

# 紫外分光光度法测定八角枫中水杨苷的含量

斯佳丽<sup>1</sup>, 翟科峰<sup>1,2,3</sup>, 徐佳佳<sup>1</sup>, 胡梦雪<sup>1</sup>, 张振馨<sup>1</sup>, 马海洋<sup>1</sup>, 王青遥<sup>2</sup>

(1. 宿州学院 特色种植业苗种生产工程技术研究中心, 安徽 宿州 234000; 2. 宿州学院 生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000; 3. 宿州学院 药物生物技术研究, 安徽 宿州 234000)

**摘要:**为建立紫外分光光度法测定八角枫中水杨苷的含量,以水为溶剂,回流提取八角枫中水杨苷,采用香草醛-高氯酸法显色,紫外分光光度法扫描,确定最大吸收波长,通过精密度试验,稳定性试验,加样回收试验建立水杨苷含量的测定方法。水杨苷的紫外扫描的结果表明:水杨苷的最大吸收波长为 281 nm,水杨苷标准液浓度在 34.40~172.10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时浓度与吸光度呈现良好的线性关系,线性回归方程为  $Y=0.0063X-0.0107$ ,  $r=0.999\ 3$ ,加样回收率为 100.29%。该方法操作简便、准确、快速,可用于八角枫中水杨苷的定量检测。

**关键词:**八角枫;水杨苷;紫外分光光度法;含量测定

中图分类号:S567.1 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2016)05-0114-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.05.0114

八角枫 (*Alangium Chinese* (Lour.) Harms)  
属八角枫科八角枫属植物,别名华瓜木,柽木等,

主要分布于珠江流域及长江流域各省区均,东南亚及非洲东部,且资源丰富<sup>[1]</sup>。八角枫的根有祛风,通络,散瘀,镇痛,并有麻醉及松弛肌肉作用,主治风湿疼痛,麻木瘫痪,心力衰竭,劳伤腰痛,跌打损伤的疗效<sup>[2]</sup>。八角枫含有糖及其苷类、氨基酸、酚类和鞣质、皂苷、甾体、三萜、强心甘、萜醌及其苷类、生物碱、有机酸等生物活性成分<sup>[1-2]</sup>。研究显示以水杨苷为代表的苷类成分为八角枫主要活性成分<sup>[3]</sup>。水杨苷类化合物具有解热、镇痛的功效,且在人体类的毒副作用小于其它萜醌类和吡唑酮类解热镇痛药而受到极大的关注,同时也广泛用于食品、美容等领域<sup>[4]</sup>,因此,国内外的需求量也越来越大。

收稿日期:2016-03-13  
基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(1608085QH185);安徽省教育厅自然科学研究重点资助项目(KJ2015A220);安徽省高校省级优秀青年人才支持计划重点资助项目(gxyq ZD2016348);宿州学院博士启动基金资助项目(2015jb12);安徽省大学生创新创业计划资助项目(201510379120);宿州区域发展协同创新中心开放课题资助项目(2015SZXTZXK-FYB03,2015SZXTXSKF03)  
第一作者简介:斯佳丽(1995-),女,安徽省望江县人,在读学士,从事中药效应物质基础与作用机理研究。E-mail:sijiali@126.com。  
通讯作者:翟科峰(1981-),男,安徽省无为县人,博士,讲师,从事中药效应物质基础与作用机理研究。E-mail:kefengzhai@163.com。

## Screening and Isolation of High Neutral Protease Yielding Strains and Study on the Best Fermentation Performance

LU Zhen<sup>1</sup>, CHEN Fu-jia<sup>1</sup>, LI En-zhong<sup>1</sup>, LIU Jia-yang<sup>1</sup>, LU Zi-zhou<sup>1</sup>, ZHANG Jian-she<sup>2</sup>, GAO Sheng-qin<sup>2</sup>

(1. Biological Engineering Department of Huanghuai University, Zhumadian, Henan 463000; 2. Henan Yupo Limited Company, Zhumadian, Henan 463900)

**Abstract:** In order to extract the strains with high yield neutral protease from high temperature Daqu, enzyme production conditions were studied and authenticated. 8 Jiangxiang bacterial strains were isolated from the high temperature Daqu before, and the strain GX03 with high-yield of neutral protease was isolated from the 8 Jiangxiang bacterial strains. It was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* through the physiological and biochemical characteristics and molecular identification. The optimal condition for the fermentation were as follows: moisture content 35%, the strain inoculation amount 11%,  $\text{NaNO}_3$  as nitrogen source, the initial pH 5.5, fermentation time for 6 days. Under this conditon, the neutral protease was  $567.30\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ .

**Keywords:** microorganism; sauce bacterium; neutral protease; enzyme activity

目前天然水杨苷类化合物的提取主要来自于柳杨科植物,很少有从八角枫中提取。有关学者建立薄层色谱法、分光光度法、高效液相色谱法<sup>[5-6]</sup>等方法测定柳杨科植物中水杨苷的含量,但是针对八角枫中水杨苷含量测定方法目前仅有高效液相色谱法<sup>[7-8]</sup>。高效液相色谱法虽然精密度、准确性、重现性较好,但仪器价格昂贵,所需试剂要求较高,与紫外分光光度法相比操作相对繁琐、对操作者要求也较高。因此,本试验采用紫外分光光度法对其含量进行进一步测定,该法具有操作简便、快速、重现性好,仪器价格较低,普适性较强等特点,可为八角枫中水杨苷成分的开发和利用奠定了重要基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验仪器有 UV-3600 紫外可见分光光度计(日本岛津公司)、SHBⅢ循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)、FA2004 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)、HH-S 恒温水浴锅(江苏国盛实验仪器厂)、80-2 型电动离心机(金城国盛实验仪器厂);供试材料为八角枫(购自安徽省亳州市药材市场),水杨苷对照品 S0625-5G D(-)-Salicin(美国 Sigma 公司);供试试剂为香草醛、高氯酸、冰乙酸、甲醇等,均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 水杨苷对照品的制备** 精密称取水杨苷标准品 17.1205 mg 置 10 mL 量瓶中,用 50% 甲醇定容,制成浓度为  $1.71205 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的母液。准确移取 1 mL 母液置 25 mL 量瓶中,用 50% 甲醇定容,配制浓度为  $68.482 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的水杨苷标准液。

**1.2.2 八角枫样品制备** 取一定量八角枫药材,精密称定,按 1:20 料液比,加水回流 1.5 h,离心,将滤液置 50 mL 量瓶中,蒸馏水定容,即得供试品。

**1.2.3 吸收波长的确定** 参照文献<sup>[6]</sup>方法,取水杨苷标准液( $68.482 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )0.5 mL 于试管中,加 5% 的香草醛冰乙酸溶液 0.2 mL,加入高氯酸 0.8 mL,摇匀,放在 60 °C 水浴中加热 15 min,取出后立即用冰浴冷却,加入 5 mL 冰乙酸稀释,以不加水杨苷标准品作为空白对照组,作紫外扫描,确定最大吸收波长。紫外扫描结果表明水杨苷在 281 nm 处有最大吸收峰(见图 1)。

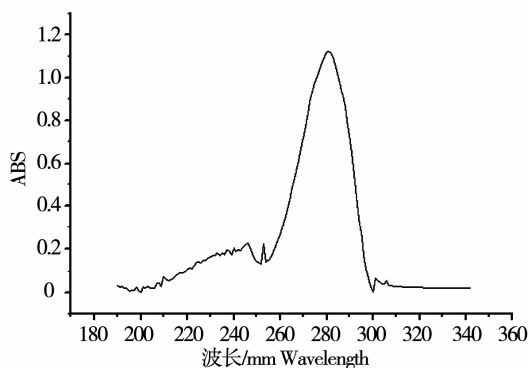


图 1 水杨苷紫外特征吸收图

Fig. 1 UV characteristic absorption of salicin

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的制备

从水杨苷母液中分别移取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,用 50% 甲醇定容,配制成系列浓度,按照“1.2.2”的方法显色,测定其吸光度。以吸光度与其浓度进行线性回归,回归方程为  $Y=0.0063X-0.0107$ ,  $r=0.9993$ 。水杨苷浓度在  $34.241 \sim 171.205 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时呈良好的线性关系。

### 2.2 精密度试验

准确移取浓度为  $171.205 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的水杨苷标准液,按“1.2.2”方法下显色,连续测定 5 次,计算浓度的 RSD 为 0.10%。

### 2.3 稳定性试验

精密移取浓度为  $171.205 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  水杨苷标准液,按照“1.2.2”方法显色,分别在 0、1、2、3、4 h 时测定吸光度,计算浓度的 RSD 为 1.80%。

### 2.4 重复性试验

称取 1 g 同一批八角枫药材 5 份,精密称定。按“1.2.2”项制备样品,按“1.2.3”项方法显色,测定吸光度,计算含量的 RSD 为 1.63%。

### 2.5 加样回收率考察<sup>[9]</sup>

精确称取 5 份已测定含量的八角枫药材各 1 g,分别加入浓度  $1712.05 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准品 1 mL,按“1.2.2”制备样品,按“1.2.3”方法显色,测定吸光度,结果见表 1,水杨苷的回收率为 100.29%,RSD 为 0.85%。

### 2.6 三批药材测定

精密称取三批的八角枫样品 1 g,按“1.2.2”制备样品,按“1.2.3”方法显色,测定吸光度,代入标准曲线,计算样品的含量,结果水杨苷的含量分别为  $4.7259$ 、 $4.7615$ 、 $4.6392 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (RSD=1.34%)。

表 1 加样回收试验

Table 1 Recovery experiments of adding sample

样品/g Sample	样品含量/ $\mu\text{g}$ Content of sample	加入量/ $\mu\text{g}$ Amount	测得值/ $\mu\text{g}$ Measured value	回收率/% Recovery rate	平均回收率/% Mean recovery rate	RSD/%
1. 0492	5074. 77	1712. 05	6808. 7302	101. 28		
1. 0127	4898. 23	1712. 05	6628. 5714	101. 07		
1. 0515	5085. 9	1712. 05	6786. 5079	99. 33	100. 29	0. 85
1. 0527	5091. 7	1712. 05	6799. 2063	99. 73		
1. 0856	5250. 83	1712. 05	6963. 4921	100. 04		

3 结论与讨论

本试验采用紫外分光光度法对三批八角枫药材中水杨苷进行测定,测得水杨苷平均含量约为 $4.7\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。该方法快速简单,灵敏高、准确可靠,可以作为八角枫中水杨苷含量测定的方法。

香草醛-高氯酸显色方法目前已广泛用于苷类的检测,香草醛—高氯酸法能与苷类化合物反应形成特征的红色。其显色原理是高氯酸将苷元的酚羟基氧化为羧基,增加 1 个双键结构,再经双键位移,双分子缩合等反应生成共轭双键系统,又在酸的作用下形成阳碳离子盐而显色。显色时要注意显色时间、温度、冰水浴等条件,5%香草醛—冰乙酸试剂需现配现用。显色后作最大吸收波长紫外扫描时发现最大吸收波长与有关报道的最大吸收波长有出入,根据实际情况最终选定紫外图谱显示的最大吸收波长作为本试验的条件。试验过程中也对八角枫提取液进行显色扫描,发现图谱中已存在的 253 nm 处最大吸收峰的峰太宽,

将 281 nm 处水杨苷吸收峰覆盖了,对试验造成了一定影响,因此不能用紫外分光光度对八角枫提取液直接进行测定。

参考文献:

[1] 徐佳佳,翟科峰,董璇,等. 八角枫的研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2016(2):143-146.

[2] 翟科峰,王青遥,叶竹青,等. 八角枫化学成分的系统定性研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(2):295-296.

[3] 段红,翟科峰,曹稳根,等. 响应面法优化八角枫中水杨苷的提取工艺[J]. 北京中医药大学学报,34(5):322-326.

[4] 段红,翟科峰,高贵珍,等. 大孔吸附树脂纯化八角枫根中水杨苷工艺[J]. 食品科学,2012,33(22):99-102.

[5] 惠玉虎,王让成. RP-HPLC 法测定白柳皮提取物中水杨苷的含量[J]. 中草药,2004,35(5):524-525.

[6] 闫雪,钱和,张根义. 分光光度法测定水杨苷含量的研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(1):111-113.

[7] 段红,翟科峰,高贵珍,等. RP-HPLC 测定八角枫药材中的水杨苷[J]. 光谱实验室,2012,29(2):1065-1068.

[8] Zhai KF,Gao GZ,Cao WG,et al. Simultaneous HPLC Determination of Four Active Compounds in Fengshiding Capsules Chinese Medicine, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences,2014,76(5):379-466.

[9] 詹利之,杨家庆,杨兆丽,等. 紫外分光光度法测定抗疟药哌喹的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(11):2182-2184.

Determination of Salicin from *Alangiaceae* by Ultraviolet Spectrophotometry

SI Jia-li<sup>1</sup>, ZHAI Ke-feng<sup>1,2,3</sup>, XU Jia-jia<sup>1</sup>, HU Meng-xue<sup>1</sup>, ZHANG Zhen-xin<sup>1</sup>, MA Hai-yang<sup>1</sup>, WANG Qing-yao<sup>2</sup>

(1. Engineering Research Center of Special Farm Seed Production, Suzhou University, Suzhou, Anhui 234000; 2. School of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou, Anhui 234000; 3. Institute of Pharmaceutical Biotechnology, Suzhou University, Suzhou, Anhui 234000)

**Abstract:** A ultraviolet spectrophotometry was established to measure the concentration of salicin from *Alangiaceae*. The water extract of *Alangiaceae* developed by Vanillin- perchloric acid method was used to make ultraviolet scan for the largest ultraviolet absorption wavelength. Then, the content determination method for salicin was established through the accuracy, stability, and recovery test. The maximum absorption wavelength of salicin was at 281 nm. The linear range of the salicin concentration was from  $34.40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  to  $172.10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and the regressive equation was  $Y=0.006\text{ }3X-0.010\text{ }7$ ,  $r=0.999\text{ }3$ . The average recovery of the method was 100.29%. The method was simple, fast and accurate, which could be applied to control the quality of salicin from *Alangiaceae*.

**Keywords:** *Alangiaceae*; salicin; ultraviolet spectrophotometry; determination