

裘纪莹,陈相艳,刘孝永,等. 银杏花粉及其发酵饮料的总黄酮含量及总黄酮测定方法比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):371-373.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.119

银杏花粉及其发酵饮料的总黄酮含量 及总黄酮测定方法比较

裘纪莹, 陈相艳, 刘孝永, 王未名, 周庆新, 张翔, 陈蕾蕾

(山东省农业科学院农产品研究所, 山东济南 250100)

摘要:为了检测银杏花粉及其发酵饮料的总黄酮含量,对银杏花粉发酵饮料的水解条件进行了优化,采用高效液相色谱-质谱联用技术对水解得到的3种苷元进行了鉴定,采用高效液相色谱(HPLC)对3种苷元的含量进行了定量分析,并换算得到银杏花粉及其发酵饮料的总黄酮含量,最后将高效液相色谱测定银杏花粉总黄酮的方法与紫外分光光度计法、比色法进行了比较。结果表明,优化的银杏花粉发酵饮料水解条件为盐酸浓度0.6 mol/L,水解时间40 min。水解液中的3种苷元分别为槲皮素、山柰酚、异鼠李素。高效液相色谱法测定的银杏花粉及其发酵饮料的总黄酮含量分别为21.40 mg/g、93.04 μ g/mL。紫外分光光度计法和比色法准确性低,干扰因素多,均不适用于银杏花粉及其发酵饮料的总黄酮测定。

关键词:银杏;总黄酮;花粉;发酵饮料;含量测定;测定方法

中图分类号: TS201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0371-03

银杏是我国特有的珍稀植物,被称为植物界的“活化石”。银杏树浑身是宝,其果、叶、苗具有重要的食用、药用、观赏价值。目前,国内外利用银杏叶、银杏果提取物开发出多种药品、保健品。但是,关于银杏花粉的研究比较少,国内学者大多仅从生物学角度研究其形态特征、生长发育、基本化学成分、人工授粉等,关于银杏花粉产品开发及活性物质研究还比较欠缺。笔者以银杏花粉为原料,采用益生菌发酵技术,研制出银杏花粉益生菌发酵饮料,采用高效液相色谱法测定银杏花粉原料及发酵饮料中总黄酮的含量,旨在为开发利用银杏资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

银杏花粉采自山东省郯城县,干燥过100目筛。银杏花粉发酵饮料由笔者所在实验室自行研制。槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品(纯度 $\geq 98\%$)均购自山东省中药化学对照品/标准品工程技术研究中心。甲醇为色谱级;浓盐酸、磷酸等均作为分析纯。

1.2 仪器与设备

Mettler AE240 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Agilent

6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 液相色谱-质谱联用系统(美国 Agilent 公司), Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司), UV-160 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司), BK-120F 型超声波清洗器(济南巴克超声波科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 待测样品制备 参照王国霞等的方法^[1]制备银杏花粉样品。精确吸取一定量的银杏花粉发酵饮料,加入一定量的浓盐酸、10 mL 100% 甲醇,总体积为 25 mL,闭塞后在天平上精确称质量,加入沸水浴中水解一定时间,快速冷却,再次称质量并用 100% 甲醇补足失质量,摇匀并过滤,用 0.45 μ m 滤膜过滤滤液,作为供试品溶液。

1.3.2 对照品溶液制备 分别精确称取干燥至恒质量的槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品,加 100% 甲醇制成浓度分别为 74.56、38 μ g/mL 的混标溶液,再用 0.45 μ m 滤膜过滤,即为对照品储备液。将储备液稀释不同倍数各进样 10 μ L,按色谱条件测定,以峰面积和浓度进行线性回归,绘制标准曲线。

1.3.3 液相色谱检测条件 ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱, 4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m; 甲醇-0.2% 磷酸水溶液(50:50)为流动相,流速:1.0 mL/min;检测波长:360 nm,柱温:35 $^{\circ}$ C,进样量:10 μ L。

1.3.4 样品测定及总黄酮计算 分别吸取各样品溶液 10 μ L,注入液相色谱仪。将色谱图中 3 种苷元的峰面积代入回归方程进行外标法定量,求出样品溶液浓度,再换算成样品含量。每个样品 3 次重复,取平均值。总黄酮含量计算公式^[2]如下:总黄酮含量 = 槲皮素含量 \times 2.51 + 山柰酚含量 \times 2.64 + 异鼠李素含量 \times 2.39。

1.3.5 质谱鉴定条件 检测模式:正离子模式;离子源:ESI(+);雾化气温度:350 $^{\circ}$ C;干燥气流速:10.0 L/min;雾化气压:30 psi(206.85 kPa);毛细管电压:3 500 V;碎裂电压:175 V;Skimmer 电压:65 V;八极射频电压:750 V;离子质量扫

收稿日期:2014-11-27

基金项目:山东省自然科学基金三院联合基金(编号:ZR2014YL020);山东省农业科学院青年科研基金(编号:2014QNM47);山东省留学人员科技活动项目择优资助(编号:人社厅函[2014]240号)。

作者简介:裘纪莹(1981—),女,浙江嵊州人,硕士,助理研究员,从事食品生物技术与农产品加工研究。E-mail:qjyfood@163.com。

通信作者:陈蕾蕾,博士,副研究员,主要从事微生物源生物活性物质研究。Tel:(0531)83179292;E-mail:chenleilei8210@163.com。

描范围:100~3 000 m/z 。

2 结果与分析

2.1 标准曲线及相关系数

将混合对照品储备液稀释不同倍数各进样 10 μL ,以峰面积(Y)与溶液的浓度(X)进行线性回归分析,得到回归方程和相关系数(r^2),分别为:

$$\text{槲皮素}: Y = 38.102X - 13.101, r^2 = 0.9999;$$

$$\text{山柰酚}: Y = 37.515X + 1.3084, r^2 = 0.9997;$$

$$\text{异鼠李素}: Y = 92.980X - 34.230, r^2 = 0.9999。$$

混合对照品溶液的色谱图见图 1,此色谱条件下 3 种对照品在 13 min 内得到良好的分离。

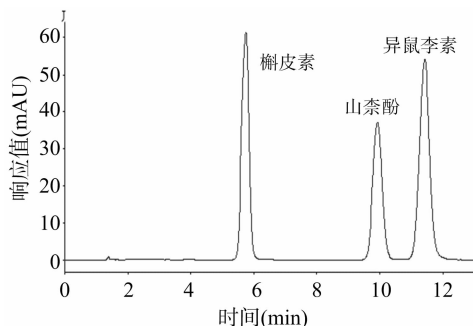


图1 混合对照品溶液的分离色谱图

2.2 银杏花粉 3 种苷元的质谱鉴定结果

采用高效液相色谱法检测样品中的黄酮苷元,银杏花粉及其发酵饮料的色谱图分别如图 2、图 3 所示,在混合对照品相同保留时间处均有出峰。

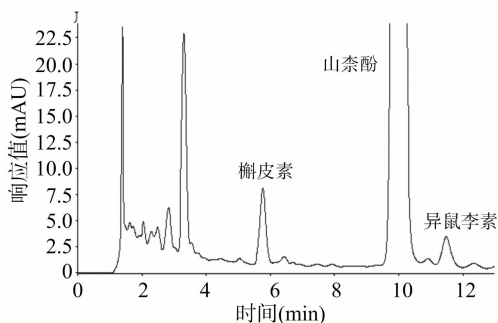


图2 银杏花粉的 HPLC 色谱图

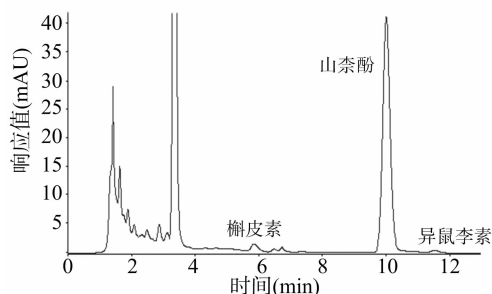


图3 银杏花粉发酵饮料的HPLC色谱图

采用液质联用技术对银杏花粉样品中与对照品相同保留时间的组分进行分析,质谱图见图 4。图 4-A 组分的保留时间与槲皮素对照品一致, $[M+H]^+$ 分子量为 303.049 6,与槲皮素对照品一致,故鉴定为槲皮素。图 4-B 组分的保留时

间与山柰酚对照品一致, $[M+H]^+$ 分子量为 287.055 2,与山柰酚对照品一致,故鉴定为山柰酚。图 4-C 组分的保留时间与异鼠李素对照品一致, $[M+H]^+$ 分子量为 317.065 3,与异鼠李素对照品一致,故鉴定为异鼠李素。

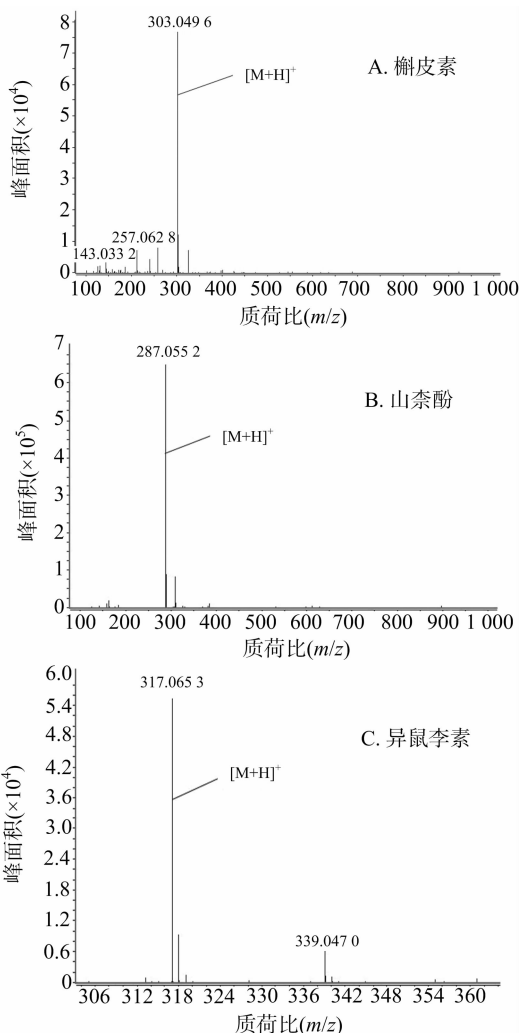


图4 银杏花粉中 3 种苷元的质谱图

2.3 银杏花粉发酵饮料水解酸度、水解时间选择

选取 3 份银杏花粉发酵饮料,采用不同的盐酸浓度、时间进行供试品溶液制备,结果如表 1 所示。

张平安等在对银杏叶及其提取物进行酸水解时发现,用 1.5 mol/L 盐酸水解效果最好^[2]。王国霞等采用 25 mL 水解液($V_{\text{甲醇}}:V_{25\% \text{ 盐酸}} = 4:1$)水解银杏花粉,水解时间为 40 min,结果表明,银杏花粉郑城 02 的槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量分别为 0.33、7.83、0.10 mg/g,总黄酮含量为 21.74 mg/g^[1]。盐酸浓度过低时水解不充分,浓度过高时苷元容易降解;将发酵饮料冷冻干燥后测得的总黄酮为 94.59 $\mu\text{g/mL}$,发酵饮料直接水解测定的总黄酮含量只有 39.83 $\mu\text{g/mL}$ 。可见,发酵饮料直接加水解液水解的方法导致测定结果偏低。原因是发酵饮料中 90% 以上是水,而银杏花粉总黄酮的含量较低,加入 25 mL 水解液($V_{\text{甲醇}}:V_{25\% \text{ 盐酸}} = 4:1$)后,盐酸浓度被进一步稀释,导致发酵饮料中的黄酮水解不充分。如果将发酵饮料冷冻干燥后测定固然结果比较准确,但是耗时耗力,成本较高。如表 1 所示,在一定量的银杏花粉发酵饮料中加入一定

表 1 不同盐酸浓度、水解时间下的 3 种苷元、总黄酮含量

盐酸浓度 (mol/L)	水解时间 (min)	槲皮素含量 ($\mu\text{g/mL}$)	山柰酚含量 ($\mu\text{g/mL}$)	异鼠李素含量 ($\mu\text{g/mL}$)	总黄酮含量 ($\mu\text{g/mL}$)
0.60	30	0.734 ± 0.023	28.744 ± 0.005	0.174 ± 0.001	78.14
0.60	40	1.086 ± 0.013	34.013 ± 0.027	0.219 ± 0.009	93.04
0.36	30	0.466 ± 0.003	20.104 ± 0.014	未检出	54.24
0.36	40	0.830 ± 0.012	31.617 ± 0.009	0.190 ± 0.002	86.01

量的浓盐酸、10 mL 100% 甲醇,总体积为 25 mL,25 mL 体系中的盐酸浓度分别为 0.60、0.36 mol/L,分别水解 30、40 min,结果表明,13.75 mL 发酵饮料中加 1.25 mL 浓盐酸、10 mL 100% 甲醇,水解 40 min 的总黄酮含量最高,为 93.04 $\mu\text{g/mL}$,与发酵饮料冻干粉的测定结果非常接近。可见,采用此方法对包括银杏花粉发酵饮料在内的银杏花粉稀溶液进行水解,操作方法比较简单,同时测定结果比较准确。

2.4 高效液相色谱法与分光光度计法的比较

采用分光光度计测定总黄酮含量主要有紫外分光光度计法^[3]、比色法^[4] 2 种方法。3 种方法测定银杏花粉及其发酵饮料总黄酮含量见表 2、表 3。

表 2 不同方法测定银杏花粉的总黄酮含量

样品	总黄酮含量(mg/g)		
	紫外分光光度计法	比色法	高效液相色谱法
银杏花粉 1	52.10	13.60	21.40
银杏花粉 2	53.91	14.29	21.46
银杏花粉 3	51.19	12.90	21.34

表 3 不同方法测定银杏花粉发酵饮料的总黄酮含量

样品	总黄酮含量(mg/g)		
	紫外分光光度计法	比色法	高效液相色谱法
发酵饮料	583.80	133.51	93.04
发酵饮料的乙酸乙酯提取液	70.25	60.50	62.51

由表 2、表 3 可知,采用紫外分光光度计法测定银杏花粉的总黄酮含量是采用比色法的 3.7~3.9 倍,是采用高效液相色谱法的 2.3~2.5 倍。采用紫外分光光度计法测定发酵饮料的总黄酮含量是比色法的 4.37 倍,是高效液相色谱法的 6.27 倍。用乙酸乙酯提取发酵饮料后,采用 3 种方法测定的总黄酮含量均明显下降。紫外分光光度计法是利用黄酮类化合物在 200~400 nm 区域内有很强的吸收带,在 258 nm 处有 1 个最大吸收峰,在 360 nm 处也有 1 个肩峰。这使得利用紫外吸收作为评价黄酮含量指标成为可能。该方法简单,但易受底液、干扰组分、溶液浑浊、吸收池不干净的影响。从发酵饮料乙酸乙酯提取前后的巨大差异可知,此方法准确度最差,非黄酮组分对结果影响很大,导致测定结果偏高。比色法是当前测定总黄酮使用最为广泛的方法,以芸香苷为标准品,利用黄酮类化合物官能团中的 3-或 5-OH 及邻二酚羟基与 Al^{3+} 络合,形成黄色物质,再加入 NaOH 生成红色,在 510 nm 处有最大吸收峰,但此方法结果易受底液、干扰组分等的影响。郭亚健等研究结果显示,黄酮类成分黄芩苷、黄芩素、香蒲新苷、山柰酚、槲皮素、橙皮苷在 500 nm 左右处无吸收或吸收较弱,非黄酮类成分咖啡酸、原儿茶醛、绿原酸、原儿茶酸在波长 500 nm 左右处有最大吸收或吸收较强,香草醛、阿魏酸等也有一定吸收^[5]。此方法专属性不强,有局限性,准确性

较差。从液相检测结果可知,银杏花粉水解后的苷元主要是山柰酚,还有少量槲皮素、异鼠李素。本研究结果表明,山柰酚对照品在 500 nm 左右处几乎无吸收,槲皮素也只有较弱吸收,故比色法测定银杏花粉时结果偏低。由于发酵饮料成分比较复杂,颜色偏深,影响比色法测定,导致结果偏高。比色法不适合用于银杏花粉及其发酵饮料总黄酮含量的测定。采用高效液相色谱法测定银杏花粉发酵饮料总黄酮,用乙酸乙酯提取后的总黄酮含量下降较多,主要是因为提取不充分以及分离、回收提取液时的损耗较大。又因为采用高效液相色谱法时杂质组分及色泽对发酵饮料总黄酮测定结果几乎无影响,故只要将银杏花粉发酵饮料直接水解即可上机测定。

3 结论与讨论

本研究表明,紫外分光光度计法、比色法均不适用于银杏花粉及其发酵饮料的总黄酮测定,高效液相色谱法专一性强,杂质和色泽影响小,准确度、精确度高,适用于银杏花粉及其发酵饮料的总黄酮含量测定。采用高效液相色谱-质谱联用技术对水解液的 3 种苷元进行鉴定,3 种苷元分别为槲皮素、山柰酚、异鼠李素。银杏花粉及其发酵饮料应采用不同的酸水解方式。发酵饮料的酸水解宜直接添加浓盐酸,以便提高水解液体系中的盐酸浓度,使水解更加充分。同时注意盐酸添加量也不宜过高,一方面过高盐酸含量会造成黄酮苷元的降解,另一方面也会变相稀释银杏花粉发酵饮料,导致其中低浓度的苷元不易检出。采用 25 mL 水解液体系盐酸浓度 0.6 mol/L 水解 40 min 比较合适。采用高效液相色谱法检测了银杏花粉及其发酵饮料的总黄酮含量。银杏花粉的总黄酮含量平均为 21.40 mg/g,发酵饮料的总黄酮含量为 93.04 $\mu\text{g/mL}$,此含量比培养液灭菌和接种前略低,主要原因可能是灭菌时的高温降解以及微生物生物转化的影响。

参考文献:

- [1] 王国霞,曹福亮,汪贵斌,等. 不同地区银杏花粉黄酮和内酯含量的差异性[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2007,31(3): 34-38.
- [2] 张平安,祝美云,高向阳,等. 反相高效液相色谱法测定银杏叶及其提取物中的总黄酮[J]. 广州食品工业科技,2004,20(4):98-100.
- [3] 陈肖家,张庆文,季 晖,等. 紫外分光光度法和高效液相色谱法测定淫羊藿总黄酮含量的比较研究[J]. 药物分析杂志,2007,27(5):625-630.
- [4] 李维莉,彭永芳,马银海,等. 银杏花粉总黄酮提取工艺优化[J]. 云南大学学报:自然科学版,2006,28(S1):252-254.
- [5] 郭亚健,范 莉,王晓强,等. 关于 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志,2002,22(2): 97-99.