

苹果叶总黄酮的提取及其含量测定

库尔班江·巴拉提¹, 王 萌², 张小莺^{1,2}

(1. 新疆伊犁师范学院 化学与生物科学学院, 新疆 伊宁 835000; 2. 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以“红元帅”苹果的干燥叶子为试材,通过单因素试验确定苹果叶总黄酮的最佳提取工艺条件,采用可见分光光度法对苹果叶中总黄酮含量进行测定,以期为苹果叶中总黄酮提取工艺及含量测定提供方法和依据。结果表明:苹果叶总黄酮的最佳提取工艺条件为乙醇作溶剂,乙醇浓度60%,料液比1:20 g/mL,提取温度为70℃,提取时间为30 min;在选定试验条件下对苹果叶进行含量测定,对芦丁对照品浓度与吸光度进行线性回归,其回归方程为 $Y=24.82143X-0.031$, $R^2=0.99945$ ($n=6$),芦丁对照品质量在4~24 μg范围内呈良好的线性关系,在此条件下测定苹果叶中总黄酮平均含量为30.28 mg/g。试验优选出了苹果叶中总黄酮的最佳提取工艺条件及含量测定方法,该方法简单、快速、准确,精密度、稳定性、重现性良好。

关键词:苹果叶;总黄酮;提取工艺;含量测定

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)14-0129-04

苹果系蔷薇科(Rosaceae)苹果属(*Malus pumila* Mill.)植物苹果的果实,属大宗水果,是我国及全世界上

种植最广、产量最多的果品。新疆苹果资源丰富,已发展成为我国苹果主产区之一^[1-2]。大量的苹果叶大多被废弃或焚烧,不但造成严重的资源浪费而且污染了环境。黄酮类化合物是植物的次生代谢产物,广泛存在于高等植物及啮齿植物的根、茎、叶、花、果实等中,是许多中草药的有效成分。由于其生理活性多样性,近年来,

第一作者简介:库尔班江·巴拉提(1962-),男,维吾尔族,教授,研究方向为中药与天然药物。E-mail:korbanjhon@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21166024)。

收稿日期:2015-03-15

[11] 赖传雅,李朝生,韦迎春,等. 龙眼叶枯病菌疏毛拟盘多毛孢生物学特性研究[J]. 中国南方果树,2013,42(4):84-88.

[12] 孔琼,袁盛勇,刘双芹,等. 枇杷拟盘多毛孢生物学特性研究[J]. 河北

农业大学学报,2010,33(2):84-87.

[13] 徐永辉,邹燕敏,蔡平,等. 桂花拟盘多毛孢灰斑病生物学特性研究[J]. 上海农业科技,2008(4):83-84.

Pathogen Identification and Biological Characteristics of Rose Leaf Blotch in Tianjin

FENG Youren, LIU Baosheng, BAI Penghua

(Tianjin Institute of Plant Protection, Tianjin 300381)

Abstract: Taking one disease on leaf of *Rosa chinensis* that found in Tianjin flower nursery as test material, the pathogen was identified through morphological characteristics, pathogenicity and rDNA-ITS sequence analysis, simple biological characteristics research of this pathogen was conducted also. The results showed that fungal colony that developed on PDA was 34.6—37.2 mm in diameter, with concentric rings in white in four days. The conidia was fusiform and 4.83—9.11 μm in diameter, formed by five cells with four transverses; the apical appendage of conidia was 2—3, 5.93—36.23 μm in length; the basal appendage of conidia was 1, 2.85—16.05 μm in length. The homology of rDNA-ITS sequence between this pathogen and *Pestalotiopsis clavispora* was 99%. Based on the morphological characteristics and rDNA-ITS sequence analysis, the pathogen was finally identified as *P. clavispora*. This was the first report that *Pestalotiopsis clavispora* could cause leaf blotch disease of *Rosa chinensis* Jacq in China. Biological characteristics studies demonstrated that the optimum temperature for growth was 25℃, no significant difference existed in the range of 20—30℃; the suitable pH value was around 5.0; the suitable carbon source was lactose.

Keywords: *Rosa chinensis* Jacq; leaf blotch; pathogen identification; biological characteristics; *Pestalotiopsis clavispora* (Arth.) Stey.

引起了国内外学者的广泛重视,研究进展较快^[3-6]。对黄酮类物质的分离提取方法和抗氧化、抗癌及抗菌等作用的研究日渐增多^[7-8]。

为充分利用废弃资源,更好地开发利用苹果叶中的黄酮类物质,试验拟对苹果叶黄酮类化合物的提取工艺进行优化,确定其最佳工艺条件,并对苹果叶总黄酮进行含量测定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苹果叶 2012 年 10 月采自新疆伊宁县阿热吾斯坦乡,并被新疆伊犁师范学院专家鉴定为蔷薇科(Rosaceae)苹果属(*Malus pumila* Mill.)“红元帅”苹果的干燥叶子。

芦丁(生化试剂,国药集团化学试剂有限公司,批号为 20120122);95%乙醇(A.R.,天津市大茂化学试剂厂);无水乙醇(A.R.,天津市大茂化学试剂厂);甲醇(A.R.,天津市大茂化学试剂厂);氢氧化钠(A.R.,天津市大茂化学试剂厂);硝酸铝(A.R.,天津市大茂化学试剂厂);亚硝酸钠(A.R.,天津市大茂化学试剂厂)。

DF-101S 蒸热式磁力加热搅拌器(金坛市医疗仪器厂);KQ-250DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FA-N/JA-N 系列电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);PC-723 可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);QE-10A 型 500 g 装高速中药粉碎机;SHZ-III 循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试验方法

黄酮类化合物提取的影响因素众多,根据相关文献^[9-11],分别对溶剂、乙醇浓度、料液比、温度和时间进行了分析。

1.2.1 溶剂对总黄酮提取率的影响 准确称取苹果叶粉末 5 份(每份 2.8 g),提取条件为:料液比 1:20 g/mL、提取温度 70℃、超声波强度 100%,分别用 95%乙醇、无水乙醇和甲醇等超声提取 30 min,采用可见分光光度法在 510 nm 波长处测定提取液吸光度,比较不同溶剂对黄酮类化合物提取率的影响。

1.2.2 乙醇的不同浓度对总黄酮提取率的影响 准确称取苹果叶粉末 5 份,在料液比 1:20 g/mL、提取温度 70℃、超声波强度为 100%的条件下,分别用 50%、60%、70%、80%、90%的乙醇等超声提取 30 min,比较乙醇浓度对黄酮类化合物提取率的影响。

1.2.3 料液比对总黄酮提取率的影响 准确称取苹果叶粉末 5 份,在提取温度 70℃、超声波强度为 100%的条件下,用 60%乙醇分别在料液比 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL 对样品进行超声波提取 30 min,比较不同料液比对黄酮类化合物提取率的影响。

1.2.4 温度对总黄酮提取率的影响 准确称取苹果叶

粉末 5 份,在超声波强度为 100%、乙醇浓度为 60%、料液比 1:20 g/mL 的条件下,分别对样品在 40、50、60、70、80℃进行超声波提取 30 min,比较不同温度对黄酮类化合物提取率的影响。

1.2.5 时间对总黄酮提取率的影响 准确称取苹果叶粉末 5 份,在超声波强度为 100%、乙醇浓度为 60%、料液比 1:20 g/mL、提取温度 70℃的条件下,对样品分别进行超声波提取 10、15、20、25、30、35 min,比较提取时间对黄酮类化合物提取率的影响。

1.3 项目测定

通过检测芦丁的含量检测苹果叶中总黄酮的含量^[12]。对照品溶液的配制:精确称取芦丁对照品 10 mg,置于小烧杯中,用体积分数 70%的乙醇溶解并定量转移至 50 mL 容量瓶中定容,摇匀,即得浓度为 0.20 mg/mL 的芦丁标准溶液。供试品溶液的制备:称取干燥至粉碎的苹果叶 2.0 g,置于 100 mL 带塞锥形瓶中,按试验最佳提取条件进行超声提取,提取液减压抽滤,取其滤液。将滤液定量转移至 50 mL 容量瓶中,加相同浓度的乙醇定容至刻度,摇匀、备用。测定波长的选择:精密量取芦丁标准品溶液 1.5 mL,置于 10 mL 容量瓶中,加入体积分数 70%乙醇至 5 mL。加 5%亚硝酸钠溶液 0.30 mL,摇匀,放置 6 min;再加入 10%硝酸铝溶液 0.30 mL,摇匀,放置 6 min;加入 1.0 mol/L 的氢氧化钠溶液 4.00 mL,加水至刻度,摇匀,放置 15 min。以不加芦丁对照品溶液作为空白。采用 PC-723 可见分光光度计在 440~560 nm 波长范围内测定吸光度。标准曲线:精密量取芦丁标准溶液 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 mL 分别置于 25 mL 容量瓶中,各加入体积分数 70%乙醇至 10 mL,加 5%亚硝酸钠溶液 1.00 mL,摇匀、放置 6 min;加 10%硝酸铝溶液 1.00 mL,摇匀、放置 6 min;加 4%氢氧化钠溶液 10.00 mL,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀、放置 15 min。配成浓度 0.004、0.008、0.012、0.016、0.020、0.024 mg/mL 溶液,以不加芦丁对照品溶液为空白,采用可见分光光度法在 510 nm 波长处测定吸光度。

苹果叶中总黄酮含量测定^[13]:准确吸取供试品溶液 1.5 mL 置于 25 mL 容量瓶中,加入体积分数 70%乙醇至 10 mL,加 5%亚硝酸钠溶液 1.00 mL,摇匀、放置 6 min;加 10%硝酸铝溶液 1.00 mL,摇匀、放置 6 min;加 4%氢氧化钠溶液 10.00 mL,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀、放置 15 min,采用 PC-723 可见分光光度计于 510 nm 处测定供试品溶液吸光度。以芦丁的标准曲线,总黄酮含量测定:总黄酮含量 = $A/M \times 100 \times$ 稀释倍数。式中:A 为标准曲线中的含量(mg);M 为样品的质量(g)。

1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 软件进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 苹果叶总黄酮的提取工艺优化

2.1.1 溶剂对总黄酮提取率的影响 由图 1 可以看出, 95%乙醇作为溶剂所得黄酮提取量最高, 因此超声波提取的最适溶剂为 95%乙醇。

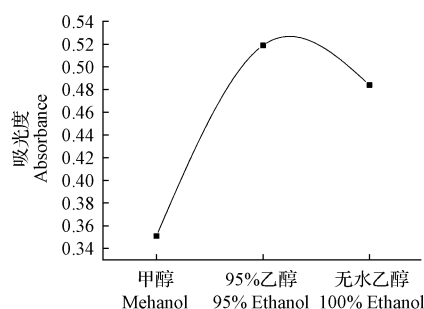


图 1 溶剂对总黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effect of solvents on total flavonoids extraction ratio

2.1.2 乙醇的不同浓度对总黄酮提取率的影响 由图 2 可以看出, 乙醇浓度为 60% 时所得黄酮提取量为最高, 因此超声波提取的最适乙醇浓度为 60%。

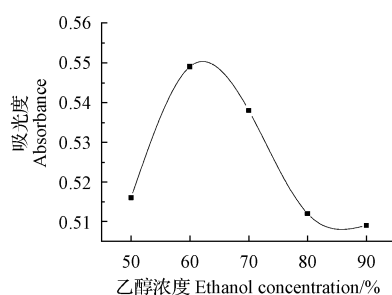


图 2 乙醇的不同浓度对总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on total flavonoids extraction ratio

2.1.3 料液比对总黄酮提取率的影响 由图 3 可以看出, 随料液比的增大, 黄酮提取效果随之降低, 在料液比 1:20 g/mL 的条件下所得黄酮类物质的提取效果最好。

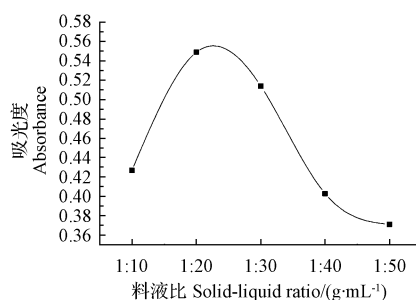


图 3 料液比对总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on total flavonoids extraction ratio

2.1.4 温度对总黄酮提取率的影响 由图 4 可以看出, 随着提取温度的升高, 苹果叶总黄酮提取效果呈上升趋势, 提取温度在 70℃ 的条件下所得黄酮类物质的提取量为最高, 所以提取温度以 70℃ 为最佳。

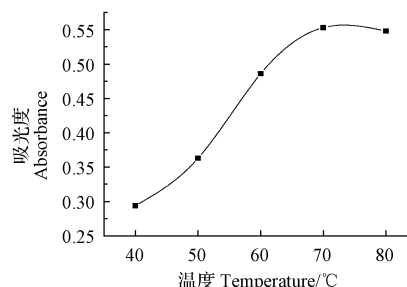


图 4 温度对总黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on total flavonoids extraction ratio

2.1.5 时间对总黄酮提取率的影响 由图 5 可以看出, 随超声波处理时间延长, 苹果叶总黄酮提取效果呈上升趋势, 提取时间在 30 min 的条件下所得黄酮类物质的提取量为最高, 所以提取时间以 30 min 为最佳。通过单因素试验表明, 超声波对提取黄酮类化合物效果的影响大小依次为不同的溶剂、乙醇浓度、料液比、温度、时间。最佳条件是乙醇作为溶剂, 乙醇浓度为 60%, 料液比 1:20 g/mL, 提取温度为 70℃, 提取时间为 30 min。

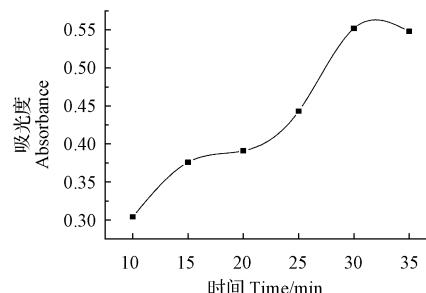


图 5 时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 5 Effect of reaction time on total flavonoids extraction ratio

2.2 苹果叶中总黄酮含量测定

2.2.1 最大吸收波长的确定 由图 6 可知, 芦丁标准溶液吸收波长增大至 510 nm 时吸光度最大, 随着波长继续增大, 吸光度又开始降低。说明芦丁标准溶液在 510 nm 波长处有固定且很强的吸收峰。因此, 选择波长 510 nm 为最大吸收波长。

2.2.2 芦丁标准曲线的绘制 由图 7 芦丁标准溶液的浓度与吸光度进行线性回归可知, 其回归方程为 $Y = 24.82143X - 0.031$, $R^2 = 0.99945$ ($n=6$), 结果表明, 芦丁标准品的质量在 4~24 μg 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.2.3 苹果叶中总黄酮含量测定结果 通过对提取条件的摸索, 选择最优方法分别对 3 个不同批次的苹果叶总黄酮含量进行测定, 由表 1 可知, 苹果叶中总黄酮的含量约为 30.28 mg/g, 且不同批次间的差异不显著。

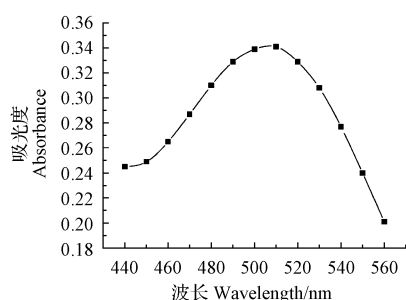


图6 芦丁标准溶液的吸收光谱

Fig. 6 The absorbance of rutin standard solvent

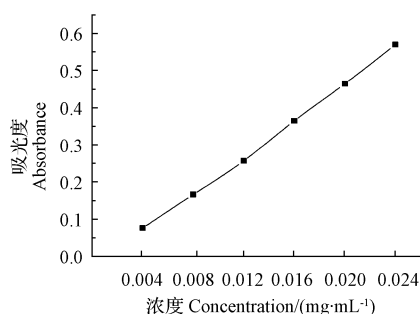


图7 芦丁标准溶液的吸收曲线

Fig. 7 The standard curve of rutin standard solution

表1 苹果叶中总黄酮含量测定

Table 1 The content of total flavone in apple leaves

批次 Batches	1	2	3	均值 Mean
吸光度 Absorbance	0.421	0.419	0.42	0.42
总黄酮含量 Total flavone content/(mg·g ⁻¹)	30.35	30.21	30.28	30.28

3 结论

通过单因素试验表明,超声波对提取黄酮类化合物效果的影响大小依次为不同的溶剂、乙醇浓度、料液比、

温度、时间。最佳条件是乙醇作为溶剂,乙醇浓度为60%,料液比1:20 g/mL,提取温度为70℃,提取时间为30 min。

采用可见分光光度法,按单因素最佳条件下测定苹果叶中总黄酮含量平均值为30.28 mg/g,超声波技术应用于苹果叶中黄酮类化合物的提取可行的。此法具有仪器方便、操作简单、快速、溶剂用量小、成本低、无毒害、准确等优点,为提高了苹果叶的利用价值及进一步开发利用可提供参考依据。

参考文献

- [1] 兰茂,于乃义,于兰馥. 滇南本草[M]. 昆明:云南科技出版社,2004.
- [2] 刘汉成,易法海,祁春节. 我国苹果的比较优势与国际竞争力分析[J]. 农产品易,2002,18(3):45-47.
- [3] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:173-177.
- [4] 汤建国. 生理活性黄酮类化合物的合成与提取新方法研究[D]. 长沙:湖南大学,2004.
- [5] 方超程. 天然化合物结构修饰是创制新药的重要途径[J]. 中国新药杂志,1994,9(2):65.
- [6] 陆曦,王磊,魏红,等. 黄酮类化合物抗氧化活性的构效关系[J]. 食品科学,2006,27(12):233-237.
- [7] 姚新生. 天然药物化学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2001.
- [8] 吴世荣. 黄酮类化合物的提取分离及定量构效关系研究[D]. 重庆:重庆大学,2005.
- [9] 郭周瑞,谢永荣,钟海山,等. 超声波提取银杏黄酮的工艺研究[J]. 赣南师范学院学报,2001(3):45-48.
- [10] 张妍,李厚伟,张永春. 山楂中总黄酮几种提取分离方法的考察及含量测定[J]. 哈尔滨医科大学学报,2001,35(3):183-184.
- [11] 毕丽君,李慧. 水芹中总黄酮类化合物最佳提取工艺的研究[J]. 食品科学,1999(12):35-37.
- [12] GANZLER K, SZINAI I, SALGO A. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique[J]. Journal of Chromatography, 1990, 520:257-262.
- [13] GUO Z K, JIN Q, FANG Q, et al. Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 436:41-47.
- [14] 严赞开. 紫外分光光度法测定植物黄酮含量的方法[J]. 食品研究与开发, 2007(28):164-165.

Extraction and Determination of Apple Leaf Total Flavonoids

Korbanjhon · BRAD¹, WANG Meng², ZHANG Xiaoying^{1,2}

(1. College of Chemistry and Biological Sciences, Yili Normal University, Yining, Xinjiang 835000; 2. College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking dry apple leaf of 'Red delicious' as test material, the optimized extraction method for the apple leaves was explored by the single factor experiment. The total flavonoids were quantitative determined by visible spectrophotometer, to supply an optimized method and methodological basis for flavonoids extraction from apple leave. The results showed that the optimum extraction conditions of apple leaves flavonoids were diluted in 60% ethanol by the ratio of 1:20 g/mL, 70℃ for 30 minutes. Under the above conditions, the flavonoids concentration in apple leaves was measured and took rutin as standard. The linear regression was good within the range of 4—24 μg of rutin and the equation was $Y=24.821\ 43X-0.031$, $R^2=0.999\ 45$ ($n=6$). The total flavonoid in apple leaves was 30.28 mg/g at average. And had set up an optimized flavonoid extraction and assessment methods for apple leave. This method is simple, rapid, accurate, precision, stable and good repeatable.

Keywords: apple leaves; total flavonoids; extraction method; concentration measurement