

黄酮类化合物的提取·分离纯化和含量测定方法的研究进展

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 综述了黄酮类化合物提取方法(溶剂法、微波法、酶解法、超临界流体萃取法、双水相萃取法、超声波提取法), 分离纯化方法(柱层析法、薄层层析法、高效液相色谱法、纸层析法、超临界流体分离法、大孔树脂吸附法、液滴逆流层析法、梯度 pH 值萃取法、金属试剂络合沉淀法、膜分离法、活性炭吸附法), 黄酮含量测定方法(分光光度法、高效液相色谱法、毛细管电泳法、超临界流体色谱法、薄层扫描法), 为黄酮类化合物研究工作者提供参考。

关键词 黄酮类化合物; 提取; 分离; 纯化; 测定

中图分类号 Q946 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)26-08083-04

Research Advances in Extraction, Isolation, Purification and Content Determination of Methods Flavonoids

GUO Xue-feng et al (International Centre for Bamboo and Rattan, SFA Key Open Laboratory on Bamboo and Rattan Science and Technology, Beijing 100102)

Abstract Extraction methods for flavonoids (solvent method, microwave method, enzyme decomposition method, supercritical fluid extraction method, aqueous two phase extraction and ultrasonic extraction method) were summarized, as well as isolation-purification method for flavonoids (column chromatography method, thin layer chromatography method, high-performance liquid chromatography method, paper chromatography method, supercritical fluid chromatography method, macroporous resin adsorption method, high-speed counter current chromatography method, pH grads extraction method, complexation precipitate method, film filtration method and active carbon adsorption method) and determination methods for flavonoids content (spectrophotometric method, high-performance liquid chromatography method, capillary electrophoresis method, supercritical fluid chromatography method, thin layer chromatography method). All these provided systemic reference for researchers studied on flavonoids.

Key words Flavonoids; Extraction; Isolation; Purification; Determination

黄酮类化合物是一类在植物界中分布广泛、具有多种生物活性的多酚类化合物^[1-2]。如白果双黄酮和葛根总黄酮等, 对心血管疾病有治疗作用; 木犀草素、羟基茺花素和杜鹃素等能治疗气管炎; 竹叶黄酮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^[3]。自1965年德国科学家首先发现了银杏叶中含有降低胆固醇的有效成分以来, 对银杏叶中黄酮类化学成分、药理药效与应用方面的研究一直是该领域的热点^[4]。有些黄酮类成分已正式投入药物生产, 如槲皮素片、黄芩甙片和银杏叶制剂等。

1 黄酮类化合物提取方法

1.1 溶剂法

1.1.1 水提法。水提法适于黄酮甙类物质提取。该法成本低、对环境及人类无毒害、设备简单, 适合工业化大生产, 但提取率低, 提取物中杂质较多(如无机盐、蛋白质、糖类等), 后续分离麻烦, 现在很少单一使用该法。胡敏等对水提法作了改进, 使所得银杏提取物(GBE)中总黄酮的含量有所提高^[5]。

1.1.2 碱性水或碱性稀醇提取法。黄酮类化合物大多具有酚羟基, 易溶于碱水, 酸化后又可沉淀析出。其原因一是由于黄酮酚羟基的酸性, 二是由于黄酮母核在碱性条件下开环, 形成2-羟基查耳酮, 极性增大而溶解。因此可用碱性水(碳酸钠、氢氧化钠、氢氧化钙水溶液)或碱性稀醇(50%乙醇)浸出, 浸出液经酸化后析出黄酮类化合物。氢氧化钠水溶液的浸出能力高, 但杂质较多, 不利于纯化。当植物材料(如花和果实)含有较多的果胶、黏液质、鞣质及水溶性杂质时, 宜采用石灰水, 使它们与氢氧化钙生成钙盐沉淀滤除,

但浸出效果不如氢氧化钠水溶液好, 同时有些黄酮类化合物能与钙结合成不溶性物质被滤除。一般可以根据不同的原料使用不同碱性溶液。丁利君等用 pH 值为 10 的氢氧化钠溶液从菊花中提取黄酮类物质时, 效果较好^[6]。曹永刚用碱性较强的饱和石灰水从魁米中提取芦丁, 使芦丁成盐溶解, 效果好^[7]。一般应注意酸碱性不宜过强, 以免强碱在加热时破坏黄酮, 也防止在酸化时生成盐, 使析出的黄酮又复分解, 影响收得率。

1.1.3 有机溶剂提取法。根据黄酮类化合物与杂质极性不同来选择适合的有机溶剂, 常用乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、水或某些极性较大的混合溶剂如甲醇-水(1:1)进行提取。一般游离甙元, 难溶或不溶于水, 易溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚、丙酮、石油醚等有机溶剂及稀碱液中, 黄酮甙类易溶于水、甲醇、乙醇等强极性的溶剂中, 故浓度 90%~95%的乙醇适宜提取黄酮甙元, 60%左右的乙醇适宜提取黄酮甙类。许钢等用 70%丙酮提取竹叶黄酮, 提取率达 95.5%^[8]。王兰珍等用 70%乙醇冷浸, 从元宝枫叶粉中提取黄酮类物质, 提取率和黄酮含量都很高, 提取物易于浓缩和干燥^[9]。

1.2 微波法 微波法原理是利用磁控管所产生的 24.5 亿次/s 超高频的快速震动, 使材料内分子间相互碰撞、挤压, 利于有效成分的浸出。此法不仅具有反应高效性和强选择性等特点, 还具有操作简单、副产物少、产率高及产物易提纯等优点。浸出过程中材料细粉不凝聚、不糊化, 克服了热水法易凝聚、糊化的不足。范志刚等用微波法提取雪莲黄酮类物质, 提高了雪莲的利用率^[10]。

1.3 酶解法 酶解法对于一些黄酮类物质被细胞壁包围不易提取的原料比较实用。原理是能够充分破坏以纤维素为主的细胞壁结构及其细胞间相连的果胶, 使植物中的果胶完全分解成小分子物质, 减小提取的传质阻力, 使植物中

基金项目 国家林业局“948”项目资助(98006); 国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD24B0802)。

作者简介 郭雪峰(1972-), 男, 河南新乡人, 博士, 讲师, 从事竹藤化学方面的研究。* 通讯作者, 博士生导师, 教授。

收稿日期 2007-05-15

的黄酮类物质能够充分地释放出来。王晓等^[11]用复合酶提取山楂叶中黄酮类物质,提取率比常用的方法提高了2%~3%。邢秀芳等将纤维素酶用于葛根总黄酮的提取,比较加酶和不加酶提取葛根总黄酮的得率,结果表明,用纤维素酶提取葛根总黄酮的得率提高了13%,效果很好^[12]。

1.4 超临界流体萃取法 超临界流体萃取(SFE)主要指超临界CO₂萃取,该法提取率高,无残留溶剂污染,活性成分和热不稳定成分不易被分解破坏而保持天然特征,可选择性提取和分离纯化,溶剂和溶质分离方便^[13]。但该法生产成本高,提取物中烷基酚含量较高,超临界CO₂是非极性溶剂,对非极性和分子量很低的极性物质表现出很好的溶解性,但对极性较强的物质溶解能力不足。虽然增大密度能使其溶解能力提高,但增大密度需提高萃取压力,这将使萃取设备的费用显著增加,不适于大规模生产^[14]。因此在实际操作中,常常在超临界CO₂中加入另一种物质以改变其极性,如从甘草中提取黄酮类化合物,用CO₂-水-乙醇溶剂体系可萃取出极性较小的甘草查耳酮,以及极性较大的甘草素和异甘草素。加入的物质被称作夹带剂,也称作提携剂。常用的夹带剂有甲醇、水、乙醇、丙酮、三氯甲烷、乙酸乙酯等^[15]。骆祥峰用此法提取银杏黄酮获得成功,得黄绿色精提物,黄酮类化合物含量在35%以上^[16]。

1.5 双水相萃取分离法 双水相萃取技术(ATPE)分离原理是物质在双水相体系中的选择性分配。该法设备投资少,操作简单,无有机溶剂残留污染。由于天然植物中所含的化合物众多,而双水相萃取技术具有较高的选择性和专一性,因此利用这些技术有希望为从天然植物中提取有效药用成分开辟一条新的思路^[16]。

1.6 超声波提取法 超声波提取是利用超声波空化作用加速植物有效成分浸出的提取。该法具有设备简单、操作方便、提取时间短、产率高、无需加热,有利于保护热不稳定成分、省时、节能、提取率高等优点^[17]。许刚等通过超声提取正交试验确定对超声提取结果影响大小的因素依次为:浸提剂>浸提剂浓度>超声时间>液固比;得出用20倍原料重的70%丙酮在57℃水介质条件下超声浸提30min,黄酮类物质提取率最高;还得出超声竹叶提取物对自由基的除去作用比水浴法好^[18]。郭孝武等从黄芩中提取黄芩甙,用超声波提取10min比煎煮法提取3h的提取率还高^[19]。

2 黄酮类化合物分离纯化方法

2.1 柱层析法

2.1.1 聚酰胺柱层析法。聚酰胺柱层析法分离效果好,样品容量大,适于在制备分离工艺中应用。但洗脱速度慢,死吸附较大(损失有时高达30%),常有低分子量酰胺的低聚物杂质混入,装柱时用5%甲醇或10%盐酸预洗除去低聚物。李文魁等以甲醇-氯仿为洗脱剂,用聚酰胺层析柱对各种黄酮甙类进行分离,效果好^[19]。高木修造等利用硅胶层析柱(氯仿-甲醇作洗脱剂)和聚酰胺层析柱(水-甲醇作洗脱剂)配合分离,从黄芩中分离出11种黄酮类化合物;利用聚酰胺层析柱,水和乙醇梯度洗脱,从金钱草中分离到5种黄酮类化合物。

2.1.2 硅胶柱层析法。由于黄酮类化合物与硅胶有很强的吸附能力,难洗脱,而且与硅胶中很多金属离子络合而不能被洗脱,所以应预先用浓盐酸处理硅胶除去金属离子,以免

干扰分离效果。硅胶主要用于分离极性较低的黄酮类化合物如异黄酮、黄酮类、二氢黄酮(醇)和高度甲基化或乙酰化的黄酮和黄酮醇,如用乙醚-氯仿溶剂系统从野靛中分离异黄酮类^[20]。硅胶在降活后也可用于极性较大的黄酮类化合物,如甙类、多羟基黄酮类化合物。如穿心莲根丙酮提取物用苯-己烷(3:1)洗脱得到芹菜素,7,4-二甲醚,用苯洗脱得到5-OH-7,8,2-四甲氧基黄酮醇^[21]。

2.1.3 葡聚糖凝胶柱层析法。葡聚糖凝胶主要有Sephadex LH-20型和Sephadex-G型)是一种淋洗速度快,可以反复使用,没有损失的非常好的分离和纯化黄酮类化合物的填充材料。其中Sephadex-LH20的洗出液中不含杂质,适用于从纸色谱分析、硅胶及聚酰胺柱色谱中分离出来的黄酮类化合物糖甙配基及糖甙的最终纯化。葡聚糖凝胶在分离游离黄酮时,主要靠吸附作用,吸附程度取决于游离酚羟基的数目,游离酚羟基的数目越多越难以洗脱;在分离黄酮甙时,则分子筛的属性起主导作用,相对分子质量的大小或含糖的多少决定化合物被洗脱的先后,分子量越大,连的糖越多,越易洗脱。如用甲醇作洗脱剂,从SephadexLH-20柱洗出下列物质先后顺序为:刺槐甙、山萘酚-3-半鼠李糖-7-鼠李糖甙)、芦丁(双糖)、槲皮甙(单糖)、芹菜素(5,7,4-三羟基黄酮)、山萘酚(3,5,7,4-四羟基黄酮)、槲皮素(3,5,7,3,4-五羟基黄酮)^[22]。李教社等用葡聚糖凝胶柱层析从密蒙花中分离得到了8个黄酮类化合物^[23]。

2.2 薄层层析法(TLC) 薄层层析法有离心薄层层析和制备性薄层层析,前者具有分离速度快、处理量大等优点,可以替代制备型薄层层析,有时甚至能替代柱层析;后者适宜量小的纯化处理,李教社等用制备性TLC从密蒙花中分离得到3个黄酮类化合物^[23]。

2.3 高效液相色谱法(HPLC) HPLC正相系统的固定相有硅胶柱和氨基柱,反相系统的固定相有C₁₈柱、C₈柱、苯基柱、氨基柱及C₂柱等。流动相一般用甲醇-水或乙腈-水系统,并加入少量的酸(乙酸、磷酸、甲酸及磷酸二氢钾)来改善分离效果,防止拖尾。虽然HPLC较纸色谱、柱色谱、薄层层析的分离效果更理想,但考虑到其分离成本较高,更多的是用于黄酮类化合物的定性检测、定量分析或少量样品的制备等^[24]。

2.4 纸层析法 适于分离各种类型黄酮类化合物及其甙类的复杂混合物。优点是容易得到满意的层析分离,既便于分离量小的也便于分离相对量大的黄酮类化合物,所需设备和材料的费用少。郭新华等应用表面活性剂胶束水溶液纸色谱分离测定了5种黄酮及黄酮甙类化合物的R_f值^[25]。

2.5 超临界流体萃取分离法 超临界流体萃取分离是利用超临界流体对中草药有效成分进行提取分离的新技术。邓启焕对银杏叶的有效成分进行提取分离工艺的研究表明:利用混合超临界流体萃取得率高、操作时间短、黄酮含量高^[26]。刘志敏等利用该法对6种黄酮及黄酮类化合物作了研究,发现色谱条件也是影响色谱分离的重要因素,流动相组成是影响色谱条件的主要因素^[27]。

2.6 大孔树脂吸附法 大孔吸附树脂具有吸附快、吸附容量大、吸附选择性好、解吸条件温和、洗脱率高、物化稳定性高、不受无机物存在的影响、再生简单、使用周期长、易于构成闭路循环、节省费用等优点,适宜工业化生产。大孔吸附

树脂为吸附和筛选相结合的分选材料,在确定分离条件时,首先根据被分离化合物分子体积的大小选用适当的树脂孔径,其次要根据分子中是否含有酚羟基、羧基或碱性氮原子来确定树脂的型号和分离条件。常用的洗脱剂有水、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等。对非极性大孔树脂,洗脱剂极性越小,洗脱能力越强;对极性大孔树脂和极性较大的化合物,则用极性强的溶剂能更好地分离。据报道,弱极性 AB-8 大孔树脂对葛根黄酮、银杏叶黄酮进行吸附分离,提取物中黄酮含量提高近 1 倍。吉云秀等用 D101 型树脂成功地纯化了银杏叶中的黄酮类化合物,效果良好^[29]。

2.7 液滴逆流层析法 液滴逆流层析是利用化合物在两相溶剂中的不同溶解度而实现分离,具有分离效果好、上样量大(0.5-2.0 g)、分离速度快、样品零损失、分离自动化等优点。适用于分离黄酮(醇)的溶剂系统为氯仿-甲醇-水、正丁醇-醋酸-水、氯仿-正丁醇-甲醇-水,后者不仅适用于甙元也适用于甙的分离;适用于分离异黄酮的溶剂系统有氯仿-甲醇-水;分离双苯吡酮的溶剂系统有氯仿-甲醇-水。

2.8 梯度 pH 值萃取法 黄酮类化合物中有酚羟基的取代而显酸性,并且由于羟基的数目和位置不同,酸性强弱也不同,利用这一特性,将植物提取的总黄酮溶于有机溶剂中,依次按弱碱至强碱,从稀碱至浓碱的水溶液的顺序进行萃取,就可以将黄酮按较强酸性至较弱酸性的顺序分别萃取出来。如将混合物溶于有机溶剂乙醚后,依次用 5%NaHCO₃、5%Na₂CO₃、0.2%NaOH、5%NaOH 水溶液萃取,可依次萃取出 7,4-二羟基黄酮、7-羟基黄酮或 4-羟基黄酮、一般酚羟基黄酮、5-羟基黄酮。

2.9 金属试剂络合沉淀法 金属试剂络合沉淀法是利用铝盐、铅盐、镁盐能与具有邻二酚羟基结构的黄酮类化合物形成配合物沉淀,可以把它们与其他化合物分开,加酸解离还原。如铅盐沉淀法即将植物原料的乙醇提取液蒸干,浓缩物用水溶解,加醋酸铅饱和水溶液沉淀黄酮类物质,滤集沉淀,洗净后,悬浮于乙醇中,通硫化氢脱铅,过滤,浓缩乙醇液即可。现很少用硫化氢脱铅,而用硫酸盐、磷酸盐或阳离子交换树脂脱铅。

2.10 膜分离法 主要有超滤、微滤、纳滤和反渗透等,是在常温下操作,低能耗,在原生物体系环境下实现物质分离,无相变,能高效浓缩富集产物,有效去除杂质。超滤法(UF)是膜分离法的代表,通过控制超滤膜孔径大小,能有效除去提取液中大分子物质,故选用适宜孔径的超滤膜是提高产品收率和质量的关键。王世岭用超滤法分离黄芩甙,效果较好^[29]。

2.11 活性炭吸附法 活性炭吸附法适用于纯化黄酮甙,尤其是初步纯化水或甲醇水液提取的植物粗提物中的黄酮甙非常有效。方法是先将植物原料用水煎煮(也可直接用甲醇提取),水煎液浓缩至稠浆状,加入甲醇溶解,过滤,于滤液中分次加入活性炭,检查直至溶液无黄酮反应为止。过滤,将吸有黄酮的活性炭依次用沸甲醇、沸水及 7%苯酚水液(即室温下饱和水溶液)洗脱,即得总黄酮。

3 黄酮类化合物含量测定方法

3.1 分光光度法 分光光度法是利用黄酮类化合物结构上的酚羟基及其还原性羰基能够与金属盐试剂形成有色络合物原理进行测定。该法设备价廉,操作简便,但样品未经

分离纯化,受花色素、酚酸及其他酚性成分的干扰,误差较大,结果高于实际含量^[30]。冯涛等验证了利用分光光度法测定竹叶中总黄酮含量的可靠性^[31]。张正康利用分光光度法测定刺五加片中总黄酮含量,可为控制刺五加片质量提供检测依据^[32]。

3.2 高效液相色谱法(HPLC) 自 20 世纪 70 年代以来,应用 HPLC 已成功分离了大量的黄酮类化合物,在分析中,以 C₁₈ 柱与 C₈ 柱最为常用,柱内填充粒径以 10、5 μm 用的最多。由于黄酮类化合物常带有酚羟基,在水中会部分解离,而未解离的羟基与固定相作用较强,从而导致拖尾,所以黄酮类的反相高效液相色谱(RP-HPLC)中需要加入酸调节 pH 值以抑制解离克服拖尾现象,这与离子抑制色谱技术的原理是一致的^[33]。自 HPLC 应用于黄酮类的分析以来,RP-HPLC 一直扮演着中心角色,流动相以甲醇-水、乙腈-水体系应用最为广泛。张廷之等用 RP-HPLC 法测定了毛竹叶中总黄酮的含量,并与分光光度法作了比较,结果表明:两者测定结果较接近,但 HPLC 法相对干扰少,重现性好,测定结果更为精确可靠,比色法稳定性稍差^[34]。

3.3 毛细管电泳法 毛细管电泳法具有速度快,选择性强,分离效率高,经济及样品前处理简单,产、进样体积小,溶剂消耗少和抗污染能力强等优点。毛细管电泳因其电泳迁移技术的差异可分为区带电泳、等速电泳、等电点电泳、凝胶电泳和电动色谱柱电泳 5 种类型。最普通的分离方式是在溶液中使用单一的缓冲溶液,称之为毛细管区域电泳(CZE)。在黄酮类化合物的分离中,主要采用的方法是 CZE。吴同在大豆异黄酮提取液分离分析工作中建立了毛细管电泳技术的定量方法^[35]。Vanttinen 等采用毛细管电泳法对处理过的豆粉和豆腐中大豆黄素及金雀异黄素进行了测定^[36]。

3.4 超临界流体色谱法 近年来,超临界流体色谱法在国际上发展很快,但在我国还处于探索阶段。刘志敏等利用超临界流体色谱法测定银杏叶中的总黄酮类,以苯基为固定相,二氧化碳-乙醇-磷酸(V/V, 90 9.98 0.02)为流动相,3 个黄酮甙元获得良好的分离,然后计算了总黄酮的含量,这种方法定量结果准确,重现性好^[37]。

3.5 薄层扫描法 薄层扫描法是样品经薄层层析分离后,直接在薄层扫描仪上,在选定 R_f 和 S_f 范围内扫描(或单波长法),得薄层斑点的面积积分值,由回归方程计算含量。该法不受其他成分干扰,方法简便、准确。章崇仪等用聚酰胺薄膜为固定相,以乙醇-36%醋酸为展开剂层析后,双波长反射法锯齿扫描测定了黄芩中黄芩甙的含量^[38]。

3.6 其他方法 极谱法灵敏、方便、快速。徐礼葵等以硫酸铵为底液,用导数脉冲极谱法测定了三白草中总黄酮含量^[39]。库伦滴定法是利用黄酮类化合物的分子结构中带有羟基的性质,可与溴发生取代反应。徐礼葵等用库伦滴定法测定了三白草中总黄酮和金丝桃甙的含量,与比色法结果基本一致,但库伦滴定法操作方便、快速^[40]。络合滴定法是利用黄酮类与某些金属离子具有很强的络合作用形成一定的组成沉淀,经过滤洗涤后溶于适当溶剂中,再以 EDTA 滴定沉淀中的金属离子。

参考文献

- [1] MIDDLETON J R. Biological properties of plant flavonoid: an overview [J]. *Int J Pharmacognos*, 1996(34): 344-348.

- [2] HAVESTEEN B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1983, 32(7): 1141-1148.
- [3] 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.
- [4] 骆祥峰. 银杏黄酮类生物活性物质提取工艺研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2000.
- [5] 胡敏, 张艳红, 胡艳. 银杏黄酮甙的水浸提方法研究[J]. *食品与发酵工业*, 1998, 24(4): 31-34.
- [6] 丁利君, 吴振辉, 蔡创海, 等. 菊花中黄酮类物质提取方法的研究[J]. *食品工业科技*, 2002, 23(2): 20-22.
- [7] 曹永刚. 芦丁提取工艺的研究[J]. *中国医药工业杂志*, 1993, 24(2): 51-53.
- [8] 许钢, 张虹, 胡剑. 竹叶黄酮的提取方法[J]. *分析化学*, 2000, 28(7): 857-859.
- [9] 王兰珍, 马希汉, 王婧清, 等. 元宝枫叶总黄酮提取方法研究[J]. *西北林学院学报*, 1997, 12(4): 64-67.
- [10] 范志刚, 麦军利, 杨莉斌, 等. 微波技术对雪莲中黄酮浸出量影响的研究[J]. *中国民族医药杂志*, 2000, 6(1): 43-44.
- [11] 王晓, 李林波, 马小来, 等. 酶法提取山楂叶中总黄酮的研究[J]. *食品工业科技*, 2002, 23(3): 37-39.
- [12] 邢秀芳, 于宏芬. 纤维素酶在葛根总黄酮提取中的应用[J]. *中草药*, 2001, 32(1): 37.
- [13] 成诗明, 张树海, 张景林. 超临界流体技术应用研究[J]. *安徽化工*, 2003(1): 30-33.
- [14] 朱廷凤, 廖传华. 螺旋藻中-胡萝卜素超临界 CO₂ 萃取实验研究[J]. *粮油加工与食品机械*, 2003(4): 66-68.
- [15] 廖劲松, 郭勇. 超临界流体萃取的应用技术研究[J]. *食品科技*, 2002(12): 12-14.
- [16] 李伟, 朱自强, 梅乐和. 双水相技术在药物分离和提取中的应用[J]. *化工进展*, 1998, 14(5): 87-89.
- [17] 王昌利, 朱周才. 超声提高芦丁得率的实验研究[J]. *中成药*, 1993, 15(2): 7.
- [18] 郭孝武, 张福成. 超声提取对黄芩成分提出率的影响[J]. *中国中药杂志*, 1994, 19(6): 348.
- [19] 李文魁, 潘景岐, 吕木坚, 等. 朝藿素 D 的分离和结构[J]. *药学报*, 1996, 31(1): 29-32.
- [20] LEBRETON P. Flavonoids of *Batisia australis* [J]. *Phytochemistry*, 1967(6): 1675.
- [21] GOVINDACHARI T R. Chemical investigation of *andrographis paniculata* [J]. *Indian J Chem*, 1969(7): 306.
- [22] JOHNSON K M. Separation of flavonoid compounds on Sephadex LH-20 [J]. *J Chromt*, 1968, 33: 539.
- [23] 李教社, 赵玉英, 王彬, 等. 密蒙花黄酮类化合物的分离和鉴定[J]. *药学报*, 1996, 31(11): 849-854.
- [24] 郑玉果, 姚新生. 高效液相色谱在黄酮类化合物分析中的应用[J]. *中草药*, 1994, 25(10): 542-545.
- [25] 郭新华, 杜林. 黄酮类药物的胶束纸色谱分离研究[J]. *兰州医学院学报*, 1996, 22(3): 3.
- [26] 邓启焕. 第二类超临界流体萃取银杏叶有效成分的实验研究[J]. *中草药*, 1999, 30(6): 419.
- [27] 刘志敏, 赵锁奇, 王仁安, 等. 黄酮类化合物的超临界流体色谱分离[J]. *分析化学*, 1997, 25(3): 272-275.
- [28] 吉文秀, 葛文光. D101 型吸附树脂纯化银杏叶中黄酮类化合物的研究[J]. *辽宁师范大学学报*, 2000, 23(2): 175-177.
- [29] 王世岭. 超滤法一次提取黄芩甙的工艺研究[J]. *中成药*, 1994, 16(3): 2-3.
- [30] 林维宣, 孙学谦, 佟绍芳. 紫外分光光度法测定山楂中总黄酮的研究[J]. *大连轻工业学院学报*, 1993, 12(2): 42-50.
- [31] 冯涛, 曹东旭, 吕晓玲. 竹叶总黄酮含量的测定[J]. *中国食品添加剂*, 2002(6): 85-87.
- [32] 张正康. 分光光度法测定刺五加片中总黄酮含量[J]. *时珍国医国药*, 2001, 12(1): 41-42.
- [33] 马养民, 毋宇佳, 于孟洁. 离子抑制反相高效液相色谱法测定槐米中芦丁含量的研究[J]. *分析化学*, 1993, 21(3): 368.
- [34] 张廷之, 侯镜德, 徐秀珠. 反相高效液相色谱法测定毛竹叶中总黄酮[J]. *理化检验: 化学分册*, 2001, 37(3): 117-118.
- [35] 吴同. 毛细管电泳分离 4 种大豆异黄酮类化合物[J]. *宜宾学院学报*, 2003(3): 82-84.
- [36] VANTTINEN K, MORAVCOVA J. Phytoestrogen in soy foods: determination of daidzein and genistein by capillary electrophoresis [J]. *J Food Sci*, 1999, 17(2): 61-67.
- [37] 刘志敏, 赵锁奇, 王仁安, 等. 超临界流体色谱法测定银杏叶提取物中的黄酮类化合物[J]. *分析化学研究简报*, 1999, 27(2): 214-216.
- [38] 章崇仪, 郭济贤, 邹东明. 聚酰胺薄膜-薄层扫描法快速测定黄芩中黄芩甙[J]. *中成药*, 1993, 15(6): 43.
- [39] 徐礼燊, 张秀琴, 刘爱茹. 三白草中黄酮的微分脉冲极谱测定[J]. *药物分析杂志*, 1988, 8(4): 223.
- [40] 徐礼燊, 徐叶周. 三白草中总黄酮及金丝桃素的库伦滴定[J]. *药学报*, 1986, 21(3): 306.

(上接第 8082 页)

响较大。

2.2.6 培养温度试验。将摇床温度分别设定为 20、25、30、35、40 进行发酵试验, 结果见图 7。从图 7 可以看出, 枯草芽孢杆菌 DPG-01 最适发酵温度在 35~40, 工艺中定为 (37 ±1)。

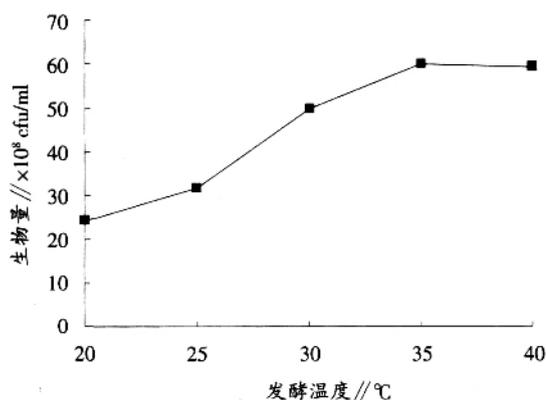


图 7 温度对 DPG-01 发酵的影响

2.3 正交试验结果 正交试验结果见表 1。从表 1 可以看出: 最优方案为 A₂B₂C₁D₂, 即摇瓶培养基配方为: 豆饼粉 2.0%,

尿素 0.1%, 玉米浆 0.15%, 玉米淀粉 1.00%, 磷酸氢二钾 0.3%, 磷酸二氢钾 0.15%, 硫酸镁 0.1%, 硫酸锰 0.02%。以该培养基进行摇瓶试验, 发酵水平最高达到 9.1 ×10⁹ cfu/ml, 芽孢形成率达到 90% 以上。

3 结论与讨论

发酵液可以达到的有效活菌总数对于微生态产品生产意义重大, 不但直接影响生产成本, 而且对产品质量及实际使用效果起着至关重要的作用。在该试验优化条件下, 枯草芽孢杆菌 DPG-01 发酵水平达到 9.1 ×10⁹ cfu/ml, 芽孢形成率达到 90%。发酵液采用超滤工艺浓缩, 然后加入淀粉作为载体, 干燥后浓缩菌剂有效活菌总数达到 200 ×10¹⁰ cfu/g 以上, 成品室温保存 18 个月, 活菌保存率为 82%。

参考文献

- [1] 葛葛健. 工业微生物实验技术[M]. 北京: 轻工业出版社, 1994: 94-163.
- [2] 郭兴华. 益生菌基础与应用[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2002: 256-276.
- [3] 曹友声. 现代工业微生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998: 60-135.
- [4] 陈坚. 发酵工程实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 113-239.
- [5] 夏伯忠. 正交试验法[M]. 长春: 吉林人民出版社, 1985: 1-31.