

三波长法测定超临界萃取九州虫草总黄酮含量

朱建民^{1,2}, 张国英³, 窦培培¹, 耿艳平¹, 冯婧¹, 凌建亚¹

(1. 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100; 2. 山东省轻工工程学校 海洋经济系, 山东 青岛 266112;

3. 山东中医药大学 药学院 山东 济南 250014)

摘要:以九州虫草为试材,采用三波长-紫外分光光度法,测定了九州虫草超临界流体萃取物中的总黄酮含量。结果表明:以芦丁为标准品,选定 244、272、302 nm 为测定波长,标准曲线回归方程为 $y=0.0253x-0.0904$ ($r^2=0.9997$);在浓度 $16\sim56\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内,△A 与浓度之间呈良好的线性关系,表明该方法稳定性好,回收率为 94.80%~97.75%,精密度 $RSD<0.67\%$ ($n=6$),超临界提取获得的虫草黄酮含量为 $1.89\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

关键词:九州虫草;黄酮类化合物;三波长-紫外分光光度法;超临界萃取

中图分类号:TQ 041;S 567.3⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)02-0132-04

天然黄酮类化合物是植物体多酚类的内信号分子及中间体或代谢物,包括黄酮、异黄酮、黄酮醇、异黄酮醇、黄烷酮、异黄烷酮、查耳酮等。鉴于黄酮类化合物具有抗癌、抗氧化、抗艾滋病毒(HIV-1)等广泛的生理药理学活性^[1],并具有保肝、降压、降血脂、镇静止痛等功效^[2],利用天然产物中的黄酮类组分进行保健品及新药(中间体)的研究与开发,具有广阔的应用前景。

九州虫草(*Cordyceps kyushuensis*)属子囊菌纲(Ascomycetes)麦角菌目(Clavicipitales)麦角菌科(Clavicipitaceae)虫草属(*Cordyceps*),是近年来发现的虫草属新纪录种^[3-4]。随着以冬虫夏草、蛹虫草为代表的该属真菌因其显著的药用价值而享有极高的声誉,其中的药用活性物质包括黄酮类化合物的研究日益引起学界的关注。

超临界流体萃取是近年来广泛应用于天然组分研究的“绿色化工提取技术”。临界点流体具有特殊的溶解能力,在改性剂作用下进行黄酮等极性组分

的萃取分离,可以有效的防止易挥发成分的逸散和活性物质的氧化破坏,操作简便安全、选择性强、产品质量高。

目前,对于总黄酮的定量测定主要采用芦丁为标准品的可见分光光度法^[5],薄层色谱法、高效液相色谱法和毛细管电泳法则用于单一黄酮成分的分离及分析^[6-7]。由于光谱吸收峰不对称影响样品的定量分析,同时干扰组分的存在易造成吸收光谱产生基线倾斜,该研究应用超临界技术萃取九州虫草,考察其紫外-可见光吸收曲线,首次采用三波长法^[8-10]对虫草总黄酮予以定量分析,力图进一步排除组分干扰,提高总黄酮定量的准确性及快捷性,以期为虫草黄酮的大规模超临界制备奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的九州虫草子座由山东大学生命学院提供,干燥、粉碎后过 60~80 目筛备用。芦丁标准储备液:芦丁(上海试剂二厂)标准品 0.040 0 g 置 10 mL 的容量瓶中,甲醇定容、摇匀置 4℃ 冰箱备用。1%三氯化铝溶液:称取 $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (国医集团化学试剂公司) 1.756 7 g,加水溶解并稀释至 100 mL。试验其它试剂均为分析纯,配制用水为双蒸水。

UV2450 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);SPE-ed SFE 型超临界萃取仪(美国 Applied Separations 公司);高纯液体 CO_2 (纯度>99.99%,北京大兴气体厂)。

第一作者简介:朱建民(1963-),男,本科,高级讲师,研究方向为天然活性组分分析与工业生产。E-mail:82348177@qq.com。

责任作者:凌建亚(1975-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事药用真菌分子系统学及天然活性组分等研究工作。E-mail:lingjian-ya@sdu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770041,30970012);山东省自然科学基金资助项目(ZR2015CM028);山东省科技攻关计划资助项目(2009GG10002063)。

收稿日期:2016-09-29

1.2 试验方法

1.2.1 超临界 CO_2 萃取虫草黄酮 精密称取 7.500 g 九州虫草粉末,加入 10 mL 超临界萃取池中。参数设置为压力 25 Mpa;萃取池温度 40 $^{\circ}\text{C}$,静态萃取 30 min,动态萃取 120 min; CO_2 流量 1.0 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,夹带剂为 70% 乙醇。提取物挥去溶剂以甲醇定容。

1.2.2 三波长的确定 分别取芦丁标准液和九州虫草黄酮样品液适量,用 1% AlCl_3 定容至 10 mL,在 200~600 nm 波长范围内测定相应的吸收曲线,根据作图法确定检测九州虫草总黄酮相应的三波长 λ_1 、 λ_2 和 λ_3 。

1.2.3 线性关系的考察 分别吸取芦丁标准储备液 25、150、200、250、300、350 mL,用 1% AlCl_3 定容至 10 mL,使其终浓度为 16、24、32、40、48、56 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在波长 200~600 nm 范围内扫描绘制其吸收曲线。在 1.2.2 确定的 3 个测定波长 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 处分别测定其吸光度值, $\Delta A = A_2 - ((\lambda_2 - \lambda_3) A_1 + (\lambda_1 - \lambda_2) A_3) / (\lambda_1 - \lambda_3)$ 。

1.2.4 精密度试验 精密配置标准浓度为 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准溶液,分别移取上述标准溶液 500、550、600、650、700 μL 到 10 mL 容量瓶中,以 1% AlCl_3 定容,配制成浓度分别为 20、22、24、26、28 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准液,在 1.2.2 确定的 3 个测定波长下 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 处分别测定其吸光度值,计算 ΔA ,求其平均浓度,标准偏差及变异系数。

1.2.5 稳定性试验 称取九州虫草总黄酮溶液适量,经适当稀释后使其 272 nm 吸光度在 0.5~1.0,在 1.2.2 确定的 3 个测定波长 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 处分别测定其吸光度值,计算 ΔA 值。在之后 20、40、60、120、180、240、360、480 min 时测样,以 ΔA 为纵坐标,时间为横坐标绘制变化曲线,观察 ΔA 随时间的变化。

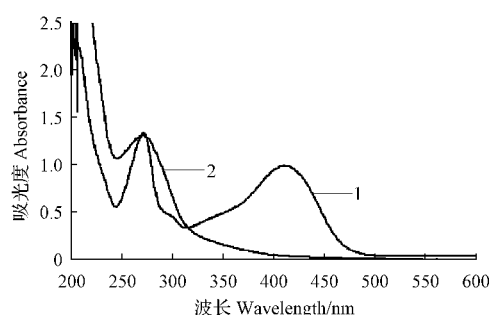
1.2.6 回收率 将九州虫草黄酮样品液稀释至总黄酮含量为 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别移取上述标准溶液 500、550、600、650、700 μL 到 10 mL 容量瓶中,在每个容量瓶中加入 500 μL 标准浓度为 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准溶液,使芦丁终浓度达到 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,以方法 1.2.2 确定的三波长测定相应 ΔA ,计算加样回收率,回收率(%)=(加标样品测定值-样品测定值)/加标量 \times 100。

2 结果与分析

2.1 标准品的选择及三波长的确定

由图 1 可知,黄酮样品液与芦丁在 240~310 nm 内均形成吸收 II 带相对应的吸收峰,最大吸收波长

272 nm;而在 350~500 nm 波长范围内,仅芦丁表现出了吸收 I 带加入铝离子络合红移的特征吸收峰。因此可以考虑选取 240~310 nm 波长范围,以芦丁为标准品,选用三波长-紫外分光光度法进行定量分析;鉴于总黄酮成分可能较为复杂,干扰组分较多,选用三波长法提高检测精度。由作图法确定 3 个测定波长分别为 $\lambda_1 = 302 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 272 \text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 244 \text{ nm}$ 。



注:1. 芦丁;2. 九州虫草总黄酮。

Note: 1. Rutin; 2. Total flavone of *Cordyceps kyushuensis*.

图 1 芦丁和九州虫草总黄酮的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of rutin and total flavone of *Cordyceps kyushuensis*

2.2 线性关系考察

根据图 2 的吸收光谱,分别测定了 20、22、24、26、28 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁溶液在 $\lambda_1 = 302 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 272 \text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 244 \text{ nm}$ 下的吸收波长, ΔA 值见表 1。

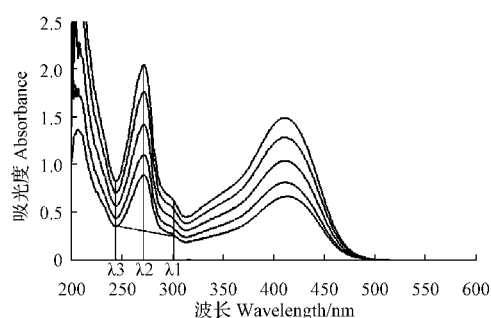


图 2 不同浓度芦丁的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra at different concentrations of rutin

根据表 1 的数据,以 ΔA 为纵坐标,芦丁浓度为横坐标进行回归分析,根据 ΔA 与浓度的关系绘制标准曲线,得回归方程为 $y = 0.0253x - 0.0904$,相关系数 $r^2 = 0.9997$,表明芦丁浓度在 16~56 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, ΔA 与芦丁浓度之间呈良好的线性关系,可按标准曲线法进行定量分析。

表 1

芦丁浓度和 ΔA 的关系

Table 1

Relationship between ΔA and rutin concentrations

芦丁浓度 Rutin concentration/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	16	24	32	40	48	56
ΔA	0.314 4	0.517 5	0.716 5	0.922 8	1.136 7	1.320 7

2.3 精密度试验

由表 2 可知,不同浓度芦丁标准溶液分别平行

测样 6 次,相对标准偏差 0.20%~0.67%,表明选用的三波长方法精密度高,符合试验需要。

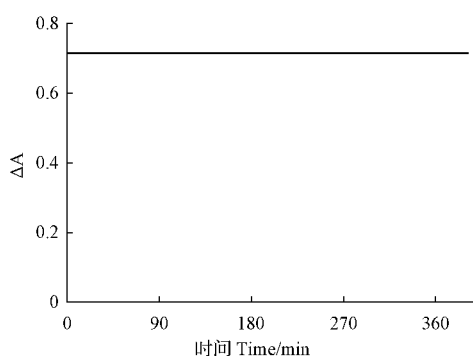
表 2

方法的精密度

Table 2

Precision of the method ($n=6$)

编号 No.	芦丁浓度 Rutin concentration/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测值范围 Found/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均浓度 Average concentration/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相对标准偏差 Standard deviation	变异系数 RSD/%
1	20.00	20.589 6~20.708 2	20.638 9	0.040 8	0.20
2	22.00	22.214 3~22.334 2	22.282 2	0.046 7	0.21
3	24.00	23.802 1~24.018 8	23.913 2	0.072 4	0.30
4	26.00	25.623 0~26.119 1	25.792 7	0.173 0	0.67
5	28.00	27.861 9~28.100 4	27.969 4	0.106 5	0.39

图 3 ΔA -时间相关曲线Fig. 3 ΔA -time relation curve

2.4 稳定性试验

稳定性试验表明,样品放置 6 h 以上,其吸光度值不变。

2.5 回收率

由表 3 可知,三波长法的加样回收率为 94.80%~97.75%。综合试验结果可知,三波长-紫外法稳定性好,可操作性较强,准确度与精密度均较高,标准曲线线性关系良好,为准确测定虫草中黄酮的含量提供了可行的方法。

表 3

方法的回收率

Table 3

Recovery of the method

编号 No.	初始量 Original /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量 Added /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量 Found /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 Recovery /%
1	20.00	20.00	38.97	94.85
2	22.00	20.00	41.55	97.75
3	24.00	20.00	42.96	94.80
4	26.00	20.00	45.45	97.25
5	28.00	20.00	47.39	96.95

2.6 样品分析

取九州虫草干粉,按 1.3 法制备总黄酮,1% AlCl_3 定容,于波长 244、272、302 nm 处分别测定吸光度值,根据 1.2.3 公式计算 ΔA 值,代入回归方程计算虫草中黄酮平均含量为 $1.89 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 结论

黄酮类物质是药用植物中重要的活性成分之一,总黄酮含量也被作为相关保健品或医药中间体的检测标准和质控指标,但由于黄酮种类繁多、成分复杂,测定其总含量时,标准品的选择、检测波长的确定及所采用的方法要格外慎重。

采用三波长法测定九州虫草超临界萃取总黄酮含量,较之原单一波长分光光度法,三波长法能有效消除随浓度不同发生的本底漂移,油脂等干扰物质及吸收峰不对称给定量分析造成的影响^[1],较好地提高了试验灵敏度和准确性,又比较简便易于操作,实用性较强,有利于工厂规模化生产中应用。

同时,前期试验中发现,前处理过程中对总黄酮进行相应的纯化有利于含量的测定。超临界流体萃取选择性强,提取效率高,较之于传统的溶剂浸提法,所得的黄酮纯度高、杂质少,后续处理步骤少,相应的也提高了测定的准确性。

参考文献

- [1] CRITCHFIELD J W, COLIGAN J E, FOLKS T M. Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(12): 6110-6115.
- [2] CACCIOLA F, JANDERA P, HAJDÚ Z, et al. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with parallel gradients for separation of phenolic and flavone antioxidants[J]. J Chromatogr A, 2007, 1149: 73-87.
- [3] THOMAS W. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass[J]. Semin Cancer Biol, 2007, 17(5): 354-362.

- [4] 郭英兰,李春燕. 中国一新记录种-九州虫草[J]. 菌物系统, 2000,19(2):296.
- [5] 丁明玉,赵纪萍,李擎阳. 贯叶金丝桃提取物中总黄酮的测定方法[J]. 分析试验室,2001,20(6):45-47.
- [6] de RIJKE E,ZAFRA-GOMEZ A. Determination of isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts; quantification and stability studies[J]. J Chromatogr A,2001,932:55-64.
- [7] LAI J P,LIM Y H,SU J, et al. Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS[J]. J Chromatogr B,2007,848(2):215-225.
- [8] 符泰然,程晓舫,范学良,等. 三波长测温中波长选取原则的理论分析[J]. 光谱学与光谱分析,2005,25(2):166-170.
- [9] 回瑞华,侯冬岩,关崇新,等. 三波长分光光度法测定沱茶中茶多酚的含量[J]. 光谱学与光谱分析,2005,25(2):266-269.
- [10] 尚永辉,孙佳娟,刘彬,等. 三波长紫外分光光度法测定葡萄籽中黄酮含量[J]. 分析科学学报,2013,29(5):706-708.
- [11] 鞠兴荣,袁建,汪海峰. 三波长紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量的研究[J]. 食品科学,2001,22(5):46-48.

Three-wavelength Ultraviolet Spectrophotometric Determination of Total Flavonoes From *Cordyceps kyushuensis* Extracted by Supercritical Fluid Method

ZHU Jianmin^{1,2}, ZHANG Guoying³, DOU Peipei¹, GENG Yanping¹, FENG Jing¹, LING Jianya¹

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100; 2. Department of Marine Economy, Shandong Light Industry Engineering College, Qingdao, Shandong 266112; 3. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250014)

Abstract: *Cordyceps kyushuensis* was used as test material, three-wavelength ultraviolet spectrophotometry was used for determining the content of total flavones in *Cordyceps kyushuensis* which was extracted by Supercritical fluid method (SFE). The results showed that regression equation of ΔA rutin standard concentration was obtained: $y = 0.0253x - 0.0904$ with a relation coefficient $r^2 = 0.9997$. Rutin concentrations in $16 - 56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ with ΔA obeyed the linear relation measured at wavelength $\lambda_1 = 302 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 272 \text{ nm}$ and $\lambda_3 = 244 \text{ nm}$. It indicated that the method had a good stability. The recovery was $94.80\% - 97.75\%$; the relative standard deviation was less than 0.67% ($n=6$). The content of total flavones extracted from *Cordyceps kyushuensis* by SFE was $1.89 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Keywords: *Cordyceps kyushuensis*; flavone; three-wavelength ultraviolet spectrophotometry; supercritical fluid extraction

认识虫草—虫草的分类(一)

知识窗

虫草是指包括冬虫夏草在内的广义虫草属真菌的总称。虫草真菌属于生物界中真菌界、真菌门、子囊菌亚门、核菌纲、麦角菌目、麦角菌科、虫草属,寄生在昆虫、蛛类、大团囊菌以及麦角菌上并形成子实体,构成了种类繁多的一大类群,在世界范围内分布广泛。虫草的种类基本上是以其有性世代的形态特征、寄主、地名、人名而取名的,所以虫草属的各种名就是各单一虫草真菌的名称。

已经发现的虫草有 400 多种。虫草主要包括冬虫夏草、蝉花虫草、亚香棒虫草、凉山虫草、新疆虫草、分枝虫草、霍克虫草、蛹虫草、武夷山虫草、龙洞虫草、张家界虫草、大塔顶虫草、多壳虫草、柔柄虫草、下垂虫草、江西虫草、四川虫草、尖头虫草、巴恩虫草、贵州虫草、赤水虫草、革翅目虫草、拟布班克虫草、珊瑚虫草、娄山虫草、鼠尾虫草、绿核虫草、泽地虫草、茂兰虫草、布氏虫草、高雄山虫草[淡黄蛹虫草]、球头虫草、金龟子虫草、螳螂虫草、沫蝉虫草、柄壳虫草、拟茂兰虫草、细虫草[黑锤虫草]、发丝虫草、金针虫草、日本虫草、辛克莱虫草、喙壳虫草、拟暗绿虫草、峨眉虫草、粉被虫草、大邑虫草、叉尾虫草、杪椌虫草、蜻蜓虫草、蚁虫草、罗伯茨虫草、九州虫草、细柱虫草、戴氏虫草、变形虫草、稻子山虫草、双梭孢虫草、古尼虫草等。

(来源:百度百科)