

玉米须黄酮类测定方法的研究

任顺成, 丁霄霖

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本文选用多种黄酮类测定方法, 通过对玉米须黄酮类提取液、单体及芦丁标样用不同的显色剂反应后, 测定各反应液在200~600nm范围内的吸收曲线, 确定了适合玉米须黄酮类定量测定的波长, 并对不同测定方法的定量结果进行了比较。结果表明, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法不适合测定玉米须黄酮类的含量, 而 AlCl_3 比色法是一种简便、准确的方法, 以芦丁为标样, 可用于玉米须黄酮类含量的测定。

关键词: 玉米须; 黄酮类; 测定

Study on Determination Methods of Flavonoids from Corn Silk

REN Shun-cheng, DING Xiao-lin

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Several methods were selected to determine the content of flavonoids in corn silk, while satisfying wave length was decided by means of UV-visible photometer curves of flavonoids and its monomer in corn silk, as well as rutin at the range of 200~600nm after reacting with different reagents, and comparison of experimental results were carried out. The results showed that $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ colorimetry is not suitable to determine content of flavonoids in corn silk. While AlCl_3 colorimetry is a simple, accurate method which can be used to determine content of corn silk flavonoids with rutin as reference substance.

Key words: corn silk; flavonoids; determination

中图分类号: TS2

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630 (2004) 03-0139-04

玉米须(*Zea mays* L.)为禾本科玉蜀属植物玉米 *Zea mays* L.的花柱和柱头。它含有多种化学成分, 如挥发油、皂苷、生物碱、黄酮类、多聚戊糖、尿囊素、有机酸等。其味淡、性平, 有利尿、泄热、平肝、利胆之功效, 可用于治疗肾炎、胆结石、糖尿病、黄疸、麻疹、乳糜血尿、血崩等症^[1]。现代药理研究证明玉米须有显著的利尿^[2]、降血糖^[3]、抑菌^[4-5]、降压^[6]、增强免疫^[7]、抗癌^[8]等功效。玉米须是我国传统的中药材, 全国各地均广泛栽培玉米, 因此, 作为玉米副产物的玉米须的资源十分丰富, 但对它的开发利用非常有限, 仅少量入药外, 大部分被白白丢弃, 鉴于玉米须既有明显的药理价值, 又具备一定的食疗特征, 进行工业化开发利用前景相当广阔。作为玉米须主要活性成分之一的黄酮类单体, 国外研究不多, 国内至今未见报道。目前测定食品及中草药中黄酮类的方法有直接测定法、紫外测定法、三氯化铝比色法、硝酸铝比色法、HPLC法等。有关食品及中草药中黄酮类的含量测定, 当前用的较多的方法之一是以芦丁为标样的硝酸铝显色法。但通过我们的研究发现, 玉米须中的主要黄酮类(5种

单体的精确结构已被鉴定)使用这种比色法在波长510nm左右并无特征吸收峰, 而黄酮类以外的其它成分, 如咖啡酸、原儿茶酸、绿原酸等在510nm处却有最大吸收或吸收较强^[9], 因此, 大家普遍采用的硝酸铝比色法并不适合玉米须黄酮类含量的测定, 由于芦丁为黄酮类, 作为标准品, 很容易得到, 所以本文仍以芦丁为标样, 通过分析研究, 确定了适合玉米须黄酮类测定的简便方法, 为该中草药的开发利用, 奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

玉米须 ZZ、ZJ、WZ、WS、WF、ZJ031、ZJ034、DY 分别从郑州中药店、郑州郊区、无锡中药店、无锡菜场、山东潍坊郊区、湖北当阳郊区获得。

试剂 标准品芦丁 上海试剂一厂生化试剂; 玉米须黄酮类单体 本实验室制备; 其它试剂均为分析纯。

仪器 U-3000紫外分光光度计, 日立; Waters 2690型高效液相色谱仪, 美国Waters公司。色谱柱: Lichrospher C-

收稿日期: 2003-07-28

作者简介: 任顺成 (1963-), 男, 讲师, 博士研究生, 研究方向为药食科学。

18, 26×250mm。

1.2 玉米须黄酮类的提取及处理

将80%乙醇(V/V)冷浸的玉米须黄酮类提取液分成两部分,取其中的一部分上AB-8柱,分别用水、95%(V/V)乙醇洗柱,得到水洗部分(杂质)和醇洗部分(粗黄酮类)。

1.3 测定波长的确定 将不同测定方法的反应液进行紫外扫描,结果见图1~4。

1.4 黄酮类含量测定

氯化铝显色法^[10] 取1ml黄酮类提取液置于25ml容量瓶中,加20ml 0.1mol/L三氯化铝甲醇溶液,定容,摇匀,10min后测定 A_{400} 、 A_{272} 。以芦丁作标样,制标准曲线,得回归方程: $Y_{400}=38.75X+0.0323$, $R^2=0.9986$; $Y_{272}=26.144X-0.1154$, $R^2=0.9991$ 。

硝酸铝显色法^[11] 取5ml黄酮类提取液置于25ml容量瓶中,加50%乙醇补充至12.5ml,加入0.7ml 5% NaNO_2 ,摇匀,放置5min后,加入0.7ml 10%硝酸铝,6min后再加入5ml 1mol/L氢氧化钠,混匀,用50%乙醇稀释至刻度,10min后比色测定 A_{310} ,试剂为空白参比。以芦丁作标样,制标准曲线,得回归方程: $Y_{310}=38.75X+0.0323$, $R^2=0.9997$ 。

直接测定法^[12] 取1ml黄酮类提取液置于25ml容量瓶中,甲醇定容,摇匀,10min后测定 A_{355} 、 A_{260} 。以芦丁作标样,制标准曲线,得回归方程: $Y_{355}=38.309X+0.5241$, $R^2=0.9974$; $Y_{260}=29.747X+0.3736$, $R^2=0.9987$ 。

紫外测定法^[13] 取1ml黄酮类提取液置于25ml容量瓶中,加入10ml 0.1%三氯化铝甲醇溶液,定容,摇匀,10min后测定 A_{272} 。以芦丁作标样,制标准曲线,得回归方程: $Y_{272}=25.162X-0.2853$, $R^2=0.9987$ 。

HPLC测定法^[14] 流动相:甲醇-水-1%乙酸梯度洗脱,流速:0.3ml/min,柱温:30℃,检测波长350nm,进样量10 μ l。取玉米须黄酮类提取液20ml,加3ml 25%盐酸,80℃水浴回流2h,冷却,用碱中和,浓缩干,甲醇定容至5ml,取10 μ l进行HPLC测定,以槲皮素作外标,参考A.Hasler and O.Sticher的方法^[15],计算玉米须黄酮类的含量。

2 结果与讨论

2.1 测定波长的确定

我们分别对玉米须黄酮类提取液、水洗AB-8部分、醇洗AB-8部分、芦丁标样和我们自己制备的玉米须黄酮类单体,用不同测定方法显色反应后,在200~600nm波长范围内,进行紫外—可见扫描,扫描结果见图1~4。

从图1~4的扫描结果可以发现,芦丁与玉米须黄酮类的吸收峰位置有较大差别,杂质在紫外区有较强吸收,在可见区吸收较弱。(1)直接测定方法(图1),在260nm处芦丁与玉米须黄酮类的吸收峰位置基本一致,但杂质(水洗AB-8部分)在该处的吸收也很强,在360nm左右,玉米须黄酮类与芦丁的吸收峰虽不完全吻合,但选择波长355nm较合适。(2)

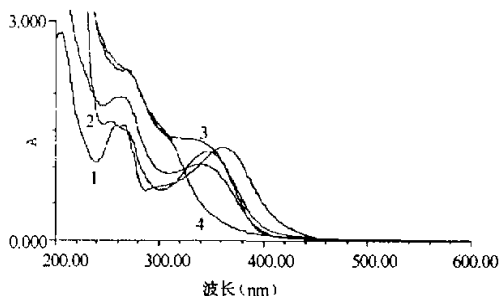


图1 直接测定法

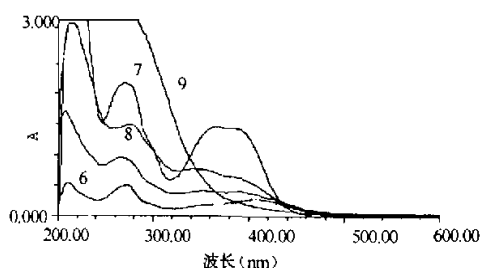


图2 三氯化铝显色法

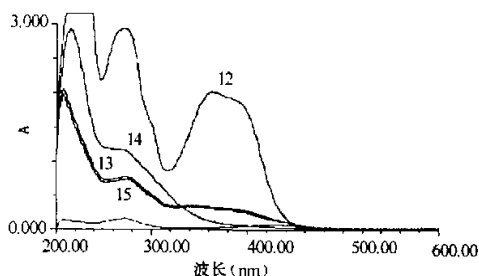


图3 紫外测定法

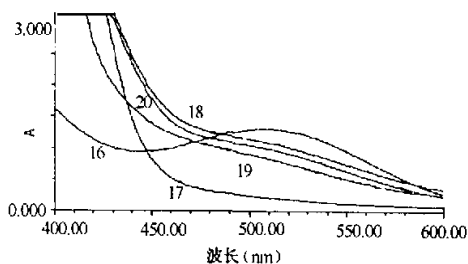


图4 硝酸铝显色法

注: 1. 芦丁标样 200~600nm 扫描; 2 玉米须黄酮类单体 200~600nm 扫描; 3. 玉米须黄酮类提取液 200~600nm 扫描; 4. 水洗AB-8溶液(杂质) 200~600nm 扫描; 5. 醇洗AB-8(粗玉米须黄酮类) 200~600nm 扫描; 6. 芦丁标样 + 0.1mol/L AlCl_3 甲醇溶液 200~600nm 扫描; 7. 玉米须黄酮类单体 + 0.1mol/L AlCl_3 甲醇溶液 200~600nm 扫描; 8. 玉米须黄酮类提取液 + 0.1mol/L AlCl_3 甲醇溶液 200~600nm 扫描; 9. 水洗AB-8溶液 + 0.1mol/L AlCl_3 甲醇溶液 200~600nm 扫描; 10. 醇洗AB-8溶液 + 0.1mol/L AlCl_3 甲醇溶液 200~600nm 扫描; 11. 芦丁标样 + 0.1% AlCl_3 甲醇溶液 200~600nm 扫描; 12. 玉米须黄酮类

表1 不同方法测定玉米须黄酮类的结果比较

品种	直接测定		紫外测定	AlCl ₃ 显色		Al(NO ₃) ₃ 显色	HPLC测定
	A ₂₆₀	A ₃₅₅	A ₂₇₂	A ₂₇₂	A ₄₀₀	A ₅₁₀	
ZZ1	0.54	0.33	0.35	0.40	0.22	0.08	0.24
ZJ1	0.56	0.45	0.39	0.42	0.31	0.09	0.35
WZ1	0.58	0.36	0.36	0.40	0.23	0.07	0.28
WS1	0.38	0.06	0.25	0.27	0.03	0.02	0.04
WF	1.09	0.79	0.76	0.85	0.50	0.16	0.60
ZJ031	1.24	0.84	0.81	0.91	0.62	0.20	0.68
ZJ034	1.50	1.27	1.25	1.34	0.92	0.33	1.09
DY	0.48	0.29	0.31	0.27	0.13	0.05	0.16

单体-0.1% AlCl₃ 甲醇溶液 200~600nm 扫描; 13. 玉米须黄酮类提取原液+0.1% AlCl₃ 甲醇溶液 200~600nm 扫描; 14. 水洗 AB-8 溶液+0.1% AlCl₃ 甲醇溶液 200~600nm 扫描; 15. 醇洗 AB-8 溶液+0.1% AlCl₃ 甲醇溶液 200~600nm 扫描; 16. 芦丁标样+10%Al(NO₃)₃ 400~600nm 扫描; 17. 玉米须黄酮类单体+10%Al(NO₃)₃ 400~600nm 扫描; 18. 玉米须黄酮类提取原液+10%Al(NO₃)₃ 400~600nm 扫描; 19. 水洗 AB-8 溶液+10%Al(NO₃)₃ 400~600nm 扫描; 20. 醇洗 AB-8 溶液+10%Al(NO₃)₃ 400~600nm 扫描。

三氯化铝显色法(图2), 在272nm处, 芦丁与玉米须黄酮类均有明显的吸收峰, 但杂质(水洗 AB-8 部分)在该处的吸收也很强, 在400nm左右, 玉米须黄酮类与芦丁的吸收峰吻合性较差, 若盲目选择大家普遍使用的420nm波长进行玉米须黄酮类含量的测定, 势必会导致测定结果的严重偏低, 从图2可以看出, 为了兼顾玉米须黄酮类和芦丁的吸收峰, 选择波长400nm基本满意。(3) 紫外测定法(图3): 在272nm处, 芦丁与玉米须黄酮类的吸收峰吻合很好, 而且, 杂质在该处的吸收也不是太强。(4) 硝酸铝显色法(图4): 该方法是目前大家在食品和中草药测定黄酮类时, 用的较多的方法之一, 但我们发现, 玉米须中的主要黄酮类单体在510nm处根本无吸收峰, 这说明玉米须中的主要黄酮类不具有该显色法所要求的化学基团, 这已通过我们对该黄酮类的精细结构的鉴定得到了证实。文献报道^[9] 硝酸铝显色法发生在芦丁B环的3', 4'-邻二酚羟基部位, 具有邻二酚羟基结构的非黄酮类成分原儿茶醛、原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸等也发生此显色反应, 并在500nm左右有最大吸收或有较强吸收。而我们所鉴定的玉米须中5种黄酮类单体的B环均为3'-甲氧基, 4'-酚羟基, 在500nm左右并无吸收峰, 足以说明以芦丁为标样的硝酸铝显色法不适合玉米须黄酮类的含量测定。

2.2 测定方法的比较

玉米须黄酮类的提取 称4g过40目的玉米须, 用滤纸包好, 加入80%的甲醇90ml, 80℃回流提取5h, 冷却, 过滤, 定容至100ml, 按1.4的方法定量测定, 测定结果见表1。

通过四种比色方法的测定结果与HPLC的定量结果比

较, 我们发现在波长260nm处直接测定时, 测定结果均高于其它测定方法的测定结果, 正如前面分析所言, 主要是杂质在该波长下吸收较强所致。测定结果最低的是Al(NO₃)₃比色法, 这是由于玉米须中的主要黄酮类在510nm处无吸收峰。同HPLC测定结果吻合较好的是在波长400nm处的AlCl₃比色法。该法的稳定性较好, 2h内测得的吸光度基本不变; 精密度较高, RDS为1.08% 加样回收率平均98.9%, RDS为1.15%。该方法同HPLC法的测定结果有较好的相关性(R²=0.9966)。HPLC法虽然可以较准确地测定玉米须总黄酮类含量, 但对设备和操作要求较高, 峰面积的计算也比较烦琐。AlCl₃比色法是一种操作简便、结果较准确的方法, 以易得到的芦丁为标准品, 可用于玉米须总黄酮类含量的快速测定。通过比较分析, 得到了AlCl₃比色法与HPLC法之间的校正系数为0.87。

3 结论

Al(NO₃)₃比色法不适合玉米须黄酮类含量的测定, AlCl₃比色法的测定结果同HPLC的测定结果基本一致, 通过比较分析, 得到了AlCl₃比色法(测定波长400nm)与HPLC法之间的校正系数为0.87。该法是一种操作简便、结果较准确的方法, 以易得到的芦丁为标准品, 可用于玉米须黄酮类含量的快速测定。

参考文献:

- [1] 吴征镒. 新华本草纲要[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.525.
- [2] 王鼎, 郭蓉. 玉米须利尿作用的初步研究[J]. 内蒙古中医药, 1991, (2): 38.
- [3] 李伟, 陈颖莉, 杨铭. 玉米须降血糖的实验研究[J]. 中草药, 1995, 26(6): 305.
- [4] 纪丽莲, 范怡梅. 玉米须提取物对食品腐败菌及致病菌抑制作用的研究[J]. 食品科学, 2000, 21(12): 131-134.
- [5] N N Joseph. Inhibition of *Aspergillus flavus* Growth by Silk Extracts of Resistant and Susceptible[J]. Corn J Agric Food

- Chem. 1996, 44: 1982-1983.
- [6] C A. 80: 116288f.
- [7] 汤鲁宏, 丁霄霖, 尤丽芬. 玉米须生物活性成分的初步研究—玉米须多糖及其免疫增强作用[J]. 无锡轻工大学学报, 1995, 14 (4): 319-324.
- [8] 马虹, 高凌. 玉米须提取物 ESM 对 K_{562} 和 SGC 细胞的作用[J]. 南京中医药大学学报, 1998, 14 (1): 28-29.
- [9] 郭亚健, 范莉, 王晓强, 等. 关于 $NaNO_2 - Al(NO_3)_3 - NaOH$ 比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2002, 22 (2): 97-99.
- [10] 唐宇, 赵钢, 任建川. 荞麦中总黄酮和芦丁含量的变化[J]. 植物生理学通讯, 1989, 25 (1): 33-35.
- [11] 吴文珊, 纪小苹, 王扬飞, 等. 薛荔叶及花序托中总黄酮的提取工艺[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9 (2): 55-56.
- [12] 梁红, 潘伟明, 张伟锋. 银杏叶黄酮提取方法比较[J]. 植物资源与环境, 1999, 8 (3): 12-17.
- [13] 王长青. 黄刺玫叶片中黄酮物质的提取和分析[J]. 食品工业科技, 1999, 20 (5): 14-16.
- [14] 翁德宝, 汪海峰, 翁佳颖. 菊花脑茎叶中黄酮类化合物的测定[J]. 药物生物技术, 2001, 8 (3): 167-169.
- [15] A Hasler, O Sticher. Identification and determination of the flavonoids from Gingo biloba by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1992, 602: 41-48.

白胡椒萜类化合物的分析

侯冬岩, 回瑞华, 李铁纯, 朱永强, 刘晓媛, 杨 阳
(鞍山师范学院化学系, 辽宁 鞍山 114005)

摘 要: 报道了用蒸馏—萃取法提取白胡椒果挥发性物质, 测得白胡椒挥发油的含量为 4.7%, 用 GC/MS 法从白胡椒挥发油中分离并确定出 35 种化学成分, 其中主要成分为萜类化合物。占总检出量的 88.70%。

关键词: 白胡椒果; 挥发性物质; 萜类化合物; GC/MS 法

Analysis of Terpene Constituents in White *P. nigrum* L.

HOU Dong-yan, HUI Rui-hua, LI Tie-chun, ZHU Yong-qiang, LIU Xiao-yuan, YANG Yang
(Department of Chemistry, Anshan Normal University, Anshan 114005, China)

Abstract: The water distillation-extractor was used for extracting the volatile substances of white *P. nigrum* L. in Hainan. The average oil yield obtained was 4.7%. 35 components were identified by GC/MS method. The contents of the identified terpinene compounds make up 88.70% of the total volatile substances detected.

Key words: white *P. nigrum* L.; volatile substances; terpenes; GC/MS method

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)03-0142-04

白胡椒为胡椒科植物胡椒的干燥成熟果实^[1], 又名白川。为近圆球形果实, 直径 3~6mm。平滑, 表面灰白色, 顶端略扁而微凹, 基部多少隆起, 有时显黑棕色斑。四种有纵走的脉纹。以个大、粒圆、坚实、色白、气味强烈者为佳。白胡椒原产于南印度马拉巴尔海岸地区, 现主产于马来西亚、印度尼西亚、泰国、越南、印度南部等地区, 由于欧洲人对白胡椒的需要量年年增加, 曾与黄金等价。在我国海南、广东、

广西、福建南部、云南的西双版纳和台湾等省均有栽培, 以海南、湛江种植最多。白胡椒的药用作用与辣椒相似, 但刺激性小, 可刺激肠胃、促进蠕动, 内服可作驱风、健胃剂, 外用可作刺激剂、发赤剂。所含胡椒碱曾用作解热和驱风剂。并有微弱的抗疟作用。胡椒的水、醚或酒精提取物有杀绦虫的作用。白胡椒有强烈芳香和刺激性辣味。兼有除臭、防腐和抗氧化作用。是当今食用香辛料中消耗最多、最为人们喜爱的

收稿日期: 2003-3-26

基金项目: 辽宁省教育厅科学技术基金资助课题 (20331079)

作者简介: 侯冬岩 (1962-), 男, 教授, 硕士, 从事有机分析及天然产物化学教学与研究。