

· 基础研究 ·

猕猴桃藤总黄酮纯化工艺研究[△]

李雪, 李栋红, 王小平*, 白吉庆

(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的: 猕猴桃藤中总黄酮纯化工艺的优选。方法: 采用单因素设计, 以总黄酮的含量为评价指标。结果: 最佳纯化条件样品与聚酰胺的比例为 1:10, 10 倍量柱体积的 60% 乙醇洗脱, 所纯化的总黄酮含量最高, 可达 51.8%。结论: 该纯化工艺简单、可行, 可用于猕猴桃藤中总黄酮的纯化。

[关键词] 猕猴桃藤; 总黄酮; 纯化工艺; 正交设计

Purification Process of total flavonoids in Vine of *Actinidia chinensis*

LI Xue, LI Donghong, WANG Xiaoping*, BAI Jiqing

(Shaanxi University of TCM, Xianyang 712046, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize of flavonoids purification process of *Actinidia chinensis* vine. **Methods:** The optimized The purification process of the flavonoids was optimized with the total flavonoids as a index. **Results:** Optimal purification process was as following: The ratio of samples and adsorbent 1:10, tenfold column volumes of 60% ethanol elute, the content of total flavonoids was 51.8%. **Conclusion:** The purification process is simple and feasible, and can be used for purification of total flavonoids in vine of *A. chinensis*.

[Keywords] Vine of *Actinidia chinensis*; total flavonoids; purification process; orthogonal design

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2015.2.010

猕猴桃藤为猕猴桃科猕猴桃属植物猕猴桃 *Actinidia Chinensis* Planch. 的藤^[1]。猕猴桃根具有清热解毒、活血散结、祛风利湿之功能。临床上用于治疗胃癌、乳腺癌、风湿性关节炎、淋巴性结核、跌扑损伤、痈疖等病^[2]。我国为猕猴桃的主要产区, 陕西省广泛栽培, 栽植面积占全国 60% 以上。近年发现中华猕猴桃根富含黄酮类、生物碱类等成分, 具有降压、抗肿瘤等药理作用^[2-5]。猕猴桃根资源相对匮乏, 但其藤因为果农每年都要修剪, 资源非常丰富。前期研究发现猕猴桃藤富含大量黄酮类成分, 但对其总黄酮纯化工艺研究报道较少, 因此本文对其总黄酮的纯化工艺进行研究, 希望为猕猴桃藤总黄酮的开发利用提供参考。

1 仪器与试剂、试药

1.1 仪器

紫外-分光光度计(上海美普达仪器有限公司);

德国 IKA RV10 旋转蒸发仪; KQ-300VDE 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DZF-6050B 真空干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司); 101-2 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司); BT125D 电子天平(赛多利斯)。

1.2 试剂、试药

猕猴桃藤, 经陕西中医学院生药教研室白吉庆副教授鉴定为猕猴桃科猕猴桃属植物猕猴桃 *Actinidia Chinensis* Planch. 的藤; 芦丁对照品(中国食品药品检定研究院提供, 批号: 100080-200707); 聚酰胺(100~200 目); 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醇等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 粗提物制备 称取猕猴桃藤藤饮片 150 g, 用

[△][基金项目] 陕西省科技资源统筹中药现代化专项(2012KTCL03-14); 陕西省大学生创新训练项目(1689)

*[通信作者] 王小平, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药质量分析与新药研究; E-mail: wangxiaoping323@126.com

8 倍量 60% 的乙醇提取 3 次, 每次 1 h, 合并滤液, 减压回收乙醇至稠膏状, 减压干燥, 得粗提物 14.64 g。

2.1.2 对照品的制备 精密称取芦丁对照品 9.93 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 标准曲线的绘制

分别取芦丁对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL 于 10 mL 容量瓶中, 精密加入 5% 的亚硝酸钠溶液 0.4 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加入 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加入 4.3% 的氢氧化钠试液 4 mL, 加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应试剂为空白, 用紫外-可见分光光度法, 在 500 nm 波长处测吸收光度。以总黄酮(芦丁计)浓度为纵坐标, 吸光度为横坐标, 进行线性回归, 绘制标准曲线, 得 $Y=0.00873X-0.0028$ ($r=0.9999$), 总黄酮(芦丁计)在 0.01~0.08 mg·mL⁻¹ 线性关系良好^[6]。

2.3 上柱溶液的制备

称取粗提物适量置烧瓶中, 精密加入 10 倍量 60% 的乙醇, 称定重量, 超声 20 min, 取出, 室温放置, 称重, 用 60% 的乙醇补足减失的重量, 过滤, 滤液备用。

2.4 纯化工艺考察

2.4.1 洗脱量的考察 取供试品 2 g(平行 3 份), 精密称定, 按照 2.3 项下的方法制备上柱溶液, 加到已处理好的聚酰胺(10 g)柱上(30 cm×5 cm), 分别用 6、8、10、12 倍量柱体积的 60% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 摇匀, 精密量取 0.3 mL 置 10 mL 容量瓶中, 照 2.2 项下的方法自加入 5% 的亚硝酸钠 0.4 mL 起, 依法测定吸光度。代入标准曲线, 计算总黄酮的浓度。精密量取洗脱液适量, 置干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 105℃ 烘 3 h, 取出, 置干燥器中冷至室温, 精密称重。计算所得纯化物中总黄酮的含量分别为 31.6%、40.5%、49.2%、42.8%。

2.4.2 洗脱浓度的考察 取供试品 2 g(平行 3 份), 精密称定, 按照 2.3 项下的方法制备上柱溶液, 加到已处理好的聚酰胺(10 g)柱上(30 cm×5 cm), 用 10 倍量柱体积的 50%、60%、70%、80% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 摇匀, 精密量取 0.3 mL 置 10 mL 容量瓶中, 照 2.2 项下的方法自加入 5% 的亚硝酸钠 0.4 mL 起, 依法测定吸光度。代入标准曲线, 计算

总黄酮的浓度。精密量取洗脱液适量, 置干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 105℃ 烘 3 h, 取出, 置干燥器中冷至室温, 精密称重。计算所得纯化物中总黄酮的含量分别为 32.4%、48.6%、39.2%、40.6%。

2.4.3 上样量的考察 分别取供试品 1、2、3 g(平行 3 份), 精密称定, 按照 2.3 项下的方法制备上柱溶液, 加到已处理好的聚酰胺(10 g)柱上(30 cm×5 cm), 分别用 10 倍量柱体积的 60% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 摇匀, 精密量取 0.3 mL 置 10 mL 容量瓶中, 照 2.2 项下的方法自加入 5% 的亚硝酸钠 0.4 mL 起依法测定吸光度。代入标准曲线, 计算总黄酮的浓度。精密量取洗脱液适量, 置干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 105℃ 烘 3 h, 取出, 置干燥器中冷至室温, 精密称重, 计算所得纯化物中总黄酮的含量分别为 51.8%、48.5%、46.4%。

2.5 结果

试验结果表明, 最佳纯化条件为样品与聚酰胺的比例为 1:10, 10 倍量柱体积的 60% 乙醇洗脱。

2.6 工艺验证

取供试品 5 g(平行 3 份), 精密称定, 按照 2.3 项下的方法制备上柱溶液, 加到已处理好的聚酰胺(50 g)柱上(30 cm×5 cm), 分别用 10 倍量柱体积的 60% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 摇匀, 精密量取 0.3 mL 置 10 mL 容量瓶中, 照 2.2 项下的方法自加入 5% 的亚硝酸钠 0.4 mL 起, 依法测定吸光度。代入标准曲线, 计算总黄酮的浓度。精密量取洗脱液适量, 置干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 105℃ 烘 3 h, 取出, 置干燥器中冷至室温, 精密称重, 计算所得纯化物中总黄酮的含量分别为 51.6%、52.5%、50.9%, 表明优选的纯化工艺稳定可行。

3 结论与意义

采用薄层色谱法, 猕猴桃藤粗提物色谱中在与芦丁对照品相应的位置出现相同的斑点, 表明猕猴桃藤粗提物中含有芦丁, 故本文选择芦丁作为对照品测定猕猴桃藤粗提物纯化前后总黄酮的含量。本文采用单因素试验, 筛选影响猕猴桃藤粗提物中总黄酮纯化效果的主要因素, 并对优化的纯化工艺进行放大试验验证, 为猕猴桃藤总黄酮工业化生产及开发利用提供参考。

本试验以芦丁为对照品, 用紫外-分光光度法对

(下转第 135 页)

报道的脂肽类物质的理化特征相近,推测可能是结构相同或类似的脂肽类物质^[8]。另外,本文用不同极性的有机溶剂萃取发酵上清液,发现极性较大的水饱和正丁醇萃取物具有较强的抑菌活性,说明 ge15 胞外分泌液中可能存在多种抗菌活性物质。

ge15 菌株经鉴定为寡养单胞菌 *Stenotrophomonas* sp., 有关该细菌的报道主要集中在苜^[9]、苦马豆素^[10]、多环芳烃菲^[11]、黄曲霉^[12]等有毒有害物质的生物脱毒以及土壤、水体的修复^[13]等研究领域,将该细菌用于植物病害防治的研究鲜有报道,仅见张泽坤等^[14]报道杨树中的内生寡养单胞菌 *Stenotrophomonas* sp. 对三倍体毛白杨和枫香组培苗的生根及幼苗生长有促进作用,但并未开展该菌株的次生代谢产物的成分分析。本文在对 ge15 菌株开展抑菌活性研究的基础上,就其次生代谢产物中的抑菌活性成分开展了初步研究,基本明确了抑菌活性物质的活性部位,这为菌株抑菌活性物质的分离纯化、结构鉴定及抑菌机理研究奠定了良好基础;另外,上述试验结果的获得也将有助于推动人参病害的生物防治。

参考文献

- [1] 吴连举,关一鸣,逢世峰,等. 利用拮抗微生物防治人参、西洋参土传病害研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(28):15630-15631,15657.
- [2] 石晶盈,陈维信,刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报,2006,26(7):2395-2401.

- [3] Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts[J]. Mol Plant Microbe In, 2006,19(8):827-837.
- [4] 李勇,赵东岳,丁万隆,等. 人参内生细菌的分离及拮抗菌株的筛选[J]. 中国中药杂志,2012,37(11):27-30.
- [5] Kim Y S, Song J G, Lee I K, et al, *Bacillus* sp. BS061 suppresses gray mold and powdery mildew through the secretion of different bioactive substances[J]. Mycobiology, 2013,41:64-166.
- [6] Finking R, Marahiel M A. Biosynthesis of nonribosomal peptides[J]. Annu Rev Microbiol,2004,58:453-488.
- [7] 黄曦,张荣灿,王何健,等. 枯草芽孢杆菌 ON-6 菌株抑制荔枝炭疽菌活性物质的初步研究[J]. 中国农学通报,2011,27(13):195-200.
- [8] 汪澈,何月秋,张永庆,等. 枯草芽孢杆菌 B9601-Y2 抑菌蛋白活性及产生条件的研究[J]. 植物病理学报,2005,35(1):30-36.
- [9] 王晓朝. 两株苜高效降解菌的分离鉴定及降解特性研究[D]. 江苏科技大学,2010.
- [10] 赵兴华. 苦马豆素降解菌分离、鉴定与特性研究[D]. 西北农林科技大学,2008.
- [11] 杨滨银. 多环芳烃菲降解菌的筛选、鉴定及其在土壤修复中的应用研究[D]. 新疆大学,2013.
- [12] 王凯. 黄曲霉生防菌的筛选鉴定及高效菌株 JPP1 的生防机制[D]. 哈尔滨工业大学,2013.
- [13] 李顺鹏,蒋建东. 农药污染土壤的微生物修复研究进展[J]. 土壤,2004,36(6):577-583.
- [14] 张泽坤. 氮利用内生细菌对几种植物生根及生长影响的研究[D]. 河北农业大学,2012.

(收稿日期 2014-09-21)

(上接第131页)

总黄酮进行含量测定,通过聚酰胺柱层析对猕猴桃藤中总黄酮纯化效果进行筛选。结果表明,样品与聚酰胺的比例为1:10,洗脱剂为10倍量柱体积60%的乙醇,所得纯化物中总黄酮含量最高,可达51.8%。本试验对优化的工艺进行放大试验验证,结果纯化效果较为理想,纯化后总黄酮的含量可高达50%以上,与单因素考察所得的最佳纯化效果进行比较,无显著差异。该纯化工艺简单、可行,重复性好,可用于猕猴桃藤中总黄酮的纯化。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第九

卷(第三册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.

- [2] 赫军,马秉智,赵铁. 藤梨根的化学成分研究[J]. 中国药理学杂志. 2014,49(3):184-186.
- [3] 邱学,海波,杨欣欣. 藤梨根药材 HPLC 指纹图谱及质量研究[J]. 中国实验方剂学杂志. 2013,19(10):135-137.
- [4] 龙凯花,王小平,白吉庆. 中药藤梨根抗肿瘤研究[J]. 中国现代中药,2013,15(10):846-849.
- [5] 邱学,徐洋洋,裴世柱. 响应面法优化藤梨根总生物碱提取工艺[J]. 辽宁中医药大学学报. 2013,15(7):58-61.
- [6] 王小平,白吉庆. 藤梨根总黄酮提取方法及含量测定研究[J]. 陕西中医学院学报,2008,31(3):65-66.

(收稿日期 2015-01-28)