

酒花黄酮提取工艺和含量测定

李 敏¹, 杨建华², 李 渊¹, 胡君萍^{1,*}

(1.新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2.新疆医科大学附属肿瘤医院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘 要: 建立酒花黄酮的提取方法和含量测定方法。采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法, 以芦丁为对照品, 通过单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交设计确定酒花黄酮的提取方法, 并测定和比较酒花、酒糟和啤酒中黄酮的含量。结果表明: 酒花黄酮提取方法为样品加入 50 倍的甲醇, 超声提取 2 次, 每次 1h, 酒花黄酮含量为 69.98mg/g, 酒糟和啤酒中黄酮的含量较低。对照品芦丁在 10.2~40.8 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内与吸光度呈良好线性关系, 平均回收率 99.33%, $\text{RSD}=3.60\%$ 。该提取方法合理, 含量测定方法简便、快速、准确, 可用于酒花黄酮提取物制备及其质量控制。

关键词: 酒花; 黄酮; 提取工艺; 含量测定

Optimization of Extraction Process and Content Determination of Total Flavonoids in *Humulus lupulus* L.

LI Min¹, YANG Jian-hua², LI Yuan¹, HU Jun-ping^{1,*}

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Ürümqi 830011, China;

2. Affiliated Tumor Hospital, Xinjiang Medical University, Ürümqi 830011, China)

Abstract: Ultrasonic extraction conditions for total flavonoids from *Humulus lupulus* L. were optimized by single factor experiments and orthogonal design with the aim of establishing a sample preparation method for determination of the content of total flavonoids in *Humulus lupulus* L. by $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ colorimetric method using rutin as the reference. The optimal extraction process parameters were material-to-liquid ratio of 1:50, extraction duration of 1 h and repeated extraction number of 2. The content of total flavonoids from *Humulus lupulus* L. was 69.98 mg/g under the optimal extraction conditions, which was much higher than that of residues and beer. The linear range was between 10.2 $\mu\text{g/mL}$ and 40.8 $\mu\text{g/mL}$ with a correlation coefficient of 0.9985. The average recovery rate was 99.33% with a relative standard deviation of 3.60%. The extraction and determination methods were simple and feasible, which is suitable for the preparation and quality control of flavonoids extracted from *Humulus lupulus* L.

Key words: *Humulus lupulus* L.; total flavonoids; extraction; determination

中图分类号: O623.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)06-0016-04

啤酒花 *Humulus lupulus* L. 是桑科(Moraceae)葎草属(*Humulus* Linn.)多年生草质蔓生藤本植物, 其雌性球穗花序简称酒花^[1]。酒花是一种使用历史悠久的药食同源植物, 不仅用于啤酒的酿制, 还具有抗菌和镇静作用, 传统医学用作结核病、麻风病、神经衰弱症的治疗^[2-3]。酒花原产欧洲, 主产地分布于美国、欧洲、澳大利亚、南美洲和中国, 我国新疆天山、阿尔泰山的山坡林间有大量野生分布, 在东北、华北有栽培^[4]。酒花富含树脂、挥发油、多酚、黄酮等多种生物活性成分, 其中黄酮类成分(酒花黄酮)是代表酒花多种生物活性的一类重要物质。酒花黄酮包括黄

酮醇糖苷和异戊二烯查尔酮两类, 前者主要包括黄芩苷、异槲皮素、芸香苷、山柰酚苷等成分, 具有抗病毒、抗菌、抗肿瘤、抗氧化等活性^[5]; 后者包括黄腐酚、异黄腐酚、异戊二烯基柚皮素等成分, 为酒花所特有, 具有预防癌症和抑制癌细胞扩增^[6-9]、抗病毒^[10]、抗菌^[11]、抗氧化^[12]及雌激素样作用^[13]。酒花黄酮结构类型多样、生物活性显著、在啤酒花中含量高、药食用途广泛, 显示了良好的开发利用前景。新疆是酒花的主产区, 酒花资源丰富, 但其药用价值尚未得到有效开发。本实验建立酒花黄酮的提取工艺和含量测定方法, 比较不同酒花样品的黄酮含量, 为

收稿日期: 2010-04-18

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划重点项目(XJEDU2009I24)

作者简介: 李敏(1983—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事天然药用植物资源的开发与利用研究。E-mail: hjp-yft@163.com

*通信作者: 胡君萍(1971—), 女, 副教授, 博士, 主要从事新疆特色药用资源的开发与利用研究。E-mail: yjh-yft@163.com

进一步制备酒花黄酮提取物及其功能性开发利用提供一定参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

颗粒酒花(产地新疆吉木萨尔县)经新疆医科大学药学院胡君萍副教授鉴定为啤酒花 *Humulus lupulus* L.; 啤酒花及酒糟样品干燥, 粉碎, 过 40 目筛, 冷藏备用。颗粒酒花、酒糟、啤酒 新疆乌苏啤酒厂。

芦丁标准品 中国药品生物制品检定所; 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、95% 乙醇、甲醇、乙酸乙酯、丙酮(均为分析纯)。

ST-02A 型多功能粉碎机 永康帅通工具有限公司; AB104-N 电子天平 上海 Mettler Toledo 公司; SX721 分光光度计 山东高密分析仪器厂; KQ300DE 型数控超声清洗机(功率 300W, 频率 400kHz) 昆山市超声仪器有限公司; KD-S2.4 数显恒温水浴锅 金坛市医疗仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 酒花黄酮测定原理^[14]

在黄酮类化合物溶液中加入铝离子试剂后, 黄酮类化合物中的酚羟基与铝离子生成络合物, 控制适宜的 pH 值, 所生成的络合物在可见区能获得特征吸收峰, 其质量浓度与吸光度符合比尔定律, 其颜色深浅与黄酮类化合物的量成一定的比例关系, 可以定量测定。

1.2.2 对照品溶液的配制

精密称取干燥至质量恒定的芦丁对照品 25.5mg, 置于 50mL 容量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度 0.51mg/mL 的对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备

精密称取颗粒酒花粉末 1g、酒糟粉末 3g, 加入 50 倍体积的甲醇溶液, 超声提取 2 次, 每次 1h, 过滤, 合并滤液, 浓缩, 定容至 50mL, 摇匀, 即分别制得酒花供试品溶液和酒糟供试品溶液。

啤酒临用前超声 20min 去除泡沫, 即得啤酒供试品溶液(每 100mL 啤酒的质量为 4.1382g)。

1.2.4 测定波长的选择

精密吸取酒花供试品溶液 1mL, 置于 10mL 容量瓶中, 加入 5% NaNO_2 溶液 0.3mL, 摇匀, 放置 6min 后加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.3mL, 放置 6min, 再加入 10% NaOH 溶液 4.0mL, 摇匀, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀。以溶剂代替供试品溶液同法制备空白对照, 15min 后扫描 200~800nm 波长范围的吸光度, 确定最大吸光度在 510nm, 因此分光光度法选择 510nm 为测定波长。

1.2.5 标准曲线的制备

精密量取芦丁对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、

1.0、1.2、1.4、1.6mL 于 10mL 容量瓶中, 分别加入 5% NaNO_2 溶液 0.3mL, 摇匀, 放置 6min 后加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.3mL, 放置 6min, 再加入 10% NaOH 溶液 4.0mL, 摇匀, 用溶剂稀释至刻度, 15min 于波长 510nm 处测定吸光度。以质量浓度 $C(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标、吸光度 A 为纵坐标, 建立标准曲线, 得回归方程: $A=0.0108C-0.023$, $r=0.9985$, 表明芦丁在 10.2~40.8 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内与吸光度呈良好线性关系。

1.2.6 精密度假实验

精密吸取酒花供试品溶液 0.3mL, 按 1.2.5 节方法测定吸光度 6 次, 其 RSD 为 2.46%。

1.2.7 稳定性实验

精密吸取酒花供试品溶液 0.3mL, 按 1.2.5 节方法, 每隔 0.5h 测定 1 次吸光度, 共测 5 次, 计算吸光度的 RSD 为 1.33%, 表明显色液在 2.5h 内较稳定。

1.2.8 重复性实验

精密吸取 0.3mL 酒花供试品溶液 6 份, 按 1.2.5 节方法测定吸光度, 计算结果的 RSD 为 2.00%。

1.2.9 回收率实验

精密吸取酒花供试品溶液 9 份各 0.15mL, 分别加入对照品溶液(0.51mg/mL)0.2、0.4、0.6mL, 按 1.2.5 节方法测定吸光度, 计算回收率和 RSD。结果见表 1。

表 1 回收率实验结果
Table 1 Results of recovery rate experiments

实验号	样品量/mg	加标量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.2099	0.102	0.3074	95.60	99.33	3.60
2	0.2099	0.102	0.3102	98.32		
3	0.2099	0.102	0.3139	102.0		
4	0.2099	0.204	0.4111	98.63		
5	0.2099	0.204	0.4139	99.99		
6	0.2099	0.204	0.4204	103.2		
7	0.2099	0.306	0.5213	101.8		
8	0.2099	0.306	0.5019	95.41		
9	0.2099	0.306	0.5130	99.04		

1.2.10 酒花黄酮提取工艺优化

在建立酒花黄酮含量测定方法的基础上, 采用单因素试验筛选了酒花黄酮的 5 种提取溶剂(水、乙醇、甲醇、丙酮和乙酸乙酯)和 4 种提取方法(冷浸法、回流法、索式提取法和超声法); 并采用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 考察了溶剂体积、提取时间和提取次数对酒花黄酮含量的影响, 优化并确定了酒花黄酮的最佳提取工艺。

1.2.11 样品中黄酮含量测定

按 1.2.3 节分别制备酒花、酒糟和啤酒供试品溶液各 6 份, 精密吸取酒花供试品溶液 0.3mL、酒糟供试品溶液 4.0mL、啤酒供试品溶液 4.0mL, 按 1.2.5 节方法测

定吸光度, 代入回归方程计算各供试品中黄酮的含量 [黄酮含量/(mg/g)= $CDV/m \times 100$, 其中 C 为样品溶液质量浓度/($\mu\text{g/mL}$), V 为样品溶液稀释后总体积/mL, D 为样品稀释倍数, m 为样品质量/g]。

2 结果与分析

2.1 酒花黄酮提取工艺的筛选

2.1.1 提取溶剂的选择

精密称取颗粒酒花粉末 1g 共 10 份, 分别加入水、乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯各 50 mL, 超声提取 30min, 过滤。精密吸取滤液 1.0mL, 按 1.2.5 节方法测定吸光度, 另取 25mL 滤液浓缩干燥, 计算浸膏得率 [浸膏得率/%= 浸膏质量 \times 2/ 样品质量 \times 100]。结果见表 2。

表 2 不同溶剂提取液的吸光度和提取率($n=2$)

Table 2 Absorbance and extraction rates of the extracts using different extraction solvents ($n=2$)

溶剂	水	乙醇	甲醇	丙酮	乙酸乙酯
吸光度	0.447	0.933	1.061	0.396	0.300
浸膏得率/%	23.05	24.34	28.62	19.21	18.51

由表 2 可知, 各溶剂对酒花黄酮提取率差异明显, 以甲醇溶液的吸光度和浸膏得率为高, 因此选择甲醇为酒花黄酮的提取溶剂。

2.1.2 提取方法的选择

精密称取颗粒酒花样品粉末适量, 加入 50 倍量甲醇溶液, 分别采用冷浸法(室温浸泡 30min)、回流法(75℃水浴回流 30min)、索式提取法(75℃水浴至提取液无色)和超声法(超声 30min)提取, 提取液冷却至室温, 补足质量损失, 过滤。分别取滤液 1.0mL, 按 1.2.5 节方法测定吸光度, 另取 25 mL 滤液浓缩干燥, 计算浸膏得率。结果见表 3。

表 3 不同提取方法所得提取液的吸光度和提取率($n=2$)

Table 3 Absorbance and extraction rates of the extracts using different extraction methods ($n=2$)

提取方法	冷浸法	回流法	索式提取法	超声法
吸光度	1.007	1.201	1.037	1.203
浸膏得率/%	25.06	30.90	30.39	29.93

结果表明, 上述提取溶液中以超声法吸光度略高, 而回流法浸膏得率略高, 考虑到超声法简便易行, 故采用超声法提取酒花黄酮。

2.1.3 酒花黄酮提取工艺优化

在以上单因素试验的基础上, 采用 $L_9(3)^4$ 正交设计

(表 4), 确定酒花黄酮最佳提取工艺。精密称取酒花样品粉末各 1g, 以甲醇为提取溶剂, 采用超声提取法, 优选溶剂体积、提取时间和提取次数, 提取液过滤, 滤液浓缩并定容至 50mL。精密吸取上述溶液 0.3mL, 按 1.2.5 节方法测定吸光度, 按回归方程计算黄酮的含量。结果见表 5。

表 4 酒花黄酮提取正交试验的因素和水平

Table 4 Factors and levels of orthogonal tests for optimizing the extraction conditions of flavonoids

水平	因素			
	A 溶剂体积 / 倍	B 提取时间 / h	C 提取次数	D 空白
1	25	0.5	1	
2	50	1.0	2	
3	75	1.5	3	

表 5 酒花黄酮提取正交试验结果($n=2$)

Table 5 Results and analysis of orthogonal tests for optimizing the extraction conditions of flavonoids ($n=2$)

水平	因素			黄酮含量/(mg/g)
	A 溶剂体积 / 倍	B 提取时间 / h	C 提取次数	
1	1	1	1	60.25
2	1	2	2	65.84
3	1	3	3	59.54
4	2	1	2	64.63
5	2	2	3	68.45
6	2	3	1	57.30
7	3	1	3	62.93
8	3	2	1	62.62
9	3	3	2	64.63
k_1	61.88	62.60	60.06	
k_2	63.46	65.64	65.03	
k_3	63.39	60.49	63.64	
R	1.58	5.15	4.97	

由表 5 极差分析可得, 各因素对黄酮提取工艺的影响顺序为 B (提取时间) $> C$ (提取次数) $> A$ (溶剂体积), 酒花黄酮最佳提取工艺 $A_2B_2C_2$, 即精密称取供试品粉末适量, 加入 50 倍体积甲醇溶液、超声提取 2 次、每次 1h。

2.2 样品中黄酮含量测定

分别制备酒花、酒糟和啤酒供试品溶液, 按 1.2.10 节方法测定各供试品中的黄酮含量。实验结果见表 6。结果表明, 上述 3 种样品中, 颗粒酒花黄酮含量最高, 其次为商品啤酒, 而酒糟中黄酮含量很低。

表 6 3 种供试品中的黄酮含量($n=6$)

Table 6 Contents of total flavonoids in three samples ($n=6$)

供试品	颗粒酒花	酒糟	啤酒
黄酮含量/(mg/g)	69.98	0.44	3.19

3 结 论

本研究采用单因素和正交试验确定了酒花黄酮的提

取工艺,即精密称取供试品粉末适量,加入50倍体积甲醇溶液、超声提取2次、每次1h。并以芦丁为对照品,采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法测定颗粒酒花、酒糟和啤酒中黄酮的含量,方法操作简便、稳定性和重现性好,对设备要求低,是检测酒花黄酮的可靠方法。

啤酒酿造企业使用的酒花制品有全酒花、酒花粉、颗粒酒花、酒花浸膏、酒花油制品等^[15]。本实验的研究对象颗粒酒花是世界上使用最广泛的酒花制品,它是将粉碎至一定规格的粉状酒花压制成直径为2~8mm,长约15mm的短棒,充以惰性气体并包装,因此颗粒酒花能有效防止酒花中有效成分的氧化和损失。酒花黄酮是酒花多酚的重要组成部分^[16],本研究结果表明,颗粒酒花、酒糟和啤酒3种酒花样品的黄酮含量差异很大,其中颗粒酒花黄酮含量最高,达69.98mg/g,而酒糟中黄酮含量极低,不足颗粒酒花的1%。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴: 第1册[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 502.
- [2] 周娟, 邹翔, 季宇彬. 啤酒花的有效成分及活性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2005(4): 414-417.
- [3] 欧阳军. 啤酒花化学药理研究与临床应用[J]. 中国民族医药杂志, 1999(1): 95.
- [4] 朱丹, 牛广才, 姜述君, 等. 酒花的化学成分及药理作用[J]. 中国药业, 2008, 17(21): 1-2.
- [5] 李隽, 崔承彬, 蔡兵, 等. 啤酒花黄酮的研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(7): 1110-1114.
- [6] PAN L, BECKER H, GERHAUSER C. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway[J]. Mol Nutr Food Res, 2005, 49(9): 837-843.
- [7] HO Y C, LIU C H, CHEN C N, et al. Inhibitory effects of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) on human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Phytother Res, 2008, 22(11): 1465-1468.
- [8] COLGATE E C, MIRANDA C L, STEVENS J F, et al. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells[J]. Cancer Lett, 2007, 246(1/2): 201-209.
- [9] DELMULLE L, BELLAHCENE A, DHOOGHE W, et al. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines[J]. Phytomedicine, 2006, 13(9/10): 732-734.
- [10] WANG Qian, DING Zhihui, LIU Jikai, et al. Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops *Humulus lupulus*[J]. Antiviral Res, 2004, 64(3): 189-194.
- [11] GERHAUSER C. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites[J]. Mol Nutr Food Res, 2005, 49(9): 827-831.
- [12] STEVENS J F, MIRANDA C L, FREI B, et al. Inhibition of peroxynitrite-mediated LDL oxidation by prenylated flavonoids: the alpha, beta-unsaturated keto functionality of 2'-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore[J]. Chem Res Toxicol, 2003, 16(10): 1277-1286.
- [13] MILLIGAN S R, KALITA J C, POCOCK V, et al. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(12): 4912-4915.
- [14] 努尔阿米娜·阿尤甫, 阿不都拉·阿巴斯. 曼陀罗种子中总黄酮含量测定及提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 260-263.
- [15] 朱恩俊. 酒花及酒花制品在啤酒工业中的应用[J]. 中国食物与营养, 2006(8): 25-28.
- [16] 刘玉梅, 汤坚, 刘奎舫. 啤酒花的化学研究及其和啤酒酿造的关系[J]. 酿酒科技, 2006(2): 71-75.