

纤维素酶在竹叶总黄酮提取中的应用

奚奇辉¹, 李士敏^{2*}

(1. 浙江大学 化学系, 浙江 杭州 310027; 2. 浙江大学 分析测试中心, 浙江 杭州 310029)

竹叶为禾本科竹亚科刚竹属毛竹 *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens* 的叶, 主产于浙江、江西、四川等地。竹叶中含有丰富的黄酮, 竹叶提取物在抗氧化、抗氧化、抗衰老、调节血脂和血胆固醇、调节免疫、抗菌、抗病毒等方面具有多种功效^[1,2]。

目前, 植物中总黄酮常以水、乙醇、甲醇作为溶剂提取。水浸提成本低, 但提取率也低; 乙醇等有机溶剂提取成本较高。竹叶中的总黄酮几乎都被以纤维素为主体的细胞壁所包围。近年来, 纤维素酶在国内外广泛应用^[3,4]。本实验将纤维酶应用于竹叶的提取中, 为纤维素酶在中药提取中的应用提供依据。

1 材料和仪器

竹叶采自浙江省德清县。纤维素酶由浙江省医学科学院微生物研究所提供; 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所); 其他试剂均为分析纯。日立 U—2000 紫外可见分光光度仪。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的制备: 准确称取干燥至恒重的芦丁对照品 0.100 1 g, 置于 50 mL 量瓶内, 用 95% 乙醇溶解并稀释至刻度, 即得芦丁储备液。精密吸取此溶液 5.0 mL 于 50 mL 量瓶中, 用 40% 乙醇溶液稀释至刻度, 即得芦丁对照品溶液。精确吸取 0, 0.3, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 4.5 mL 芦丁对照品溶液于 10 mL 量瓶中, 先加 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL, 放置 6 min, 加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL, 放置 6 min, 再加 4% NaOH 溶液 4 mL, 最后用 40% 乙醇溶液加至刻度, 摇匀, 静置 15 min 后在 510 nm 处测定吸光度值。以吸光度对浓度作标准曲线, 得方程: $A = 0.012\ 64C + 0.008\ 9$ ($r = 0.999\ 9$) 表明芦丁在 6.006~90.09 μg/mL 线性关系良好。

2.2 供试品溶液的制备: 取竹叶提取液浓缩后的水溶液加热至沸并保持 5 min, 自然冷却后离心(3 000 r/min) 15 min, 倒出上清液, 在沉淀中加水搅拌后再离心, 合并上清液并定容至 100 mL。取溶液 5 mL 上已经预处理的聚酰胺柱(14 cm×1 cm), 用水 100 mL 冲洗, 再用 95% 乙醇溶液 50 mL 洗脱, 收集乙

醇洗脱液于 100 mL 量瓶中加水定容, 即得供试品溶液。取上述供试品溶液 5 mL 于 10 mL 量瓶中, 按标准曲线项下从“先加 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL”起同法操作, 测定其吸光度并计算总黄酮含量。

2.3 提取工艺研究: 多数黄酮由于不易溶于冷水, 水很难透过细胞壁将总黄酮溶解出来, 所以用水直接提取得率比较低。纤维素酶可以用来破解细胞壁, 然后用水回流提取, 可提高提取效率。

称取干燥竹叶 20 g, 装入烧瓶中, 按固液比 1:16 加水。加入催化剂 ZnCl₂, MgCl₂, MnCl₂ 各 0.2 g。因素水平见表 1, 结果见表 2。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels				
水平	因 素			
	A 提取温度/℃	B pH 值	C 酶用量/g	D 反应时间/h
1	40	3.5	0.1	0.5
2	50	4.5	0.2	1.0
3	60	5.5	0.3	1.5

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 2 Results of L ₉ (3 ⁴) orthogonal test					
实验号	A	B	C	D	吸光度
1	1	1	1	1	0.697
2	1	2	2	2	0.789
3	1	3	3	3	0.749
4	2	1	2	3	0.946
5	2	2	3	1	0.974
6	2	3	1	2	0.860
7	3	1	3	2	0.749
8	3	2	1	3	0.801
9	3	3	2	1	0.706
K ₁	2.235	2.392	2.358	2.377	
K ₂	2.781	2.564	2.441	2.399	
K ₃	2.256	2.316	2.473	2.496	
R	0.546	0.248	0.116	0.119	

可知竹叶以酶处理的 最佳条件为: 反应温度 50℃, pH 4.5, 酶 0.3 g, 反应时间 1.5 h。

分别用酶处理过的竹叶和未处理的竹叶进行对比试验, 用水提取, 物料比为 1:16, 提取 3 次, 合并提取液, 测定总黄酮, 结果酶处理组总黄酮的 A 值为 0.951, 未处理组为 0.770 ($n = 3$), 经 t 检验, 两者

* 收稿日期: 2003-04-05

的黄酮含量差异具有显著性($P < 0.001$)。

3 讨论

植物药的细胞壁是由纤维素构成,植物的有效成分往往被包裹在细胞壁内。纤维素由 β -D-葡萄糖以 1,4- β -葡萄糖苷键连结,用纤维素酶酶解可以破坏 β -D-葡萄糖键,使细胞壁破坏。实验中经过纤维素酶处理后再进行水回流提取,总黄酮含量比直接水提提高 23.5%,这可能是由于纤维素酶可充分破坏竹叶以纤维素为主的细胞结构。

植物中总黄酮的含量测定方法大多是采用提取液直接经显色反应后测定吸光度,然后计算含量。本实验对竹叶总黄酮的含量测定方法做了改进,提取液经过聚酰胺树脂纯化后再显色测定。提取液经过

聚酰胺柱,水洗可以去除极性大的杂质,如糖类、多酚类等,使显色反应干扰减小,从而使测得的总黄酮含量准确度提高。

References:

- [1] Zhang Y. Studies on antioxidative fraction in bamboo leaves and its capacity to scavenge active oxygen radicals [J]. *J Bamboo Res* (竹子研究汇刊), 1996, 15(3): 17-24.
- [2] Zhang Y, Wu X Q, Yu Z Y. Comparison study on total flavonoid content and anti free radical active of the leaves of bamboo, *Phyllostachys nigra*, and *Ginkgo biloba* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(4): 254-257.
- [3] Xing X F, Ma J Y, Yu H F, et al. Application of cellulase in extraction of total flavonoid of *Radix Puerariae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(1): 37-38.
- [4] Ma T T. Primary study of cellulase applied in Chinese drugs' extraction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(3): 123.

灵芝、香菇、黄芪、枸杞提取物中多糖的含量测定

张立,马琼,何永利,张朋涛*

(西安高科实业股份有限公司天诚医药生物工程分公司,陕西 西安 710075)

研究发现许多药用植物及真菌的多糖成分具有独特的生物活性:香菇多糖有抗肿瘤作用,灵芝多糖有调血糖和抗衰老的作用,枸杞多糖能提高机体免疫力并能抗衰老,黄芪多糖有双向调节血糖的作用。苯酚-硫酸法是比较经典的多糖含量测定方法,本实验优化了显色条件,统一了样品处理条件,同时测定了灵芝、香菇、黄芪、枸杞提取物中多糖含量,得到了稳定的检测结果。

1 仪器与试剂

UV-2101PC 紫外-可见分光光度计(日本岛津),KQ-250 超声波清洗仪(昆山淀山湖仪器厂)。

葡萄糖等为分析纯,水为蒸馏水,灵芝、香菇、黄芪、枸杞提取物由本公司提供。

2 方法与结果

2.1 标准曲线制备:精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖对照品约 50 mg 于 50 mL 量瓶中,加水溶解并加至刻度。分别精密移取该溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 于 50 mL 量瓶中,加水稀释并加至刻度。各取 1.0 mL 于 25 mL 具塞刻度试管中,分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,加入 5.0 mL 浓硫酸(加入浓硫酸时,勿沿壁加入,应将移液管口悬于试管口,使浓硫酸垂直冲入液面),立即摇匀。沸水浴加

热 10 min,冰水浴冷却,放至室温,以蒸馏水同法做空白参比,在 485 nm 处测吸光度(A)。以 A 为横坐标,浓度为纵坐标,绘制标准曲线,得线性方程 $Y = 94.9X$, $r = 0.9988$ 。线性范围:20~120 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 供试品溶液的制备:精密称取提取物约 200 mg,置 100 mL 量瓶中。按 200 mg 加入 100 mL 的比例,计算并加入 80% 乙醇溶液,超声振荡 2 h。放置至室温,滤过,弃去滤液,用 80% 乙醇溶液洗涤残渣 3 次。将残渣连同滤纸一同移入原 100 mL 量瓶中,加入沸水共约 80 mL,超声振荡 1 h,放置至室温定容,摇匀,滤过,取续滤液 5.0 mL 于 50 mL 量瓶中(适于含量 10%~60% 的样品,对于含量过低或过高样品,应适当改变移取体积),加水定容,即得。

2.3 精密度试验:分别精密吸取 4 种供试品溶液 1.0 mL 于 25 mL 具塞试管中,依 2.1 项下方法显色,测定 A 值,求得其 RSD 分别为 0.78%, 0.54%, 1.03%, 0.62% ($n = 5$)。

2.4 显色稳定性:将 4 种供试品溶液完成显色后,2 h 内连续测定,得其 A 值为一定值不变。

2.5 重现性试验:取 4 品种供试品,分别精密称取 5 份,制备供试品溶液并测定多糖含量,结果灵芝、香菇、黄芪、枸杞多糖的含量分别为 13.87%,