

金荞麦叶总黄酮含量测定方法研究

李 光^{1,2,3}, 余 霜¹, 邓 银¹, 周永红², 陈庆富¹

(1. 贵州师范大学 生命科学院 植物遗传育种研究所, 荞麦产业技术研究中心, 贵州 贵阳 550001;

2. 四川农业大学 小麦研究所, 四川 温江 611130; 3. 安顺学院 化学与生物农学系, 贵州 安顺 561000)

摘 要:以金荞麦叶为试材, 采用超声波辅助法提取金荞麦叶中的黄酮类化合物, 研究了基于亚硝酸钠-硝酸铝法的金荞麦叶总黄酮含量测定的改良方法。结果表明:该方法稳定性好, 操作简单方便, 可适用于金荞麦叶提取液中总黄酮含量的测定。

关键词:金荞麦叶; 黄酮; 测定方法

中图分类号:S 567 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)17-0154-03

黄酮类化合物是一类重要的天然有机化合物, 它能清除生物体内的自由基, 具有抗氧化作用^[1]。金荞麦 (*Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn.) 属蓼科

(Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum*) 植物。别名天荞麦、赤地利(唐本草)、透骨消、苦荞麦、野桥荞麦^[2], 它是国家二级保护植物, 药用价值极大。金荞麦叶富含黄酮类化合物, 而有关金荞麦叶总黄酮含量的研究鲜见报道。该研究拟以建立基于亚硝酸钠-硝酸铝法的金荞麦叶总黄酮含量的改良测定方法为目标, 以期在金荞麦的合理开发利用提供理论基础和科学依据。

第一作者简介:李光(1980-), 男, 河南商丘人, 博士, 副教授, 研究方向为作物遗传育种及天然产物提取。E-mail:lg20029@126.com.

责任作者:陈庆富(1966-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为作物遗传育种及天然产物提取。E-mail:cqf1966@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31060207, 31171609); 国家现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-08-A4); 贵州省农业科技攻关资助项目(黔科合 NY 字[2010]3094); 贵州省科技创新团队资助项目(黔科合人才团队(2011)4007); 贵阳市科技计划资助项目(筑科合同[2011102]1-12)。

收稿日期:2013-04-15

1 材料与方法

1.1 试验材料

金荞麦叶采自贵州师范大学生命科学学院植物遗传育种研究所。芦丁标准品购自贵州迪大生物科技有限公司; 乙醇(95%)为分析纯, 12.5 cm 快速试纸(杭州特种纸业公司)。DHG-90A(101AB)干燥箱(上海索谱仪

[5] Duff S J B, Murray William D. Bioconversion of forest products industry waste celluloses to fuel ethanol: a review[J]. Bioresource Technology, 1996, 55:1-33.

[6] Lee D, Yu A H C, Saddler J N. Evaluation of cellulase recycling

strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1995, 45(4):328-336.

[7] Kim T H, Kim J S, Lee Y Y, et al. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia[J]. Bioresource Technology, 2003, 90(1):39-47.

Effect of Dilute Acid Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis *Pennisetum* sp. Cellulose

SHI Jing^{1,2}, LIN Zhan-xi^{1,2}, LIN Dong-mei¹, SU De-wei^{1,2}, LUO Hai-ling¹, LIN Xing-sheng¹,

LIN Zhan-sen¹, ZHENG Dan^{1,2}, YAO Jun-xin^{1,2}, CHEN Jin-hua^{1,2}

(1. The National Juncao Engineering Research Center, Fuzhou, Fujian 350002; 2. College of Life Science, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract: Taking *Pennisetum* sp. as material, the effect of solid-liquid ratio, acid concentration, processing time and processing temperature of H₂SO₄ on chemical composition of *Pennisetum* sp. and the reducing sugar content in enzymatic hydrolysis solution were studied. The results showed that the best dilute acid (H₂SO₄) pretreatment methods were as follows: solid-liquid ratio 1 : 20, acid concentration 2.0%, treatment time 60 min and processing temperature 100°C. This article conducted a preliminary exploration for giant Juncao as bio-ethanol fuel.

Key words: *Pennisetum* sp.; cellulose; dilute acid pretreatment; enzymatic hydrolysis

器有限公司);紫外可见分光光度计 UV-1800(岛津公司);AR1140 电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司);WB-400 小型高速粉碎机(北京维博创机械设备有限公司);TDL-5C 型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);AKJY-20 超纯净水机(艾柯);KQ-250DE 型数控超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司);PHS-3C 型酸度计(上海虹仪仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 过滤对标准曲线的影响 准确称取 100 mg 芦丁标准品,定容至 100 mL,获得 1.0 mg/mL 芦丁标准品。用移液器吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 芦丁标准品置于 10 mL 容量瓶中,用 60% 的乙醇补充至 5.0 mL,分别加入 5% 的 NaNO_2 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;再依次加入 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.3 mL,摇匀,静置 6 min,再分别加入 1.0 mol/L 的 NaOH 4.0 mL,用 60% 乙醇定容至刻度,摇匀,静置 20 min,然后于 510 nm 下测吸光度。以吸光度为纵坐标,浓度(mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线^[3]。研究过滤法对芦丁标准的影响,使用快速定性滤纸过滤,然后绘制标准曲线。

1.2.2 金荞麦叶总黄酮测量方法的确定 取 100 g 金荞麦叶在 60℃ 下烘至恒重,粉碎后过 40 目,准确称取 0.3 g 干粉,以浓度为 60% 的酒精,固液比 1:20,温度 40℃,提取时间 20 min,提取 3 次,超声波功率 178.5 W,

超声提取前静置 5 min,提取液 2 000 r/min 离心 3 min,合并提取液即为黄酮提取液。移取黄酮提取液 0.5 mL,按照 1.2.1 的方法加入试剂,然后进行 180 s 的连续吸光度值测定,测定间隔设定为 0.5 s。研究过滤对提取液的影响,将提取液用 1.0 mol/L 的 NaOH 调 pH 值至 9.0,静置,使用快速定性滤纸过滤,过滤后进行 180 s 的连续吸光度值测定。

1.3 数据分析

运用 SPSS 17.0 软件对连续吸光度值测定中获得的吸光度值进行统计分析,对比 2 种方法的优劣。

2 结果与分析

2.1 过滤对标准曲线的影响

未过滤芦丁的浓度与其吸光度的回归方程为: $Y=0.1017X-0.0139$, $R^2=0.9993$ (X 为吸光度值, Y 为总黄酮提取液浓度,单位为 mg/mL)。过滤后测得芦丁浓度与其吸光度的回归方程为: $Y=0.1049X-0.0261$, $R^2=0.9995$,单位相同。过滤前后的标准曲线的方程变化不大,从拟合优度系数来看,过滤后标准曲线方程相关系数有所提高。由表 1 可知,芦丁标准品溶液通过快速滤纸后,吸光度变化不大,变化区间在正负 0.0090 之间,第 3 组数据过滤前后的吸光度是一致的。表明芦丁在通过滤纸的过程中损失较小,暗示提取液通过滤纸后再测量黄酮含量的方法是可行的。

表 1 过滤法对标准溶液吸光度值的影响

Table 1 Influence of filtering method on absorbency value of standard solution

黄酮浓度 /mg · mL ⁻¹	未过滤吸光度	过滤后吸光度	吸光度差
1.0	0.0890	0.0830	0.0060
2.0	0.1870	0.1780	0.0090
3.0	0.2890	0.2890	0.0000
4.0	0.4000	0.3930	0.0070
5.0	0.4910	0.5000	-0.0090

2.2 金荞麦叶总黄酮含量测定方法的确定

从图 1 可以看出,使用 2 种方法进行测量的前 60 s 内数据均有一定的波动,这个阶段的数据不宜采用,而在 60~180 s 的区间内数据相对较好。对 2 种方法 60~180 s 区间的数据进行统计分析发现,过滤后提取液的吸光度在标准误差、标准差、方差、峰度、偏度等指标上均优于未过滤的提取液(表 2)。表现在图 1 中,未过滤的提取液吸光度曲线有较多的波峰,而过滤后明显减少,故金荞麦叶总黄酮含量测定的方法为,使用快速滤纸过滤提取液,依次加入反应液后静置 21 min,测量在 3 min 内完成,以便获得更加稳定和重现性好的试验数据。

3 讨论与结论

该研究确定的静置时间与林静等^[4]确定的 10~15 min

不同,这可能是由于测定的对象不同造成的。同时,该研究确定的测量方法对其它植物叶片黄酮含量的测定是否适用要根据测定对象的不同具体分析。

该试验结果表明,过滤后提取液吸光度值的稳定性比未过滤的好,其原因可能是在黄酮提取液中加入碱液使部分杂质发生沉淀,过滤使沉淀被除去,导致过滤后的黄酮提取液吸光度的动力学特征得到改善。

可见及紫外分光光度法是黄酮测量常用的方法,该方法有操作简便、检测成本低的优点,目前使用的可见及紫外分光光度法有亚硝酸钠-硝酸铝法和三氯化铝法 2 种,而由于使用三氯化铝法获得的黄酮含量的测量值比实际的要低,所以,亚硝酸钠-硝酸铝法的使用更为普遍,该研究建立了一种基于亚硝酸钠-硝酸铝法的金荞麦叶总黄酮含量的测定方法,该法可以为金荞麦其它组织中总黄酮含量的测定提供参考。

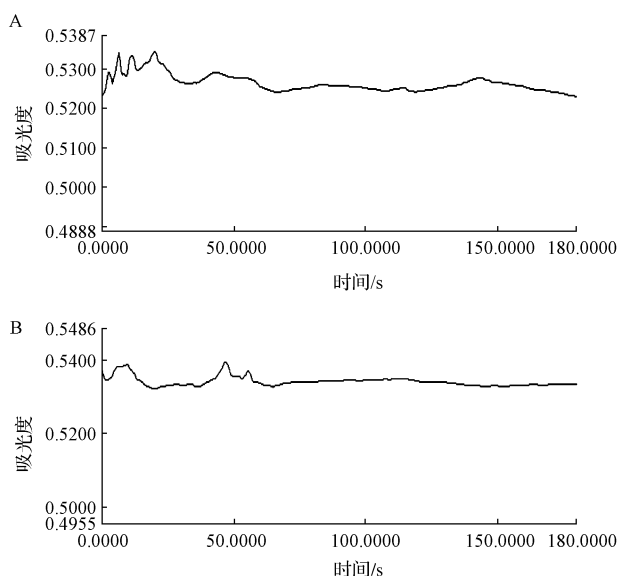


图1 2种方法的时间进程曲线

注:A:未过滤;B:过滤。

Fig. 1 The time course graph of two methods

Note: A: Not filter; B: Filter.

表2

2种方法吸光度值的统计分析

Table 2

Statistical analysis of the absorbency value about two methods

序号	标准误差	标准差	方差	峰度	偏度	区域	置信度 (95.0%)
未过滤	8.87×10^{-5}	0.0010	9.5×10^{-7}	0.0096	0.3366	0.0046	0.0002
过滤	5.65×10^{-5}	0.0006	3.9×10^{-7}	-1.3146	0.1141	0.0021	0.0001

参考文献

- [1] 延玺,刘会青,邹永青,等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学, 2008, 28(9): 1534-1544.
- [2] 李安仁. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998.

- [3] 李敏晶,游景艳,刘忠英,等. 微波辅助流动萃取槐花中的黄酮类成分[J]. 高等学校化学学报, 2004(5): 850-852.
- [4] 林静,刘群,李艳冬,等. 金荞麦愈伤组织诱导及其总黄酮含量测定方法的建立[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2010(2): 230-234.

Study on the Determination Method of Flavonoids in *Fagopyrum cymosum* Complex Leaves

LI Guang^{1,2,3}, YU Shuang¹, DENG Yin¹, ZHOU Yong-hong², CHEN Qing-fu¹

(1. Research Center of Buckwheat Industry Technology, Institute of Plant Genetic and Breeding, School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001; 2. Triticeae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang, Sichuan 611130; 3. College of Chemistry and Biology, Anshun University, Anshun, Guizhou 561000)

Abstract: Taking *Fagopyrum cymosum* complex leaves as material, ultrasonic extraction method was used to extract flavonoids from *Fagopyrum cymosum* complex leaves, and a new determination method base on NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH spectrophotometric method was built. The results showed that this method was convenient, accurate, and reproducible, which could be used for flavonoids content determination of other parts in *Fagopyrum cymosum* complex.

Key words: *Fagopyrum cymosum* complex leaves; flavonoids; determination method