

板栗花粉黄酮的精制及其质谱分析

郭丽梅, 王盼盼

(天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457)

摘要: 对板栗花粉中总黄酮进行提取. 用 AB-8 大孔树脂对总黄酮进行初步分离纯化, 其最佳洗脱程序为用 200 mL 蒸馏水淋洗后使用 140 mL 70% 乙醇淋洗. 粗提液反复纯化后用液相色谱-质谱联用仪对黄酮进行定性分析. 结果表明, 经过大孔树脂纯化后总黄酮的含量由 13.39% 提高到 78.12%, 依据质谱图推断出板栗花粉中黄酮的主要成分为山奈酚、槲皮素、异鼠李素以及杨梅黄酮.

关键词: 板栗花粉; 黄酮; 精制; 质谱

中图分类号: TQ911

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2013)02-0015-04

Refinement and MS Analysis of Flavonoids in Chestnut Pollen

GUO Limei, WANG Panpan

(College of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Flavonoids in chestnut pollen were extracted by using ethanol. The crude extraction was purified with macroporous resin AB-8 using 200 mL distilled water and 140 mL 70% ethanol. The content of flavonoids after refinement increased from 13.39% to 78.12%. The flavonoids from chestnut pollen were analyzed with HPLC-MS. The result showed that there were four kinds of flavonoids in chestnut pollen, which were myricetin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin.

Key words: chestnut pollen; flavonoids; refinement; MS

黄酮类化合物是一类广泛存在于植物中的天然植物成分, 为植物多酚类的代谢物, 大多有颜色, 其相对分子质量较低且具有多种生理活性, 如抗氧化、抗自由基、抗癌、抗炎、抗病毒和降血糖等^[1-2]. 黄酮类化合物对高血压引起的头痛、项强、头晕、耳鸣等症状有明显的疗效^[1]. 黄酮在板栗花粉中含量较高^[3], 是板栗花粉中值得研究的一类具有生物活性的化合物^[4-6]. 常用的提取黄酮的方法为醇提法^[7]. 分析黄酮的方法主要有分光光度法、气相色谱法、高效液相色谱法、薄层色谱法等^[8-13]. 其中分光光度法操作简单、耗时较少, 可用于总黄酮的检测. 液相色谱质谱法分离效率高, 分析速度快, 检测灵敏度高, 可用于黄酮种类及黄酮含量的检测.

本研究采用板栗花粉作为原料, 采用醇提法对其中的黄酮进行了提取, 并采用分光光度法检测总黄酮的含量, 用高效液相色谱-质谱联用法对提取的黄酮

进行定性检测, 为板栗花粉黄酮的开发提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 原料、试剂及仪器

板栗花粉, 承德畅达天然营养品有限公司; AB-8 大孔树脂, 南开大学化工厂; 乙醇、乙腈、超纯水等试剂, 天津北方天医化学试剂厂; 芦丁、杨梅黄酮、槲皮素等标准品, 南京替斯艾么中药研究所.

旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; VIS-723G 可见分光光度计, 北京福利仪器分析公司; Waters 3100 液质联用仪, 美国 Waters 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 树脂的预处理

先用 95% 乙醇浸泡 12 h, 然后用蒸馏水洗至无醇

味,再用 4%盐酸溶液浸泡 12 h,用蒸馏水洗至中性后,用 4%NaOH 溶液浸泡 12 h,用蒸馏水洗至中性,置于 4 °C 冰箱备用。

1.2.2 黄酮提取工艺^[14]

取破壁板栗花粉 5 g 置于四口烧瓶中,加入 50 mL 70%乙醇溶液,70 °C 水浴加热提取 1.5 h,过滤得滤液 I。重复提取 1 次得滤液 II,合并滤液得到黄酮粗提液。

1.2.3 纯化工艺

取 20 mL 预处理好的大孔树脂装柱,取 10 mL 粗提液旋转蒸发至干,用 4 mL 70%乙醇进行溶解,湿法上样,用 200 mL 蒸馏水淋洗,然后依次用 140 mL 体积分数分别为 60%、70%、80%的乙醇淋洗^[15],流量为 1 mL/min,收集乙醇部分,得到乙醇洗脱液。

1.2.4 标准曲线绘制

芦丁标准液:称量 120 °C 下烘干的芦丁标准品 0.025 0 g,用 95%乙醇溶解,定容于 50 mL 容量瓶中,质量浓度为 0.5 mg/mL。

取 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 芦丁标准液于 25 mL 容量瓶中,加水 6 mL 后再加入 5%的亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min;加入 10%的 Al(NO₃)₃ 溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min;再加入 4%的 NaOH 溶液 10 mL,加水定容,摇匀,静置 15 min;4 000 r/min 离心 10 min,以不含芦丁的空白溶液为参比溶液,采用可见分光光度法在波长 510 nm 处测定吸光度,以质量浓度与吸光度绘制标准曲线^[15]。

将提取液在相同的方法下测定吸光度(A)。由回归方程算出总黄酮类化合物质量浓度。取 40 mL 的黄酮粗提液或者乙醇洗脱液蒸干,计算旋蒸瓶前后的质量差(m),蒸干后固体中总黄酮含量(P)按照式(1)计算:

$$P = \frac{(A + 0.0088) \times 40}{9.4165 \times m} \quad (1)$$

1.2.5 液相色谱-质谱分析

色谱条件:Waters 3100 高效液相色谱仪,PDA 2998 检测器,Waters 2767 收集和进样系统,Waters symmetry C₁₈ 色谱柱(5 μm, 150 mm × 4.6 mm),流动相 A 为 0.1%的甲酸水溶液,流动相 B 为 0.1%的甲酸乙腈溶液,流量为 1 mL/min,检测波长为 280、350 nm,流动相的洗脱程序见表 1。

质谱参数:毛细管电压 3.00 kV,离子源温度 110 °C,锥孔电压 30 V,抽取器电压 3 V,去溶剂化温度 300 °C,载气为高纯氮气,脱溶剂气流流量 550 L/h,反吹气流流量 50 L/h。电离方式为电喷雾

(ESI),正离子扫描模式,扫描范围质荷比(m/e)为 85 ~ 1 500。

表 1 梯度淋洗程序

Tab. 1 Process of gradient elution

时间/min	流动相组成	
	A/%	B/%
0	90.0	10.0
5	73.0	27.0
10	73.0	27.0
15	60.0	40.0
20	20.0	80.0
25	20.0	80.0
30	90.0	10.0

2 结果与分析

2.1 提取物中总黄酮含量

按 1.2.4 方法绘制标准曲线,得线性回归方程为 $A = 9.4165 X - 0.0088$, $R^2 = 0.9996$ 。不同浓度乙醇淋洗所得总黄酮的含量见表 2。

表 2 不同浓度乙醇淋洗所得总黄酮的含量

Tab. 2 Content of flavonoids and ethanol concentrations in elution

样品	含量/%
粗提液	13.39
60%乙醇洗脱液	32.49
70%乙醇洗脱液	36.12
80%乙醇洗脱液	31.56
70%乙醇重复洗脱液	78.12

由表 2 可知,粗提液中黄酮的含量为 13.39%,使用大孔树脂纯化后,总黄酮含量均有提高,较佳的洗脱液浓度为 70%乙醇,将 70%乙醇的洗脱液浓缩,重复纯化两次,得到黄酮含量为 78.12%的液相色谱-质谱待测液。

2.2 液相色谱-质谱检测黄酮种类

黄酮类物质在 280、350 nm 左右为典型吸收峰,因此同时出现在两个波长下的峰为黄酮峰,其他峰为杂质峰,将待测液在 1.2.5 液质条件下分析(图 1)。从图 1 可以看出,黄酮峰的保留时间为 6.63、6.97、7.43、7.87、8.25、8.50 min(取 350 nm 下的保留时间)。杂质在 280 nm 下有较强的干扰作用,相比于 350 nm 的谱图,该波长下各峰的分离情况较差。

黄酮类物质在正离子模式中通常表现出加氢峰 $[M + H]^+$,加钾峰 $[M + K]^+$ 或者加钠峰 $[M + Na]^+$ 的形式,并且在 ESI 电离方式得到的谱图为一二级质谱图,

通常产生较大的碎片离子和分子离子峰,可从谱图中 找到各物质相应的分子离子峰.

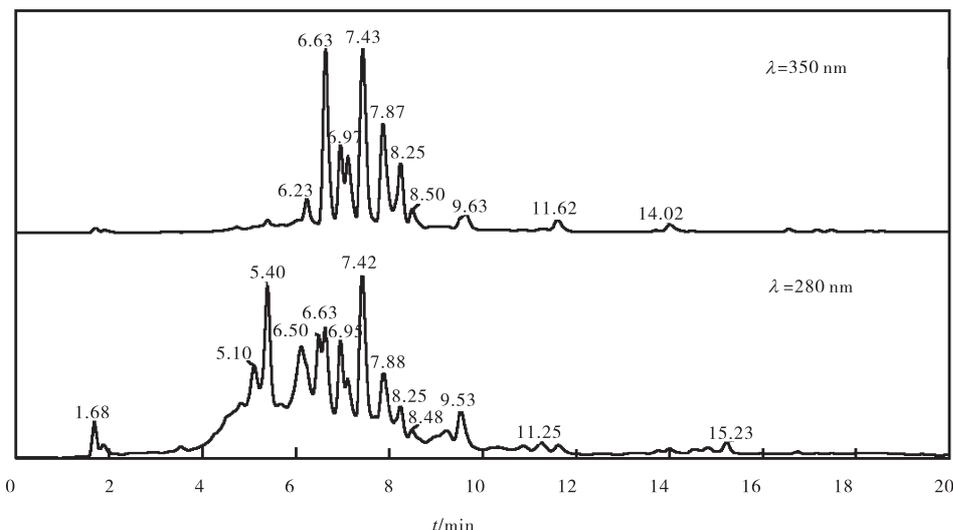


图1 待测液的液相色谱图

Fig. 1 HPLC of the extraction

依据参考文献[16-18],总结出板栗花粉中可能存在的黄酮种类见表3.

通过表3可以看出,板栗花粉中可能存在的黄酮有6种,不考虑黄酮与其他物质的结合,花粉中检测

到的黄酮为槲皮素、山奈酚、异鼠李素以及杨梅黄酮4种.为了进一步确定4种黄酮的存在,将4种黄酮的标准品在相同的质谱条件下检测,得到的标准谱图与样品谱图中的离子峰进行比较,结果见表4.

表3 板栗花粉中可能存在的黄酮及分析

Tab. 3 The kinds and analysis of flavonoids contained in chestnut pollen

组分名称	相对分子质量	常见文献峰值	在质谱中检测到的黄酮组分		
			保留时间/min	主要离子峰峰值	识别理由
山奈酚(1)	286.23	287.23[M + H] ⁺ 309.23[M + Na] ⁺ 325.23[M + K] ⁺	-	-	-
槲皮素(2)	302.23	303.23[M + H] ⁺ 325.23[M + Na] ⁺ 341.23[M + K] ⁺	7.87	303.1 479.2	该峰的分子离子峰为479.2,没有找到与之相合的物质,但主要碎片303.1为槲皮素的质子峰,因此该组分可能是槲皮素的某个结合态.
异鼠李素(3)	316.27	317.23[M + H] ⁺ 339.23[M + Na] ⁺ 355.23[M + K] ⁺	8.25	317.2 479.1	该峰的分子离子峰为479.1,没有找到与之相合的物质,但主要碎片317.2为异鼠李素的质子峰,因此该组分可能是异鼠李素的某个结合态.
杨梅黄酮(4)	318.24	319.24[M + H] ⁺ 341.24[M + Na] ⁺ 357.24[M + K] ⁺	6.63	319.2 481.2	该峰的分子离子峰为481.2,没有找到与之相合的物质,但主要碎片319.2为杨梅黄酮的质子峰,因此该组分可能是杨梅黄酮的某个结合态.
山奈酚葡萄糖醛酸苷(5)	462.36	463.36[M + H] ⁺ 485.36[M + Na] ⁺ 501.36[M + K] ⁺	8.50	287.1 463.2	该峰的分子离子峰为463.2,为(5)的质子峰,287.1为山奈酚的质子峰,因此该组分有可能为(5).
槲皮素-3-O-葡萄糖苷(6)	464.38	465.38[M + H] ⁺ 487.38[M + Na] ⁺ 503.38[M + K] ⁺	7.43	303.2 465.2	该峰的分子离子峰为465.2,为(6)的质子峰,303.2为槲皮素的质子峰,因此该组分有可能为(6).
山奈酚-3,7-O-L-二鼠李糖(7)	578.57	579.57[M + H] ⁺ 601.57[M + Na] ⁺ 617.57[M + K] ⁺	6.97	617.2	该峰的分子离子峰为617.2,为(7)的加钾峰,因此该组分有可能是(7).

表4 标准品在质谱中的行为及与样品质谱图对照
Tab. 4 The behavior of standard substance and the samples

黄酮标准品	在质谱中的表现峰值	待测液中检测的主要离子峰峰值
山奈酚	287.2	287.1
槲皮素	303.1	303.2
异鼠李素	317.2	317.2
杨梅黄酮	319.2	319.2

由表4可以初步断定,板栗花粉中可能存在的黄酮为山奈酚、槲皮素、异鼠李素以及杨梅黄酮等。

3 结论

经液相色谱-质谱联用仪的检测,初步可断定板栗花粉中含有的黄酮种类主要为山奈酚、槲皮素、异鼠李素以及杨梅黄酮,存在的形式多为游离态与葡萄糖、鼠李糖等糖的结合。粗提液经过大孔树脂纯化后总黄酮的含量由13.39%提高到78.12%,较佳的洗脱体系可选为200 mL蒸馏水和140 mL 70%乙醇,依次洗脱,流量为1 mL/min。

参考文献:

- [1] 裴凌鹏,惠伯棣,金宗濂,等. 黄酮类化合物的生理活性及其制备技术研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 203-207.
- [2] 陈华,郑军. 槲皮素对 HepG2 细胞的抑制作用及对耐药基因和 P-糖蛋白的影响[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(9): 791-794.
- [3] 武首香,包秀萍. 板栗花粉总黄酮提取及 HPLC 定量[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 270-272.
- [4] 陈玉琼,李安琪,孟燕. 大孔树脂纯化藤茶黄酮及主要成分结构鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 51-55.
- [5] 韩薇妍,魏超,赵有玺,等. 蜂花粉中总黄酮和 SOD 酶的测定[J]. 食品科技, 2009, 34(7): 257-265.
- [6] 徐秀廷,赵玉英,李广环,等. 荞麦花水溶物中黄酮的提取及含量测定[J]. 光谱实验室, 2010, 27(2): 658-660.
- [7] 唐德智. 黄酮类化合物的提取、分离、纯化研究进展[J]. 中药与天然药物, 2009, 21(12): 101-104.
- [8] Chen Haifang, Zhang Wugang, Yuan Jinbin, et al. Simultaneous quantification of polymethoxylated flavones and coumarins in Fructus aurantii and Fructus aurantii immaturus using HPLC-ESI-MS/MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 59: 90-95.
- [9] 高淑云,程熙. 麻叶千里光中总黄酮的测定分析[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 316-319.
- [10] 龚叶南. 分光光度法测定蜂花粉中的总黄酮[J]. 河南大学学报, 2009, 28(2): 121-124.
- [11] Hasegawa T, Tanaka A, Hosoda A, et al. Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. *gigantea*[J]. Phytochemistry, 2008, 69(6): 1419-1424.
- [12] 张瑞,胡娜娜,邢军. 薄层色谱法和硅胶柱层析法分离新疆紫花苜蓿中黄酮类化合物的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(1): 177-180.
- [13] 木努尔丁·托合尼牙孜,艾尔肯·艾米尔,依米提·热合曼. 新疆产蜂胶总黄酮的提取工艺优化及 GC-MS 分析[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 132-135.
- [14] 包秀萍,郭丽梅,白玉琢,等. 板栗花粉总黄酮的分离纯化工艺研究[J]. 杭州化工, 2010, 40(1): 29-31.
- [15] 田宝娟,王孟歌,康永胜. 茶花蜂花粉中总黄酮的提取与含量测定[J]. 光谱实验室, 2009, 26(2): 303-305.
- [16] 任顺成,查磊. 玉米花粉黄酮类的精制及其质谱分析[J]. 河南工业大学学报:自然科学版, 2010, 31(4): 1-4.
- [17] 杨洁,陈纯,邢建军,等. 油菜蜂花粉中黄酮类化合物提取与鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 273-278.
- [18] 杨开,叶兴乾,刘东红,等. 油菜蜂花粉中黄酮苷类的制备分离和鉴定[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(8): 91-97.

责任编辑: 郎婧