

HPLC 分析芦苇叶中天然抗氧化成分黄酮类化合物

戴 军 王洪新* 华春雷

(中央研究所)

摘要 用高效液相色谱法(HPLC)成功地分离和制备了芦苇叶中天然抗氧化成分黄酮类化合物,并进行了定性和定量分析。

关键词 高效液相色谱法;黄酮类化合物;芦苇叶

0 前 言

芦苇叶具有一定的医药功能^[1,2]和食品保鲜、抗氧化作用^[3],这与其中含有一定量的黄酮类化合物有密切关系^[3,4]。关于芦叶中黄酮类化合物的分析研究,国内外都未见报道。本文应用高效液相色谱法(HPLC),在苯基柱上,成功地分离出 10 余种化合物,通过二极管阵列检测器检测和采集光谱,初步定性出其中有 9 种化合物为黄酮类;并用苯基柱制备得到其中 8 种黄酮纯品,经结构鉴定,有 6 种已确证为结构相近的黄酮甙类物质。以其中之一芦丁为标准,测定出 9 种黄酮化合物在芦叶中的近似含量。本研究为探索芦叶中黄酮类化合物的抗氧化机理及其提取、利用的方法提供了依据。

1 实验方法

1.1 仪器

HP1050 高效液相色谱仪

1.2 试剂

甲醇光谱纯;芦丁为生化试剂(含量不少于 95%);芦苇叶,1990 年 5 月采于江苏如皋地区;水为超纯级,华晶微电子公司提供;其它皆为 A·R 级。

1.3 芦叶样品预处理

收稿日期:1993-04-01

* 现在无锡粮食科学研究所工作

将芦叶低温干燥、粉碎,称取其碎叶 130g 左右,用石油醚($b \cdot p_{60} \sim 90^{\circ}\text{C}$)抽提除色素、蜡质;再将其叶渣自然风干,用 70%乙醇溶液提取,将其酒精抽提物浓缩至约 40ml,经过 PVPP 填充柱(4.0g 精制过的 PVPP 装填 $\varnothing 16 \times 80$ 柱)充分吸附,先用水洗去不吸附物,再用 30%DMF 水溶液解吸,收集洗脱液,真空旋转浓缩,用甲醇溶解并定容至 10ml,用 $0.5\mu\text{m}$ 微孔膜过滤,其滤液供色谱制备用。色谱分析时,需将此滤液稀释 100 倍左右。

1.4 色谱条件

分析时 色谱柱: Waters μ -Bondapak Phenyl $\varnothing 3.9 \times 300\text{mm}$ ($10\mu\text{m}$);流动相: 甲醇/水(40/60, v/v);流速: 1ml/min ;柱温: 20°C (室温);进样 $5\mu\text{L}$;检测波长 540nm ,带宽 8nm ;参比波长 536nm ,带宽 80nm ;放大因子 MF1.0;光谱采集: 手动, $190 \sim 600\text{nm}$ 。

制备时 色谱柱: 大连化物所色谱中心 Spherisorb- C_6H_5 , $\varnothing 8 \times 300\text{mm}$ ($10\mu\text{m}$);流动相: 甲醇/水(14/86, v/v);流速 3ml/min ;柱温: 40°C ;进样 $100\mu\text{L}$;检测 MF0.1;其它与分析时相同。

1.5 收集和制备

定时手动收集检测器出口的有关组分。用 HPLC 检验收集液纯度。收集液经真空旋转浓缩、干燥(40°C , 400Pa),即得高纯度的黄酮制品。

2 结果与讨论

2.1 定性试验

按上述分析条件,测得芦叶样品的色谱分离分析图如图 1。其中 9 个色谱峰的光谱图都具有黄酮类所特有的吸收带 I ($300 \sim 380\text{nm}$)和带 II ($240 \sim 280\text{nm}$),且两带相对强度也具有黄酮类特征^[3]。保留时间 $RT = 13.02\text{min}$ 的峰为芦丁,因为该峰和芦丁标准品的保留时间、光谱采集图完全一致(见图 2,3)。

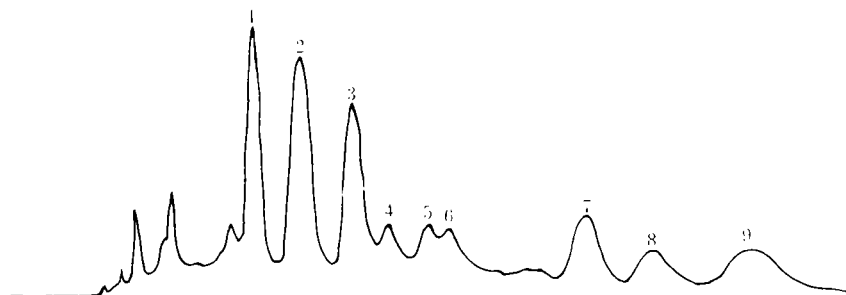


图 1 芦叶样品的色谱分离图

本实验收集和制备了芦叶中 8 个黄酮类组分,经做 FAB-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、UV 及位移试剂对 UV 光谱影响试验,酸水解液中糖基的 GC 分析^[4],鉴定出 6 个组分的结构于表 1。其结果也确证了上述芦丁的定性。

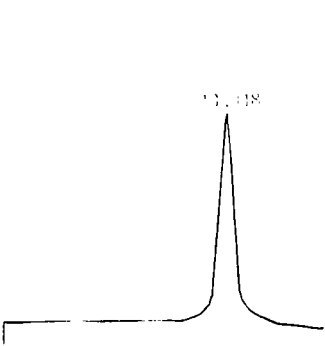


图2 芦丁标样色谱图

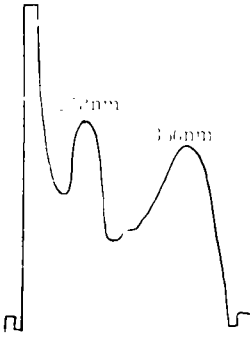


图3 芦丁光谱采集图(200~450nm)

表1 芦苇叶中6种黄酮体的化学结构

峰号	保留时间 (min)	黄 酮 名	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	通 式
1	7.615	木槿草素 —6—C—双 葡萄糖甙	—OH	—H	—OH	—C—G—O G	—H	
2	9.092	木槿草素 —5'—C—三 葡萄糖甙	—OH	—H	—OH	—H	—C—G—O G—O G—O	
3	10.653	木槿草素 —7—甲氧 基—6—C— 葡萄糖甙	—OH	—H	—OCH ₃	—C—G	—H	
5	13.020	槲皮素 —3—O—芸香 糖甙(芦丁)	—OH	—O—G—R	—OH	—H	—H	
6	13.750	木槲皮素 —3—O—葡 萄糖甙	—OH	—O—G	—OH	—H	—H	
9	23.250	异鼠李素 —3—O—芸 香糖甙	—OCH ₃	—O—G—O R	—OH	—H	—H	

2.2 芦叶中黄酮化合物的含量

以芦丁为标准,用外标法测得芦苇叶中9种黄酮体的近似含量和芦苇叶中总黄酮含量的近似值于表2.本法测定芦叶中芦丁的平均回收率为93.6%.

表2 芦叶中黄酮的含量(以芦丁计)

峰 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
RT(min)	7.615	9.092	10.653	11.726	13.020	13.750	18.126	20.221	23.250
黄酮含量 (%,干叶中)	0.0641	0.0881	0.0635	0.0268	0.0289	0.0260	0.0431	0.0359	0.0513
总黄酮 (%,干叶中)	0.428								

2.3 色谱条件的优化

以 HPLC 分析黄酮类, 色谱体系一般采用 ODS 柱-甲醇/水/醋酸(或加磷酸盐)^[5,6]。本实验起始也选用 ODS 柱, 分别以甲醇/水/磷酸二氢钾-磷酸及甲醇/水/醋酸作流动相, 效果皆不够理想。为考虑到制备纯化方便, 不加盐和酸, 而改用甲醇/水作流动相, 分离效果有所改善, 但仍有部分峰重叠。又考虑到黄酮含有芳环结构, 在苯基柱上的容量因子较大, 可调整变化范围较宽, 较适合同时分离复杂样品多种黄酮化合物, 故改用 phenyl 柱-甲醇/水体系分离, 其结果较满意(参阅图 1)。

在上述色谱体系中, 甲醇-水的最佳比例在 Bondapak Phenyl 分析柱上为 40/60, 而在 Spherisorb-C₆H₅ 半制备柱上为 14/86(这与两柱的苯基键合量不同有关)。在这两个最佳点上下, 增大甲醇含量, 黄酮容量因子 k' 和保留时间 RT' 都变小, 分离变差; 减少甲醇含量, k' 值和 RT' 则都增大, 分离虽可, 但峰形变差(谱带扩张), 检测灵敏度降低, 且分析时间拖长。

2.4 芦叶中黄酮化合物的抗氧化性能

用 Rancimat 法和烘箱贮存法, 以猪油、菜籽色拉油和二级豆油为底物, 测定本实验制取的芦叶中黄酮类化合物的抗氧化性能, 结果表明^[4]: 这些黄酮化合物确实具有显著的油脂抗氧化作用, 是芦叶中抗氧化组分的主要组成部分, 并且它们与芦叶中酚酸类化合物及氨基酸类化合物有较强的抗氧化协同效应。

参 考 文 献

- 1 李时珍. 本草纲目校本. 人民卫生出版社, 1982
- 2 江苏新医学院. 中药大辞典. 上海人民出版社, 1977
- 3 J. B. 哈本等. 戴伦凯, 谢玉如等译. 黄酮类化合物, 科学出版社, 1983
- 4 王洪新. 食品天然抗氧化剂的研究. 无锡轻工业学院博士学位论文. 1991
- 5 Joyce M Hardin, Charles A Stutte. Chromatographic analysis of Phendic and Flavonoid Compounds, In. "Food Constituents and Food Residues" Ed by Jumes F. Cawrence, Marcel Bckker, 1984
- 6 赵厚民. 第五次全国色谱学术报告会文集. 1985, 10: 461~463

Analysis of Flavonoids in Reed Leaves by HPLC

Dai Jun Wang Hongxin Hua Chenglei

(Centre research and design Institute)

Abstract As the main antioxidative components in leaves of reed (*Phragmites communis* Trin), the flavonoids were separated and collected by using High Performance Liquid Chromatography to prepare the pure compounds for the identification of the flavonoids structures. The qualitative and quantitative analysis of the flavonoids were represented.

Key-words High performance liquid chromatography; Flavonoids; Reed leaves