

老鸦瓣黄酮的制备及其稳定性研究

汪道兵^a, 高青海^a, 孙玉军^{*b}

(安徽科技学院 a. 农学院; b. 生命与健康科学学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要:以老鸦瓣叶片为材料,65%乙醇为提取剂,D-110大孔树脂纯化制备老鸦瓣黄酮,比色法测定其黄酮含量,红外光谱扫描观察其基团特征,并考察温度、pH、氧化剂、还原剂、光照等对其稳定性的影响。结果表明,制备得到的老鸦瓣黄酮为槲皮素、芦丁等黄酮类化合物,具有良好的醇溶性和水溶性等特点。老鸦瓣黄酮在低于85℃、自然光或避光以及偏酸性环境下较为稳定,氧化剂H₂O₂对其稳定性影响也不显著($P > 0.05$),但还原剂Na₂SO₃对其稳定性影响显著($P < 0.05$)。因此,在试验范围内,除还原剂Na₂SO₃存在之外,老鸦瓣黄酮的性质较为稳定,且具有醇溶性和水溶性特点,适合开发与利用。

关键词:老鸦瓣;黄酮;制备;表征;稳定性

中图分类号:R284.1

文献标志码:A

文章编号:1673-0143(2019)06-0549-06

DOI:10.16389/j.cnki.cn42-1737/n.2019.06.010

Preparation and Stability Characterization of Flavonoids from *Tulipa edulis*

WANG Daobing^a, GAO Qinghai^a, SUN Yujun^{*b}

(a. College of Agriculture; b. College of Life and Health Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China)

Abstract: Flavonoids from leaves of *Tulipa edulis* were prepared with D-110 macroporous resin purification and 65% ethanol as extractant. The contents of flavonoids were determined by colorimetry. Their group characteristics were observed by infrared spectroscopy. The effects of temperature, pH, oxidant, reductant, illumination on their stability were investigated. The results showed that flavonoids from *Tulipa edulis* contained quercetin, rutin and other flavonoids, which had good alcohol solubility and water solubility. Flavonoids from *Tulipa edulis* were stable under the conditions of less than 85 °C, natural light or shelter from light and acidic environment. The effect of oxidant H₂O₂ on their stability was not significant ($P > 0.05$). However, reductant Na₂SO₃ had a significant effect on their stability ($P < 0.05$). Therefore, in the test range, except for reducing agent Na₂SO₃, the flavonoids from *Tulipa edulis* were stable. They have good alcohol solubility and water solubility, which are suitable for development and utilization.

Key words: *Tulipa edulis*; flavonoids; preparation; characterization; stability

0 引言

老鸦瓣(*Tulipa edulis*)为百合科郁金香属草本植物,别名迎春草^[1-2]。老鸦瓣的鳞茎为中药材光慈

收稿日期:2019-06-11

基金项目:现代生物制造安徽省重点实验室开放课题(MB2017003);安徽科技学院稳定人才项目(XJWD201801)

作者简介:汪道兵(1993—),男,硕士,研究方向:农业资源开发与利用。

*通讯作者:孙玉军(1975—),男,教授,博士,研究方向:天然产物的开发与利用。E-mail:sunyujun208@163.com

菇,具有清热解毒、消肿、抑菌、抗肿瘤等功效^[3-4],多用于治疗痢疾、痛风、咽喉肿痛、蛇虫狂犬伤等^[5]。自20世纪90年代以来,国内外学者对光慈菇进行了相关研究,分离得到糖类、生物碱、萜类、黄酮类和苷类等50多种化合物,这些化合物表现出多种药理活性,包括抗肿瘤、抗菌、降压、抗氧化等功能^[6]。在民间,夏季将老鸦瓣叶片与面条一起蒸煮以防面条变馊变味。

黄酮类化合物在中药材中分布广泛,是药用植物的有效成分之一。研究发现老鸦瓣叶片黄酮具有较强的抗氧化性^[7]和抑菌活性,但关于其性质未见报道。据此,本试验以老鸦瓣叶片为材料,通过提取、分离纯化制备老鸦瓣黄酮,研究其稳定性,为老鸦瓣资源的开发及其黄酮的利用提供参考。

1 材料、仪器与试剂

老鸦瓣(安徽省蒙城县南望槐种植专业合作社馈赠,由安徽科技学院中药学教授刘汉珍鉴定为老鸦瓣。将老鸦瓣叶片烘干,粉碎,过100目筛,备用。

AR2140型电子天平(梅特勒-托利多有限公司),U-T6PC型紫外可见分光光度计(上海屹谱仪器制造有限公司),YRE-5299型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司),BSZ-100型自动部分收集器(上海嘉鹏科技有限公司),pH-3C型酸度计(上海佑科仪器仪表有限公司),PE-1730型红外光谱仪(美国PEAKIN-ELMER公司)。

槲皮素标准品(国药集团化学试剂有限公司,批号LOT.NO.F20051117),D-101型大孔树脂(安徽三星树脂科技有限公司),蔗糖、柠檬酸、维生素C(AR,国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 老鸦瓣黄酮的制备

2.1.1 制备流程 取老鸦瓣叶片过筛粉末→加入乙醇→恒温水浴浸提→离心→上清液旋转蒸发→D-110大孔树脂柱层析→收集洗脱液→旋转蒸发→冷冻干燥→老鸦瓣黄酮。

2.1.2 老鸦瓣黄酮的提取 称取一定量的老鸦瓣过筛粉末,按汪道兵等^[7]的方法优化得到的工艺(65%乙醇、料液比1:20($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、温度65℃、浸提时间80min)进行提取,提取液4500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15min,沉淀再浸提一次,合并上清液,旋转蒸发浓缩,得老鸦瓣黄酮浓缩液。

2.1.3 老鸦瓣黄酮的分离纯化^[8] 将经无水乙醇预处理的D-101大孔树脂装柱(2.6×50cm),65%乙醇平衡3倍柱床体积后,老鸦瓣黄酮浓缩液上样,65%乙醇洗脱,自动部分收集器收集,NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH显色法^[9]逐管检测,收集含黄酮部分,合并洗脱液,旋转蒸发浓缩,冷冻干燥得淡黄色固体干粉。经溶解性能测定,发现老鸦瓣黄酮易溶于不同浓度的乙醇、易溶于水,这与大多数黄酮难溶于水的性质不同。因此,老鸦瓣黄酮具有良好的醇溶性和水溶性的特点,应用范围将会更加广泛。

2.2 老鸦瓣黄酮的鉴定

2.2.1 盐酸镁粉反应^[10] 取适量的冻干粉于试管中,加入65%乙醇溶解,再加入少许Mg粉摇振后滴加几滴浓盐酸,摇振后有紫红色泡沫出现,根据特征颜色反应,表明制备的物质含有黄酮类化合物。

2.2.2 紫外可见光谱扫描^[11] 槲皮素和老鸦瓣黄酮分别采用65%乙醇溶解,按文献^[9]的方法加入试剂反应后,于200~600nm波长范围内扫描,见图1。结果发现,老鸦瓣黄酮(B)和槲皮素(A)的图谱十分相似,均在372nm附近有吸收峰,这与文献^[12]报道相似,因此将372nm作为老鸦瓣黄酮含量的测定波长。但老鸦瓣黄酮的紫外光谱与槲皮素不完全相同,这表明老鸦瓣黄酮除含有槲皮素外还含有其他物质。

2.2.3 红外光谱扫描^[11] 分别称取3mg老鸦瓣黄酮于玛瑙研钵中,再加入100mgKBr粉末,研磨混匀,压片,采用PE-1730红外光谱仪于波数400~4000 cm^{-1} 区间扫描,见图2。由图2可知,老鸦瓣黄酮的主要强吸收峰有3397、2925、2854、1739、1604、1457、1247、1209、1052、588 cm^{-1} 等,其中3397、2925、1604、1052 cm^{-1} 与芦丁^[13]的官能团相似,波数2854、1457、1209、588 cm^{-1} 处的吸收峰与槲皮素^[14]的官能团相似,而波数1739、1247 cm^{-1} 处的吸收峰分别是糖的乙酰酯和C—H变角振动引起的。因此从老鸦瓣中提取得到的物质为含有槲皮素和芦丁等的黄酮类化合物,其部分基团可能被糖类物质所取代。

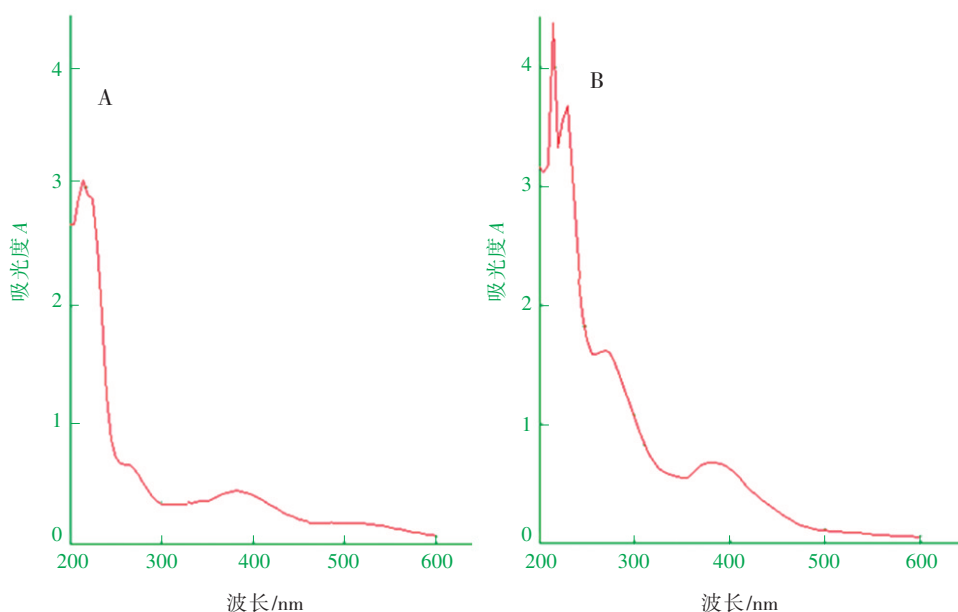


图1 槲皮素(A)和老鸦瓣黄酮(B)的紫外可见扫描图谱

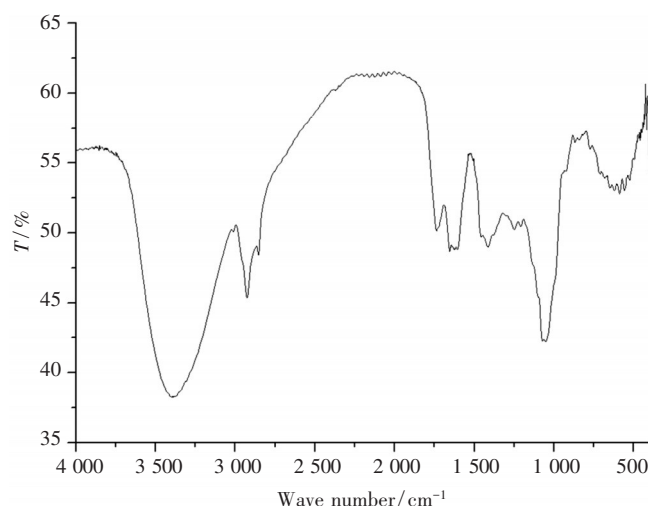
Fig. 1 UV spectra of quercetin (A) and flavonoids from *Tulipa edulis*(B)

图2 老鸦瓣黄酮的红外光谱

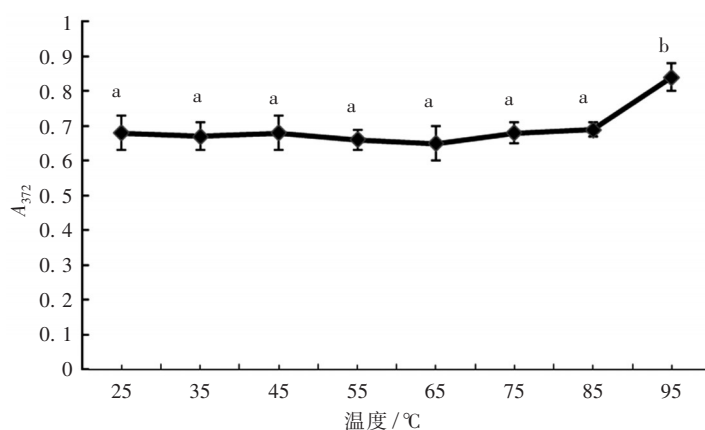
Fig. 2 FT-IR spectra of flavonoids from *Tulipa edulis*

2.3 老鸦瓣黄酮含量测定

以槲皮素为标准品,按照文献[9]操作方法绘制标准曲线,得出标准曲线回归方程: $Y = 1.0729X + 0.0021$, Y 表示吸光度, X 表示槲皮素的含量, $R^2 = 0.9998$ 。按标准曲线操作测得老鸦瓣黄酮的含量为63.09%。

2.4 老鸦瓣黄酮稳定性考察

2.4.1 温度对老鸦瓣黄酮稳定性的影响 于每支试管中加入1 g/L老鸦瓣黄酮水溶液5 mL,分别置于25、35、45、55、65、75、85、95℃的恒温水浴锅中避光恒温1 h,然后取出冷却至室温,按文献[9]的方法加入试剂反应后,于372 nm波长下测定吸光度(根据紫外可见扫描图谱,确定以 A_{372} 值来表示黄酮相对含量的多少,下同),考察温度对老鸦瓣黄酮稳定性的影响,见图3。结果发现,在25~85℃温度范围内,老鸦瓣黄酮的 A_{372} 值变化不大($P > 0.05$),当温度大于85℃时, A_{372} 突然增大,影响显著($P < 0.05$),其原因可能是温度过高破坏了老鸦瓣黄酮的分子结构,产生更多的酚羟基导致的。这和王丽娟等^[14]研究温度对黑苦荞黄酮稳定性的结果相似。因此,老鸦瓣黄酮应在低于85℃的条件下保存或者使用。



注:图中不同字母表示差异有统计学意义($P < 0.05$)。下同。

图3 温度对老鸦瓣黄酮稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on stability of flavonoids from *Tulipa edulis*

2.4.2 pH对老鸦瓣黄酮稳定性的影响 于每支试管中加入1 g/L老鸦瓣黄酮水溶液5 mL,调pH值依次为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,静置30 min后,按文献[9]的方法加入试剂反应后,于372 nm波长下测定吸光度,考察pH对老鸦瓣黄酮稳定性的影响,见图4。结果发现,老鸦瓣黄酮水溶液 A_{372} 值在pH 4~7之间时变化不大($P > 0.05$),黄酮类化合物因分子中含有多个酚羟基,一般呈弱酸性,在此范围内老鸦瓣黄酮较为稳定。在强酸或偏碱环境中老鸦瓣黄酮的稳定性较差($P < 0.05$),因此老鸦瓣黄酮不宜在强酸或偏碱的环境中保存或使用。

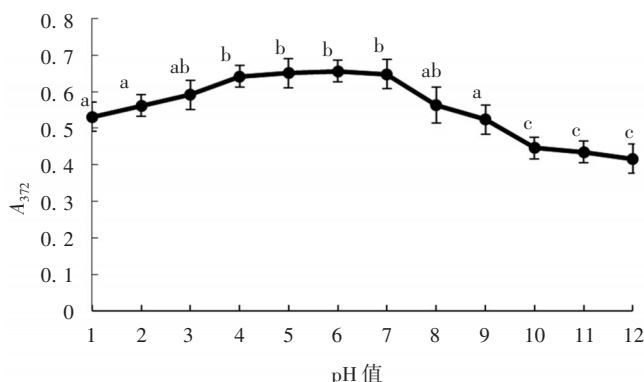
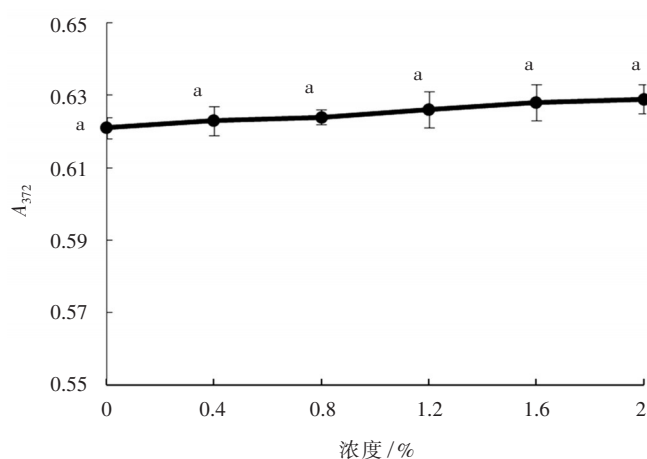
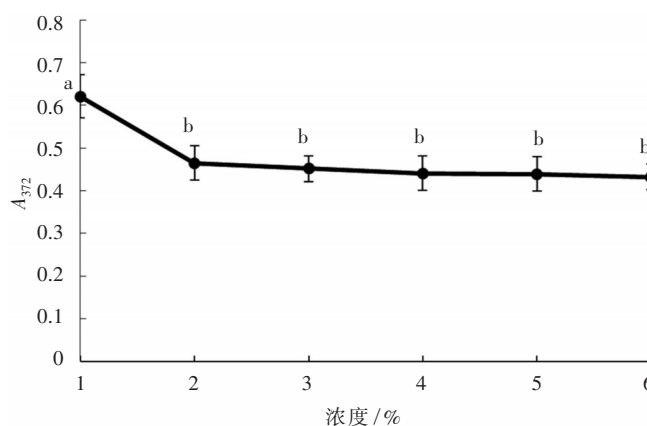


图4 pH对老鸦瓣黄酮稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on stability of flavonoids from *Tulipa edulis*

2.4.3 氧化剂 H_2O_2 对老鸦瓣黄酮稳定性的影响 于每支试管中加入1 g/L老鸦瓣黄酮水溶液5 mL,添加 H_2O_2 ,使每管中的 H_2O_2 浓度依次为0%、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0%(根据食品行业规定,食品中 H_2O_2 的允许含量不超过2%^[15]),摇匀后在室温下静置1 h,按文献[9]的方法加入试剂反应后,于372 nm波长下测定吸光度,考察氧化剂 H_2O_2 对老鸦瓣黄酮稳定性的影响,见图5。结果发现,随着 H_2O_2 浓度的不断增大,老鸦瓣黄酮水溶液的 A_{372} 值随之升高,但升高不显著($P > 0.05$),表明氧化剂 H_2O_2 对老鸦瓣黄酮水溶液稳定性影响不大,进而说明了老鸦瓣黄酮具有良好的抗氧化活性^[16]。

2.4.4 还原剂 Na_2SO_3 对老鸦瓣黄酮稳定性的影响 于每支试管中加入1 g/L老鸦瓣黄酮水溶液5 mL,添加 Na_2SO_3 ,使每管中的 Na_2SO_3 浓度依次为0%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%(根据食品行业规定,食品中 Na_2SO_3 的允许含量不超过0.05%^[15]),摇匀后在室温下静置1 h,按文献[9]的方法加入试剂反应后,于372 nm波长下测定吸光度,考察还原剂 Na_2SO_3 对老鸦瓣黄酮稳定性的影响,见图6。结果发现,随着 Na_2SO_3 浓度的不断增大,老鸦瓣黄酮水溶液的 A_{372} 呈下降趋势,表明还原剂 Na_2SO_3 对老鸦瓣黄酮的稳定性有较大影响($P < 0.05$),使其发生了化学变化。因此,老鸦瓣黄酮在保存或使用时需要避免接触此类物质。

图5 H_2O_2 对老鸦瓣黄酮稳定性的影响Fig. 5 Effect of H_2O_2 on stability of flavonoids from *Tulipa edulis*图6 Na_2SO_3 对老鸦瓣黄酮稳定性的影响Fig. 6 Effect of Na_2SO_3 on stability of flavonoids from *Tulipa edulis*

2.4.5 光照对老鸦瓣黄酮稳定性的影响 于每支试管中加入1 g/L老鸦瓣黄酮水溶液5 mL,分别在密闭和自然光照射下放置,于0、1、2、3、4、5 d时定时取样,按文献[9]的方法加入试剂反应后,于372 nm波长下测定吸光度,研究光照对老鸦瓣黄酮稳定性的影响,见图7。结果发现,随着处理时间的延长,老鸦瓣黄酮水溶液的 A_{372} 值逐渐下降,且下降趋势为自然光大于避光条件,但均不显著($P > 0.05$),表明光照或者避光条件对老鸦瓣黄酮的稳定性影响不大。相比之下,在避光条件下老鸦瓣黄酮的稳定性稍高。

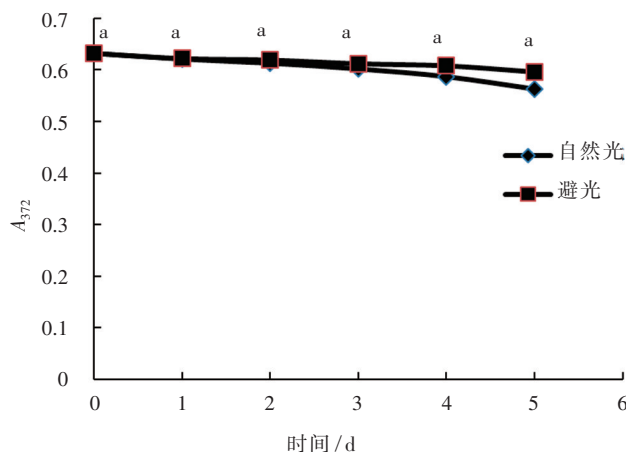


图7 光照对老鸦瓣黄酮稳定性的影响

Fig. 7 Effect of illumination on stability of flavonoids from *Tulipa edulis*

3 结论

本试验以老鸦瓣叶片为原料,65%乙醇为提取剂提取老鸦瓣粗黄酮,并采用D-101大孔树脂柱层析法对老鸦瓣黄酮进行分离纯化。该提取和纯化方法操作方便,成本低廉,适合于老鸦瓣黄酮的制备。

天然类黄酮化合物具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤、防腐保鲜等功效,但诸多功效均受到其稳定性的影响。在不同的条件下,黄酮的稳定性具有一定的差异。本试验研究了氧化剂 H_2O_2 、还原剂 Na_2SO_3 、光照、温度、pH值等因素对老鸦瓣黄酮稳定性的影响,其中 Na_2SO_3 对黄酮的稳定性影响显著($P < 0.05$),而温度($< 85\text{ }^\circ\text{C}$)、氧化剂 H_2O_2 、pH 4~7的酸性条件以及在自然光或避光条件对黄酮的稳定性影响不大($P > 0.05$)。总之,在试验范围内,老鸦瓣黄酮稳定性较高。另外本课题组研究发现,老鸦瓣黄酮具有体外抗氧化活性^[7],还具有良好的抑菌活性,因此,老鸦瓣黄酮具有一定的应用价值,值得进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] 朱丽芳,徐超,朱再标,等. TDZ和NAA对老鸦瓣不定芽诱导和丛生芽增殖的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3030-3035.
- [2] 周妍,肖兵,张明冬,等. 老鸦瓣多糖的制备及其对 H_2O_2 致果蝇氧化损伤的保护作用[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2018, 15(22): 46-49.
- [3] 阮小丽,施大文. 山慈菇的抗肿瘤及抑菌作用[J]. 中药材, 2009, 32(12): 1886-1888.
- [4] LIN R, LI Z, LIN J, et al. Ethanolic extract of *Tulipa edulis* Bak induces apoptosis in SGC-7901 human gastric carcinoma cells via the mitochondrial signaling pathway[J]. Oncology Letters, 2015, 10(4): 2371-2377.
- [5] 缪媛媛,朱再标,郭巧生,等. 摘蕾和人工授粉对老鸦瓣生长和产量的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2016-2018.
- [6] 董海玲,郭顺星,王春兰,等. 山慈菇的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(11): 1734-1738.
- [7] 汪道兵,张强强,周妍,等. 老鸦瓣黄酮的提取及其体外抗氧化性研究[J]. 安徽科技学院学报, 2018, 32(6): 58-63.
- [8] DONG Y, ZHAO M M, SUN-WATERHUOUSE D X, et al. Absorption and desorption behaviour of the flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* L. leaf on macroporous adsorption resins[J]. Food Chem, 2015, 168: 538-545.
- [9] 董怡,林恋竹,赵谋明. 光果甘草叶总黄酮测定方法[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 195-198.
- [10] 黎英,刘春艳,潘银来,等. 大孔树脂分离纯化状元豆黄酮及其抗油脂氧化研究[J]. 热带作物学报, 2016, 37(11): 2155-2163.
- [11] 徐美奕,韩雅莉,东野广智,等. 紫荆花总黄酮的分离纯化与光谱分析[J]. 中药材, 2007, 30(10): 1252-1255.
- [12] 梁永锋. 桃花中黄酮含量的测定及超声波辅助下提取工艺优化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 329-331.
- [13] 赵希,张黎明,高文远. 芦丁和槲皮素的几种快速鉴定方法[J]. 分析试验室, 2008, 27(增刊): 243-246.
- [14] 王丽娟,刘苏萌,李可,等. 黑苦荞中黄酮类化合物的稳定性和抑菌活性研究[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(8): 62-65.
- [15] 刘程,周汝忠. 食品添加剂应用大全[M]. 北京:北京工业大学出版社, 1994: 131-133.
- [16] 王磊,刘长姣,吴婕. 黑米中黄酮类化合物的稳定性分析[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(3): 14-17.

(责任编辑:范建凤)