶液定容后室温放置30 min,在波长515 nm处,分别测

收稿日期:2010-01-11

作者简介:刘智勇 男 硕士 副主任医师 研究方向为营养与食品卫生

定光密度,与标准曲线比较定量。

同时按照上述步骤,分别采用石油醚和氯仿代替乙醚作为提取溶剂,比色后与标准曲线比较定量。

1.5 测定波长的选择

取 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准使用溶液(1.3)和样品制备溶液(1.4)各 1.0 ml,置于 25 ml 具塞比色管中,挥干溶剂后加入 0.4% 醋酸镁甲醇溶液定容到刻度,混匀。在分光光度计上 200 ~ 800 nm 进行扫描,确定最大吸收波长在 515 nm。

1.6 显色稳定性试验

取 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准溶液,于室温中放置 10、20、30、40、50、60 min 分别测定其光密度。其变化见图 1。

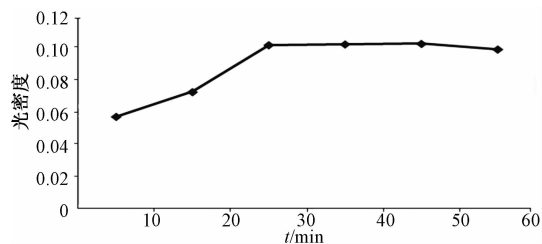


图 1 时间-光密度变化图

Figure 1 Time-optical density

1.7 标准曲线的绘制

吸取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 标准使用溶液(相当于 50、100、150、200、250 μg 蒽醌),分别置于 25 ml 具塞比色管中。置比色管于氮吹仪上挥干溶剂后,加入 0.4% 醋酸镁甲醇溶液定容到刻度,混匀。室温下放置 30 min 后,用 1 cm 比色杯,以 0.4%

醋酸镁甲醇溶液为空白,在波长 515 nm 处,分别测定光密度,见图 2。

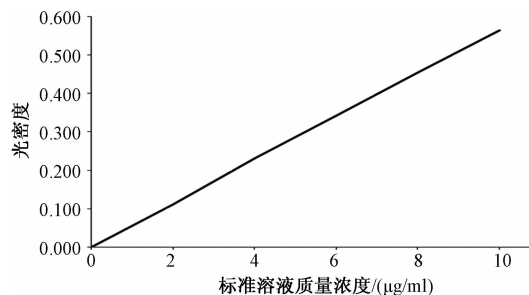


图 2 蒽醌衍生物标准曲线

Figure 2 Standard curve for anthraquinones

2 结果

2.1 线性范围和检出限

方法的线性范围 2 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,按照 3 倍空白光密度的标准偏差(测定次数 $n = 20$)相对应质量浓度计算,其检出限 0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。线性回归方程 $y = (1.994 \times 10^{-3})x + 1.014 \times 10^{-3}$,相关系数 $r = 0.9999$ 。

2.2 精密度

取 2、5、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准溶液,按照 1.4 的测定方法连续 6 次测定光密度,计算标准溶液光密度的标准偏差,见表 1。

2.3 回收率

取样品分别加入 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准溶液 2.00、5.00、10.0 ml 按照 1.4 用乙醚作为提取液处理后测定,计算加标回收率,见表 2。

表 1 方法精密度

Table 1 Precision of the method ($n = 6$)

水平($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1	2	3	4	5	6	均值	RSD(%)
2	0.1110	0.1009	0.1114	0.1121	0.1098	0.1112	0.1094	3.87
5	0.2312	0.2304	0.2279	0.2317	0.2341	0.2271	0.2304	1.12
10	0.5649	0.5651	0.5637	0.5632	0.5644	0.5607	0.5637	0.29

表 2 方法回收率试验

Table 2 Recovery of the method ($n = 6$)

加标水平	取样量(g)	含量(mg)	添加量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)
1	0.211	2.28	1.00	3.21	93.0	92.0
1	0.195	2.11	1.00	3.02	91.0	
2	0.199	2.15	2.50	4.57	96.8	
2	0.201	2.17	2.50	4.58	96.4	96.6
3	0.191	2.06	5.00	7.20	102.8	
3	0.204	2.20	5.00	7.36	103.2	103.0

2.4 样品测定

按照 1.4 的步骤测定,得出 3 种不同有机溶剂处理后,总蒽醌衍生物的结果见表 3。

3 讨论

3.1 样品提取条件的选择

决明茶中富含多种蒽醌类化合物,其存在形式以游离或与糖结合成苷。蒽醌苷除了大多以氧苷或碳苷化合物形式存在以外,也以二元和多元蒽醌环通过化学键连接的形式存在。因此,本文参考文献[10],采用了混合酸解的方法将结合态蒽醌苷水解为游离态。

表3 3种溶剂对总蒽醌衍生物提取的影响
Table 3 Effect of three solvents on the extraction of total anthraquinones ($n=3$)

提取溶剂	取样量(g)	平均含量(%)	RSD(%)
氯仿	0.193	—	—
石油醚	0.217	0.85	5.2
乙醚	0.206	1.08	0.64

注:—为未检出。

在提取溶剂的选择上,最后选用乙醚作为提取溶剂。由表3可见,采用石油醚作为提取溶剂,最终测定值较低和结果稳定性较差,可能由于石油醚由多种烷烃组成,对待测组分提取有影响所致;而采用氯仿作为提取溶液则没有测出结果,分析其原因可能是氯仿和混合酸中的冰乙酸互溶而造成的无法提取待测物。

3.2 比色测定条件选择

通过在紫外-可见分光光度计上扫描样品制备溶液和标准溶液的紫外吸收光谱,观察紫外吸收光谱图发现反应物在515 nm处有较大的吸收,因此选用了515 nm作为检测波长;通过对标准溶液的光密度在不同时间的测定(见图1),发现反应溶液在30~60 min较为稳定,考虑到分析速度,选择了30 min的反应时间作为实验条件。

3.3 测定结果分析

从标准曲线绘制和样品比色情况看,其最终反应物的光密度均在0.1~0.6之间,并且标准曲线线性良好($r=0.9999$),样品待测液的最最终反应物的光密度又处于曲线内,定量较准确。需要注意的是,样品中总蒽醌衍生物含量较高,取样量不能太大,否则需要加大混合酸的用量、提取液的用量和次数,试验证明,取样量应根据样品中总蒽醌衍生物的含量做调整,大致控制在0.1~0.2 g之间较好。精密度实验说明在整个曲线范围内,其光密度标准偏差均 $<4\%$,重复性较好。回收率实验说明在3个水平的加标下,本文方法的回收率范围为92.0%~103.0%,回收率较高。

3.4 存在问题

从多个样品的比色情况来看,标准曲线的反应溶液的颜色为紫红色,而样品的反应溶液则并非如此,分析原因是由于蒽醌衍生物种类较多所致,解决这些问题可以通过色谱法分离后分别测定。

4 结论

本法测定线性范围较宽,在2~10 $\mu\text{g/ml}$ 的线性范围内,其相关系数均 >0.999 ;其次,精密度较高,在2~10 $\mu\text{g/ml}$ 范围内RSD均 $<4.0\%$;适用于决明茶功能成分的快速测定。

本文方法可用于大多数决明茶功能成分的快速测定,在分析速度上优于其他方法。测定结果为总蒽醌衍生物含量,可作为保健成分的参考指标之一。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典[M]. 2005:98.
- [2] 陆宗良,寇火熔,徐文框,等. 决明子散剂调节血脂的临床研究[J]. 中国新药杂志,1998,7(6):449.
- [3] 南景一,王忠,沈玉清,等. 决明子对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 辽宁中医杂志,1989(5):43.
- [4] 邱德文,沙凤桐,谢宝忠,等. 红眼滴眼液抗腺病毒实验研究[J]. 中国中医眼科杂志,1992,2(3):156.
- [5] 郑水庆,秦路军. 几种植物抗真菌活性成分研究近况[J]. 国外医学植物药分册,1999,14(4):158.
- [6] JAE S C, HEE J L, KUN Y P, et al. In vitro antimutagenic effects of anthraquinone aglycones and naphthopyrone glycosides from *Cassia tora*[J]. Planta Medica, 1997, 63:11.
- [7] 周红燕,陈建伟. 紫外分光光度法测定炒决明子中总蒽醌含量[J]. 天津中医药,2007,24(2):156-158.
- [8] 张毅,黄小平,翁代群,等. HPLC测定不同产地决明子中蒽醌类成分[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2797-2799.
- [9] 贾宝秀,齐永秀,张波,等. 流动注射化学发光法测定决明子中总蒽醌含量[J]. 泰山医学院学报,2008,29(11):868-871.
- [10] 黄琼华. 正交试验法优选决明子提取工艺[J]. 海峡药学, 2004,16(4):14.