

广西产黄杞叶不同溶媒提取物中二氢黄酮醇的定量分析

付晓雪¹, 宋明明¹, 周辉², 史丽颖¹, 唐玲¹, 王永奇^{1*}¹大连大学药物研究所, 大连 116622; ²广西钦州市农业机械学校, 钦州 535000

摘要: 为了测定黄杞叶不同溶媒提取物中主要化学成分二氢黄酮醇的含量, 以落新妇苷为标准品, 采用分光光度法测定黄杞叶醇提物、水提物及醇提物的 PE 层、EtoAc 层、H₂O 层和水提物的 EtoAc 层、H₂O 层中总二氢黄酮醇的含量。结果表明: 落新妇苷在 12.3 ~ 28.7 μg/mL 范围内呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.9991$); 该方法灵敏度高、稳定性好, 可用于黄杞叶提取物的质量控制。

关键词: 黄杞叶提取物; 总二氢黄酮醇; 落新妇苷

中图分类号: R284

文献标识码: A

Determination of Total Dihydroflavonols in Extract of *Engelhardtia roxburghiana* Wall. Leaves

FU Xiao-xue¹, SONG Ming-ming¹, ZHOU Hui², SHI Li-ying¹, TANG Ling¹, WANG Yong-qi^{1*}¹Institute of Materia Medica of Dalian University, Dalian 116622, China;²Agricultural Machinery Technology College of Qinzhou, Qinzhou 535000, China

Abstract: The objective of this study was to determine the content of total dihydroflavonols in different extracts of *Engelhardtia roxburghiana* wall. leaves. The contents of total dihydroflavonols in ethanol extract and its PE, EtoAc and water fractions as well as water extract and its EtoAc and water fractions of *E. roxburghiana* leaves were determined by spectrophotometry with astilbin as standard. The results indicated that astilbin showed a good linear relationship in the range of 12.3 ~ 28.7 μg/mL ($R^2 = 0.9991$); the developed method was with high sensitivity, good stability, and it is applicable for the quality control of *E. roxburghiana* leaves.

Key words: *Engelhardtia roxburghiana* Wall. leaves; total dihydroflavonols; astilbin

黄杞 (*Engelhardtia roxburghiana* Wall.) 俗称甜茶, 为胡桃科 (Juglandaceae) 黄杞属 (*Engelhardtia* Leschen. ex Bl.) 植物。其叶和树皮均为中华本草所记载^[1], 具有清热、止痛、行气、化湿、导滞之功能, 用于治疗感冒发热、疝气腹痛、脾胃湿滞、腔腹胀闷、泄泻^[1]。分布于广西、广东、云南等省区, 资源非常丰富。现代研究发现其富含大量的二氢黄酮醇类成分, 并从中首次发现具有甜味的二氢黄酮醇, 这也是其称之为甜茶的原因之所在^[2]。它不仅是二氢黄酮醇的主要资源, 而且也是落新妇苷 (Astilbin) 和黄杞苷 (engeletin) 及其异构体和同系物的重要药源植物^[3]。现代研究还发现其所含的二氢黄酮醇类成分具有降糖^[3, 4, 8]、降血脂^[5]、镇痛^[6]、抗高尿酸血症 (痛风)^[7, 9]、活血化瘀^[10]、抗粥样动脉硬化

化^[11, 12]作用, 其所含的色原酮苷 (euryphin) 具有治疗烧伤、烫伤、刀伤、冻伤及毒蛇咬伤作用^[13]。但对其所含的二氢黄酮醇类成分在植物部位及不同提取物中的定量分析, 未见报道。

硝酸铝-亚硝酸钠法是目前在中药和中草药测定黄酮时使用最多的方法之一, 而标准品多选择芦丁。该法显色发生在芦丁 B 环的 3'-*O*-邻二-OH 部位, 具有邻二-OH 结构的原儿茶醛、原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸、羟基苯甲酸等非黄酮类多酚也可发生此显色反应, 并在波长 200 ~ 600 nm 左右有最大吸收峰或较强吸收峰, 而黄杞中亦含有非黄酮类多酚, 显然会对黄酮的测定造成干扰, 势必导致测定结果偏高。

氯化铝法的测定环境是酸性, 可以避免邻二羟基结构的非黄酮类化合物的干扰, 所以氯化铝法具有更好的专属性, 更高的准确度, 其显色机理见图 1。通过显色机理的比较分析说明氯化铝法是黄杞

收稿日期: 2013-06-25 接受日期: 2013-11-21

* 通讯作者 Tel: 86-411-87403834; E-mail: dalianwyq@163.com

叶中总黄酮测定的适宜方法。本文以落新妇苷为标准品(图2),采用分光光度法和氯化铝法,对其醇提取物、水提取物及醇提取物石油醚萃取物(PE)、EtOAc萃取

物、H₂O层和水提取物的EtOAc萃取物、H₂O层进行了定量分析。以期从药效物质基础上为其开发利用提供参考。

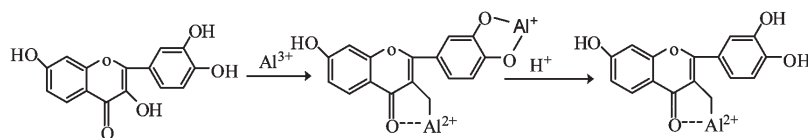


图1 氯化铝法的显色机理

Fig. 1 Mechanism of color development of aluminum chloride method

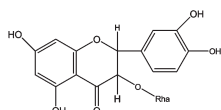


图2 落新妇苷的化学结构式

Fig. 2 Chemical structure of astilbin

1 仪器与药品

1.1 仪器

Unico7200 可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司);BP210S 十万分之一电子天平(Sartorius 公司);Jasco v-560 紫外可见分光光度计(日本Jasco 公司)。

1.2 药品

黄杞叶采集于广西壮族自治区钦州市那坡乡,经广西林科院庞定轮研究员鉴定为黄杞,标本存放于大连大学生命科学与技术学院标本室;落新妇苷(Astilbin)(对照品购自成都曼思特生物科技有限公司,纯度98%);其余试剂均为分析纯;水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 提取物的制备

取黄杞叶2 kg,用95%乙醇回流提取3次,2.5 h/次,合并提取液,浓缩至干,得95%乙醇提取物779.06 g。

取黄杞叶0.5 Kg,水煎法提取3次,2 h/次,合并提取液,浓缩至干,得水提取物196.41g。

95%乙醇提取物依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,得石油醚萃取物(85.17 g)、乙酸乙酯萃取物(289.17 g)、水层(352.09 g)。

水提取物直接用乙酸乙酯萃取,得乙酸乙酯萃取物(79.73 g)和水层(104.06 g)。

2.2 总黄酮的含量测定^[14]

2.2.1 对照品溶液的制备

精确称取干燥至恒重的落新妇苷对照品5 mg,置于50 mL容量瓶中,加入甲醇溶解并稀释到刻度,摇匀,得浓度为0.1 mg/mL的标准溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备

分别精确称取黄杞叶95%乙醇提取物及其石油醚层、乙酸乙酯层、水层的干浸膏50.76、50.98、50.52、50.38 mg,置于100 mL棕色容量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为0.5076、0.5096、0.5052 mg/mL、0.5038 mg/mL的供试品溶液,备用。再分别精确称取黄杞叶水提取物及其乙酸乙酯层和水层的干浸膏50.80、50.63、50.82 mg,置于100 mL棕色容量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到浓度为0.5080、0.5063、0.5082 mg/mL的供试品溶液,备用。

2.2.3 测定波长的选择

取黄酮对照品溶液、供试品溶液各0.6 mL,置于具塞试管中,各加甲醇至4.0 mL,再分别加入质量分数为5%的NaNO₂溶液0.3 mL,摇匀,室温放置6 min,再加10% AlCl₃溶液0.3 mL,摇匀,室温放置10 min,在200~600 nm波长下扫描,空白溶液做参比,样品溶液在400 nm波长处有强吸收。因此,选定总黄酮的检测波长为400 nm。

2.2.4 线性关系考察

分别精确称取0、0.6、0.8、1.0、1.2和1.4 mL的落新妇苷对照品溶液置于具塞试管中,按“2.2.3”项方法,自“各加甲醇至4.0 mL”起重复同样操作,于400 nm处测定吸光度,同时以空白试剂做参比。以吸光度A为纵坐标、浓度C(mg/mL)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程为: A = 18.902C - 0.0141 (R² = 0.9991),落新妇苷的线性范围为12.3~28.7 μg/mL。

2.2.5 精密度实验

取0.6 mL落新妇苷对照品,按“2.2.3”中所述

实验方法操作 测定吸光度值 ,平行测定 5 次 ,RSD 为 0.74% ,实验说明精密度良好。

2.2.6 稳定性实验

按样品测定方法操作 测定同一供试品在不同时间吸收度。结果表明 吸收值在 45 min 内基本稳定。

2.2.7 重现性实验

取同一提取物 5 份 ,按“2.2.2”法配制供试品溶液 ,按“2.2.3”法处理并显色 ,在 400 nm 处测定吸光度 A ,平行测定 5 次 ,代入回归方程 ,计算黄酮含量 ,黄杞叶 95% 乙醇提取物及醇提物的石油醚层、乙酸乙酯层、水层的 RSD 分别为: 1.02%、0.84%、1.07%、0.223%; 黄杞叶水提及水提的乙酸乙酯层、水层的 RSD 分别为: 0.783%、0.588%、1.08%; 结果表明重现性良好。

表 1 黄杞叶 95% 乙醇提取物及其不同溶媒提取物总黄酮加样回收率实验 (n = 3)

Table 1 Recoveries of total flavonoids in 95% ethanol extract and its different fractions of *E. roxburghianan* leaves (n = 3)

编号 No.	样品 Samples	吸光度平均值 Average of absorbance(A)	RSD (%)
1	黄杞叶 95% 乙醇提取物 95% ethanol extract	107.3	0.41
2	醇提物石油醚层提取物 PE fraction of 95% ethanol extract	100.7	1.38
3	醇提物乙酸乙酯层提取物 EtOAc fraction of 95% ethanol extract	104.3	0.77
4	醇提物水层提取物 Water fraction of 95% ethanol extract	110.2	0.42

表 2 黄杞叶水提取物及其不同溶媒提取物中总黄酮加样回收率实验 (n = 3)

Table 2 Recoveries of total flavonoids in water extract and its different fractions of *E. roxburghianan* leaves (n = 3)

编号 No.	样品 Samples	吸光度平均值 Average of absorbance(A)	RSD (%)
1	黄杞叶水提取物 Water extract	108.0	1.46
2	水提乙酸乙酯层提取物 EtOAc fraction of water extract	101.4	1.11
3	水提物水层 Water fraction of water extract	103.1	0.43

2.2.9 样品中总黄酮的测定

2.2.9.1 黄杞叶醇提物及其不同溶媒提取物中总黄酮含量的测定

取 95% 的乙醇提取物供试液 0.4 mL 醇提石油醚层供试液 0.4 mL 醇提乙酸乙酯层 0.2 mL 醇提

2.2.8 加样回收率实验

(1) 精确量取已知总黄酮含量的黄杞叶 95% 乙醇提取物 0.2 mL 醇提物石油醚层 0.2 mL 醇提物乙酸乙酯层 0.1 mL 醇提物水层 0.4 mL 置于具塞试管中 ,分别加入 0.1 mg/mL 的落新妇苷标准品溶液 0.4 mL ,余下实验部分按“2.2.3”中所述显色方法进行的操作 ,平行测定 3 次 ,计算加样回收率 ,结果见表 1。

(2) 精确量取已知总黄酮含量的黄杞叶的水提取物 0.2 mL 水提物乙酸乙酯层 0.1 mL 水提物水层 0.8 mL 置于具塞试管中 ,分别加入 0.1 mg/mL 的落新妇苷标准品溶液 0.4 mL ,余下实验部分按“2.2.3”中所述显色方法进行的操作 ,平行测定 3 次 ,计算加样回收率 ,结果见表 2。

水层 0.8 mL 置于具塞试管中按“2.2.3”项方法 ,自“各加甲醇至 4.0 mL”起重复同样操作 ,于 400 nm 处测定吸光度 ,同时以空白试剂做参比 ,各平行测定五次 ,总黄酮含量(%) = $[(C \times 4.6) / V_{取}] \times 100$,得出样品中的总黄酮含量如表 3 所示。

表 3 黄杞叶 95% 乙醇提取物及其不同溶媒提取物中总黄酮含量测定结果 (n = 5)

Table 3 Total dihydroflavonols contents detected in 95% ethanol extract and its PE ,EtOAc and water fractions of *E. roxburghianan* Wall. leaves (n = 5)

编号 No.	样品 Samples	吸光度平均值 Average of absorbance(A)	黄酮含量 Flavonoids content (%)
1	黄杞叶 95% 乙醇提取物 95% ethanol extract	0.392	48.71
2	醇提物石油醚层提取物 PE fraction of 95% ethanol extract	0.367	45.57
3	醇提物乙酸乙酯层提取物 EtOAc fraction of 95% ethanol extract	0.256	65.10
4	醇提物水层提取物 Water fraction of 95% ethanol extract	0.446	22.19

2.2.9.2 黄杞叶水提物及其不同溶媒提取物中总黄酮含量的测定

取水提物供试液 0.4 mL,水提物乙酸乙酯层供试液 0.2 mL,水提物水层供试液 1.2 mL 置于具塞

试管中按“2.2.3”项方法,自“各加甲醇至 4.0 mL”起重复同样操作,于 400 nm 处测定吸光度,同时以空白试剂做参比,各平行测定五次,计算样品中的总黄酮含量如表 4 所示。

表 4 黄杞叶水提物及其不同溶媒提取物中总黄酮含量测定结果($n=5$)

Table 4 Total dihydroflavonols contents detected in water extract and its EtOAc and water fractions of *E. roxburghianan* Wall. leaves ($n=5$)

编号 No.	供试品 Samples	吸光度平均值 Average of absorbance(A)	黄酮含量 Flavonoids content (%)
1	黄杞叶水提物 Water extract	0.338	42.11
2	水提乙酸乙酯层提取物 EtOAc fraction of water extract	0.266	67.20
3	水提物水层 Water fraction of water extract	0.242	10.18

3 结论

黄杞叶中二氢黄酮醇类成分在不同提取物中的含量如下:醇提物为 48.71%,醇提物石油醚萃取物为 45.57%,EtOAc 萃取物为 65.10%,水层为 22.19%;水提物为 42.11%,水提物 EtOAc 萃取物为 67.20%,水层为 10.18%。由此可见,黄杞叶中二氢黄酮醇类成分采用醇、水提取皆可,但必须采取 EtOAc 萃取的工艺路线。

参考文献

- 1 State Administration of Traditional Chinese Medicine(国家中医药管理局). Chinese Materia Medica(中华本草). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999. 371-373.
- 2 Kasai R, Hirono S, Chou WH *et al.* Sweet dihydroflavonol rhamnoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepis* a Chinese folk medicine *hung-qi*. *Chem Pharm Bull* 1988 36:4167-4170.
- 3 Kasai R, Hirono S, Chou WH *et al.* An additional sweet dihydroflavonol glycoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese folk medicine, *hung-qi*. *Chem Pharm Bull*, 1991 39: 1871-1872.
- 4 Li CL(李晨岚), Wang DP(王大鹏), Cai B(蔡兵). Experimental studies in *Engelhardtia roxburghianan* Wall. leaves extractions of anti-blood sugar. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2008 39: 1696-1698.
- 5 Zhong ZX(钟正贤), Zhou GF(周桂芬), Chen XF(陈学芬), *et al.* Experimental studies in total flavone of *Engelhardtia roxburghiana* wall (ERTF). *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药) 2000 11: 495-496.
- 6 Zhang BJ(张白嘉), Liu YO(刘亚欧), Liu L(刘榴) *et al.* 土茯苓及落新妇苷抗炎、镇痛、利尿作用研究. *Chin Med*

Pharm Clin(中药药理与临床) 2004 20:11-12.

- 7 Xu TT(徐婷婷), Cheng ZK(承志凯), Yin L(尹莲) *et al.* 土茯苓抑制黄嘌呤氧化酶活性的物质基础研究. *Chin Med Mat*(中药材) 2012. 35:582-585.
- 8 Xu R(许睿), Zheng ZW(郑作文), Wei S(韦松). 毛叶黄杞总黄酮降血糖作用的实验研究. *Chin Tradit Pat Med* (中成药) 29: 1068-1069.
- 9 Wu LM(吴丽明), Zhang M(张敏). The diuretic and analgesic action of Astilbin from *Smilax glabra*. *Chin Med Mat* (中药材) 1995 18: 627-630.
- 10 Zhong ZX(钟正贤), Zhou GF(周桂芬), Chen XF(陈学芬) *et al.* Study on the effects of total flavone of *Engelhardtia roxburghiana* on promoting blood circulation to remove blood stasis. *Guangxi J Tradit Chin Med*(广西中医药), 1999 22(44): 45-48.
- 11 Zheng C(郑楚), Yang DY(杨冬业), Xu Q(徐琴). Effect of total flavone of *Engelhardtia roxburghiana* wall on the blood lipid and hemorrheology in of atherosclerosis in rats. *Guiding J Tradit Chin Med Pharm*(中医药导报) 2010 16(10): 75-79.
- 12 Pan ZB(潘照斌), Li FC(李棊朝), Liao YE(廖月娥) *et al.* Protective effect of total flavone of *Engelhardtia roxburghiana* Folium on experimental cerebral ischemia in rats. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2011 17: 223-226.
- 13 Sumiyoshi M, Kimura Y. Enhancing effects of a chromone glycoside *aucryphin* isolated from *Astilbe* rhizomes on burn wound repair and its mechanism. *Phytomedicine*, 2010 17: 820-829.
- 14 Yang Y(杨悠), Xu J(许军), Liu YH(刘燕华) *et al.* Study on quantitative determination of total flavonoids in *Hedyotis diffusa* Willd by colorimetry. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊) 2011 29: 313-316.