

## 黄杞叶化学成分的含量分析

宋明明<sup>1</sup>, 尚志春<sup>1</sup>, 周辉<sup>2</sup>, 付晓雪<sup>1</sup>, 史丽颖<sup>1</sup>, 唐玲<sup>1</sup>, 于大永<sup>1</sup>, 王永奇<sup>1\*</sup>

(1. 大连大学药物研究所, 辽宁 大连 116622; 2. 广西钦州市农业机械学校, 广西 钦州 535000)

**[摘要]** 目的: 测定黄杞叶不同提取物中主要化学成分的含量。方法: 分别以芦丁、没食子酸和齐墩果酸为对照品, 采用分光光度法测定黄杞叶 95% 乙醇提取物及水提取物中总黄酮、总多酚以及总皂苷的含量。结果: 黄杞叶 95% 乙醇提取物中总黄酮含量为 48.01%、总多酚含量为 34.01%、总皂苷含量为 20.91%; 黄杞叶水提取物中总黄酮含量为 42.04%、总多酚含量为 33.25%、总皂苷含量为 17.84%。结论: 方法简便、准确、稳定性好、重复性好, 可用于黄杞中三大类化学成分的含量测定。

**[关键词]** 黄杞; 黄酮; 多酚; 皂苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0150-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013210150

## Quantitative Analysis of Chemical Compositions in Leaves of *Engelhardtia roxburghiana*

SONG Ming-ming<sup>1</sup>, SHANG Zhi-chun<sup>1</sup>, ZHOU Hui<sup>2</sup>, FU Xiao-xue<sup>1</sup>,

SHI Li-ying<sup>1</sup>, TANG Ling<sup>1</sup>, YU Da-yong<sup>1</sup>, WANG Yong-qi<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Materia Medica of Dalian University, Dalian 116622, China;

2. Agricultural Machinery Technology College of Qinzhou, Qinzhou 535000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the quality of chemical compositions in the different extracts of *Engelhardtia roxburghiana* leaves. **Method:** Rutin, gallic acid and oleanolic acid were used as the control samples. Spectrophotometry was used to determine the content of total flavonoids, total polyphenol and total saponins in the 95% alcohol extract and water extract of the leaves of *E. roxburghiana*. **Result:** The 95% alcohol extract content of total flavonoids, total polyphenols and total saponins were 48.01%, 34.01% and 20.09% respectively. The content of water extract was 42.04%, 33.25% and 17.84% respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and reliable, which could be used to determine the quality of the three major chemical compositions in *E. roxburghiana*.

**[Key words]** *Engelhardtia roxburghiana*; flavonoids; saponins; polyphenol

黄杞系胡桃科黄杞属植物, 约 15 种, 分布于亚洲热带和亚热带地区, 我国有 8 种, 产西南部、南部至东南部<sup>[1]</sup>, 生于海拔 200 ~ 1 500 m 的林中。其叶为《中华本草》所收载<sup>[2]</sup>, 具有清热止痛之功能, 用于治疗感冒发热、疝气腹痛<sup>[3]</sup>。作为甜茶, 在广东、

广西一带广为使用。大量动物实验表明黄杞叶具有降血糖、降血脂、抗凝血等作用<sup>[4]</sup>, 但关于黄杞叶化学成分定量分析的研究报道较少。本实验采用分光光度法对黄杞叶 95% 乙醇提取物及水提取物中的黄酮、多酚及皂苷类成分进行了定量分析, 为深入研究其化学成分和药理活性提供科学依据。

### 1 材料

Unico 7200 型可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司), Laborata 4000 型旋转蒸发器(德国 Heidolph 公司), BP210S (1/10 万) 型电子天平(Sartorius 公司), Jasco v-560 型紫外-可见分光光度

**[收稿日期]** 20121022(013)

**[第一作者]** 宋明明, 在读研究生, 从事中药资源学研究, Tel: 15904244120, E-mail: mingming3639@126.com

**[通讯作者]** \* 王永奇, 博士, 特聘教授, 从事天然活性物质的研究, Tel: 0411-87403834, E-mail: dalianwyq@163.com

计(日本Jasco公司)。

黄杞叶于2012年4月采集于广西壮族自治区钦州市那坡乡,经广西林科院研究员庞定轮鉴定为黄杞 *Engelhardtia leschen. ex Blume*,标本存放于大连大学生命科学与技术学院标本室,芦丁对照品(东京化成工业株式会社,纯度98%),没食子酸(中国药品生物制品检定所,批号120563-200412,纯度99.1%),齐墩果酸(中国药品生物制品检定所,批号110709-200304,纯度>98%),其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

## 2 方法

### 2.1 总黄酮的含量测定<sup>[5-6]</sup>

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精确称取干燥至恒重的芦丁对照品10 mg,置50 mL量瓶中,加入甲醇溶解并稀释到刻度,摇匀,得质量浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液,备用。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 分别精确称取黄杞叶95%乙醇提取物及水提物的干浸膏71.35,71.10 mg,置100 mL棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 $0.7135, 0.7110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试品溶液I和II,备用。

**2.1.3 测定波长的选择** 取黄酮对照品溶液、供试品溶液各0.5 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 $\text{NaNO}_2$ 溶液0.3 mL,摇匀,室温放置6 min,再加10%  $\text{AlCl}_3$ 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,总黄酮的检测波长为400 nm。

**2.1.4 线性关系考察** 分别精确吸取0,0.2,0.4,0.6,0.8和1.0 mL芦丁对照品溶液,置具塞试管中,按2.1.3项方法,自“各加甲醇至4.0 mL”起同法操作,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 $C(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 为横坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $A = 20.345C + 0.007 (r = 0.9998)$ ,芦丁的线性范围为 $8.70 \sim 43.48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.1.5 精密度试验** 取0.4 mL供试品溶液I和II,按2.1.3中所述实验方法操作,测定吸光度,平行测定6次,RSD分别为1.26%,1.44%,说明精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 按样品测定方法操作,在45 min内从起始时间开始每隔5 min测定同一供试液的吸光度一次,RSD 1.15%,表明吸收度在45 min

内基本稳定。

**2.1.7 样品中总黄酮的测定** 精确吸取供试品溶液I和II各0.4 mL置具塞试管中,按2.1.3项方法,自“各加甲醇至4.0 mL”起同法操作,于400 nm处测定吸光度,同时以空白试剂做参比,各平行测定5次,计算即得,结果见表1,2。

表1 黄杞叶95%乙醇提取物中总黄酮含量测定

No.	A	含量/%	平均值/%
1	0.620	48.56	
2	0.627	49.12	
3	0.611	47.85	48.01
4	0.593	46.42	
5	0.614	48.09	

表2 黄杞叶水提物中总黄酮含量测定

No.	A	含量/%	平均值/%
1	0.546	42.85	
2	0.541	42.45	
3	0.543	42.61	42.04
4	0.552	43.33	
5	0.553	43.41	

**2.1.8 重复性试验** 称取同一95%乙醇提取物及水提物各6份,按2.1.2项中所述实验方法操作,配制供试品溶液I'和II',精确量取0.4 mL的供试品溶液I'和II'置具塞试管中,按2.1.3中所述方法进行的操作并显色,在400 nm处测定吸光度,代入回归方程计算乙醇提取物及水提物中总黄酮的含量,RSD分别为1.62%,1.86%,表示重复性良好。

**2.1.9 加样回收率试验** 精确吸取已知总黄酮含量的供试品提取液I,II各0.2 mL置具塞试管中,分别加入 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芦丁标准溶液0.1 mL,余下部分按2.1.3中所述方法进行的操作,平行测定6次,计算加样回收率,结果见表3,4。

### 2.2 总多酚的含量测定<sup>[7-8]</sup>

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精确称取干燥至恒重的没食子酸对照品7.45 mg,置100 mL棕色量瓶中,加水溶解并稀释到刻度,摇匀,得浓度为 $0.0745 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 分别精确称取黄杞叶95%乙醇提取物及水提物的干浸膏30.14,30.83 mg,置100 mL棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 $0.3014, 0.3083 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试品溶液I和II,备用。

表 3 黄杞叶 95%乙醇提取物的总酚加样回收率试验

No.	试品量 /μg	加样 回收量 /μg	加样 回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	52.8	93.23	99.33	95.04	4.04
2	52.8	92.68	97.99		
3	52.8	93.36	99.66		
4	52.8	89.87	91.09		
5	52.8	89.53	90.24		
6	52.8	90.22	91.93		

注:加入量均为 40.70 mg(表 4 同)。

表 4 黄杞叶水提物的总黄酮加样回收率试验

No.	试品量 /μg	加样 回收量 /μg	加样 回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	45.05	82.93	93.06	96.79	2.99
2	45.05	84.28	96.38		
3	45.05	85.49	100.92		
4	45.05	84.44	96.79		
5	45.05	83.51	94.49		
6	45.05	85.38	99.10		

**2.2.3 测定波长的选择** 没食子酸对照品溶液和供试品溶液经磷钼钨酸-碳酸钠显色后,在紫外-可见分光光度计上,于波长 400 ~ 1 000 nm 扫描,两者均在 754 nm 处有最大吸收,因此选择 754 nm 为测定波长,测得的结果以没食子酸为基准计算总多酚的含量。

**2.2.4 线性关系考察** 分别精密吸取 0,0.2,0.3,0.4,0.6,0.8 mL 0.074 5 g·L<sup>-1</sup> 没食子酸标准溶液,置 10 mL 棕色量瓶中,各依次加 4 mL 水,1 mL 磷钼钨酸试液,最后用 29% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液稀释至刻度,摇匀,以相应的试剂为空白,30 min 后,在 754 nm 波长下测定吸光度 A。以吸光度 A 为纵坐标、浓度 C(g·L<sup>-1</sup>)为横坐标,绘制标准曲线,得到回归方程  $A = 136.13C - 0.0004$  ( $R^2 = 0.9997$ ),线性范围 1.49 ~ 5.96 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.2.5 精密度试验** 取 0.6 mL 供试品溶液 I 和 II,按 2.2.4 中所述实验方法操作,测定吸光度,平行测定 6 次,RSD 分别为 0.22%,0.20%,说明精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 按样品测定方法操作,测定同一供试液在 60 min 内的吸光度。结果吸光度在 30 ~ 60 min 内稳定,RSD 2.85%。因此,显色时间

定为 30 min。

**2.2.7 样品中总多酚的测定** 精确吸取供试品溶液 I 和 II 各 0.4 mL,分别置于 10 mL 棕色量瓶中,照 2.2.4 项方法,自“各依次加 4 mL 水”起同法操作,在 754 nm 处测定吸光度,各平行测定 5 次,计算即得样品中总多酚的含量,结果见表 5 和表 6。

表 5 黄杞叶 95%乙醇提取物中总多酚含量测定

No.	吸光度 A	含量/%	平均值/%
1	0.492	34.29	34.01
2	0.489	34.11	
3	0.488	34.06	
4	0.480	33.60	
5	0.503	34.91	

表 6 黄杞叶水提取物中总多酚含量测定

No.	吸光度 A	含量/%	平均值/%
1	0.484	33.07	33.25
2	0.498	33.85	
3	0.496	33.74	
4	0.496	33.74	
5	0.489	33.25	

**2.2.8 重复性试验** 称取同一 95%乙醇提取物及水提取物各 6 份,按 2.2.2 项中所述实验方法操作,配制供试品溶液 I' 和 II',各精确量取 0.4 mL 的供试品溶液 I' 和 II',分别放入 10 mL 的棕色量瓶中,按 2.2.4 中所述方法进行的操作并显色,在 754 nm 处测定吸光度,计算乙醇提取物及水提取物中总多酚的含量,RSD 分别为 0.01%,0.17%,表示重复性良好。

**2.2.9 加样回收率试验** 精确吸取已知总多酚含量的供试品试液 I,II 各 0.2 mL,置于 10 mL 棕色量瓶中,分别加入 0.4 mL 没食子酸对照品溶液,按 2.2.4 中所述方法进行的操作,测定吸光度,平行测定 6 次,计算得到平均加样回收率分别为 99.44%,96.64%,结果见表 7,8。

### 2.3 总皂苷的含量测定<sup>[9]</sup>

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精确称取干燥至恒重的齐墩果酸对照品 25 mg,置 100 mL 量瓶中,加入甲醇溶解并稀释到刻度,摇匀,得质量浓度为 0.25 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,备用。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 分别精确称取黄杞叶 95%乙醇提取物及水提取物的干浸膏 52.58,52.19 mg,置 100 mL 棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得 0.525 8,0.521 9 g·L<sup>-1</sup> 的供试品溶液 I

和Ⅱ,备用。

表7 黄杞叶95%乙醇提取物的总酚加样回收率试验

No.	试品量 /μg	加样 回收量 /μg	加样 回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	20.0	49.60	99.33		
2	20.0	49.70	99.66		
3	20.0	49.60	99.33		
4	20.0	49.97	100.56	99.44	0.74
5	20.0	49.63	99.43		
6	20.0	49.30	98.33		

注:加入量均为29.8 μg(表8同)。

表8 黄杞叶水提取物的总酚加样回收率试验

No.	试品量 /μg	加样 回收量 /μg	加样 回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	21.0	50.20	97.99		
2	21.0	49.80	96.64		
3	21.0	49.40	95.30		
4	21.0	50.43	98.77	96.64	1.65
5	21.0	49.80	96.64		
6	21.0	49.16	94.50		

**2.3.3 测定波长的选择** 齐墩果酸对照品溶液和供试品溶液香草醛-冰醋酸-高氯酸显色后,在紫外-可见分光光度计上,于波长400~800 nm扫描,两者均在551 nm处有最大吸收,因此选择551 nm为测定波长,测得的结果以齐墩果酸为基准计算样品中总皂苷的含量。

**2.3.4 线性关系考察** 分别精密吸取0,0.20,0.25,0.30,0.35,0.40 mL齐墩果酸对照品溶液,置具塞试管中,挥去甲醇,精密加入0.2 mL 5%香草醛-冰醋酸溶液(新鲜配制)和0.8 mL高氯酸,摇匀,于60℃水浴中加热15 min后置冰浴中冷却;加5 mL冰醋酸,摇匀,立即在551 nm波长下测定吸光度,同时以试剂空白做参照。以吸光度A为纵坐标、浓度C为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $A = 42.739C - 0.017$  ( $r = 0.9997$ ),线性范围5.6~14.2 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.5 精密度试验** 取0.6 mL供试品溶液Ⅰ和Ⅱ,按2.3.4中所述实验方法操作,测定吸光度,平行测定6次,RSD 0.45%,1.83%,精密度良好。

**2.3.6 稳定性试验** 按样品测定方法操作,测定同一供试液在不同时间吸收度。结果表明,吸收度在30 min内稳定,RSD 1.76%。因此,测定时间应控

制在30 min内完成。

**2.3.7 样品测定** 精确吸取供试品溶液Ⅰ和Ⅱ各0.4 mL和0.6 mL,置具塞试管中,按2.3.4项方法,自“挥去甲醇”起同法操作,在551 nm处测定吸光度,各平行测定5次,计算即得样品中总皂苷的含量,结果见表9,10。

表9 黄杞叶95%乙醇提取物中总皂苷含量测定

No.	A	含量/%	平均值/%
1	0.344	22.71	
2	0.349	22.95	
3	0.348	22.90	22.91
4	0.349	22.95	
5	0.348	22.90	

表10 黄杞叶水提取物中总皂苷含量测定

No.	A	含量/%	平均值/%
1	0.429	18.06	
2	0.420	17.76	
3	0.420	17.76	17.84
4	0.414	17.56	
5	0.427	17.99	

**2.3.8 重复性试验** 称取同一95%乙醇提取物及水提取物各6份,按2.3.2项中所述实验方法操作,配制供试品溶液Ⅰ'和Ⅱ',各精确量取0.4,0.6 mL的供试品溶液Ⅰ'和Ⅱ',置具塞试管中,按2.3.4中所述方法进行的操作并显色,在551 nm处测定吸光度,计算乙醇提取物及水提取物中总皂苷的含量,RSD分别为3.52%,3.18%,显示重复性良好。

**2.3.9 加样回收率试验** 精确吸取已知总皂苷含量的供试品溶液Ⅰ和Ⅱ,置具塞试管中,加入0.1 mL齐墩果酸对照品溶液,按2.2.4项方法,自“挥去甲醇”起同法操作,在551 nm处测定吸光度,各平行测定6次,计算得到平均加样回收率分别为99.44%,96.64%,结果见表11,12。

### 3 结果与讨论

以芦丁为对照品的氯化铝法是测定总黄酮含量比较成熟的方法,其显色的原理<sup>[10]</sup>是黄酮醇类成分B环的3',4'-邻二酚羟基与显色剂发生络合反应显黄色。有文献报道<sup>[11-12]</sup>称从黄杞叶中分离到大量二氢黄酮醇类成分,这些化合物的B环大都符合此条件,所以氯化铝法具有更好地专属性,更高的准确度,故选择了此法测定黄杞叶95%乙醇提取物及水提取物中总黄酮的含量,其结果分别为48.01%,

表 11 黄杞叶 95% 乙醇提取物的总皂苷加样回收率试验

No.	试品量 /μg	加样 回收量 /μg	加样 回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	20.01	38.82	82.50		
2	20.01	36.26	78.41		
3	20.01	36.82	82.50	81.14	1.83
4	20.01	36.58	79.99		
5	20.01	36.97	81.87		
6	20.01	36.91	81.56		

注:加入量均为 20.72 μg(表 12 同)。

表 12 黄杞叶水提取物的总皂苷加样回收率试验

No.	试品量 /μg	加样 回收量 /μg	加样 回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	16.02	38.39	88.73		
2	16.02	38.02	86.90		
3	16.02	37.75	85.60		
4	16.02	37.92	86.46	87.16	1.28
5	16.02	38.09	87.24		
6	16.02	38.25	88.03		

42.04%。总黄酮含量如此高的药材,在现有研究报道中实属罕见。

经大量的文献调研表明,以没食子酸为对照品的可见分光光度法是测定总多酚的含量比较成熟的方法,此方法稳定性好,准确度高,且简便快捷,易于操作,结果可靠。分光光度法测定黄杞叶 95% 乙醇提取物及水提取物中总多酚的含量,其结果分别为 34.01% ,33.25% 。

皂苷的分析测定有多种方法,如沉淀法、溶血指数法、色谱法等,沉淀法测定往往易带进杂质或导致皂苷变质;色谱法一般可以分离出总皂苷,但对总含量测定不适,误差大,成本高,但分光光度法操作简便,灵敏,属于经典、成熟的方法。本研究选择了与皂苷类成分基本母核结构接近的齐墩果酸为对照

品,采用分光光度计法测定黄杞叶 95% 乙醇提取物及水提取物中总皂苷的含量,其结果分别为 20.91% ,17.84% 。

[参考文献]

[ 1 ] 侯宽昭. 中国种子植物科属词典 [M]. 北京:科学出版社,1998:176,252.

[ 2 ] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 5 卷 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:371.

[ 3 ] 李晨岚,王大鹏,蔡兵,等. 黄杞叶提取物降血糖作用的研究 [J]. 中草药,2008,39(11):1696.

[ 4 ] 钟铃,张越非,李小菊,等. 乙醇/无机盐双水相体系分离纯化黄芪总黄酮的研究 [J]. 中国中药杂志,2012,37(22):3395.

[ 5 ] 毕和平,韩长日,廖家旺,等. 穿心莲总黄酮含量的测定 [J]. 光谱实验室,2006,23(3):356.

[ 6 ] 张美玲,甄汉深. 了哥王片总黄酮含量测定方法的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(7):3.

[ 7 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:附录 57.

[ 8 ] 何文静,张帆,田树革,等. Folin-Ciocalteu 比色法测定啤酒花中总多酚的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):58.

[ 9 ] 申海燕,龚小见,李文敏,等. 苗药黑古藤中总皂苷含量的测定 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):94.

[ 10 ] 刘立群. 有机理论与药物分析 [M]. 北京:人民卫生出版社,1984:344.

[ 11 ] Ryoji Kasai, Satomi Hirono, Wen-hua Chou, et al. An additional sweet dihydroflavonol glycoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese folk medicine, Huang-qi [J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39(7):1871.

[ 12 ] Ryoji Kasai, Satomi Hirono, Wen-hua Chou, et al. Sweet dihydroflavonol rhamnoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese folk medicine, Huang-qi [J]. Chem Pharm Bull, 1988, 36(10):4167.

[责任编辑 顾雪竹]