

琼榄不同部位化学成分预试验及总黄酮含量测定^Δ

孙玉婉*,汪春牛,韩 星,刘平怀[#](海南大学材料与化工学院热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室,海口 570228)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0618-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.16

摘要 目的:研究南药琼榄根、茎、叶、果壳不同部位所含的化学成分,并测定琼榄各部位中总黄酮的含量。方法:采用系统预试验法对琼榄各部位的水、95%乙醇、石油醚提取液进行化学成分研究;以芦丁为对照品,采用NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH比色法测定琼榄不同部位中总黄酮的含量。结果:琼榄根、茎、叶、果壳中均含有糖及多糖类、氨基酸、多肽及蛋白质、黄酮、甾体及三萜类、生物碱、香豆素及内酯、挥发油等成分;均可能含有有机酸。此外,其根、叶中含有酚类、蒽醌、强心苷,茎、果壳中可能含有酚类、蒽醌、强心苷;各部位均不含皂苷。琼榄根、茎、叶、果壳中总黄酮的质量分数分别为0.028%、0.017%、0.033%、0.012%,以叶中总黄酮质量分数最高。结论:本试验初步确定了琼榄各部位的化学成分类型并测定了总黄酮的含量,可为进一步研究琼榄提供依据。

关键词 琼榄;化学成分;预试验;总黄酮含量;部位

Preliminary Test of Chemical Components and Content Determination of Total Flavonoids in Different Parts of *Gonocaryum lobbianum*

SUN Yu-wan, WANG Chun-niu, HAN Xing, LIU Ping-huai (Key Laboratory of Protection and Development Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources, Ministry of Education, College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the chemical components of root, stem, leaves and nut shell of *Gonocaryum lobbianum*, and to determine the content of total flavonoids in different parts of *G. lobbianum*. METHODS: The extraction of every part with water, 95% ethanol and petrol ether was respectively experimented by comprehensive preliminary tests. Using rutin as substance control, the contents of total flavonoids in different parts of *G. lobbianum* were measured by colorimetric method with sodium nitrite-aluminum nitrate-sodium hydroxide. RESULTS: The different parts of *G. lobbianum* contained sugar, polysaccharide, amino acid, polypeptide, protein, flavonoids, sterides, triterpene, alkaloids, coumarin, latones, volatile oils, and may contain organic acids. The root and leaves contained phenols, anthraquinone, cardiac glycosides, but stem and nut shell may contain phenols, anthraquinone, cardiac glycosides. All of them didn't contain saponins. The content of total flavonoids of root, stem, leaves, nut shell were 0.028%, 0.017%, 0.033%, 0.012%. The content of total flavonoids of leaves was the highest. CONCLUSION: The results of preliminary tests determine the types of chemical components and the content of total flavonoids of *G. lobbianum*, which provide evidence for further study.

KEY WORDS *Gonocaryum lobbianum*; Chemical components; Preliminary tests; Content of total flavonoids; Parts

- [3] 邬蓉,高守红,辛海量.人参抗辐射损伤研究概况[J].药学实践杂志,2007,25(6):364.
- [4] 王莉.人参与西洋参的比较鉴别[J].海峡药学,2007,19(4):58.
- [5] 许见春.人参在实际应用中的药理作用[J].时珍国医国药,2006,17(4):578.
- [6] 褚秀玲,苏建青,韦旭斌.人參皂苷免疫调节和抗病毒作用研究进展[J].中兽医医药杂志,2008(5):20.
- [7] 杨明,崔志勇,王岩,等.人参茎叶多糖的药理作用[J].人参研究,1992(1):34.
- [8] 张彬,林瑞超,冯芳.人參多糖的研究概况[J].中国药事,2004,18(9):566.
- [9] 王俊刚,张树珍,杨本鹏.3,5-二硝基水杨酸法测定甘蔗茎节中总糖和还原糖含量[J].甘蔗糖业,2008(5):45.
- [10] 李辉,罗佳波.苯酚-硫酸法测定围乐颗粒中总多糖的含量[J].中国药房,2008,19(9):685.
- [11] 钟岩,潘浦群,王艳红.苯酚-硫酸法测定鲜人參中多糖含量[J].时珍国医国药,2008,19(8):1957.
- [12] 喻方圆,徐锡增.植物逆境生理研究进展[J].世界林业研究,2003,16(5):6.
- [13] 尹恒,王文霞,赵小明,等.植物糖生物学研究进展[J].植物学报,2010,45(5):521.

(收稿日期:2012-03-04 修回日期:2012-08-09)

^Δ 基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)课题资助(No.2007AA021500);海南省自然科学基金资助项目(No.309001)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物提取分离技术。E-mail: waner_ha@126.com

通信作者:教授,药学研究员,制药高级工程师,硕士。研究方向:热带药用植物资源及代谢产物。电话:0898-66281892。E-mail: twlph@163.com

琼榄 [*Gonocaryum lobbianum* (Merr.) Kurz.], 又称黄蒂、黄柄木, 是茶茱萸科 (Icacinaceae) 琼榄属 (*Gonocaryum* Miq.) 植物, 分布于热带、亚热带地区, 我国常见于海南、云南、广东、台湾等地^[1-2]。有文献表明, 琼榄属植物台湾琼榄 [*G. calleryanum* (Baill.) Becc.] 叶的提取物可以用来治疗胃病^[3]; 而琼榄有清热解毒、散郁结的功效, 海南民间用其治疗黄疸型肝炎、胸肋闷痛^[4-7]。目前有关琼榄的报道仅见于徐蕾等人^[8]及本课题组^[9]对琼榄油脂成分的研究, 而关于琼榄化学成分的研究未见报道。黄酮类化合物是一类天然的抗氧化剂, 不仅具有很强的清除自由基的能力, 而且在抗衰老、抗血栓、降血压、降血脂、降糖等方面表现出明显的药理活性^[10], 因此有必要对琼榄中黄酮含量进行测定。为明确其化学成分类型, 本研究通过预试验初步探索了南药琼榄根、茎、叶、果壳不同部位的化学成分类型^[11-14], 并采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定了琼榄不同部位总黄酮的含量^[15-17], 旨在为进一步研究其活性成分的提取分离及探索其化学成分与药理活性之间的关系提供试验基础。

1 材料

1.1 仪器

中药粉碎机 (上海淀久中药机械制造有限公司); DHG-9071A 电热恒温干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); BT224S 电子天平 (德国 Sartorius 公司); HH6-数显恒温水浴锅 (金坛市亿通电子有限公司); SHZ-D(III) 循环水真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); DLSB-5/20 °C 低温冷却循环泵 (上海美强仪器设备有限公司); RV10-数显旋转蒸发器 (德国 iKA 公司); KH2200DE 超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司, 功率: 600 W, 频率: 100 kHz); TU1810 紫外-可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 药材

琼榄根、茎、叶、果实均于 2011 年 7 月采自海南吊罗山自然保护区, 经海南大学生物工程系刘平怀教授鉴定为真品, 标本 (凭证号: DLS20110703) 保存于海南大学生物工程综合实验室。

1.3 试剂

95% 乙醇、石油醚、乙酸乙酯、氯仿、硫酸、醋酐、冰醋酸、

盐酸、氨水均为国产分析纯, 其他试剂均为自配, 水为蒸馏水; 芦丁对照品 (加拿大 Bio Basic 公司, 纯度 > 95%)。

2 琼榄不同部位化学成分预试验

2.1 供试品溶液的制备

取琼榄根、茎、叶、果壳适量, 分别置 40 °C 烘箱烘干, 粉碎, 备用。

2.1.1 水供试液 分别取根、茎、叶、果壳 (取出种仁) 不同部位样品粗粉 10 g, 加水 100 ml, 冷浸 24 h, 滤过, 取滤液 10 ml 做氨基酸、多肽及蛋白质的检查。滤渣在 60 °C 水浴下加热 30 min, 滤过, 取滤液做糖及多糖、有机酸、皂苷、酚类及鞣质等的检查。

2.1.2 乙醇供试液 分别取根、茎、叶、果壳 (取出种仁) 不同部位样品粗粉 50 g, 加 95% 乙醇 500 ml, 水浴回流 1 h, 滤过, 滤液浓缩至浸膏状 (叶提取液加入蒸馏水使其含醇量为 70%, 放冷后滤过, 滤液用等量石油醚分别萃取 2 次, 以除去叶绿素等)。将浓缩好的样品分为 2 份: ① 1/3 量加 20 ml 乙醇溶解, 制成醇溶液, 做酚类及鞣质、有机酸、黄酮、蒽醌、甾体及三萜类等的检查。② 剩下 2/3 量加盐酸 30 ml, 充分搅拌, 滤过, 溶于盐酸的部分做生物碱的检查; 不溶于盐酸的部分用乙酸乙酯 30 ml 溶解, 再加入 5% NaOH 振荡洗涤 2 次, 分出碱水层, 做有机酸、酚类及鞣质的检查; 乙酸乙酯层则用蒸馏水洗涤后, 蒸去乙酸乙酯, 再用 20 ml 乙醇溶解, 做强心苷、香豆素及内酯等的检查。

2.1.3 石油醚供试液 分别取根、茎、叶、果壳 (取出种仁) 不同部位样品粗粉 10 g, 加入 100 ml 石油醚 (沸程 60~90 °C), 室温密封放置 2 h 后抽滤, 滤液浓缩后供甾体及三萜、挥发油等的检查。

2.2 不同部位预试验结果

琼榄根、茎、叶、果壳 (取出种仁) 不同部位的水供试液、95% 乙醇供试液与石油醚供试液的预试验结果分别见表 1、表 2、表 3 (表中“+”表示正反应, “++”或“+++”表示正反应现象剧烈, “-”表示负反应)。

根据预试验结果, 若检查某类成分的结果为正反应, 则初步判断琼榄该部位含有某类成分; 若部分为正反应或成分干扰导致结果难以判断, 则判断可能含有某类成分; 若均为负反

表 1 水供试液化学成分预试验结果

Tab 1 Results of preliminary tests of chemical components from water extraction

待测成分类型	检测方法	正反应现象	检测结果			
			根	茎	叶	果壳
糖及多糖	碱性硫酸铜	红色氧化亚铜沉淀	+	+	+++	++
	氨性硝酸银	银镜或黑色沉淀	++	++	+	+
	苯酚-硫酸	显棕色	+	+	++	+
氨基酸、多肽及蛋白质	茚三酮	呈红棕色或蓝紫色	++	+	+++	+++
	双缩脲	呈紫红色	+	+	+	+
	加热煮沸	混浊或沉淀	+	+	+	+
有机酸	溴酚蓝	蓝色背景显黄色斑点	-	-	-	-
	溴甲酚绿	蓝色背景显黄色斑点	-	-	-	-
	pH 值	试纸颜色在 pH 7 以下	5.53	4.46	5.68	4.57
	乙酸铅	沉淀或混浊	+	+	+	+
酚类及鞣质	氯化钠-明胶	出现白色沉淀或混浊	-	-	-	-
	三氯化铁	绿、蓝或暗紫色	+	+	++	+
	香草醛-盐酸	不同程度的红色	+	-	+	-
皂苷	醋酐-浓硫酸	呈红紫色	-	-	-	-
	泡沫试验	振荡产生大量泡沫, 放置 10 min 后不消失	-	-	-	-

表2 95%乙醇供试液化学成分预试验结果

Tab 2 Results of preliminary tests of chemical components from 95% ethanol extraction

待测成分类型	检测方法	正反应现象	检测结果			
			根	茎	叶	果壳
酚类及鞣质	1% FeCl ₃	绿、蓝或暗紫色	+	+	+	+
	香草醛-盐酸	不同程度的红色	+	-	+	-
	氯化钠-明胶	出现白色沉淀或混浊	+	+	+	+
有机酸	溴酚蓝	蓝色背景显黄色斑点	-	-	-	-
	溴甲酚绿	蓝色背景显黄色斑点	-	-	-	-
	CaCl ₂	混浊或沉淀	+	+	+	+
	乙酸铅	混浊或沉淀	++	+	++	++
黄酮	盐酸-镁粉	泡沫处呈桃红色	+	+	+	+
	1% AlCl ₃	黄或黄绿色荧光	++	+	+	+
	氨熏	浅黄变黄色,有荧光	+	+	+	+
	荧光试验	强烈荧光	+	+	+	+
	醋酸镁	天蓝色或黄、橙黄、褐色荧光	+	+	+	+
蒽醌	1% 硼酸	显橙色荧光	+	-	+	-
	KOH,HCl	加碱变红色,加酸褪色	+	+	+	+
	醋酸镁	橙红色或紫色	+	+	+	+
甾体及三萜	磷酸	显深蓝色斑点	++	++	+	+
	醋酐-浓硫酸	颜色呈黄→红→紫青→肝绿色变化	++	++	++	+
	氯仿-浓硫酸	氯仿层显红或青色,浓硫酸层显绿色荧光	+	+	+	+
	间二硝基苯	呈黄褐色或紫色斑点	+	+	+	+
生物碱	碘化铋钾	淡黄色或棕黄色沉淀	++	+	+	++
	碘-碘化钾	红色沉淀	+	+	+	+
	苦味酸	黄色沉淀	+	+	+	+
	硅钨酸	淡黄色或白色沉淀	+	+	+	+
强心甘	亚硝基铁氰化钠	红色或紫色	+	+	+	+
	苦味酸	橙色或橙红色	+	-	+	-
	3,5-二硝基苯甲酸	显紫红色	+	+	+	+
香豆素及内酯	异羟肟酸铁	淡红色	++	+	++	+
	间硝基苯	紫红色	+	+	++	++
	开、闭环反应	加NaOH煮沸,液体较之前清晰,再加盐酸变混浊	+	+	+	+
	呈色反应	加Na ₂ CO ₃ 混浊,加FeCl ₃ 呈酸性反应	+	++	+	++

表3 石油醚供试液化学成分预试验结果

Tab 3 Results of preliminary tests of chemical components from petroleum ether extraction

待测成分类型	检测方法	正反应现象	检测结果			
			根	茎	叶	果壳
甾体及三萜	磷酸	深蓝色	++	+	++	+
	醋酐-浓硫酸	颜色呈黄→红→紫青→肝绿色变化	+	+	++	++
	氯仿-浓硫酸	氯仿层显红或青色,浓硫酸层显绿色荧光	+	+	+	+
	间二硝基苯	显褐色或紫色	+	+	+	+
挥发油	油斑检查	有油斑,立即挥发	+	+	+	+

应,则判断不含某类成分。综合表1~表3结果,琼榄根、茎、叶、果壳各部位所含有的成分大致相同,根与叶所含化学成分类型极为相似,茎与果壳所含化学成分类型也极为相似,试管反应和色谱反应根与叶较茎与果壳剧烈。琼榄各部位确含有糖及多糖、氨基酸、多肽及蛋白质、生物碱、甾体及三萜类、挥发油、香豆素及内酯、黄酮;可能含有有机酸、蒽醌、酚类及鞣质(鞣质在各部位的水提液中没有发现,存在于95%乙醇提取液中);不含有皂苷。此外,根和叶中还含有强心甘,而茎和果壳可能含有强心甘。

3 琼榄不同部位总黄酮含量的测定

3.1 供试品溶液的制备

精密称取琼榄根、茎、叶、果壳(取出种仁)不同部位样品粗粉5g,置锥形瓶中,加入35ml 70%乙醇,超声提取30min,

滤过,滤渣再次加入35ml 70%乙醇超声提取30min,滤过,合并2次滤液,浓缩至小于20ml,再用70%乙醇定容至25ml,即得。

3.2 对照品溶液的制备

精密称取芦丁对照品0.0204g,置于100ml量瓶中,加70%乙醇溶解并定容,摇匀,即得204μg/ml的对照品溶液。

3.3 标准曲线的制备

精密量取对照品溶液1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0ml,置于10ml量瓶中,各加入0.5ml 5% NaNO₂摇匀,放置6min,再加入0.5ml 10% Al(NO₃)₃摇匀,放置6min,最后加入4ml 4% NaOH,用70%乙醇定容至10ml,放置15min后于500nm波长处测定吸光度,并以相应试剂作空白对照。以芦丁对照品溶液的质量浓度(c)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A=11.35854c-0.03229$ ($r=0.9984$, $n=7$)。结果表明,经显色后的芦丁对照品溶液的质量浓度在0.0204~0.0816mg/ml范围内与吸光度呈良好的线性关系。

3.4 方法学考察

3.4.1 精密度试验 准确量取对照品溶液1.0ml,按“3.3”项下方法测定吸光度,重复测定5次,计算RSD值。结果,RSD=0.35%($n=5$),表明仪器精密度良好。

3.4.2 稳定性试验 准确量取琼榄根、茎、叶、果壳不同部位的供试品溶液各0.5ml,按“3.3”项下方法,分别于0、30、60、

90、120、150 min时测定吸光度,计算RSD值。结果,琼榄根、茎、叶、果壳供试品溶液的RSD分别为1.11%、0.97%、1.82%、1.36% (n 均为6),表明各供试品溶液在150 min内稳定性良好。

3.4.3 重复性试验 准确称取琼榄根、茎、叶、果壳不同部位样品各5 g,分别照“3.1”项下方法制备供试品溶液,按“3.3”项下方法测定吸光度,计算RSD值。结果,琼榄根、茎、叶、果壳供试品溶液的RSD分别为1.35%、1.57%、1.28%、1.90% (n 均为6),表明本方法重复性良好。

3.4.4 加样回收率试验 分别准确量取琼榄根、茎、叶、果壳不同部位的供试品溶液0.2、0.3、0.4 ml,各2份,每份各加对照品溶液1.0 ml,按“3.3”项下方法测定吸光度,计算加样回收率及RSD值。结果,琼榄根、茎、叶、果壳供试品溶液的平均加样回收率分别为97.43%、100.20%、101.50%、99.43%,RSD分别为1.91%、1.47%、1.32%、1.65% (n 均为6)。琼榄根的加样回收率试验结果见表4(因方法相同,为节省版面,茎、叶、果壳的试验数据省略)。

表4 琼榄根的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 4 Results of average recovery of roots from *G. lobbianum* ($n=6$)

编号	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	11.10	20.40	30.46	94.90		
2	11.10	20.40	30.49	95.05		
3	16.65	20.40	36.75	98.52	97.43	1.91
4	16.65	20.40	36.83	98.92		
5	22.20	20.40	42.32	98.62		
6	22.20	20.40	42.31	98.58		

3.5 总黄酮含量测定

准确量取琼榄根、茎、叶、果壳不同部位的供试品溶液0.5 ml,各3份,分别按“3.3”项下方法测定吸光度,取平均值,根据回归方程计算总黄酮的质量分数。结果,琼榄根、茎、叶、果壳中总黄酮含量的质量分数分别为0.028%、0.017%、0.033%、0.012% (n 均为3)。

4 讨论

本研究通过对南药琼榄根、茎、叶、果壳4个部位进行系统的化学成分类型考察,初步确定了琼榄各部位中含有糖及多糖、氨基酸、多肽及蛋白质、黄酮、甾体及三萜类、生物碱、香豆素及内酯、挥发油等;均可能含有有机酸;此外根、叶中含有酚类、强心苷、蒽醌等,茎、果壳中则可能含有酚类、强心苷、蒽醌;各部位均不含皂苷。根、叶所含的化学成分类型基本相同,由正反应现象的明显程度判断其含量也可能相差不大;茎、果壳中的化学成分基本类似。本研究结果表明,琼榄各部位的化学成分类型丰富,根、叶部位的化学成分类型较茎、果壳多。

由本研究结果可知,琼榄不同部位总黄酮的质量分数不同,以叶中最高(0.033%),根其次(0.028%),茎(0.017%)、果

壳(0.012%)相对较低。由精密性、稳定性、重复性、加样回收率试验结果可知,采用 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ 比色法测定琼榄不同部位总黄酮含量,方法操作简单,结果稳定、可靠。

琼榄叶这一部位既在化学成分类型上较其他部位丰富,又在总黄酮含量上高于其他部位,因此下一步试验将对琼榄叶进行系统的化学成分分离及活性筛选。

参考文献

- [1] 安树青,王峥封,曾繁敬,等.海南吊罗山热带山地雨林植物种类多样性研究[J].中山大学学报:自然科学版,1999,38(6):78.
- [2] 曾立,尹文清.茶茱萸科植物化学成分研究概况[J].中国药房,2010,21(47):4506.
- [3] Kaneko T, Sakamoto M, Ohtani K, et al. Secoiridoid and flavonoid glycosides from *Gonocaryum calleryanum*[J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(1):115.
- [4] 中国医学科学院药用植物研究所海南分所.南药园植物名录[M].1版.北京:中国农业出版社,2007:160.
- [5] 代正福,彭明.海南中药资源名录[M].1版.北京:中国农业出版社,2009:167.
- [6] 王祝年,肖邦森.海南药用植物名录[M].1版.北京:中国农业出版社,2009:283.
- [7] 邓必玉,王建荣,王茂媛,等.海南岛油脂植物种质资源[J].中国农学通报,2009,25(15):230.
- [8] 徐蕾,要文倩,纪红兵,等.海南省非粮生物柴油能源植物的调查、化学成分的测定及筛选研究[J].植物科学学报,2011,29(1):99.
- [9] 汪春牛,刘平怀,梁振益,等.琼榄果实油提取工艺优化及其脂肪酸成分分析[J].精细化工,2011,28(9):861.
- [10] 谭秦莉,刘冬,李玉宝,等.总黄酮化合物药理作用研究进展[J].安徽中医学院学报,2009,28(3):62.
- [11] 裴月湖.天然药物化学实验指导[M].2版.北京:人民卫生出版社,2010:134-146,286-308.
- [12] 韦建华,蔡少芳,陈君.倒地铃化学成分预实验[J].时珍国医国药,2011,22(3):754.
- [13] 梁洁,藤建北,柳贤福,等.龙眼叶化学成分预试研究[J].中国民族民间医药,2010,19(4):142.
- [14] 侯小涛,邓家刚,戴航,等.银合欢种子化学成分预实验[J].时珍国医国药,2009,20(1):62.
- [15] 程东岩,王隶书,王海生,等.赤霄不同药用部位中总黄酮含量的测定[J].时珍国医国药,2010,21(12):3108.
- [16] 吴佳雯,鲍佳路,吕耀平,等.乐清市铁皮石斛总黄酮含量的测定[J].安徽农业科学,2011,39(18):10856.
- [17] 孔繁晟,罗佳波,刘莉.云南红豆杉中总黄酮含量的测定[J].中国药房,2006,17(17):1342.

(收稿日期:2012-03-05 修回日期:2012-04-15)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅