

脱油油樟叶化学成分预试及其总黄酮含量测定

杜永华¹, 敖光辉², 魏 琴¹, 李向南³, 廖小龙³

(1. 宜宾学院 西南特色经济植物保护与利用重点实验室, 四川 宜宾 644000; 2. 内江师范学院, 四川 内江 641112; 3. 宜宾学院 生命科学与食品工程学院, 四川 宜宾 644000)

摘要:为进一步合理开发利用油樟资源, 采用系统预试和专项预试相结合的方法分析脱油油樟叶的化学成分, 并采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定其总黄酮含量。结果表明: 脱油油樟叶中含有有机酸、酚、鞣质、黄酮、挥发油或油脂、氨基酸、多肽、蛋白质、还原糖、多糖、甙类、甾体、三萜、内酯、香豆素及其甙类化学成分, 其中总黄酮含量为 $21.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。可见, 脱油油樟叶含有多种类型化学成分, 其总黄酮含量较高。

关键词:油樟叶; 化学成分; 预试验; 总黄酮

中图分类号: S792.23; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2014)10-0120-04

油樟 [*Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao] 属樟科 (Lauraceae) 樟属 (*Cinnamomum*) 植物, 是我国特有树种^[1], 被列为国家Ⅱ级重点保护野生植物。油樟主产于四川省宜宾市, 其叶富含芳香精油, 含油率高达 $3.8\%\sim 4.5\%$, 比香樟 [*C. camphora* (L. inn.) Presl] 叶含油量高 1~2 倍, 已成为香料、医药、日用和化工产品的重要原料来源^[2]。国内外对油樟的研究主要集中在油樟叶芳香油的方面, 油樟叶芳香油具有较强的抗动植物病原微生物^[3-5]和抗癌^[6]等活性, 含有 1,8-桉叶油素、 α -松油醇和松油烯-4-醇等 40 多种成分^[7-8]。近年发现油樟叶提取芳香油后的残渣具有抗微生物^[9-10]和抗炎^[11]等活性。该试验拟采用化学成分系统预试和专项预试相结合的方法对脱油油樟叶化学成分进行预试, 推断其可能存在的化学成分, 为进一步合理开发利用油樟资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为脱油油樟叶(经过水蒸气蒸馏提取芳香油后的残渣), 取自四川省宜宾市某油樟种植基地的炼油场。试验所需试剂均为分析纯, 仪

器有 HH-S 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂)、AR2130 电子天平(赛多利斯)、手提式高速粉碎机(温岭百乐粉碎设备厂)和 TU-1901 双光束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 方法

1.2.1 化学成分系统预试 参考《天然药物化学》^[12]中的方法, 将干燥的脱油油樟叶依次用石油醚(沸程 $30\sim 60^\circ\text{C}$)、氯仿、乙醇索氏回流提取 1 h, 残渣用温水(45°C)浸 2 h, 分别得到脱油油樟叶石油醚提取液、氯仿提取液、乙醇提取液和水提取液。石油醚提取液用于检查生物碱、黄酮、蒽醌类、挥发油或油脂、甾体、三萜、内酯、香豆素及其甙类等成分; 氯仿提取液用于检查生物碱、黄酮、蒽醌类、三萜、内酯、香豆素及其甙类等化合物成分; 乙醇提取液用于检查生物碱、有机酸、酚、鞣质、黄酮、强心甙、蒽醌类、三萜、内酯、香豆素及其甙类等化合物成分; 水提取液用于检查生物碱、有机酸、酚、鞣质、黄酮、蒽醌类、氨基酸、多肽、蛋白质、还原糖、多糖、甙类、皂甙、三萜、内酯、香豆素及其甙类等成分。每类成分采用多项经典化学预试方法, 根据多项颜色反应和沉淀反应等化学反应情况综合判断提取液所含化学成分, 若全部为阳性则推断含有某成分, 若部分为阳性则推断可能含有某成分, 若均为阴性则推断不含有某成分^[13]。

1.2.2 化学成分专项预试 (1) 生物碱类成分专项预试。干燥脱油油樟叶粗粉用 0.5% 盐酸乙醇溶液回流提取 1 h, 真空抽滤, 滤液减压浓缩至糖浆状, 用适量稀盐酸溶解, 过滤, 滤液用石油醚萃取以除去树脂和色素等杂质, 萃取后的酸水层用

收稿日期: 2014-05-24

基金项目: 四川省基础研究资助项目(2011JY0050); 四川省青年科技创新研究团队培育计划资助项目(2011JTD0035); 四川省宜宾市科技局重点科技资助项目(2012ZNY006)

第一作者简介: 杜永华(1978-), 男, 四川省遂宁县人, 硕士, 讲师, 从事天然产物及其生物活性研究。E-mail: yonghuad@163.com。

通讯作者: 敖光辉(1965-), 男, 四川省广元市人, 教授, 从事植物学研究。E-mail: aoghui@hotmail.com。

2%NaOH 将 pH 调至 7,静置,过滤,滤液用 2% NaOH 将 pH 调至 10~11,氯仿萃取,氯仿层浓缩挥干,用适量 0.5% 盐酸溶解。采用碘化铋钾试验、碘-碘化钾试验、硅钨酸试验和苦味酸试验检查生物碱成分。

(2)黄酮类成分专项预试。10 g 干燥脱油油樟叶粗粉用 70%乙醇按料液比 1:20 回流提取 2 h,过滤,滤液用石油醚萃取以除去树脂和色素等杂质,水层用终浓度为 85%乙醇沉淀以除去多糖、蛋白质和鞣质等醇不溶性杂质,过滤,滤液定容至 200 mL。采用盐酸-镁粉试验、三氯化铝试验和氨熏试验检查黄酮成分。

1.2.3 脱油油樟叶总黄酮含量测定 (1)对照品溶液的制备。精密称取芦丁对照品 20 mg,用 70%乙醇溶解并定容至 100 mL,即得 0.20 mg·mL⁻¹ 芦丁对照品液。

(2)样品溶液的制备。按 1.2.2(2)制备样品溶液,用 70%乙醇稀释 10 倍即得生药质量浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的样品溶液。

(3)标准曲线的绘制。分别精密量取芦丁对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 70%乙醇溶液补足至 5.0 mL,分别加入浓度为 5%的亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min 后,加入浓度为 10%的硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min 后,再加入浓度为 4%的 NaOH 4.0 mL,加蒸馏水至 10 mL,摇匀,静置 12 min。以 70%乙醇代替芦丁对照品溶液做空白参比,于波长 510 nm 处测定吸光度。以芦丁对照品溶液质量浓度(C)为横坐标,吸光

度(A)为纵坐标绘制标准曲线,求出回归方程。

(4)精密度试验。精密吸取对照品溶液 5 mL,按 1.2.3(2)显色后测定吸光度值,重复测定 5 次,计算 RSD 值。

(5)重复性试验。分别精密取 5 mL 的样品溶液 5 份,按 1.2.3(2)显色后分别测定吸光度值,计算 RSD 值。

(6)稳定性试验。精密吸取样品溶液 5 mL,分别在室温放置 0、30、60、90、120、150 min 后按 1.2.3(2)测定吸光度值,计算 RSD 值。

(7)加标回收率试验。分别精密吸取 4 mL 已知质量浓度的样品溶液 3 份,各加 1 mL 芦丁对照品溶液,按 1.2.3(2)测定吸光度值,计算平均加标回收率和 RSD 值。

(8)样品溶液总黄酮含量测定。精密吸取 5 mL 样品溶液 3 份,分别按 1.2.3(2)测定吸光度,根据标准曲线回归方程计算样品溶液的平均质量浓度,并换算成干脱油油樟叶中总黄酮的含量。

2 结果与分析

2.1 脱油油樟叶化学成分系统预试结果

由表 1 可知,脱油油樟叶有机酸、酚、鞣质、黄酮、挥发油或油脂、氨基酸、多肽、蛋白质、还原糖、多糖、甙类、甾体、三萜、内酯、香豆素及其甙类检查项均有阳性反应,皂甙检查项部分试验显阳性,生物碱、强心甙和蒽醌类检查项均为阴性。

2.2 脱油油樟叶化学成分专项预试结果

由表 2 可知,脱油油樟叶生物碱专项检查项均为阴性,黄酮类专项检查均为阳性。

表 1 脱油油樟叶化学成分系统预试结果分析
Table 1 Analysis on ystemic preliminary tests resutts of chemical components from de-oiled *C. longepaniculatum* leaves

检测成分 Test constituent	试验方法 Test methods	供试溶液 Test solution							
		水提取液 Water extract		乙醇提取液 Ethanol extract		氯仿提取液 Chloroform extract		石油醚提取液 Petroleum ether extract	
		现象	结果	现象	结果	现象	结果	现象	结果
		Phenomenon	Result	Phenomenon	Result	Phenomenon	Result	Phenomenon	Result
生物碱 Alkaloid	碘化铋钾	无变化	—	无变化	—	无变化	—	无变化	—
	碘-碘化钾	无变化	—	无变化	—	无变化	—	无变化	—
	硅钨酸	无变化	—	无变化	—	无变化	—	无变化	—
有机酸 Organic acid	pH 试纸	酸性	+	酸性	+	0	0	0	0
	溴酚蓝	蓝色斑点	+	蓝色斑点	+	0	0	0	0
	溴甲酚绿	黄色斑点	+	黄色斑点	+	0	0	0	0
酚,鞣质	三氯化铁	蓝绿色	+	蓝绿色	+	0	0	0	0

续表 1

检测成分 Test constituent	试验方法 Test methods	供试溶液 Test solution							
		水提取液 Water extract		乙醇提取液 Ethanol extract		氯仿提取液 Chloroform extract		石油醚提取液 Petroleum ether extract	
		现象 Phenomenon	结果 Result	现象 Phenomenon	结果 Result	现象 Phenomenon	结果 Result	现象 Phenomenon	结果 Result
Phenol, tannin	FeCl ₃ -铁氰化钾	蓝色斑点	+	蓝色斑点	+	0	0	0	0
	香草醛-盐酸	红色斑点	+	红色斑点	+	0	0	0	0
黄酮 Flavone	盐酸-镁粉	红色	+	红色	+	无变化	—	无变化	—
	三氯化铝	黄色	+	黄色	+	黄色	+	无变化	—
	氨熏	浅黄色	+	浅黄色	+	浅黄色	+	无变化	—
强心甙 Cardiotonic glycoside	3,5-二硝基苯甲酸	0	0	无变化	—	0	0	0	0
	碱性苦味酸	0	0	无变化	—	0	0	0	0
	亚硝基铁氰化钠	0	0	无变化	—	0	0	0	0
蒽醌类 Anthraquinone	蒽醌类	无变化	—	无变化	—	无变化	—	无变化	—
	醋酸镁	无变化	—	无变化	—	无变化	—	无变化	—
	硼酸	无变化	—	无变化	—	无变化	—	无变化	—
挥发油或油脂 Essential oil	油斑试验	0	0	0	0	0	0	油斑	+
	磷钼酸	0	0	0	0	0	0	蓝色	+
	香草醛-硫酸	0	0	0	0	0	0	蓝紫红	+
氨基酸, 多肽, 蛋白质 Amino acid, opypeptide, protein	加热沉淀	白色沉淀	+	0	0	0	0	0	0
	双缩脲	蓝紫色	+	0	0	0	0	0	0
还原糖, 多糖, 甙类 Reducing sugar, polysaccharide, glycoside	吡啶酮	斑点多色	+	0	0	0	0	0	0
	菲林试剂	砖红沉淀	+	0	0	0	0	0	0
	α -萘酚	紫红色环	+	0	0	0	0	0	0
皂甙 Saponin	多糖试验	砖红沉淀	+	0	0	0	0	0	0
	泡沫试验	泡沫不久	—	0	0	0	0	0	0
	醋酐-浓硫酸	黄变绿	+	0	0	0	0	0	0
甾体, 三萜 Steroid, triterpene	醋酐-浓硫酸	黄变绿	+	黄变绿	+	黄变绿	+	黄变绿	+
	氯仿-浓硫酸	青、红色	+	青、红色	+	青、红色	+	青、红色	+
内酯、香豆素, 甙类 Lactone, coumarin, glycoside	重氮化试剂	无变化	—	无变化	—	红色	+	无变化	—
	异羟肟酸铁	橙红色	+	无变化	—	橙红色	+	橙红色	+

注: “—”表示反应呈阴性, “+”表示反应呈阳性, “0”表示未检查。

Note: “—”represents negatively reaction, “+”represents positive reaction, “0”represents no examination. The same below.

表 2 脱油油樟叶化学成分专项预试结果分析

Table 2 Analysis on special preliminary tests of chemical components from de-oiled *C. longepaniculatum* leaves

检查专项 Special test	试验方法 Test methods	现象 Phenomenon	结果 Result
生物碱 Alkaloid	碘化铋钾	无变化	—
	碘-碘化钾	无变化	—
	硅钨酸	无变化	—
	苦味酸	无变化	—
	盐酸-镁粉	红色	+
黄酮 Flavone	三氯化铝	黄色	+
	氨熏	浅黄色	+
	铅盐反应	橘红色沉淀	+
	氢氧化钠反应	棕红色	+

2.3 脱油油樟叶总黄酮含量分析

由图 1 可知, 采用比色法测定脱油油樟叶中总黄酮含量, 其芦丁标准曲线回归方程为 $A =$

$13.129C - 0.0266$, 决定系数 $R^2 = 0.9996$, 可见芦丁对照品溶液在 $0.01 \sim 0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内线性良好。油樟叶总黄酮含量测定的方

法验证试验表明,精密度、重复性、稳定性和加标回收率试验的 RSD 值分别为 0.81%、2.12%、1.63% 和 1.23%,平均加标回收率为 93.1%。该方法测得样品溶液的平均质量浓度为 $0.106 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,换算成干脱油油樟叶中总黄酮的含量为 $21.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

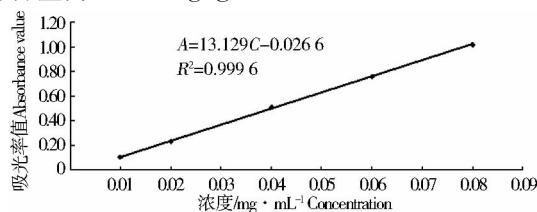


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 The standard curve of rutin

3 结论与讨论

脱油油樟叶为生产中将油樟叶用水蒸汽蒸馏法提取芳香精油后的残渣,化学成分系统预试和专项预试结果表明,其含有有机酸、酚、鞣质、黄酮、挥发油或油脂、氨基酸、多肽、蛋白质、还原糖、多糖、甙类、甾体、三萜、内酯、香豆素及其甙类物质,可能含有皂甙物质。可见,脱油油樟叶中的化学成分类型丰富,与同属植物芳樟叶中所含化学成分类型相似^[14]。芳樟叶中含有生物碱和蒽醌类物质,而该试验中未检出油樟叶中含有生物碱、强心甙和蒽醌类物质,这是否与油樟叶中含量极低或植物的种间差异有关,有待进一步研究。

由试验结果可知,采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定脱油油樟叶中总黄酮含量,在 $0.01\sim 0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性良好,精密度、重复性、稳定性及加标回收率均较好,该方法测定结果可靠,测得总黄酮含量为 $21.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,低于香樟叶中优化工艺提取的总黄酮 $39.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (3.97%) 的含量^[15],可见油樟叶中总黄酮的提取工艺需要进一步优化研究。脱油油

樟叶中检出挥发油或油脂成分,可见生产中用传统的水蒸汽蒸馏法提取芳香精油时,难以将挥发油完全蒸出,为今后生产中挥发油提取工艺的改进提供参考。

油樟叶中含有丰富的化学物质,其中不乏有生物活性研究热点物质,如黄酮、多糖和内酯等,为油樟叶中生物活性物质的提取分离和活性筛选提供依据。

参考文献:

- [1] 吴征镒,孙航,周浙昆,等. 中国植物区系中的特有性及其起源和分化[J]. 云南植物研究,2005,27(6):577-604.
- [2] 罗中杰,李维一,魏琴,等. 宜宾油樟的现状与未来[J]. 四川师范大学学报:自然科学版,2001,24(3):317-319.
- [3] 陶翠,魏琴,殷中琼,等. 油樟叶挥发油对三种真菌的抗菌效果[J]. 中国兽医科学,2011,41(1):93-97.
- [4] 魏琴,周宇科,周黎军,等. 油樟油抑制细菌生长的活性试验[J]. 热带农业科学,2009,29(1):5-7.
- [5] 魏琴,李群,罗扬,等. 油樟油对植物病原真菌活性的抑制作用[J]. 中国油料作物学报,2006,28(1):63-66.
- [6] 叶奎川,殷中琼,魏琴,等. 油樟叶挥发油及其主要成分的抗肝癌活性[J]. 解剖学报,2012,43(3):145-151.
- [7] 李昌阳,陈万生. 挥发油成分的研究Ⅳ. 油樟叶挥发油化学成分的研究[J]. 药物分析杂志,1991,11(6):346-349.
- [8] 陶光复,丁靖垠,孙汉董. 湖北油樟叶精油的化学成分[J]. 武汉植物学研究,2002,20(1):75-77.
- [9] 张超,魏琴,杜永华,等. 脱油油樟叶提取物的体外抑菌活性研究[J]. 广西植物,2011,31(5):690-694.
- [10] 曹玫,陶翠,房俊,等. 油樟叶油枯提取物抗病原真菌活性研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(11):2792-2793.
- [11] 魏琴,殷中琼,杜永华,等. 油樟叶乙醇提取物抗炎活性的研究[J]. 中国兽医科学,2011,41(8):859-864.
- [12] 吴剑峰. 天然药物化学[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [13] 孙玉婉,汪春牛,韩星,等. 琼榄不同部位化学成分预试验及总黄酮含量测定[J]. 中国药房,2013,24(7):618-621.
- [14] 苏远波. 芳樟叶中有效成分的提取及其生物活性研究[D]. 厦门:厦门大学,2006.
- [15] 孙重鲁,黄克瀛,陈丛瑾,等. 香樟叶中黄酮类化合物的提取[J]. 应用化工,2006,35(2):142-143.

Preliminary Chemical Analysis and Total Flavonoids Assaying of De-oiled Leaves from *Cinnamomum longepaniculatum*

DU Yong-hua¹, AO Guang-hui², WEI Qin¹, LI Xiang-nan³, LIAO Xiao-long³

(1. Key Lab of Southwest Special Economic Plant Protection and Utilization, Yibin University, Yibin, Sichuan 644000; 2. Neijiang Normal University, Neijiang, Sichuan 641112; 3. College of Life Science and Food Engineering, Yibin University, Yibin, Sichuan 644000)

Abstract: In order to further legitimately develop and utilize *Cinnamomum longepaniculatum* resources, it was investigated by the methods of system and special pretesting. The contents of total flavonoids in de-oiled leaves were measured by colorimetric method with sodium nitrite-aluminum nitrate-sodium hydroxide. The results showed that de-oiled leaves contained organic acid, phenol, tannin, flavone, volatile oil or grease, amino acid, polypeptide, protein, reducing sugar, polysaccharide, glycoside, steroid, triterpene, lactone, coumarin and its glycoside. The content of total flavonoids of de-oiled leaves was $21.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The de-oiled leaves of *C. longepaniculatum* contained many kinds of chemical constituent and sufficient total flavonoids.

Key words: leaves of *Cinnamomum longepaniculatum*; chemical constituent; preliminary test; total flavonoids