



高效液相色谱法检测花椒中黄酮类成分 综合实验设计

唐玉莲

(中南林业科技大学 材料科学与工程学院, 长沙 410004)

摘要: 针对学校林产化工专业天然产物现代分析方法实验课程教学的需要, 结合“双一流”专业建设, 设计了“不同产地花椒中黄酮类成分的高效液相色谱法检测”综合实验。采用甲醇浸提-盐酸水解法提取花椒中黄酮类成分槲皮素和山奈酚, 然后利用高效液相色谱法测定了不同产地花椒中槲皮素和山奈酚的含量。结果表明, 实验建立的方法准确可靠, 检出限为 0.125 $\mu\text{g/g}$, 相对标准偏差(RSD)小于 2%。教学实践表明, 实验加深了学生对理论知识的理解, 有效促进了学生理论知识和实践能力的融合, 提高了学生的科学素养及综合思维能力, 同时也培养了学生的创新思维和团队合作精神。

关键词: 综合实验设计; 花椒; 黄酮; 高效液相色谱

中图分类号: O657.32

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20230253

Design of Comprehensive Experiments for Determination of Flavonoids in Zanthoxylum Bungeanum by High Performance Liquid Chromatography

TANG Yulian

(School of Materials Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: In order to meet the teaching needs of the course of modern analytical methods for natural products of forestry chemical industry in our school, we designed a comprehensive experiment of “high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of flavonoids in Zanthoxylum bungeanum Maxim from different origins” in conjunction with the construction of “double first-class” majors. The content of quercetin and kaempferol in Zanthoxylum bungeanum Maxim varieties from different origins was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using methanol extraction and hydrochloric acid hydrolysis, and the results showed that the analytical method was accurate and reliable, and the detection limit was 0.125 $\mu\text{g/g}$ with RSD less than 2%. The teaching practice showed that the experiment deepened students’ understanding of theoretical knowledge, improved the fusion of students’ theoretical knowledge and practical ability, promoted the scientific literacy and comprehensive thinking ability of students, and cultivated students’ creative thinking and teamwork.

Key words: comprehensive experiments design; zanthoxylum bungeanum; flavone; HPLC

花椒属芸香科植物, 是我国传统的中药、香料和调味剂, 其果实、根、茎、叶都可做药用, 药食同源, 其主要功效为温中止痛、杀虫止痒^[1]。我国花椒资源丰富, 分布广泛, 产量大, 用途广泛, 但深加工程度低, 因此, 拓展对花椒的深加工和深入研究具有很好的研究前景^[2]。目前市场上的花椒产品主要有花椒粉香料和花椒中药饮片; 花椒的化学成分主要有挥发油^[3]、生物碱、酰胺、

香豆素、木脂素、脂肪酸以及黄酮等^[4]。黄酮类成分提取常用的方法包括溶剂提取法、超声波辅助提取法^[5]、微波提取法等, 常用的溶剂有甲醇^[6]、乙醇^[7]。黄酮类成分通常采用高效液相色谱法测定, C18 反相色谱柱, 甲醇、水、乙腈等作为流动相, 流速通常为 0.6~1 mL/min^[8]。

仪器分析实验课程是一门实践性和创新性很强的课程, 结合“双一流”建设和工程教育认证

收稿日期: 2023-05-13; 修回日期: 2023-07-16

基金项目: 中南林业科技大学教学研究项目(2022-65)。

作者简介: 唐玉莲(1982-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事天然产物、精细化工方面的研究。E-mail: tangyulian0824@163.com

要求, 有针对性地进行教学改革, 提高仪器分析实验的教学质量, 培养出实验能力突出, 创新意识强烈的应用型人才^[9]。为适应新要求, 满足新型专业人才培养的需要^[10], 提高新型应用型人才培养质量^[11], 为使林产化工双一流专业学生毕业后进入制药、食品与化妆品、植物提取物、环境保护等领域的企事业单位和科研院所后能快速适应工作岗位, 开设了仪器分析理论及实验课作为专业必修课。理论课为 24 学时, 实验课为 16 个学时。在理论课结课之后, 共开设 3 个实验项目, 一个验证型实验(4 个学时)、一个综合型(4 个学时)和一个综合设计型实验(8 个学时)。开设综合设计型实验, 有利于激发学生的学习热情和学习兴趣, 增强独立思考和相互讨论的能力, 培养学生的创新精神, 提高学生的专业技能^[12]。本实验选取日常生活中作为调味品且食药同源的

花椒作为分析对象, 以林源特色成分槲皮素和山奈酚的测定为实验内容, 涉及多门主干课程的基础理论知识, 兼具专业性、综合性。

1 实验教学设计

以液相色谱的发展历史及最新进展为切入点, 实现价值引领和知识传授的结合。实验过程中对比气相色谱讲解液相色谱原理、仪器结构、操作及其应用, 学生更容易理解和掌握, 达到真正理解色谱法的内涵。采用分组的形式, 每 10 人一组, 自定组长, 小组成员分工合作。首先根据实验项目内容查阅文献并整理文献资料, 小组讨论确定实验方案; 然后分工进行实验, 记录实验数据; 实验结束后进行实验数据处理及实验报告的撰写。实验教学思路设计如图 1 所示。

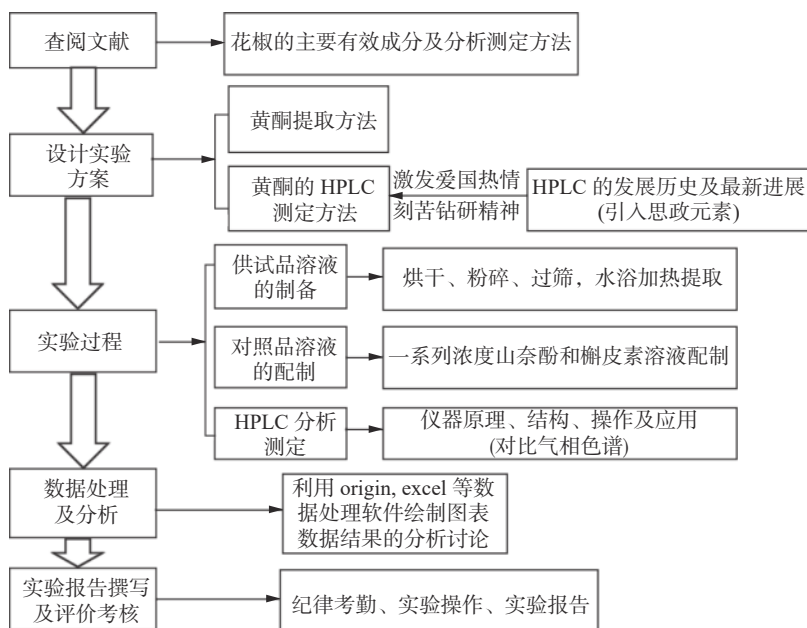


图 1 实验教学思路设计

2 实验原理

液相色谱法采用液体作为流动相, 利用物质在两相中的吸附或分配系数的微小差异达到分离的目的。当两相做相对移动时, 被测物质在两相之间进行反复多次的质量交换, 使溶质间微小的性质差异产生放大的效果, 达到分离分析和测定的目的。利用外标法即标准曲线法对仪器进行定量校正, 对测试样品中目标成分进行分离分析并测定其准确含量。

3 实验内容及过程

3.1 仪器与试剂

岛津 LC-15C 型高效液相色谱仪(日本岛津), FW100 型高速万能粉碎机, 药典筛(60 目)。

槲皮素和山奈酚对照品(成都曼思特生物科技有限公司 批号 MUST-10092801), 大红袍花椒(茂汶)、陕西花椒、韩城花椒、四川青花椒、四川红花椒、云南青花椒、山东花椒(由湖南正清制药厂提供), 甲醇、盐酸等为分析纯, 水为蒸馏水。

3.2 花椒中山奈酚和槲皮素的提取

精密称取花椒粉末 2.0 g, 加甲醇 25 mL, 置于水浴锅微沸水浴回流 1 h, 回流两次, 放冷至室温后过滤, 取滤液 15 mL, 加 5 mL 4 mol/L 的 HCl, 80 °C 水浴回流水解 1 h, 用甲醇定容至 25 mL, 摇匀, 过滤, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 备用^[13-14]。

3.3 奈酚和槲皮素对照品溶液的配制

精密称取干燥至恒重的槲皮素对照品 4.3 mg, 山奈酚 4.6 mg 分别置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别移取此溶液 0.25、0.50、1.0、2.0、4.0、6.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度摇匀, 分别配制成浓度为 0.0025、0.0050、0.010、0.020、0.040、0.060 mg/mL 的对照品溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后待用^[15]。

3.4 花椒中山奈酚和槲皮素的测定

采用参考文献^[16]色谱条件, 色谱柱为 Wondasil-TMC18, 250 mm×4.6 mm, 5 μm。流动相为甲醇:水=65:35。检测波长为 366 nm。流速 1.0 mL/min。柱温 25 °C。进样量 10 或者 20 μL。准备流动相, 在仪器上将色谱条件参数设置好, 开启仪器, 待

仪器稳定后, 分别吸取 20 μL 对照品溶液和不同产地花椒样品注入色谱仪中, 记录色谱图, 积分得出峰面积, 重复测两次取平均值, 记录实验数据。

3.5 实验数据分析及处理

3.5.1 标准曲线的绘制

利用 Origin 数据处理软件以山奈酚和槲皮素对照品峰面积对浓度进行线性拟合, 拟合曲线如图 2 所示, 槲皮素的回归方程为:

$$A=8.48842 \times 10^7 C - 70579.63181, R=0.9967;$$

山奈酚的回归方程为:

$$A=8.49302 \times 10^7 C - 23269.01532, R=0.99985。$$

由图 1 及回归方程的相关系数可以得知, 山奈酚和槲皮素的峰面积与浓度之间呈现良好的线性关系。

3.5.2 测试样品色谱数据转换及绘图

将高效液相色谱仪测试的数据通过仪器操作软件进行转换导出, 将导出的数据导入 origin 绘图软件进行绘图, 色谱图如图 3 所示(仅列出对照品和部分样品的色谱图)。

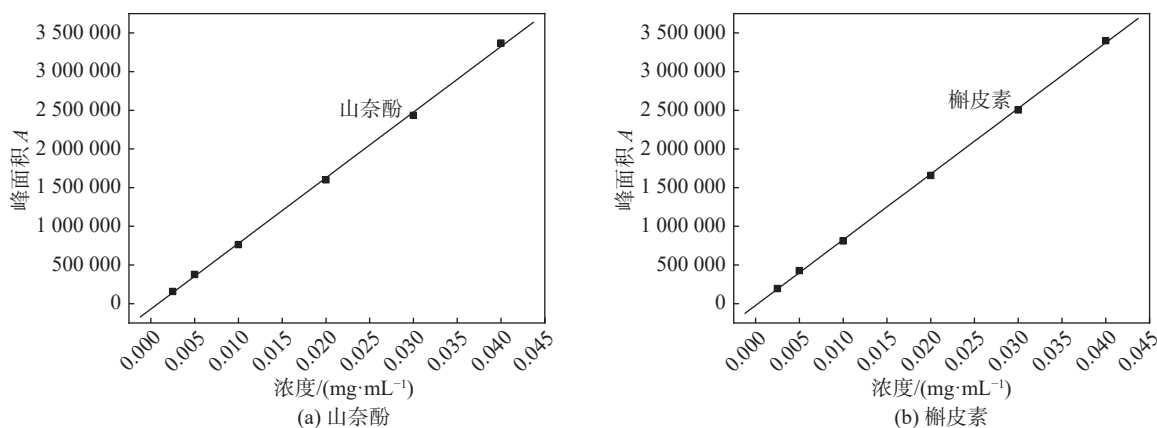


图 2 山奈酚和槲皮素对照品的标准曲线

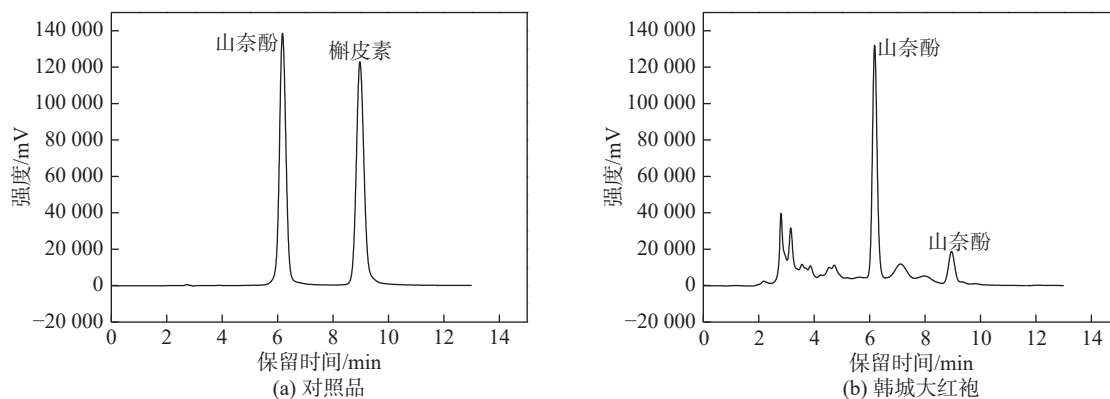


图 3 对照品及韩城大红袍的 HPLC 色谱图

3.5.3 不同产地花椒中山奈酚和槲皮素含量的计算
将高效液相色谱仪测得色谱峰面积代入回归

方程计算, 得到待测样品提取液的浓度, 再根据浓度计算不同产地不同种类花椒中槲皮素和山奈酚的含量, 如表 1 所示。

表 1 不同产地花椒中槲皮素和山奈酚的含量

花椒种类	槲皮素含量/(mg·g ⁻¹)			山奈酚含量/(mg·g ⁻¹)		
	测量值	平均值	RSD	测量值	平均值	RSD
云南青花椒	0.998	0.999	0.140	0.317	0.316	0.45
	1.000			0.315		
陕西花椒	1.747	1.748	0.081	0.407	0.408	0.35
	1.749			0.409		
四川青花椒	1.005	1.007	0.280	0.222	0.225	1.89
	1.009			0.228		
四川红花椒	2.291	2.289	0.120	0.214	0.216	1.31
	2.287			0.218		
山东花椒	2.734	2.731	0.160	0.481	0.483	0.59
	2.728			0.485		
陕西韩城花椒	2.881	2.883	0.098	0.559	0.558	0.25
	2.885			0.557		
四川茂汶大红袍	1.741	1.740	0.081	0.265	0.266	0.53
	1.739			0.267		

由表 1 可知, 陕西韩城花椒中槲皮素和山奈酚的含量最高, 分别为 2.883、0.558; 槲皮素含量最低的为云南青花椒(0.999), 山奈酚含量最低的为四川红花椒(0.216)。从地域上看北方地区(陕西、山东)种植的花椒黄酮含量比南方地区(云南和四川)要高, 可能因为产地、生长环境、气候条件、采收季节等因素对中药材有效成分都具有一定的影响。同一产地不同品种花椒中山奈酚的含量相差不大, 如来自四川的 3 种花椒山奈酚的含量分别为 0.225、0.216、0.266; 而槲皮素的含量相差较大, 如四川红花椒中槲皮素含量为 2.289, 而四川青花椒中槲皮素的含量仅为 1.007。因此, 作为指标性成分, 槲皮素不仅与地区有很大的影响, 而且与品种也有很大的关系, 山奈酚受地区和品种的影响较小。经计算, 本文方法的检出限为 0.125 μg/g, 实验结果的最大 RSD(相对标准偏差)仅为 1.89%, 表明实验方法准确和可靠, 可为花椒的种植及利用提供理论参考和指导。

4 结束语

本文设计的综合实验, 将内容与工业生产和生活实际紧密相连。通过该实验, 学生对植物提取、林特产品的化学组成、性质、林源活性成分

的分析检测以及实验数据处理技术有了更好的认识 and 了解, 对专业相关领域如制药、食品与化妆品、植物提取物等发展动态有了初步了解。通过综合实验的开展, 学生的动手能力、创新能力及科研能力得到了提高, 既锻炼了学生学以致用, 运用所学知识分析解决实际问题的能力, 又培养了学生实事求是认真严谨的科学态度, 达成了课程及专业培养目标中具有优良的实践技能和科研能力, 取得了较好的教学效果。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 朱妞. 花椒活性成分研究现状及发展前景[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(4): 4-6.
- [3] 边甜甜, 司昕蕾, 曹瑞, 等. 花椒挥发油提取、成分分析及药理作用研究概述[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(8): 129-132.
- [4] 张群, 陈红林, 郑涛, 等. 花椒叶黄酮含量的变化及其与气象因子的关系研究[J]. 西北林学院学报, 2020, 35(3): 43-47.
- [5] 周孟焦, 史芳芳, 陈凯, 等. 花椒药用价值研究进展[J]. 农产品加工, 2020(1): 65-67.

(下转第 117 页)