

竹叶黄酮的提取纯化工艺及含量测定方法比较研究*

郭雪峰, 岳永德*

(国际竹藤网络中心 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

摘要:对 6 个纯化竹叶黄酮工艺以及测量竹叶黄酮含量的分光光度法和高效液相色谱法进行了比较研究。结果表明, 工艺 4 聚酰胺柱吸附法为最佳工艺, 纯化后竹叶黄酮浓度达 $0.59 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (分光光度法) 和 $0.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (HPLC)。两种方法测定的竹叶黄酮浓度值差异不大, 结果稳定可靠。分光光度法操作简单方便, 测定结果略微偏高, HPLC 法重复性、稳定性均较好。

关键词:竹叶黄酮; 提取纯化; 分光光度法; 高效液相色谱法

中图分类号: Q946.8; S795.7 文献标识码: A 文章编号: 1672-352X(2007)02-0279-04

Comparative study on extraction-purification technics and content determination method for bamboo-leaf-flavonoids

GUO Xue-feng, YUE Yong-de

(International Centre for Bamboo and Rattan, SFA Key Open Laboratory on Bamboo and Rattan Science and Technology, Beijing 100102)

Abstract: Six technics to purify bamboo-leaf-flavonoids and spectrophotometric method were compared with high-performance liquid chromatography method. The results showed that technics four was the best one, namely polycaprolactam column adsorption method, concentration of purified bamboo-leaf-flavonoids hit $0.59 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (spectrophotometric method) and $0.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (HPLC). Bamboo-leaf-flavonoids concentrations determined by two methods were almost the same, determining result was stable and credible. Spectrophotometric method was simple and convenient.

Key words: bamboo-leaf-flavonoids; extraction-purification; spectrophotometric method; high-performance liquid chromatography method

中国素有“竹子王国”之称, 现有竹类植物 48 个属 500 余种, 竹类植物面积、蓄积量及年产竹材量均占世界 1/3 左右, 拥有极为丰富的竹类资源。竹子茎和叶中含有多种有价值的天然产物, 如黄酮类化合物, 酚类化合物^[1], 蛋白质和糖类^[2], 茶多酚^[3], 外源性抗氧化剂^[4], 氨基酸^[5]等。与普通黄酮相比, 竹叶黄酮具有结构稳定, 不易被降解; 能深入病灶部位, 直接发挥功效; 亲水性强, 有利于开发保健食品和药物等突出优点。淡竹是我国于 1998 年颁布的第三批既是食品又是药品的天然植物之

一^[6]。张英^[7]等研究表明竹叶黄酮还具有优良的抗自由基、抗氧化、抗衰老、降血脂、免疫调节、抗菌等生物学功效, 在人类的营养、健康和疾病防治上有着广阔的应用前景。但是, 我国目前竹产品贸易额仅占世界竹产品总贸易额的 3% 左右, 故如何充分利用我国丰富的竹类资源, 摆脱我国竹产业高产量、低产值状况是当务之急, 那么研究竹叶黄酮的提取纯化工艺和含量测定方法是改善当前状况的一个方面, 也具有非常重要的意义。

* 收稿日期: 2007-01-23

基金项目: 国家林业局 948 项目 (No. 98006)。

作者简介: 郭雪峰 (1972 -), 男, 博士研究生。* 通讯作者 (Corresponding author) E-mail: yueyd@icbr.ac.cn

1 材料与方法

1.1 材料

毛竹叶于 2005 年 7 月采自安徽省芜湖繁昌县磨山乡,采样时,定量摘取竹冠东西南北上中下各个方位的无伤病虫害新老叶,采后迅速洗净、凉干,于 50℃ 左右烘干至恒重(烘 24 h 左右)、粉碎,装入磨口瓶中密封干燥贮存。

1.2 试验仪器

Waters2695 高效液相色谱仪、Waters2487 检测器、Waters2996 检测器, Waters 公司; Ultrospec 3300 pro 分光光度计, 英国 Biochrom 公司; BP301S 电子天平 ($d = 0.1 \text{ mg}$), 德国 Sartorius 公司; MP3002 电子天平, 上海恒平科学仪器有限公司; DELTA 320pH 计, 梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司; DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; EYELA N-1000 旋转蒸发仪, 日本 EYELA 公司; KQ-250B 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 电热恒温水浴锅, 北京市长风仪器仪表公司。

1.3 试剂

标准品有芦丁; 色谱纯试剂有乙腈、甲醇; 分析纯试剂有浓盐酸、氢氧化钠、氯化钠、无水乙醇、石油醚 (60~90)、乙酸乙酯、氢氧化钙、亚硝酸钠、硝酸铝、明胶、聚酰胺 (100~200 目)、AB-8 大孔树脂等。

1.4 试验方法

1.4.1 竹叶黄酮的提取方法 准确称取过 40 目筛后的干燥毛竹叶粉末 30.0 g, 置于具塞三角瓶中, 以 70% (V/V) 乙醇超声提取, 超声波功率为 250 W, 水温 60℃。每次料液比为 1:8 (70% 乙醇 240 mL), 超声提取 25 min, 过滤, 滤渣再用相同的方法提取, 共提取 4 次, 合并 4 次提取液, 减压旋转蒸发回收乙醇, 浓缩液加水定容至 1 000 mL, 每次吸取 100 mL 作分离纯化工艺试验。

1.4.2 竹叶黄酮的纯化工艺 工艺 1 (乙酸乙酯萃取法): 取 100 mL 定容液 石油醚萃取 3 次 水液 乙酸乙酯萃取 3 次 乙酸乙酯液 减压蒸去溶剂 浓缩液 乙醇溶解过滤 乙醇液定容至 100 mL 用于黄酮含量测定。 工艺 2 (明胶沉淀法): 取 100 mL 定容液 石油醚萃取 3 次 水液 明胶溶液 5 mL 30℃ 水浴 1 h 溶液有棕色沉淀生成 减压浓缩得浓缩液 加入 95% 乙醇沉淀多余明胶, 并将乙醇倾出 乙醇液 减压浓缩得浓缩液 加入乙醇至不出现沉淀 乙醇溶液 过滤定容至 100 mL 用于黄酮含量测定。 工艺 3 (饱和石灰水沉淀法): 取 100 mL 水溶液 石油醚萃取 3 次 水液

加入饱和石灰水过滤沉淀 滤液 用盐酸调至中性并浓缩 浓缩液 乙醇溶解 乙醇液 过滤定容至 100 mL 用于黄酮含量测定。 工艺 4 (聚酰胺柱吸附法): 取 100 mL 水溶液 减压浓缩得浓缩液 拌入聚酰胺并上聚酰胺柱 水洗 以 70% 乙醇洗脱至检不出黄酮 洗脱液 减压浓缩定容至 100 mL 用于黄酮含量测定。 工艺 5 (拌聚酰胺法): 取 100 mL 水溶液 石油醚萃取 3 次 水液 减压浓缩得浓缩液 拌入聚酰胺静置 30 min 把吸附了黄酮的聚酰胺以 90% 乙醇洗脱至检不出黄酮 洗脱液 减压浓缩定容至 100 mL 用于黄酮含量测定。 工艺 6 (AB-8 树脂柱吸附法): 取 100 mL 水溶液 上 AB-8 树脂吸附柱 水洗 以 70% 乙醇洗脱至检不出黄酮 洗脱液 减压浓缩定容至 100 mL 用于黄酮含量测定。

1.4.3 分光光度法测竹叶黄酮的含量 标准曲线的绘制: 准确称取干燥后的芦丁标准品 19.7 mg, 溶用 30% 乙醇溶解定容于 100 mL 容量瓶中, 得 $0.197 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准溶液。用移液管分别精密量取芦丁标准液 1、2、4、8、12、16、20 mL 置于 50 mL 容量瓶中, 用 30% 乙醇补充至 25 mL, 加入 2.5 mL NaNO_2 (5%) 溶液摇匀, 放置 6 min 后加入 2.5 mL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (10%) 溶液, 6 min 后再加入 12.5 mL NaOH ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 用 30% 乙醇溶液定容, 显色 10 min 后, 以试剂空白为参比, 在波长 510 nm 处, 进行比色测定, 根据测定结果绘出标准曲线, 得出线性回归方程: $C = 0.0801A$ (A 为吸光值, C 为浓度 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), $R^2 = 0.9998$, 线性范围: $0.00361 \sim 0.07226 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。 样品黄酮含量的测定及计算: 取纯化后的竹叶黄酮定容液 1、2、4 mL 置于 3 个 50 mL 容量瓶中, 用 30% 乙醇补充至 25 mL, 加入 2.5 mL NaNO_2 (5%) 溶液摇匀, 放置 6 min 后加入 2.5 mL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (10%) 溶液, 6 min 后再加入 12.5 mL NaOH ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 用 30% 乙醇溶液定容, 显色 10 min 后, 以试剂空白为参比, 在波长 510 nm 处, 进行比色测定吸光值 A , 由回归方程 $C = 0.0801A$ 计算出黄酮含量, 再计算出平均值即为最终样品黄酮含量。

1.4.4 高效液相色谱法测竹叶黄酮的含量 色谱条件: 高效液相色谱仪: Waters 2695 泵, Waters 2487 检测器; 色谱柱: Symmetry ShieldTM RP₁₈ (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); 流动相: V (乙腈) : V (0.4% 磷酸) = 90 : 10; 检测波长 254 nm; 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温, 室温; 进样量 10 μL 。 标准曲线绘制: 准确称取干燥后的芦丁标准品 6.5 mg, 甲醇 (色谱纯) 定

容至 10 mL 得 $0.65 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液, 分别从母液中取 0.4、0.8、2.0、4.0 mL 放入 4 个 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容。分别取稀释 25.0、12.5、5.0、2.5 倍的定容液及母液各 10 μL , 按上述色谱条件进行 HPLC 分析。以各自的峰面积 (A) 对浓度 (C , $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行回归计算, 得回归方程 $C = 0.0542A - 0.0038$, $R^2 = 0.9997$, 线性范围: $0.02384 \sim 0.51605 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。样品黄酮含量的测定及计算: 把纯化后的竹叶黄酮定容液先过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 取 10 μL 按上述色谱条件进行 HPLC 分析, 根据峰面积 (A), 由回归方程 $C = 0.0542A - 0.0038$ 计算出样品黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 分光光度法测定纯化后竹叶黄酮含量

分光光度法测定的各工艺黄酮含量见表 1。由表 1 可知, 工艺 4 纯化后竹叶黄酮浓度为 $0.59 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 是 6 个工艺中最高的, 工艺 2、工艺 5、工艺 6 纯化后竹叶黄酮浓度也比较高, 分别为 0.48 、 0.52 和 $0.47 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 工艺 1、工艺 3 纯化后竹叶黄酮浓度分别为 0.21 、 $0.29 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 较低。而且, 由纯化后

竹叶黄酮浓度值计算出每克干竹叶样品中黄酮含量具有同样的规律, 工艺 4 为 $19.52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 是 6 个工艺中最高的, 工艺 2、工艺 5、工艺 6 比较高, 分别为 16.05 、 17.24 和 $13.71 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 工艺 1、工艺 3 为 6.95 、 $9.78 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 较低。由表 1 还可以看出各工艺相对标准偏差分别为 1.88% 、 2.71% 、 0.31% 、 0.10% 、 0.30% 和 0.42% , 相对标准偏差较小, 充分显示分光光度法是一种稳定可靠的测黄酮含量方法。

2.2 高效液相色谱法测定纯化后竹叶黄酮含量

高效液相色谱法测定的各工艺黄酮含量见表 2。由表 2 可知, 工艺 4 纯化后竹叶黄酮浓度为 $0.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 是 6 个工艺中最高的, 工艺 2、工艺 3、工艺 5、工艺 6 纯化后竹叶黄酮浓度也比较高, 分别为 0.41 、 0.36 、 0.43 和 $0.44 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 工艺 1 纯化后竹叶黄酮浓度最低, 为 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而且, 由纯化后竹叶黄酮浓度值计算出每克干竹叶样品中黄酮含量具有同样的规律, 工艺 4 为 $20.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 是 6 个工艺中最高的, 工艺 2、工艺 3、工艺 5、工艺 6 比较高, 分别为 13.59 、 12.02 、 14.07 和 $14.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 工艺 1 较低, 为 $3.62 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 1 分光光度法测定不同工艺纯化后竹叶黄酮含量

Table 1 Determination of the flavonoid contents with different purification technics by spectrophotometric method

纯化工艺 Purification technics	纯化后竹叶黄酮浓度 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$				相对标准偏差 / % RSD	干竹叶中黄酮含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Flavonoids content in bamboo dry leaf
	Concentration of purified bamboo-leaf-flavonoids					
	测量值 Determining	平均值 Average				
工艺 1 Technics one	0.19	0.22	0.22	0.21	1.88	6.95
工艺 2 Technics two	0.51	0.46	0.47	0.48	2.71	16.05
工艺 3 Technics three	0.29	0.30	0.30	0.29	0.31	9.78
工艺 4 Technics four	0.59	0.58	0.59	0.59	0.10	19.52
工艺 5 Technics five	0.52	0.52	0.51	0.52	0.30	17.24
工艺 6 Technics six	0.47	0.47	0.47	0.47	0.42	13.71

表 2 高效液相色谱法测定不同工艺纯化后竹叶黄酮含量

Table 2 Determination of the flavonoid contents with different purification technics by high-performance liquid chromatography method

纯化工艺 Purification technics	纯化后竹叶黄酮 浓度 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Concentration of purified bamboo- leaf-flavonoids	干竹叶中黄酮 含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Flavonoids content in bamboo dry leaf
工艺 1 Technics one	0.11	3.62
工艺 2 Technics two	0.41	13.59
工艺 3 Technics three	0.36	12.02
工艺 4 Technics four	0.60	20.08
工艺 5 Technics five	0.43	14.07
工艺 6 Technics six	0.44	14.16

2.3 分光光度法和高效液相色谱法测定不同工艺纯化后竹叶黄酮含量比较

分光光度法与高效液相色谱法测各工艺黄酮含量结果比较见表 3。由表 3 可知, 分光光度法与高效液相色谱法测定工艺 4 纯化后竹叶黄酮浓度分别为 0.59 、 $0.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 是各工艺中最高的, 而相对标准偏差为 0.71% , 是最小的。分光光度法与高效液相色谱法测工艺 1 纯化后竹叶黄酮浓度分别为 0.21 、 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 是各工艺中最底的, 而相对标准偏差为 7.07% , 是最大的; 分光光度法与高效液相色谱法测工艺 2、工艺 3、工艺 5、工艺 6 纯化后竹叶黄酮浓度和相对标准偏差都介于工艺 4 和工艺 1 之间。分光光度法与高效液相色谱法测各工艺纯

化后黄酮浓度总体上保持一致,说明两种方法都是可靠的测定黄酮含量的方法。相对标准偏差略微偏大,是由于在碱性条件下,特别是黄酮类化合物含量

低,其它多元酚含量高时,许多多元酚都可以与 Al^{3+} 发生同样的显色反应,导致分光光度法测定结果偏高,这与文献报道相一致^[8]。

表 3 分光光度法与高效液相色谱法测定不同工艺纯化后竹叶黄酮含量比较

Table 3 Comparison of the flavonoids content with different purification technics by spectrophotometric method and high-performance liquid chromatography method

测量方法 Determination method	纯化后竹叶黄酮浓度 /mg · mL ⁻¹ Concentration of purified bamboo-leaf-flavonoids					
	工艺 1	工艺 2	工艺 3	工艺 4	工艺 5	工艺 6
	Technics one	Technics two	Technics three	Technics four	Technics five	Technics six
分光光度法 Spectrophotometric method	0.21	0.48	0.29	0.59	0.52	0.47
高效液相色谱法 HPLC	0.11	0.41	0.36	0.60	0.43	0.44
平均值 /mg · mL ⁻¹ Average	0.16	0.45	0.33	0.60	0.48	0.46
相对标准偏差 /% RSD	7.07	4.95	4.95	0.71	6.36	2.12

3 结论

工艺 4 是 6 个工艺中纯化竹叶黄酮的最佳工艺,即聚酰胺柱吸附法:取 100 mL 水溶液 减压浓缩得浓缩液 拌入聚酰胺并上聚酰胺柱 水洗 以 70%乙醇洗脱至检不出黄酮 洗脱液 减压浓缩定容至 100 mL 用于黄酮含量测定。纯化后竹叶黄酮含量达 0.59 mg · mL⁻¹ (分光光度法)和 0.60 mg · mL⁻¹ (HPLC)。

分光光度法是测定竹叶黄酮含量是一个可靠的方法,操作简单方便,但测量结果略微偏高。

高效液相色谱法测定竹叶黄酮含量重复性、稳定性均较好,但仪器设备昂贵,操作复杂。高效液相色谱法测定条件为: 高效液相色谱仪: Waters 2695 泵, Waters 2487 检测器; 色谱柱: Symmetry ShieldTM RP₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相: V(乙腈) V(0.4%磷酸) = 90:10; 检测波长 254 nm; 流速 1 mL · min⁻¹; 柱温,室温; 进样量 10 μL。

参考文献:

- [1] 贾之慎,刘志坤,傅一穷. 竹类中黄酮类化合物总量的研究 [J]. 竹子研究汇刊, 1995, 14(2): 39-45.
- [2] 毛燕,王学利. 毛竹等九种竹叶中蛋白质和总糖含量的测定 [J]. 竹子研究汇刊, 1998, 17(2): 18-20.
- [3] 毛燕,王学利,杨彤. 毛竹叶、枝茶多酚提取及含量的测定 [J]. 竹子研究汇刊, 2000, 19(2): 49-51.
- [4] 张英,丁霄霖. 竹叶有效成分和抗活性氧自由基效能的研究 [J]. 竹子研究汇刊, 1996, 15(3): 17-24.
- [5] 汪传槐,陈锐. 竹叶氨基酸及生物转化的研究 [J]. 竹类研究, 1987(3): 16-19.
- [6] 李彬彬. 卫生部公布第三批药食两宜名单 [J]. 江苏调味副食品, 1999(3): 23.
- [7] 张英,吴晓琴,俞卓裕. 竹叶和银杏叶总黄酮含量及其抗自由基活性的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(4): 254-257.
- [8] 魏永生,郑敏燕,王永宁,等. 青海油菜蜂花粉黄酮类化合物含量的研究 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(2): 301-305.