

技术与方法 Techniques and Methods

富含绿原酸的植物中类黄酮测定方法探讨

周春华^{1,2,*}, 孙崇德², 李鲜²¹扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009; ²浙江大学果实分子生理与生物技术实验室, 农业部园艺植物生长发育与生物技术开放实验室, 杭州 310029

Study on Method for Flavonoids Determining of Plant Rich in Chlorogenic Acid

ZHOU Chun-Hua^{1,2,*}, SUN Chong-De², Li Xian²¹College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; ²Laboratory of Fruit Molecular Physiology and Biotechnology, The Ministry of Agriculture's Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

摘要: 以枇杷花、枇杷叶和金银花为材料, 研究绿原酸干扰类黄酮测定的结果表明, 差示分析法基本上不受绿原酸的干扰, 可用于富含绿原酸植物中类黄酮的测定; 而NaNO₂-Al(NO₃)₃比色法和二甘醇比色法均受绿原酸的严重干扰, 测得的类黄酮含量明显偏高, NaNO₂-Al(NO₃)₃比色法测得的结果甚至超过总酚含量。

关键词: 类黄酮; 测定方法; 绿原酸; 芦丁

类黄酮是酚类物质中的一种, 广泛存在于植物体内, 是重要的膳食抗氧化剂, 其对预防人们日常生活中的氧化破坏有作用(Wolfe等2003; Hassimotto等2005)。由于类黄酮可以减轻与老年相关的疾病, 因此富含类黄酮的植物性食物日益受到人们的关注(Peer和Murphy2006)。类黄酮测定的方法有分光光度法和高效液相色谱法(HPLC), 前者由于操作简便、快速且费用少而得到广泛应用, 其中常用的是NaNO₂-Al(NO₃)₃比色法。我们在测定枇杷花类黄酮的过程中发现该法测得的类黄酮含量高于总酚含量。由于枇杷叶和果实中都含有较多的绿原酸(Jung等1999; Ding等2001), 因此推测绿原酸等其他酚类物质可能会干扰类黄酮的测定。本文比较了绿原酸对3种类黄酮测定方法的干扰, 以期能为准确测定枇杷花等富含绿原酸植物中的类黄酮含量提供正确的分析方法。

材料与amp;方法

1 材料

枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.)花为整花序(50%左右小花完全盛开), 枇杷叶为成熟叶片,

两者均于2005年11月25日采自浙江余杭枇杷园区, 于微波炉中干燥至恒重; 金银花(*Lonicera japonica* Thunb.)干燥品购自超市, 由杭州福海堂茶叶有限公司出品, 产地为河南息县。所有材料均用粉碎机粉碎, 过40目筛, 收集粉末置于-20℃下贮藏备用。

2 类黄酮和总酚的提取

取0.2 g上述备用的植物粉末, 加入8 mL 60%乙醇, 以TBT/C-YCL 500Tt/3P(D)超声波仪(山东济宁, 金百特电子有限公司生产)破碎80 min, 其频率和功率为47 kHz/500 W, 温度为30℃。超声结束后以5 600×g离心10 min, 上清液用60%乙醇定容至10 mL后测定类黄酮和总酚的含量。

3 类黄酮的测定

(1) NaNO₂-Al(NO₃)₃比色法: 参照Jia等(1999)的方法并作适当修改。吸取0.5 mL待测液置于10 mL试管中, 按顺序分别加入0.3 mL 8% NaNO₂, 混匀反应6 min后, 加0.3 mL 10% Al(NO₃)₃,

收稿 2007-06-28 修订 2007-09-05

资助 浙江省科技厅重点科研国际合作项目(2006C24005)。

* E-mail: nongzch@yahoo.com.cn; Tel: 0514-87696816

混匀反应 6 min 后, 加 2.0 mL NaOH ($2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 4.9 mL 无水乙醇, 混匀静置 10 min 后, 以 $5600 \times g$ 离心 10 min 后以分光光度计测定波长 510 nm 处的光密度(OD)值, 以芦丁作标准曲线计算类黄酮含量, 重复 3 次。

(2) 二甘醇比色法: 参照元晓梅等(1996)的方法并作适当修改。先在 10 mL 试管中加入 3.5 mL 无水乙醇和 0.5 mL 待测液, 再加入 4 mL 90% 二甘醇和 0.1 mL NaOH ($4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 摇匀后在 40 水浴中静置 10 min, 然后以分光光度计测定波长 420 nm 处 OD 值, 以芦丁作标准曲线计算类黄酮含量, 重复 3 次。

(3) 差示比色法: 参照康旭珍(2005)的方法并作适当修改。分别取待测液 1 mL 两份, 置于 10 mL 试管中, 一份加入 7 mL 甲醇; 另一份加入 2% 二氯氧锆($\text{ZrOCl}_2\cdot 8\text{H}_2\text{O}$)的甲醇溶液 1 mL, 再加入 6 mL 甲醇。混匀后于 30 水浴静置 1 h, 然后在分光光度计 420 nm 下测定溶液络合前后的差示吸光值 ΔOD , 以芦丁作标准曲线计算类黄酮含量, 重复 3 次。

4 总酚的测定

参照 Maksimovic 等(2005)文中的方法并作适当修改。先在 10 mL 试管中加入 4 mL 水和 0.5 mL 植物提取液, 混匀后加入 0.5 mL Folin-Ciocalteu 试剂, 3 min 后加入 1.0 mL 饱和 Na_2CO_3 , 摇匀后放在 30 水浴中静置 1 h, 然后以分光光度计测定波长 760 nm 处的 OD 值, 以绿原酸作标准曲线计算总酚含量, 重复 3 次。

实验结果

1 标准曲线的制作

以芦丁为标准品, 采用不同的浓度, 建立测定类黄酮的回归曲线, 不同方法回归系数均在 0.99 以上, 符合定量分析要求(表 1)。但 3 种方法的线性范围浓度不同, 其中 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法线性范围更宽一些, 而二甘醇比色法和差示比色法浓度范围较小, 且比较接近。

2 绿原酸的干扰

根据 3 种方法的线性范围浓度, 选择 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芦丁测定相应的吸光值或差示吸光值, 同时同步测定 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 绿原酸干扰后的数值(表 2)。比较混合样与芦丁样品的吸光值或差示吸光值的结果表明, 差示比色法在加入绿原酸后对芦丁的测定结果几乎没有影响, 而 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法和二甘醇比色法在加入绿原酸后, 其吸光值或差示吸光值分别为芦丁样品的 2.8 倍和 2.2 倍。由此可知, 差示比色法用于测定富含绿原酸植物材料中类黄酮的效果较好。

3 样品中类黄酮和总酚含量的测定

采用 3 种不同方法测定枇杷花、枇杷叶和金银花中类黄酮含量的结果(表 3)表明, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法所测定的类黄酮含量明显超过总酚含量, 说明此法不适用。二甘醇比色法测得的类黄酮含量虽然低于总酚含量, 但仍然高于差示比色法的结果。根据这些结果, 说明绿原酸对类黄酮的测定确实有干扰。差示比色法的结果相对来

表 1 不同测定类黄酮方法的标准曲线

方法	回归方程	<i>r</i>	线性范围
$\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法	$y=1464.18x+0.9902$	0.9999	$50\sim 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
二甘醇比色法	$y=442.91x+6.5904$	0.9992	$25\sim 400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
差示比色法	$y=449.54x+3.4384$	0.9989	$25\sim 500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

表 2 绿原酸对 3 种测定类黄酮方法干扰的比较

加入的标准样品浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法 / OD_{510}	二甘醇比色法 / OD_{420}	差示比色法 / ΔOD_{420}
芦丁 200	0.143 ± 0.002	0.315 ± 0.013	0.454 ± 0.016
芦丁 200+ 绿原酸 200	0.401 ± 0.006	0.704 ± 0.016	0.459 ± 0.018
混合样 OD/ 芦丁 OD*100%	280.4%	223.5%	101.1%

表3 不同植物样品中类黄酮和总酚含量

样品	类黄酮含量 /mg·g ⁻¹ (DW)			总酚含量 /mg·g ⁻¹ (DW)
	NaNO ₂ -Al(NO ₃) ₃ 比色法	二甘醇比色法	差示比色法	
枇杷花	152.75±4.45	28.56±0.45	7.69±0.32	88.19±0.37
枇杷叶	146.83±4.58	25.39±0.76	5.48±0.11	87.60±1.61
金银花	98.13±3.84	39.32±4.56	8.54±1.08	66.76±7.73

说比较可靠, 枇杷花、枇杷叶和金银花类黄酮的含量分别为 7.69、5.48 和 8.54 mg·g⁻¹ (DW), 其含量分别为总酚的 8.72%、6.25% 和 12.79%。

讨 论

NaNO₂-Al(NO₃)₃ 比色法中的试剂显色的反应原理是发生在类黄酮成分B环3',4'-邻位二酚羟基位置上(周正华等 2006), 而绿原酸与芦丁一样, 也有邻位二酚羟基的结构, 反应后也呈现出红色, 对芦丁等类黄酮的测定产生干扰, 因而测定结果偏高。在差示比色法中, 当类黄酮化合物分子中有游离的 3-OH 或 5-OH 时, 3-OH、4-羰基或 5-OH、4-羰基均可与溶液中的 ZrOCl₂ 形成稳定的黄色络合物, 并在 420 nm 波长处有吸收峰(陈优生等 2002)。而绿原酸不具有相邻的 OH 和羰基空间结构, 与 ZrOCl₂ 不能形成稳定络合物, 因此不会对类黄酮测定产生干扰。二甘醇比色法中, 芦丁与碱作用后, 开环生成 2,6-二羟基-4-环氧基苯丙酮和对甲氧基苯甲醛, 两者在二甘醇环境中遇到碱时会缩合生成黄色橙皮素查耳酮, 其在波长 420 nm 处有吸收峰(元晓梅等 1996), 绿原酸对类黄酮测定之所以有干扰, 可能是由于碱性条件下分解产物与溶液中其它分子缩合后在 420 nm 处产生吸收峰所致, 但具体原因尚不清楚, 有待进一步研究。总之, 采用分光光度法测定类黄酮含量时, 应先对样品的成分有初步了解, 如采用薄层色谱(TLC)进行定性, 而后再根据具体情况采用不同的测定方法, 这样可以在一定程度上

提高测定结果的准确性。对于富含绿原酸的植物, 其类黄酮的测定采用差示比色法会得到比较准确的结果。

参考文献

- 陈优生, 冯锋, 尤启冬(2002). ZrOCl₂ 比色法测定藤黄中总藤黄酸的含量. 中国药师, 5 (12): 731~732
- 康旭珍 (2005). 差示分光光度法测定桑叶总黄酮含量. 光谱实验室, 22 (3): 506~508
- 元晓梅, 刘贵贤, 胡正芝(1996). 比色法测定柑桔饮料及桔皮制剂中总黄酮含量. 食品与发酵工业, (3): 13~21
- 周正华, 杜安全, 王先荣(2006). 黄蜀葵花中总黄酮含量测定方法的比较研究. 中药材, 26 (11): 1192~1194
- Ding CK, Chachin K, Ueda Y, Imahori Y, Wang CY (2001). Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. J Agric Food Chem, 49 (6): 2883~2888
- Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM (2005). Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. J Agric Food Chem, 53: 2928~2935
- Jia ZS, Tang MC, Wu JM (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem, 64 (4): 555~559
- Jung HA, Park JC, Chung HY, Kim J, Choi JS (1999). Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from the leaves of *Eriobotrya japonica*. Arch Pharm Res, 22 (2): 213~218
- Maksimovic Z, Malencic D, Kovacevic N (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. Bioresour Technol, 96: 873~877
- Peer WA, Murphy AS (2006). Flavonoids as signal molecules. In: Grotewold E (ed.). The Science of Flavonoids. USA: Springer, 239~268
- Wolfe K, Wu XZ, Liu RH (2003). Antioxidant activity of apple peels. J Agric Food Chem, 51: 609~614