

杜仲叶总黄酮含量测定方法研究^{*}

尉 芹¹, 王冬梅¹, 马希汉², 张康健¹

(1 西北农林科技大学 林学院; 2 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 为了解决硝酸铝比色法在测定杜仲总黄酮时含量偏高的问题, 用外标法和纸层析法对干扰测定的因素和测定方法进行了研究。结果表明, 绿原酸是硝酸铝比色法测定杜仲黄酮的主要干扰因素, 干扰程度大于50%; 将纸色谱与硝酸铝比色法结合进行测定, 可消除干扰, 准确度提高, 标准差为10.6 mg/g, 测定回收率为99.75%。

[关键词] 杜仲叶; 总黄酮测定; 绿原酸

[中图分类号] O 652; Q 949.751.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)05-119-05

杜仲为杜仲科杜仲属植物, 其皮是我国特有的名贵滋补药材, 叶是制备保健品的重要原料。黄酮类化合物是杜仲的主要有效成分之一, 具有多种生物活性。杜仲中黄酮类化合物含量的高低, 是判断杜仲生药及其相关产品的重要指标^[1~3]。

目前, 国内对黄酮含量的测定多采用硝酸铝比色法和高效液相色谱法^[4~7], 后者测定精度高, 但仪器价格昂贵, 而且要有合适的标样。前者虽专一性差, 测定结果受杂质干扰大, 但它适合测定样品中的总黄酮, 且不需价格昂贵的仪器, 一般实验室均可完成。作者在用硝酸铝比色法测定杜仲叶及其提取物中的总黄酮时, 发现结果往往偏高, 为了消除干扰因素, 寻求较为准确的测定方法, 本研究对影响结果的干扰因素及杜仲叶中黄酮的测定方法进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

杜仲叶采自西北农林科技大学校园内; 杜仲纯粉(杜仲叶水提取液浓缩干燥所得); 杜仲黄酮粗品(杜仲叶乙醇提取液浓缩后经大孔树脂吸附, 用质量分数为85%乙醇洗脱, 收集洗脱液后, 回收溶剂浓缩干燥所得); 试剂均为分析纯。

1.2 仪 器

754型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪

器厂); 365 nm 紫外分析仪(上海科艺光学仪器厂); H6605 超声清洗机(无锡超声电子设备厂)。

1.3 测定波长的选择和工作曲线的绘制^[8]

精密称取芦丁20 mg(120℃烘至恒重)置100 mL容量瓶中, 加质量分数为60%的乙醇定容至刻度, 摇匀, 取25 mL用蒸馏水稀释至50 mL(0.1 mg/mL), 准确吸取0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL分别置于10 mL具塞试管中, 先加质量分数为5%的亚硝酸钠溶液0.3 mL, 摇匀, 放置6 min, 再加入质量分数为10%的硝酸铝溶液0.3 mL, 摇匀, 放置6 min; 再加入1 mol/L NaOH溶液4.0 mL, 分别用质量分数为30%的乙醇稀释至刻度, 摇匀, 放置15 min, 在480~540 nm的波长范围内进行扫描, 选择最佳吸收峰波长, 并在此波长下作工作曲线。

1.4 供试液的制备

1.4.1 杜仲叶样品液制备 精密称取5 g杜仲叶粉, 用质量分数为70%的乙醇提取3次, 每次1.5 h, 合并滤液, 浓缩定容至50 mL, 吸取2 mL于50 mL容量瓶中, 用质量分数为30%的乙醇定容, 备用。

1.4.2 杜仲纯粉样品液制备 精密称取杜仲纯粉0.1 g, 用质量分数为60%的乙醇定容在100 mL容量瓶中, 然后吸取25 mL于50 mL容量瓶中用水稀释定容至刻度, 备用。

* [收稿日期] 2001-03-14

[基金项目] 陕西省科技研究重大项目(97K04-G2)

[作者简介] 尉 芹(1958-), 女, 山西临猗人, 副教授, 主要从事林产品分析和开发利用研究。

1.4.3 杜仲黄酮粗品供试液制备 精密称取杜仲黄酮 0.1 g, 用水溶解在 100 mL 容量瓶中, 备用。

2 结果与分析

2.1 测定波长与标准曲线的确定

以芦丁为标样, 硝酸铝为显色剂, 测得的最大吸收波长为 510 nm。回归方程为:

$$A = 0.0073 + 10.5886c, r = 0.9992$$

2.2 绿原酸对测定杜仲叶总黄酮含量的影响

作者在水提铅沉法对杜仲叶总黄酮用硝酸铝比色法进行测定时, 含量竟高达 92.11%, 此结果与其他现象不符。鉴于绿原酸是杜仲叶中的主要有效成分^[9], 初步判断可能是绿原酸对测定结果具有正性影响。将测试液经纸层析后, 在 365 nm 荧光灯下检测, 果然发现在与绿原酸 R_f 值相同处存在强烈荧光, 为进一步验证干扰物质为绿原酸, 用绿原酸进

行了检验。

2.2.1 定性检验 称取绿原酸标准品 0.01 g, 用质量分数为 30% 的乙醇定容至 100 mL, 加入显色剂, 在 510 nm 处测定吸收光度。结果表明, 当绿原酸质量浓度为 0.03, 0.05 和 0.07 g/L 时, 其吸光度分别为 0.338, 0.564, 0.789, 说明绿原酸加入黄酮显色剂后, 在 510 nm 处确有吸收, 吸光度随绿原酸加入量的增加而增大, 且呈线性关系。因此可以认为, 绿原酸对测定杜仲叶中总黄酮有干扰。

2.2.2 定量检验 为了确定绿原酸对硝酸铝比色法测定黄酮的影响程度, 本研究采用了外标法, 即硝酸铝比色法测定样品中总黄酮含量(样品为杜仲纯粉), 同时测定样品中的绿原酸含量^[2]。然后在样品中加入等量绿原酸, 再用硝酸铝比色法测定加入绿原酸后的样品的总黄酮含量。

表 1 绿原酸对总黄酮含量测定的影响

Table 1 The influence of chlorogenic acid on the measurement of total flavonoids

mg/g

样品中绿原酸含量 Content of chlorogenic acid in sample	未加绿原酸时总黄酮含量 Content of flavonoids without adding chlorogenic acid	加入绿原酸后总黄酮含量 Content of flavonoids after adding chlorogenic acid
150.0	248.7	547.5

测定结果(表 1)显示, 在样品中加入等量绿原酸后, 用硝酸铝比色法测得的总黄酮含量比未加入绿原酸的高出 1 倍多, 因此可以认为, 用该法测定杜仲叶中总黄酮含量时, 绿原酸的干扰大于 50%, 故绿原酸的影响不容忽视。因此, 直接用硝酸铝比色法测定杜仲叶中总黄酮含量时, 必须设法消除绿原酸的干扰。

2.2.3 绿原酸的干扰原因探讨 以杜仲纯粉为对照, 处理 1 和处理 2 分别加入等量邻苯二酚和对苯二酚, 测定酚类化合物对杜仲总黄酮含量的影响。结果(表 2)表明, 加入邻苯二酚后, 在 510 nm 处吸光值大增, 而对苯二酚却没有影响。因此, 可以确定与 Al^{3+} 配合显色。绿原酸为 3-咖啡酰奎尼酸, 分子中的咖啡酰基上含有邻二酚羟基, 故可以与 Al^{3+} 配合显色, 从而对硝酸铝法测定杜仲中的总黄酮产生干扰。

表 2 酚类化合物对硝酸铝比色法测定杜仲总黄酮的影响

Table 2 Influence of phenols on the measurement of flavonoids

处理 Treatment	CK	处理 1 Treatment 1	处理 2 Treatment 2
吸光度 Absorbency	0.563	2.72	0.536

2.3 纸层析-硝酸铝比色法测定杜仲叶总黄酮含量

为了消除绿原酸的干扰, 本研究首先采用纸层析法将样品中的黄酮与绿原酸分离, 对分离出的黄酮用硝酸铝比色法进行测定。

2.3.1 标准曲线的绘制 精密称取于 120 °C 干燥至恒重的芦丁 20 mg, 用甲醇在 10 mL 容量瓶中定容, 用 10 μ L 微量进样器点样, 点样量分别为 10, 20, 30, 40, 50 μ L, 然后用 BAW 溶剂系统(正丁醇:冰醋酸:水 = 4:1:2(体积比))分别在层析缸中展开, 挥干溶剂后在 365 nm 紫外分析仪下观察, 将褐色带状部分剪成细条, 分别装在 10 mL 具塞试管中, 各加入 5 mL 甲醇, 超声波震荡 20 min, 取出加入硝酸铝显色剂, 在 510 nm 下测定吸光度, 绘制出标准曲线, 回归方程为 $A = 0.002 + 6.1c$, $r = 0.9992$ 。其中, A 为吸光度; c 为浓度(mg/g); r 为回归系数。

2.3.2 测定步骤 将杜仲叶的乙醇提取物(或各种杜仲制品的溶液)定量点样于层析纸上, 用 BAW 溶剂系统展开, 在 365 nm 紫外分析仪下, 杜仲中所含的各种黄酮为棕褐色的谱带(自然光下为淡黄色),

绿原酸为强烈的蓝色荧光带。将代表黄酮的谱带用铅笔标记后剪下, 处理方法同 2 3 1, 测定吸光度并根据标准曲线计算总黄酮含量。若需要, 可将发荧光的绿原酸谱带剪下, 并进行含量测定。

2 3 3 精密度试验 以杜仲粗黄酮为样品, 平行称

表 3 纸层析-硝酸铝比色法测定黄酮的精密度试验

Table 3 Precision test of PC-alum inum nitrate colorimetry method				mg/g
编号 Serial No.	总黄酮含量 Content of flavonoids	编号 Serial No.	总黄酮含量 Content of flavonoids	
1	257. 7	4	268. 0	
2	243. 4	5	243. 3	
3	257. 7			

注: 标准差为 10. 6。
Note: Standard deviation is 10. 6

2 3 4 回收率试验 以杜仲黄酮粗品为供试样, 加入芦丁标准品, 进行回收率试验, 结果如表 4 所示。

表 4 纸层析-硝酸铝比色法测定黄酮的回收率试验

Table 3 Reclaim test of PC-alum inum nitrate colorimetry method					
样品编号 Serial No.	黄酮含量/mg Content of flavonoids	加入芦丁量/mg Amount of rutin added	理论值/mg Theoretic value	测定值/mg Measuring value	回收率/% Reclaim rate
1	0. 140 3	0. 01	0. 150 3	0. 146 9	97. 74
2	0. 140 3	0. 02	0. 160 3	0. 163 2	101. 8
3	0. 140 3	0. 03	0. 170 3	0. 169 8	99. 71

由表 4 可以看出, 该方法测定的平均回收率为 99. 75%。

2 3 5 杜仲叶总黄酮含量的测定 用纸层析-硝酸铝比色法对杜仲叶中的总黄酮进行了测定(表 5)。

表 5 纸层析-硝酸铝比色法测定的杜仲叶中的总黄酮的含量

Table 5 Content of flavonoids in the leaves of <i>Eucamnia ulmoides</i> by PC-alum inum nitrate colorimetry method				mg/g
编号 Serial No.	总黄酮含量 Content of flavonoids	编号 Serial No.	总黄酮含量 Content of flavonoids	
1	13. 4	3	15. 0	
2	12. 5	平均	13. 6	

由表 5 可见, 总黄酮平均含量为 13. 6 mg/g。这一结果, 与实际情况较为相符。

3 结论与讨论

据文献报道^[10], 硝酸铝比色法测定黄酮的主要

依据是铝离子 Al^{3+} 与黄酮母核中的 3 位(或 5 位)上的羟基和 4 位羰基配合形成稳定结构(图 1), 从而可用比色法对黄酮含量进行测定。

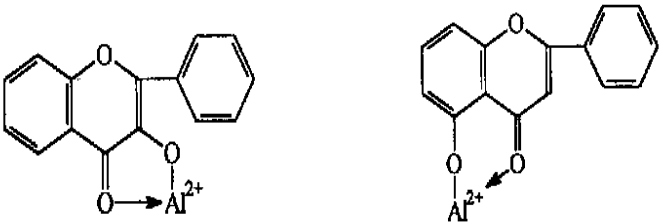


图 1 Al^{3+} 与黄酮母核中 3 位(或 5 位)羟基和 4 位羰基形成的稳定结构

Fig 1 Coordinate structure between Al^{3+} and hydroxyl and carbonyl groups in flavonoids

杜仲中的黄酮类化合物目前发现有下列几 种^[11](图 2)。从图 2 可以看出, 杜仲中所含的黄酮类

化合物, 均在 3 位(或 5 位)含有羟基, 因此可用硝酸铝进行比色, 从而对杜仲中的总黄酮进行测定。

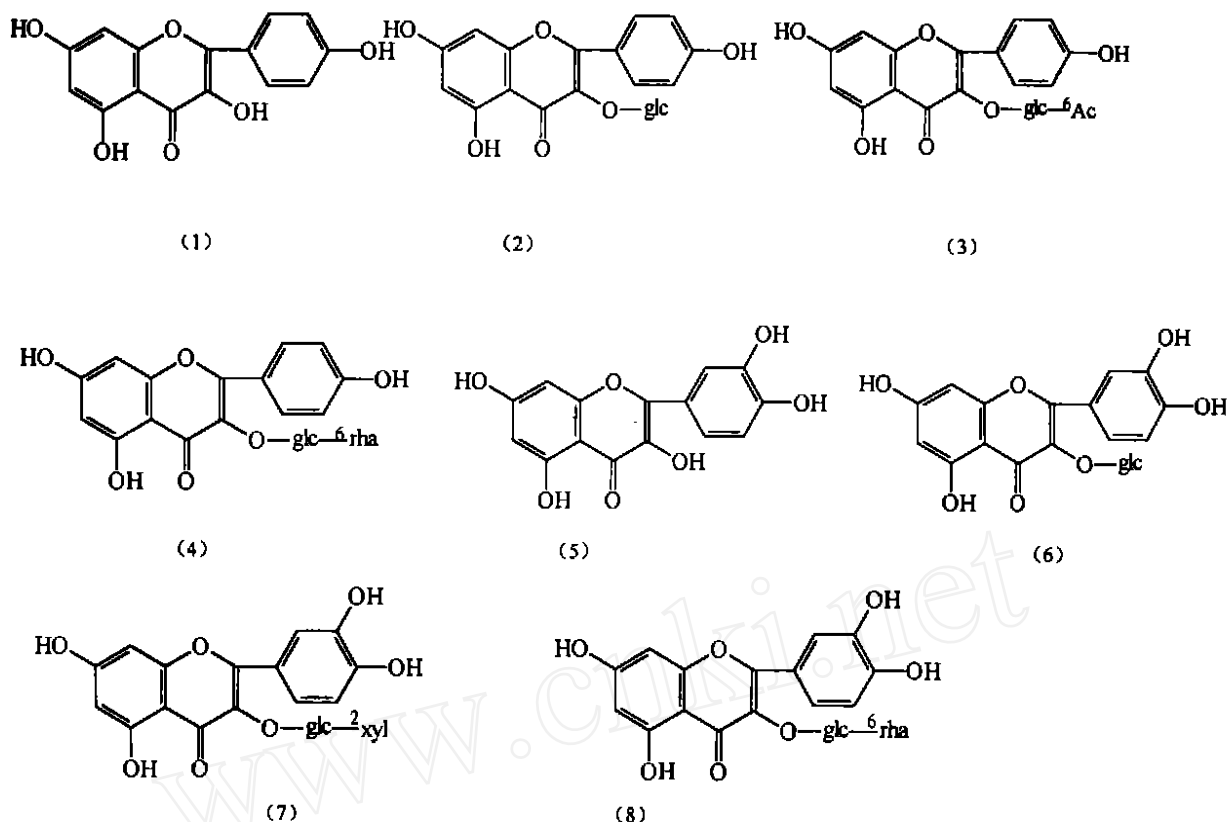


图 2 杜仲中的黄酮类化合物

(1) 山柰酚; (2) 紫云英甙; (3) 山柰酚 3-O-6''乙酰葡萄糖甙; (4) 山柰酚 3-O-芸香糖甙;
(5) 槲皮素; (6) 陆地锦甙; (7) 槲皮素 3-O 木糖(1→2)葡萄糖甙; (8) 芦丁

Fig 2 Flavonoids contained in *Eucammia ulmoides*

(1) Kaempferol; (2) Astragalin; (3) Kaempferol 3-O-6''acetylglucoside; (4) Kaempferol 3-O-rutinoside;
(5) Quercetin; (6) Isoquercitrin; (7) Quercetin 3-O-sambubioside; (8) Rutin

另一方面, 本研究结果表明, 邻二酚类化合物也可与 Al^{3+} 形成稳定结构(图 3), 从而干扰测定。

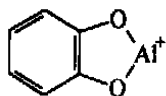


图 3 邻二酚类化合物与 Al^{3+} 形成的稳定结构

Fig 3 Coordinate structure formed between Al^{3+} and ortho-diphenolic compounds

杜仲中的邻二酚类化合物主要为绿原酸, 该化合物中的咖啡酰基具有邻二酚类结构, 因此, 直接用硝酸铝比色法测定杜仲中的黄酮含量时, 绿原酸会对测定结果产生正性干扰, 且干扰程度大于 50%。

本研究将纸层析法与硝酸铝比色法结合测定杜仲中的总黄酮含量, 可排除绿原酸的干扰, 测定结果准确, 方法简便易行。同时, 还可对杜仲中的绿原酸进行测定。

据报道^[12], 酚性物质在植物中的存在较为普遍, 倘若分子中存在邻二酚结构(如绿原酸、咖啡酸等), 直接用硝酸铝比色法测定总黄酮含量时, 就会使含量偏高。因此, 测定植物中总黄酮含量时, 首先要确定样品中是否存在会对测定产生干扰的邻二酚性物质。如果不存在, 可用硝酸铝比色法直接进行测定。如果存在, 则应考虑用纸层析-硝酸铝比色法进行测定。

[参考文献]

- [1] 张康健, 王 蓝, 张风云, 等. 杜仲叶与皮有效成分含量的比较研究[J]. 西北林学院学报, 1996, 11(2): 42- 46
- [2] 张康健, 马希汉, 马 梅, 等. 杜仲叶次生代谢物积累动态研究[J]. 林业科学, 1999, 35(2): 15- 20
- [3] 张康健, 王亚琴, 马希汉, 等. 杜仲叶次生代谢物生态学初步研究初报[J]. 林业科学, 1999, 35(6): 28- 31
- [4] 张德权, 台建详, 付 勤. 生物类黄酮的研究及应用概况[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(6): 52- 57
- [5] 罗思齐. 中草药活性成分含量测定概述[J]. 中草药, 1989, 20(9): 19- 26
- [6] 姚渭溪. 银杏叶中活性成分的提取工艺、测定及其进展[J]. 中草药, 1995, 26(3): 157- 159
- [7] 刘粤芳. 银杏叶中有效成分的提取测定[J]. 中成药, 1995, 17(6): 40- 41
- [8] 陈秀珍. 银杏叶不同生长期总黄酮的含量测定[J]. 广西植物, 1988, 8(4): 363- 364
- [9] 尉 芹, 马希汉, 张康健. 杜仲化学成分研究[J]. 西北林学院学报, 1995, 10(4): 88- 93
- [10] 徐礼荣, 刘爱茹. 黄酮类化合物测定方法[J]. 中草药通讯, 1979, 7: 39- 44
- [11] Nakamura T, Nakazawa Y, Onizuka S, et al. Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucammia ulmoides* leaves) I. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice[J]. Mutation Research, 1997, 388: 7- 20
- [12] 成 军, 赵玉英, 崔育新, 等. 杜仲叶黄酮类化合物的研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(5): 284- 285

A study on the measurement of flavonoids in the leaves of *Eucammia ulmoides*WEI Qin¹, WANG Dong-mei¹, MA Xi-han², ZHANG Kang-jian¹

(1 College of Forestry; 2 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: It was found that when aluminum nitrate was used as a chromogenic agent in the colorimetric measurement of total flavonoids in the leaves of *Eucammia ulmoides*, the result was deeply interfered by chlorogenic acid, a main chemical contained in the leaves, which possessed a structure of o-phenolic di-hydroxyls. Satisfactory result will be obtained if the paper chromatography is integrated with colorimetric measurement.

Key words: *Eucammia ulmoides* leaf; measurement of flavonoids; chlorogenic acid