

文章编号:1009-038X(2003)02-0098-04

苦荞黄酮的测定方法

徐宝才, 丁霄霖

(江南大学食品学院, 江苏无锡214036)

摘要:比较了定量测定苦荞黄酮的两种比色方法,通过与HPLC测定结果对照、影响因素的探讨以及方法评价,提出 AlCl_3 比色法比常用的 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 法更适于苦荞黄酮的测定,该方法操作简便,结果准确可靠。

关键词:苦荞;黄酮;比色法;高效液相色谱法

中图分类号:S 517

文献标识码:A

The Quantitative Methods of Flavonoids in Buckwheat(*Fagopyrum tataricum*)

XU Bao-cai, DING Xiao-lin

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

Abstract: Two colorimetric procedure for detecting flavonoids in *Fagopyrum tataricum* were evaluated, by comparing with the results by HPLC. The results showed that AlCl_3 spectrophotometric methods is superior to $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ methods both in detecting accuracy and easy operation.

Key words: *Fagopyrum tataricum*; flavonoids; colorimetric methods; HPLC

荞麦是一种适于在冷凉气候下生长的短季蓼科(Polygonaceae)作物,植物分类学上主要有苦荞(*Fagopyrum tataricum* Gaertn)和甜荞(*Fagopyrum esculentum* Moench)二个食用品种。荞麦富含高生物价的蛋白质、维生素、矿质元素等,且含有丰富的生物活性成分——黄酮类化合物,尤其是苦荞,其黄酮含量较高,比甜荞高10~100倍^[1~4],这是其它谷类粮食所不具有的,也是黄酮的重要膳食来源。

目前,荞麦黄酮的测定方法有分光光度法、高效液相色谱法、毛细管电泳法^[5]。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

苦荞籽粒购自四川西昌,经磨粉机碾磨、筛分

后,得壳、麸皮和全粉3部分(见表1)。苦荞外层粉、心粉购自四川凉山州。苦荞粉购自山西晋城。甜荞分别购自吉林、江苏,经小型磨谷机脱壳后制粉备用。

芦丁、桑色素:生化试剂,上海试剂二厂产品;槲皮素:日本,半井化学药品株式会社产品;儿茶素、原儿茶酸、咖啡酸:SIGMA公司产品;原花青素:天津尖峰天然产物有限公司产品。

表1 苦荞籽粒制粉后各组分的质量分数

Tab.1 Milling fractions obtained by Brabander machine

组 分	质量分数/%
全粉	66.67
壳	32.25
麸皮	1.08

收稿日期:2002-02-02; 修回日期:2002-10-17。

作者简介:徐宝才(1973-),男,安徽阜阳人,食品科学与工程博士研究生。

1.2 苦荞黄酮的提取

分别准确称取四川苦荞样品(壳、麸皮、外层粉、心粉)、山西苦荞及甜荞粉各 2 g,滤纸包好后置于索氏抽提器中,加入 80 mL 体积分数为 80% 甲醇的溶液,85 ℃ 条件下提取 6 h,定容至 100 mL,待测定。

1.3 黄酮含量测定

1.3.1 分光光度法

1) $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 法^[6]:定量移取样品液于 25 mL 的容量瓶中,加体积分数为 30% 的乙醇溶液补充至 10 mL,加入质量分数为 5% 的 NaNO_2 溶液 1 mL,摇匀;放置 5 min,加 1 mL 质量分数为 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,6 min 后再加 10 mL 2 mol/L 的 NaOH 溶液;静置 10 min 后,蒸馏水定容至 25 mL,,510 nm 波长处进行比色测定,试剂空白为参比。

2) AlCl_3 法分光光度法^[7]:移取定量样品液于 10 mL 容量瓶中,以质量分数 1% 的 AlCl_3 溶液定容至刻度线,于 420 nm 波长处进行比色测定,试剂空白为参比。

3) 标准曲线制定:准确称取芦丁标准品(120 ℃ 干燥至恒重),配制质量浓度为 0.218 mg/mL 的芦丁标准母液,定量移取该母液进行比色测定,绘制标准曲线。

1.3.2 高效液相色谱法

1) 样品不水解:荞麦黄酮提取液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,直接进样分析。HP Agilent 1100 高效液相色谱仪,色谱柱: Hypersil ODS(4.6 mm $\times$ 100 mm, 5 μm),可变波长检测器(VWD),波长 354 nm。流动相 A:体积分数为 65% 的甲醇溶液(含质量分数为 0.5% 乙酸);流动相 B:超纯水(含质量分数为 0.5% 乙酸)。洗脱条件见表 2;流量:0.8 mL/min;进样量:5 μL ,10 min 内完成样品分析。以芦丁为标样,峰面积外标法定量分析。儿茶素分析,波长选定为 280 nm。

2) 样品水解:取荞麦黄酮索氏抽提液 20 mL,加 3 mL 质量分数为 25% 的盐酸溶液,80 ℃ 水浴回流水解 2 h,定容至 25 mL。经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后,进行 HPLC 分析,5 μL 进样。HPLC 条件同上。槲皮素为标样,以转化因子 2.51 计算总黄酮含量^[8,9]。

表 2 黄酮的 HPLC 洗脱条件

Tab.2 HPLC eluting condition for flavonoids analysis		
时间/ min	流动相 A 体积分数/%	流动相 B 体积分数/%
0	65	35
2	100	0
5	65	35

2 结果与讨论

2.1 四川苦荞籽粒中的黄酮种类及定量标准

四川苦荞粉的黄酮种类主要由槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷(I)、槲皮素-3-芸香糖苷(芦丁)(II)、山奈酚-3-芸香糖苷(III)和槲皮素(IV)等 4 种主要成分组成^[10]。由其高效色谱图可清楚看出,按出峰时间的先后顺序依次为 I、II、III、IV(图 1)。由此可见,通过反相液相色谱(RP-HPLC)可以较好地的苦荞黄酮与其他物质分离开,从而进行较为准确的定量测定。

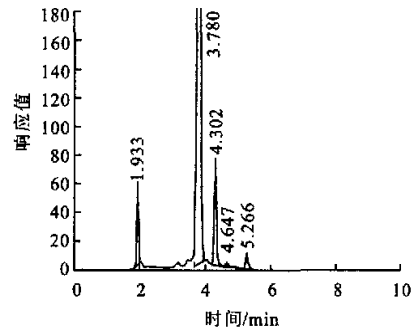


图 1 四川苦荞粉等 4 种黄酮的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of flavonoids in Sichuan buckwheat flour

测定结果表明,四川苦荞籽粒各部分中的黄酮组分相近,黄酮含量高低顺序为麸皮>外层粉>壳>心粉,芦丁是其主要成分,麸皮、壳、外层粉中的芦丁占总黄酮的质量分数达 90% 以上(见表 3)。

表 3 4 种黄酮醇在苦荞籽粒中的质量分数

Tab.3 Distribution and content of four flavonols in milled tatar buckwheat seeds

名称	I	II	III	IV	总黄酮醇	m(芦丁)/ m(总黄酮醇)
壳	0.0168	0.4443	0.0168	0.0062	0.4841	91.78
麸皮	0.1023	4.1054	0.1230	0.0704	4.4011	93.28
外层粉	0.0448	2.1605	0.1330	0.0187	2.3570	91.66
心粉		0.0816	0.0043	0.031	0.1172	69.62

另外,水解法 HPLC 得到的结果稍偏低,这与胡敏等^[11]测定银杏黄酮时得到的结果相反。他们认为,由于银杏黄酮种类繁多,极性相差很大,等梯度洗脱很难将所有黄酮类化合物都洗脱下来,从而造成水解法的结果高于未水解的结果。而四川苦荞中的黄酮主要只有 4 种(见图 1),另外还有一种微量的黄酮组分——槲皮素-3-芸香糖双葡萄糖苷,基本

苷元为槲皮素、山奈酚,在该色谱条件下基本都能洗脱下来。水解法结果偏低的原因可能是:仅仅以槲皮素(转化因子 2.51)为对照品进行定量,较分别以槲皮素、山奈酚和异鼠素为对照所得结果偏低,这与 Castele 等报道的结果是一致的^[12]。因此,作者选择 HPLC 法(不水解)作为苦荞黄酮定量分析的标准。

2.2 两种比色法测定结果的比较

2.2.1 四川苦荞的测定结果 表 4 数据表明,两种分光光度法的测定结果都较 HPLC 法高,以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 法的测定结果最高,尤其是壳、麸皮部分,偏差高达 46.36%~136.63%。而 AlCl_3 法与 HPLC 法的测定结果较接近,其偏差只有 3.91%~4.91%。

表 4 四川苦荞籽粒各部分中黄酮的质量分数

Tab.4 Flavonoid contents in Sichuan buckwheat seeds determined by HPLC and colorimetric methods %

名称	$\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 法	偏差率*	AlCl_3 法	偏差	HPLC (不水解)	HPLC (水解)
壳	1.150	136.63	0.505	3.91	0.486	0.330
麸皮	6.437	46.36	4.614	4.91	4.398	4.399
外层粉	3.113	31.91	3.098	31.27	2.360	2.143
心粉	0.162	37.29	0.174	45.76	0.118	0.091

注: * 偏差率(%) = $\frac{\text{比色法测定值} - \text{HPLC(不水解)测定值}}{\text{HPLC(不水解)测定值}} \times 100\%$

2.2.2 山西苦荞的测定结果 对于山西苦荞粉,其黄酮组成与四川苦荞相似,主要也是槲皮素-3-芸香葡萄糖苷、槲皮素-3-芸香糖苷(芦丁)、山奈酚-3-芸香糖苷和槲皮素等 4 种黄酮(见图 2),这表明植物黄酮类化学成分在其化学分类学上有着重要意义。四川苦荞籽粒各组分中的黄酮都以芦丁含量最高,但山西苦荞中槲皮素含量较高(表 5),这可能是品种差异的原因,也可能是山西苦荞粉贮藏环境中的水分活度较高,芦丁分解产生槲皮素所致。由表 5 山西苦荞粉的测定结果可以看出, AlCl_3 法的测定值与 HPLC 法相近,偏差为 -8.53%,而 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 法的测定值偏差较大。

2.2.3 甜荞的测定结果 据报道,甜荞中儿茶素成分的含量及抗氧化活性都高于芦丁^[13],作者通过对两种甜荞粉提取液的 HPLC 分析,发现其中含有芦丁、槲皮素,但未发现儿茶素的存在。对甜荞粉来说,分光光度法的测定结果高于 HPLC 法(数据略),这是因为甜荞中的黄酮组分与苦荞存在差异,甜荞中可能还含有其他黄酮类化合物,仅以芦丁、

槲皮素的含量作为其总黄酮含量,显然会造成 HPLC 结果偏低。这两种甜荞的黄酮组成及含量的研究,尚待进一步工作。

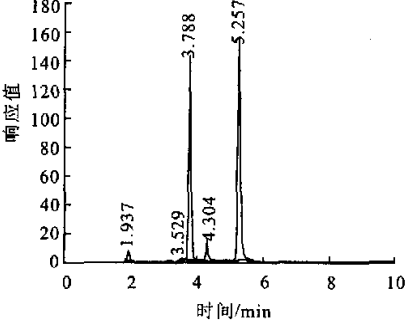


图 2 山西苦荞粉等 4 种黄酮的 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of flavonoids in Shanxi buckwheat seeds

表 5 山西苦荞粉中黄酮的质量分数

Tab.5 Flavonoid contents in Shanxi buckwheat seeds determined by HPLC and colorimetric methods

测定方法	质量分数/%	偏差率/%
$\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 法	0.608	-41.09
AlCl_3 法	0.944	-8.53
HPLC 法(不水解)	1.032	
HPLC 法(水解)	0.879	

2.3 两种比色测定方法的影响因素

2.3.1 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 法 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 法源于芦丁含量测定法,并逐步用于黄酮类化合物的测定。后来发现这并不是黄酮类化合物的专属反应,因为凡具有也只有具有邻苯二羟基的物质,均能用此法进行显色定量^[14]。

据文献报道,荞麦中含有对羟基苯甲酸类、肉桂酸类及原花色素等多酚类物质,作者在四川苦荞中也发现原儿茶酸、原花色素,这些物质都具有邻苯二羟基结构,显色反应后在 $\lambda_{510\text{ nm}}$ 都有很强吸收,显然会对黄酮的测定造成干扰,所以该法的测定结果偏高。另据报道,苦荞中还含有桑色素^[15],而 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 与桑色素反应后,其 $\lambda_{510\text{ nm}}$ 非常小。由此可见该法并非是黄酮类化合物,而只是儿茶酚类物质的专属反应。

另外,苦荞壳、麸皮提取液中可能含有天然色素,这些色素会在碱液显色,从而造成测定结果产生偏差(见表 6)。由表 6 可以看出,以试剂为参比空白,分别导致壳、麸皮、外层粉的测定结果偏高 0.23%,0.67%,0.25%。Price 等也曾发现提取液中的色素会对丹宁测定结果造成误差^[16]。

表 6 天然色素对 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 测定结果的影响
Tab.6 Effect of natural pigment on flavonoid contents determined by $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ method

参 比	$A_{510\text{ nm}}$	$\Delta A_{510\text{ nm}}$	偏差率/%
试剂空白	0.182	0.025	/
壳提取液	0.207	0.064	0.23
麸皮提取液	0.246	0.027	0.67
外层粉提取液	0.209	0	0.25
心粉提取液	0.182	/	/

注: * 相对试剂空白参比,测定结果的偏高值。

2.3.2 AlCl_3 法 其反应原理:黄酮母核上有 3-OH 和/或 5-OH, B 环上有邻位二羟基时(这是黄酮类化合物的典型结构), AlCl_3 可与之生成黄色的黄酮铝配合物^[7], 从而进行显色定量。

AlCl_3 法测定时, 芦丁、桑色素等黄酮类物质反应强烈, 而对酚酸、原花色素的反应很小, 因此该法对黄酮类化合物的专属性较强, 适于苦荞黄酮的测定。表 7 结果表明, 天然色素对 AlCl_3 法的测定结果

影响也较小。

表 7 天然色素对 AlCl_3 测定结果的影响
Tab.7 Effect of natural pigment on flavonoid contents determined by AlCl_3 method

参 比	$A_{510\text{ nm}}$	$\Delta A_{510\text{ nm}}$	偏差率/%
试剂空白	0.703	/	/
壳提取液	0.712	0.009	/
麸皮提取液	0.728	0.025	0.022
外层粉提取液	0.717	0.014	/
心粉提取液	0.710	0.006	/

2.4 AlCl_3 方法评价

该方法稳定性与重现性(精密度)均较好, 测量值与实际值的偏差也较小, 具有较高的准确度。由 14 份空白吸收值算得 $S_{\text{AlCl}_3} = 0.0065$, 进而由回归方程计算出其最小检出限为 $C_{\min} = 0.392\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

研究表明, AlCl_3 法测定苦荞黄酮较为适宜, 尤其是测定含色素、酚类物质较多的部分, 如壳、麸皮、茎秆等。操作方便, 结果准确、可靠。而常用的 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 法的测定结果偏高^[17]。

参考文献:

[1] Naghski J, Krewson C F, Porter W L, *et al*. Factors affecting the rutin contents of dried buckwheat meals[J]. *J Amer Pharm Assoc*, 1950, 29: 696 - 698.

[2] Naghski J, Couch J F, Taylor J W, *et al*. Effects of agronomic factors on the rutin content of buckwheat[J]. *Technical bulletin in USDA*. 1955, 1132 : 1 - 50.

[3] Suzuki T, Sakurada H, Meguro H, *et al*. Soba no rutin ganryo ni tsuite (in Japanese)[J]. *New Food Industry*, 1987, 29: 29 - 32.

[4] Yasuda T, Masaki K, Kashiwagi T. An enzyme degrading rutin in tartary buckwheat seeds (in Japanese with English summary)[J]. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 1992, 39: 994 - 1000.

[5] 徐宝才, 李丹, 丁霄霖. 荞麦黄酮的提取、测定及其抗氧化研究进展[J]. *中草药*, 2001, (增): 189 - 191.

[6] 庄向平, 虞杏英. 银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法[J]. *中草药*, 1992, 23(3): 122 - 124.

[7] 中国科学院上海药物研究所. 黄酮体化合物鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1981.

[8] Hasler A, Stichler O. Identification and determination of the flavonoids from Ginkgo biloba by high - performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography*, 1992, 605: 41 - 48.

[9] 张迪清, 何照范. 银杏叶资源化学研究[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.

[10] 李丹. 苦荞麦加工与利用的研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 2000.

[11] 胡敏, 姜发堂, 张声华. 三种测定银杏叶提取物中总黄酮的方法比较[J]. *食品与发酵工业*, 1997, 23(4): 40 - 43.

[12] Castele K V, Geiger H, Van Sumre C F. Separation of flavonoids by reversed-phase - performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr*, 1982, 240: 81.

[13] Watanabe M. Catechins as antioxidants from buckwheat(*Fagoryrum esculentum* Moench) groats[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 839 - 845.

[14] 胡冠时, 姜淑琴, 杨进. 黄酮化合物的邻位二羟基显色反应的探讨[J]. *药学通报*, 1980, 15(5): 2 - 3.

[15] 王宪楷. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.

[16] Price M L, Butler L G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain[J]. *J Agric Food Chem*, 1977, 24(6): 1268 - 1273.

[17] 贾冬英, 乔玉兰, 谭敏. 用正交法探讨苦荞麦茎及籽壳中总黄酮(芦丁)的乙醇提取工艺[J]. *食品科学*, 1997, 18(6): 22 - 25.

(责任编辑: 朱 明)