

图 4 加纳籽提取液(A)和 G6104 树脂处理产物(B)的 HPLC 图谱

Fig 4 HPLC Chromatograms of Ghana seeds extract solution (A) and purification of 5-HIP by G6104 resin (B)

脂吸附性能的主要指标,本实验对具有不同极性的大孔吸附树脂(AB-8、D-101、YWD-03、YWD-06)和大孔离子交换树脂(CSC-1、G6104)进行静态吸附筛选,发现大孔离子交换树脂 G6104 对加纳籽中的 5-

羟基色氨酸具有较强的吸附性能,并对其进行了吸附温度、pH 值、洗脱溶剂的选择、动态吸附解吸等多项指标的考察。实验结果表明 G6104 型树脂在 30 下进行吸附效率最高,树脂的处理量为 0.9 g/g。在 pH 2~3 的条件下,体积流量 3 mL/min 上柱,吸附效果最佳。树脂吸附饱和后以 30% 氨水溶剂洗脱,洗脱率达到 99.2%。利用 G6104 型树脂分离纯化后得到的 5-羟基色氨酸样品质量分数由原料中的 10.2% 提升到 69.1%。而且生产成本较低,生产周期短,适合大规模工业化生产。

参考文献:

[1] 聂利芳,李多伟. 加纳籽中 5-羟基色氨酸的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2008,30(1):47-49.
 [2] 欧艳,肖方青,肖艳萍. 5-羟基色氨酸的提取和测定方法研究[J]. 湖南中医杂志,2005,21(4):82-83.
 [3] 许慧,李多伟,任静,等. 正交试验法优选 5-羟基色氨酸的提取工艺[J]. 西北药学杂志,2006,21(2):61-63.

RP-HPLC 法测定竹叶提取物中黄酮类和酚酸类成分

龚金炎,吴晓琴,夏道宗,张英

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院,浙江 杭州 310029)

摘要:目的 建立一种 RP-HPLC 法同步测定竹叶提取物中特征性的 4 个黄酮碳苷和 4 个酚酸的方法。方法 采用 RP-HPLC 法。Luna C₁₈ ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-1% 乙酸水溶液(B);体积流量:1.0 mL/min;进样量:10 μL;柱温:40 °C;检测波长:330 nm。结果 异荭草苷、荭草苷、牡荆苷、异牡荆苷、对香豆酸、绿原酸、咖啡酸和阿魏酸在 1.875~290.0 μg/mL 线性关系良好,回收率在 96.13%~102.81%,RSD 在 1.10%~1.66%。结论 本方法简便、灵敏、准确,可普遍应用于竹叶提取物的质量研究和品质控制。

关键词:竹叶提取物;异荭草苷;荭草苷;牡荆苷;异牡荆苷;对香豆酸;绿原酸;咖啡酸;阿魏酸;高效液相色谱

中图分类号:R286.02 文献标识码:B 文章编号:0253-2670(2010)01-0063-03

竹叶提取物又称竹叶黄酮,是我国近年来研究和开发的一种新型植物黄酮制剂,其有效成分包括黄酮和酚酸两大部分。其中,黄酮类化合物主要是以荭草苷、异荭草苷、牡荆苷和异牡荆苷为代表的黄酮碳苷,酚酸类化合物主要是肉桂酸的衍生物,包括对香豆酸、绿原酸、咖啡酸和阿魏酸等。竹叶提取物具有抗自由基、抗氧化、抗衰老、抗菌、抗病毒及保护心脑血管、防治老年退行性疾病等生物学功效^[1-5]。通常认为,黄酮类化合物是竹叶提取物发挥抗氧化作用的关键组分,总黄酮的量越高,其抗氧化性能就越强。但随着研究的深入,越来越多的数据表明竹叶提取物的抗氧化能

力并不与其总黄酮的量呈严格对应的正相关关系,其中伴随的酚酸类化合物起到了不容忽视的独特贡献^[6]。为了建立科学、合理、全面的竹叶提取物质量评价体系,本实验建立了采用 RP-HPLC 法同步测定竹叶提取物中 8 个特征性成分的检测方法,并对目前市面上流通的两种不同规格的产品进行了验证,以期对竹叶提取物的研究、生产和消费提供科学依据。

1 材料与方法

高效液相色谱仪:美国 Waters 2695,配置 Waters PDA 2996 检测器。

异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷对照品购

收稿日期:2009-04-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972486);浙江大学曹光彪高科技发展基金资助项目(2008ZD005)

作者简介:龚金炎(1982-),男,博士研究生,研究方向为天然产物和功能性食品的研究与开发。E-mail:gongjinyan1982@163.com

*通讯作者 张英 Tel:(0571)86049803 E-mail:yzhang@zju.edu.cn

自法国 Extrasynthese 公司,质量分数均大于 98%;对香豆酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸对照品购自 Sigma 公司,质量分数均大于 98%;乙腈和甲醇色谱级,冰醋酸分析纯。

竹叶提取物试样由浙江大学食品科学与营养系提供,分别来自浙江的两家生产企业。竹叶提取物-1 为溶剂法精制的产品,竹叶提取物-2 为大孔树脂吸附-解吸的产物,以芦丁为对照,比色法测得的总黄酮质量分数分别为 25.13%、31.79%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Luna C₁₈ ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-1%乙酸水溶液(B);洗脱条件:0~15 min 时,A 15%,B 85%;15~25 min 时,A 15%~40%,B 85%~60%;25~34 min 时,A 40%,B 60%;34~40 min 时,A 40%~15%,B 60%~85%;体积流量:1.0 mL/min;进样量:10 μL;柱温:40;检测波长:330 nm。

2.2 对照品溶液的配制:精密称取干燥至恒重的异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、对香豆酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸对照品适量,用甲醇溶解并定容至 10 mL,制成含异荭草苷 480 μg/mL、荭草苷 500 μg/mL、异牡荆苷 490 μg/mL、牡荆苷 510 μg/mL、对香豆酸 1 070 μg/mL、绿原酸 1 150 μg/mL、咖啡酸 1 160 μg/mL 和阿魏酸 1 130 μg/mL 的混合对照品溶液。随后分别稀释 4、8、16、32、64、128、256 倍,制成不同质量浓度的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:精密称取竹叶提取物 100 mg,用甲醇溶解并定容至 100 mL,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过后备用。

2.4 标准曲线的制备:将 7 个不同质量浓度的对照品溶液注入高效液相色谱仪,记录峰面积。以异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、对香豆酸、绿原酸、咖啡酸和阿魏酸的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程及线性范围,见表 1。

2.5 精密度试验:取同一质量浓度的混和对照品溶液,连续进样 5 次,测定峰面积,计算得异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、对香豆酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 1.26%、1.16%、1.38%、1.42%、1.46%、1.06%、1.66%、1.14%。

2.6 稳定性试验:取同一竹叶提取物供试品溶液(批号 081226),分成 5 份,分别在 0、2、4、8、24 h 测定,以峰面积计算异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、对香豆酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸的质量分数,其 RSD 分别为 0.34%、0.58%、0.43%、0.53%、

表 1 线性回归方程

Table 1 Linear regression equation

化合物	回归方程	相关系数 (R ²)	线性范围/ (μg · mL ⁻¹)
绿原酸	Y = 26 345 X - 4 644.9	0.999 5	0.29 ~ 143.8
咖啡酸	Y = 50 534 X + 4 843.5	0.999 5	0.29 ~ 145.0
异荭草苷	Y = 20 075 X - 2 957.5	0.999 9	0.42 ~ 60.0
荭草苷	Y = 21 009 X - 1 751.9	0.999 9	0.40 ~ 62.5
对香豆酸	Y = 39 890 X - 3 594.9	0.999 5	0.27 ~ 133.8
牡荆苷	Y = 25 695 X - 3 478	0.999 9	0.41 ~ 61.3
异牡荆苷	Y = 22 241 X - 4 319.3	0.999 6	0.43 ~ 63.8
阿魏酸	Y = 50 534 X - 4 843.5	0.999 5	0.28 ~ 141.3

0.49%、0.69%、0.75%、0.77%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.7 重现性试验:取同一竹叶提取物供试品溶液(批号 081226)5 份,进行测定,以峰面积计算异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、对香豆酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸的质量分数,其 RSD 分别为 1.02%、1.35%、1.98%、0.88%、1.04%、1.57%、1.89%、1.24%。

2.8 回收率试验:取同一竹叶提取物 5 份(批号 081226),精密加入 1 mL 含异荭草苷 480 μg/mL、荭草苷 500 μg/mL、异牡荆苷 490 μg/mL、牡荆苷 510 μg/mL、对香豆酸 1.07 mg/mL、绿原酸 1.15 mg/mL、咖啡酸 1.16 mg/mL 和阿魏酸 1.13 mg/mL 的混和对照品溶液,制备供试品溶液,测定,计算加样回收率和 RSD,异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、对香豆酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸的加样回收率和 RSD 分别为 98.36%、1.10%、97.18%、1.23%、99.11%、1.59%、96.13%、1.63%、100.34%、1.09%、102.10%、1.53%、102.81%、1.66%、99.89%、1.32%。

2.9 样品测定:取竹叶提取物供试品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,测定,外标法计算竹叶提取物中异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷、牡荆苷、对香豆酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸的质量分数,平行 3 次测定,结果见表 2,HPLC 图谱见图 1。

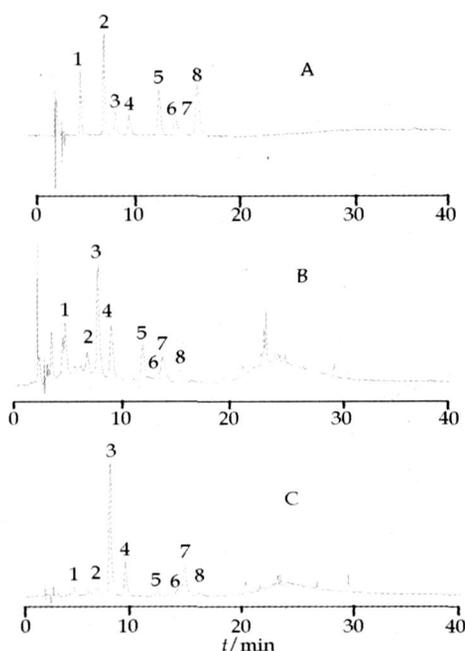
3 讨论

对目前市面上流通的两种不同工艺制备的竹叶提取物的分析测试表明,均含有 8 种特征性成分,但是量存在较大差异。竹叶提取物-1 是采用正丁醇液-液萃取精制而成,而竹叶提取物-2 则是采用大孔树脂吸附-解吸的工艺制备的。研究表明,竹叶提取物-1 较好地再现了竹叶酚性部位的自然组成,在黄酮类化合物量提高的同时保留了酚酸类化合物,如对香豆酸、绿原酸、咖啡酸和阿魏酸等;而竹叶提取

表 2 竹叶提取物中特征性成分的测定结果(n = 3)

Table 2 Determination of characteristic compounds in bamboo leaves extract (n = 3)

批号	绿原酸/ (mg · g ⁻¹)	咖啡酸/ (mg · g ⁻¹)	异荭草苷/ (mg · g ⁻¹)	荭草苷/ (mg · g ⁻¹)	对香豆酸/ (mg · g ⁻¹)	牡荆苷/ (mg · g ⁻¹)	异牡荆苷/ (mg · g ⁻¹)	阿魏酸/ (mg · g ⁻¹)	
									提取
提取物-1	081216	3.67	1.70	22.50	15.90	6.41	2.33	5.78	1.94
	081226	3.87	1.73	24.80	14.43	6.30	2.34	5.63	2.03
	081229	3.51	1.65	22.13	15.65	5.52	2.20	5.72	1.88
提取物-2	081201	1.11	0.56	43.60	13.19	1.26	2.20	12.46	1.16
	081205	1.08	0.51	40.03	17.40	1.20	2.14	13.22	1.11
	081207	1.12	0.58	44.19	17.55	1.28	2.35	13.65	1.20



1-绿原酸 2-咖啡酸 3-异荭草苷 4-荭草苷 5-对香豆酸
6-牡荆苷 7-异牡荆苷 8-阿魏酸
1-chlorogenic acid 2-caffeic acid 3-homoorientin 4-orientin
5-p-coumaric acid 6-vitexin 7-isovitexin 8-ferulic acid

图 1 混和对照品(A)、竹叶提取物-1(B)和竹叶提取物-2(C) HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), extract-1 of bamboo leaves (B), and extract-2 of bamboo leaves (C)

物-2 却表现出较大的选择性富集,其中异荭草苷的量比粗提物提高了 4.53 倍,但对香豆酸等酚酸的量显著降低。分析其主要原因在于,香豆酸、绿原酸、咖啡酸和阿魏酸属中高极性化合物,异荭草苷、荭草苷、异牡荆苷和牡荆苷为中等极性化合物,采用正丁醇液-液萃取精制时,使竹叶粗提物的中等极性部位均衡地得到富集,完整地保留了竹叶提取物中各有效成分天然存在的比例关系。而当采用大孔树脂吸附-解吸法精制时,在上柱后水洗的过程中,脱除了大量的亲水性的酚酸、多糖和矿物质等,并且用 50%乙醇解吸得到目标产物时,丢失了大量的以黄酮苷元和甲氧基黄酮为代表的低极性物质,故虽然采用这种方法可使制剂精度大大提高,但其抗氧化活性却往往不会同比例增长。因而,不同工艺得到的竹叶提取物有其不同的下游用途及工艺适用性。

参考文献:

[1] 张英,沈建福,俞卓裕,等. 竹叶黄酮作为抗衰老护肤因子的应用基础研究[J]. 林产化学与工业,2004,24(1):95-100.
[2] 陆柏益,张英,吴晓琴. 竹叶黄酮的抗氧化性及其心脑血管药理活性研究进展[J]. 林产化学与工业,2005,25(3):120-124.
[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] 魏晓霞,李叶,陈宗道,等. 竹叶黄酮对小鼠脾细胞免疫的分子机制研究[J]. 食品科学,2007,28(9):523-526.
[5] 付晓春,王敏伟,李少鹏,等. 竹叶提取物对缺血缺氧心肌的保护作用[J]. 中成药,2006,28(4):558-561.
[6] 宋仲容,江相兰,李树伟,等. 竹叶提取物的抗氧化活性研究[J]. 化学研究与应用,2006,18(1):67-69.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理总局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821 传真:23006821 联系人:陈常青