

红外光谱技术在槐米总黄酮提取过程中的应用



ZHANG Li-ming



ZHAO Xi

张黎明¹, 赵希¹, 高文远²

(1. 天津科技大学生物工程学院工业微生物重点实验室, 天津 300457;
2. 天津大学药物科学与生命技术学院, 天津 300072)

摘 要: 以芦丁标准品作对照,应用分光光度法和红外光谱法(FT-IR)对碱提酸沉法、乙醇回流法和超声波辅助法 3 种不同提取方法制备的槐米总黄酮提取物进行分析。结果表明,利用碱提酸沉法提取,碱提取液 pH 值 9 及硼砂作稳

定剂时,所得提取物的得率和总黄酮含量均较高,分别为 19.44 % 和 82.53 %;由于提取方法和条件的不同,对应提取物红外光谱的特征峰型、峰高和峰位置存在一定的差异,通过分析提取物红外图谱特征,并与芦丁标准品比较,将为采用定量分析方法结合红外光谱技术控制槐米总黄酮提取物的质量提供参考依据。

关键词: 槐米;黄酮类化合物;提取物;芦丁

中图分类号:TQ91

文献标识码:A

文章编号:0253 - 2417(2007)S0 - 0060 - 05

Extraction and FT-IR Spectral Identification of Flavonoids Extracted from the Buds of *Sophora japonica* Linn.

ZHANG Li-ming¹, ZHAO Xi¹, GAO Wen-yuan²

(1. Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Flavonoids from the buds of *Sophora japonica* Linn. were extracted by three different methods, namely alkali extraction followed by acid sedimentation, ethanol refluxing and ultrasound-assisted extraction. The extraction conditions, including pH value of solvent and the kind of stabilizer were researched as well. Furthermore, with rutin as comparison, the flavonoids content of different extracts from buds of *Sophora japonica* L. and their FT-IR spectra had been determined. The results showed that both the yield and purity of the products by alkali extracting followed by acid sedimentation with the extract adjusted to pH value 9 containing borax as stabilizer were higher than others. Meanwhile, the typical FT-IR spectra of every sample had specific absorption peak pattern, intensity and location, related to different extracting technology. Among them, the FT-IR spectrum of flavonoids obtained under the above optimum extraction technology was similar to that of standard rutin. Therefore, quantitative analysis along with their FT-IR spectra provide a favorable foundation for quality control of flavonoids from the buds of *Sophora japonica* Linn. .

Key words: buds of *Sophora japonica* Linn. ; flavonoids; extracts; rutin

槐米是豆科植物槐树(*Sophora japonica* Linn.)的未开花蕾,含有丰富的芸香苷(rutin,芦丁)、三萜皂苷等,具有凉血止痛、清肝泻火之功效;用于多种血热出血症、以及肝火上炎之头痛、目赤等。药理学实验已经证实,芦丁不但具有维生素 P 的作用,而且能够抗菌消炎,有防止血管脆性和止血作用^[1]。目前,已经有许多关于槐米总黄酮提取方法的报道,如碱提酸沉法、乙醇回流法、水提取法、超声波辅助法以及酶法提取等。为促进植物提取物质量标准化,发展多种快速、有效、操作简便、适于推广的质量控制检测方法,目前,高效液相色谱(HPLC)^[2]和薄层色谱(TLC)^[3]等方法已经用于中药提取物有效成分的测定。然而,HPLC作为一种分离检测手段,耗时长,工作量大,需根据不同样品确定不同的分离条件,使得操作较为繁琐。薄层色谱以及薄层扫描也有耗时长、所得结果不够精确等缺点。红外光谱(FT-

IR)是一种测定物质分子吸收光谱的方法,利用分子振动或转动引起偶极矩的净变化产生吸收光谱,可以鉴别化合物及其分子结构。红外光谱制样简单、操作方便,且重现性好,具有专属性指纹特性,是一种值得推广的研究中药指纹图谱的新方法,现已用于中药材及其提取物的快速鉴别和质量控制上^[4-6]。但是利用红外光谱技术研究不同提取方法以及不同提取条件对提取物质量影响的报道却很少见。作者在采用不同提取方法和条件制备槐米总黄酮的基础上,通过定量分析结合红外光谱技术研究这些槐米提取物的总黄酮含量和红外指纹图谱特征,旨在为建立快速、有效、操作简便、适于推广的中药提取物质量控制方法提供示范研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

材料:芦丁标准品 A 由中国药品生物制品检定所提供,槐米购自天津市中药饮片厂。氧化钙、硼砂、焦亚硫酸钠、盐酸、乙醇、乙醚、丙酮均为分析纯。仪器:VECTOR22 型傅立叶变换红外光谱仪,SP-2000UV型紫外可见分光光度计,KQ3200DE 型数控超声波清洗器,Helzdad WB 型旋转蒸发仪。

1.2 样品制备

分别采用碱提酸沉法、乙醇回流法和超声波辅助法制备槐米总黄酮提取物。碱提酸沉法参考文献[7]:即取 50 g 槐米粉碎,加入澄清石灰水 900 mL,硼砂 1.5 g,焦亚硫酸钠 1.5 g,调节提取液 pH 值 9,65 ℃ 恒温搅拌提取 55 min,趁热过滤,重复提取一次,滤液用盐酸调节 pH 值 2~3,放置过夜,抽滤,滤渣真空干燥得产品 C。乙醇回流法参考文献[8]:即槐米粗粉 50 g,加入体积分数 70% 的乙醇 500 mL,65~70 ℃ 下回流搅拌提取 2 h,趁热过滤,重复提取一次,滤液浓缩,静置过夜,滤去沉淀,用乙醚、丙酮洗涤,真空干燥得产品 D。超声波辅助结合碱提酸沉法参考文献[9]:在超声波清洗器中进行超声波处理,超声波频率为 40 kHz,功率 120 W,室温下提取两次,每次 30 min,用盐酸调节 pH 值 2~3,静置过夜,抽滤,滤渣真空干燥得到产品 B。

采用碱提酸沉法,用澄清石灰水调节碱提取液的 pH 值至 8、9 和 10,其它条件不变的情况下,得到碱提取液不同 pH 值下的槐米总黄酮提取物 E、F、G。同样,选择不加稳定剂、加 1.5 g 硼砂、1.5 g 硼砂和 1.5 g 焦亚硫酸钠 3 种类型,其它条件不变情况下,分别进行提取,得到不同类型稳定剂制备的槐米总黄酮提取物 H、I、J。

1.3 槐米总黄酮提取物产率及含量的测定

将 1.2 节制备的样品 B~J 于 65 ℃ 下真空干燥并称质量,分别计算槐米总黄酮得率。采用分光光度法,对以上不同提取方法和条件下制备的样品进行含量测定。本试验以芦丁为标准品制作标准曲线^[10],用最小二乘法做线性回归,得(以芦丁计)槐米总黄酮质量浓度(c ,g/L)与吸光度(A)关系曲线的回归方程: $c = 0.08394A - 0.00132$,相关系数 $R^2 = 0.9996$ 。

样品含量测定:将待测样品粉末于 120 ℃ 烘箱中活化 4 h,样品溶液的制备参考标准品溶液的制备。然后按标准曲线制备项下的方法在 510 nm 处测定各样品吸光度,每个样品平行测 3 次。通过标准曲线方程求出总黄酮质量浓度,计算不同提取方法和条件下所得产品中总黄酮的含量。

1.4 红外光谱测定

红外光谱测定在布鲁克仪器公司的 VECTOR22 型傅立叶变换红外光谱仪上完成,测量范围为 400~4000 cm^{-1} ,光谱分辨率为 4 cm^{-1} ,信号扫描累加 16 次。实验时,将 1.2 节制备的样品研磨成细粉,每个样品取约 5 mg 与 150 mg KBr 充分混匀,压片,放入样品室,以芦丁标准品作对照,在相同条件下测定不同提取物的红外吸收光谱图。

2 结果与分析

2.1 不同提取物的得率及总黄酮含量分析

不同提取物的得率及总黄酮含量见表 1。由表 1 可以看出:碱提酸沉法所得提取物 C 的得率高达

19.44%,总黄酮含量(质量分数,%,下同)亦高于其它两种提取方法的结果,其中超声波辅助结合碱提酸沉法所得提取物的总黄酮含量结果最差;碱提取液 pH 值 9 的提取物 F 的得率和总黄酮含量优于其它 pH 值条件下的结果。以硼砂为稳定剂时,所制备的提取物 I 的得率和总黄酮含量明显优于未使用稳定剂和复合稳定剂的提取效果。

2.2 芦丁标准品的红外光谱分析

由于槐米总黄酮中的主要成分是芦丁,所以在槐米总黄酮定量分析的基础上,作者又以芦丁标准品的红外光谱图为对照,对上述提取

方法和提取条件下所得提取物的红外指纹特征进行了深入分析。由芦丁标准品 A 的红外光谱图可以看出:特征区内,3386 cm^{-1} 处有一宽而强的吸收峰,这是化学键—OH 伸缩振动峰;2931 cm^{-1} 处的弱吸收峰是由化学键—CH 反对称伸缩振动引起的;1656 cm^{-1} 处出现 C=O 伸缩振动的强吸收峰;1606 cm^{-1} 处的强峰以及 1502、1446 cm^{-1} 两处中强峰是芳环中 C=C 双键伸缩振动吸收峰^[11]。在 1350~610 cm^{-1} 的指纹区内,吸收峰比较密集,且具有各自专属性指纹特征。

2.3 不同提取方法所得槐米总黄酮的红外光谱分析

不同提取方法所得槐米总黄酮红外光谱如图 1 所示。由图 1 可以看出,碱提酸沉提取物 C 与芦丁标准品 A 的红外吸收光谱基本一致,说明该法提取效果较好,产品中杂质含量低。乙醇提取物 D 在 1400、1122、1012 cm^{-1} 处具有明显的吸收峰,而标准品在相应的波数仅有不明显的肩峰;另外,标准品在 1656 和 1606 cm^{-1} 处两峰强度相近,而醇提取物 D 在 1598 cm^{-1} 处的吸收峰向低波数位移了 8 cm^{-1} ,其相对强度也明显高于 1656 cm^{-1} 的吸收峰。这可能是由于乙醇提取槐米总黄酮的过程中,其它醇溶性成分如白桦脂醇、槐二醇等也随之溶出。超声波提取物 B 的红外光谱与标准品相差较远,其在 1564、1263、1169 和 1014 cm^{-1} 处表现出明显的吸收峰,而标准品在相应波数仅出现不明显的肩峰或很小的峰,提取物 B 在 1518 和 1365 cm^{-1} 的吸收峰较标准品分别向高波数位移了 16 和 5 cm^{-1} ;另外,标准品在 1064 cm^{-1} 处吸收是一个单峰,而提取物 B 则为该峰在顶端分裂为两个小峰,且强度明显减弱。说明在超声波条件下提取总黄酮时,对提取物成分的影响较大。

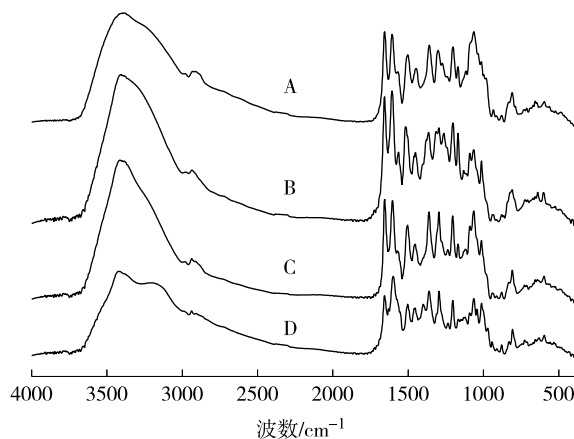
由 3 种方法所得槐米总黄酮提取物得率和总黄酮含量测定结果(见表 1)也可知道,碱提酸沉法所得样品得率和总黄酮含量最高,分别为 19.44% 和 82.53%。用乙醇提取槐米总黄酮的过程中,由于醇溶性杂质的溶出,导致提取物 D 纯度下降。在超声波辅助提取时,可能由于有效成分发生降解,导致其得率和总黄酮含量结果偏低,因此,超声波辅助提取槐米总黄酮应该注意超声波条件对提取物的影响。

2.4 碱提取液不同 pH 值所得槐米总黄酮的红外光谱分析

碱提取液不同 pH 值所得槐米总黄酮红外光谱如图 2 所示。由图 2 可以看出,碱提取液 pH 值 9 的

表 1 不同提取物得率及总黄酮含量

样品 samples	得率/% yield	总黄酮质量分数/% flavonoids mass fraction
A	—	99.72
B	15.60	59.01
C	19.44	82.53
D	18.23	67.82
E	7.96	50.51
F	18.81	80.61
G	18.24	54.64
H	14.92	54.60
I	19.71	97.22
J	19.03	78.23



A. 芦丁标准品 standard rutin; B. 超声波辅助提取物 extracts by ultrasound-assisted method; C. 碱提酸沉提取物 extracts by alkali dissolving and acid sedimentation; D. 乙醇提取物 extracts by ethanol reflux

图 1 不同提取方法所得样品的红外光谱图

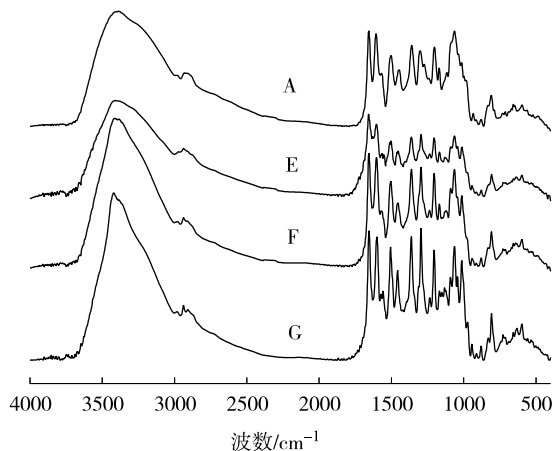
Fig. 1 FT-IR spectra of samples extracted by different methods

提取物 F,其红外光谱特征最接近芦丁标准品。pH 值 8 的提取物 E 的红外光谱吸收峰形及峰位置与标准品大体相同,谱图差异主要表现在某些峰的相对强度有所不同,例如:提取物 E 在 1656 cm^{-1} 处的吸收峰明显强于 1606 cm^{-1} 处的吸收峰,而标准品在相应波数处两峰强度相近;此外,提取物 E 在 1064 cm^{-1} 处吸收峰强度较标准品明显减弱,且在低波段 1012 cm^{-1} 处出现一弱峰。以上谱图差异说明碱性较弱时,提取物中的主要化学成分与标准品基本相似,只是其中某些成分的相对含量有所区别。pH 值 10 的提取物 G 在 1558 、 1132 、 1014 和 879 cm^{-1} 处存在 4 个明显的吸收峰,而标准品仅有不明显的肩峰或很小的峰。该提取物 G 在 1302 cm^{-1} 处吸收峰的相对强度与标准品不同,提取物 G 相对较强,标准品相对较弱;另外,对应标准品 1606 cm^{-1} 处的吸收峰,提取物 G 在 1601 cm^{-1} 处的吸收峰向低波数位移 5 cm^{-1} ,对应标准品 1446 cm^{-1} 处的吸收峰,提取物 G 在 1458 cm^{-1} 处的吸收峰,向高波数位移 12 cm^{-1} 。这说明提取物 G 与标准品在成分上存在一定差异。

通过测定不同碱提取液 pH 值所得槐米总黄酮提取得率和总黄酮含量(见表 1),也可知道,最佳碱提取液 pH 值为 9;当 pH 值 <9 时,可能由于提取液碱性较弱,总黄酮溶解不完全,使得提取物得率和纯度下降;但是 pH 值过高(如 pH 值 >10),强碱性条件下加热提取会破坏总黄酮母核,导致提取物纯度下降。

2.5 加入不同稳定剂所得槐米总黄酮的红外光谱分析

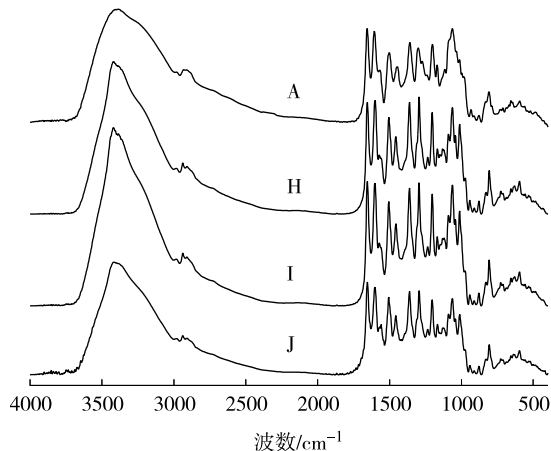
文献报道用碱提酸沉法提取槐米总黄酮时常用单一稳定剂硼砂或复合稳定剂硼砂加焦亚硫酸钠来保护总黄酮母核。加入不同稳定剂所得槐米总黄酮的红外光谱如图 3 所示。



A. 芦丁标准品 standard rutin; E. pH 值 8 pH value 8;
F. pH 值 9 pH value 9; G. pH 值 10 pH value 10

图 2 碱提取液不同 pH 值所得提取物的红外光谱图

Fig. 2 FT-IR spectra of samples extracted by alkali with different pH values



A. 芦丁标准品 standard rutin; H. 不加稳定剂 without stabilizer;
I. 加硼砂稳定剂提取物 extracts with borax as stabilizer; J. 加硼砂和焦亚硫酸钠复合稳定剂提取物 extracts with borax and sodium metabisulfite as stabilizer

图 3 加入不同稳定剂所得样品的红外光谱图

Fig. 3 FT-IR spectra of samples extracted with addition of different stabilizers

由图 3 可以看出,加入单一稳定剂制备的提取物 I 和加入复合稳定剂制备的提取物 J,它们的红外谱图整体上与芦丁标准品比较接近,但也存在细微差别。比如,提取物 J 在 1558 cm^{-1} 处出现一弱吸收峰,而标准品仅在 1606 cm^{-1} 强峰的右侧出现一肩峰,另外,其在 1064 cm^{-1} 处吸收峰的相对强度较标准品明显减弱。在提取过程中不加稳定剂所得提取物 H,其红外光谱与标准品相差较大,如在 1601 cm^{-1} 处的吸收峰较标准品 1605 cm^{-1} 向低波数位移 4 cm^{-1} ;而在 1456 cm^{-1} 处的吸收峰较标准品 1446 cm^{-1} 向高波数位移 10 cm^{-1} ;此外,提取物 H 在 1601 cm^{-1} 与 1302 cm^{-1} 两处吸收峰强度与标准品有差别,提取物 H 的吸收强度均较大。这可能与不加稳定剂提取时,总黄酮母核结构中的邻二酚羟基被破坏有关。

从表 1 列出提取物 H、I 和 J 的得率和总黄酮含量结果可以看出,使用复合稳定剂反而造成提取物 J

的得率和总黄酮含量比使用单一稳定剂的提取物 I 要低;而提取物 H 由于部分黄酮结构被破坏使得其得率和总黄酮含量显著降低。结合提取物得率和总黄酮含量可以得出:在提取槐米总黄酮的过程中,只加入一种稳定剂硼砂的提取效果优于加入复合稳定剂或未使用稳定剂的效果。

3 结论

3.1 利用红外光谱可以反映不同提取方法和提取条件所得提取物的指纹特征,从提取物整体(有效成分和杂质)的角度评价提取工艺的优劣。由于提取方法和条件不同,产品中所含化学成分及基团含量有所差异,对应红外图谱表现出不同的峰形、峰高及峰位。

3.2 从提取物得率和总黄酮含量分析得出,碱提酸沉法提取槐米总黄酮,当碱提取液 pH 值 9、硼砂作稳定剂时,提取效果最佳,分别为 19.44% 和 82.53%。在上述较佳提取方法和条件下,所得提取物的红外图谱与芦丁标准品图谱最为接近,说明利用红外光谱法可以为槐米总黄酮提取物质量控制提供辅助信息。

3.3 通过建立不同提取方法和提取条件所得提取物的定量(分光光度法)、定性(红外光谱)指纹图谱库,可以简单易行、快速、方便地对中药提取物进行质量控制。

参考文献:

- [1] 南京药学院. 中草药学[M]. 南京:江苏人民出版社, 1983: 67-69.
- [2] 张国新, 李娟, 张鹏, 等. 湖北贝母的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 药学学报, 2005, 40(9): 850-853.
- [3] 张贵君. 常用中药薄层色谱鉴定[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.
- [4] 周群, 李静, 孙素琴, 等. 中药配方颗粒红外光谱法的快速鉴别[J]. 分析化学, 2003, 31(3): 292-295.
- [5] 陆婉珍, 袁洪福, 徐广通. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京:中国石化出版社, 2000: 14-36.
- [6] 吴群绒, 胡盛, 杨光忠, 等. 滇黄精多糖 I 的分离纯化及结构研究[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(2): 80-82.
- [7] 舒晓宏, 冯梅, 陈华. 槐米中芦丁提取最佳 pH 值的实验研究[J]. 大连医科大学学报, 2005, 27(2): 91-92.
- [8] 季梅, 李强. 槐米中芦丁的提取工艺研究[J]. 山东医药, 2002, 42(33): 40-41.
- [9] PANIWNKY L, BEAUFOY E, LORIMER J P, et al. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica* [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2001(8): 299-301.
- [10] 刘树兴. 芦笋中芦丁的提取及其鉴定[J]. 食品工业科技, 2001, 22(4): 39-41.
- [11] 苏克曼, 潘铁英, 张玉兰. 波谱解析法[M]. 上海:华东理工大学出版社, 2002: 92-117.