

微乳薄层层析法分离桑叶中的黄酮类化合物

李升锋, 徐玉娟, 陈智毅, 刘学铭, 张友胜, 吴继军

(广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工公共实验室, 广东 广州 510610)

摘 要: 研究了桑叶中黄酮类化合物的微乳薄膜层析分离方法。用 10% 甲酸调酸, 以含水量 70% 的十二烷基硫酸钠-正丁醇-正庚烷-水微乳液为展开剂, 在聚酰胺薄膜上使桑叶黄酮类化合物分离。分离结果表明: 桑叶乙醇提取物中分离出 12 个斑点, 与用正丁醇-乙酸-水为展开剂的常规层析方法相比, 微乳薄膜层析法的检测灵敏度更高, 分离效果更好。

关键词: 微乳液; 薄膜层析; 桑叶; 黄酮类化合物

Separation of Flavonoids from Mulberry Leaves by Microemulsion Thin Layer Chromatography

LI Sheng-feng, XU Yu-juan, CHEN Zhi-yi, LIU Xue-ming, ZHANG You-sheng, WU Ji-jun

(Sericulture and Farm Produce Processing Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Open Access Laboratory of Agricultural Product Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: This study proposes a method for the separation of flavonoids from mulberry leaves by microemulsion thin layer chromatography. By using 10% formic acid for the pH adjustment, as well as with SDS/n-C₄H₉OH/n-C₇H₁₆/H₂O micromulsion containing 70% water as the eluant, on the polyamide spots, the flavonoids are separated by the proposed method. The results indicated that twelve spots can be obtained from ethanol extracts of mulberry leaves. It is also indicated that, compared with the common chromatography method with C₄H₉OH/CH₃COOH/H₂O as the eluant, the proposed microemulsion chromatography is of greater sensitivity of detection with better separation effect.

Key words: misroemulsion; thin- layer chromatography; mulberr method leaves; flavonoid

中图分类号: Q946.839

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0087-03

桑叶为桑科落叶乔木或灌木桑树(*Morus alba* L.)的叶片, 营养丰富, 具有多种药用价值, 已经被国家卫生部正式列入“既是食品又是药品”的名单。近年来, 桑叶在医药和食品领域中得到了广泛的应用, 人们对桑叶的化学成分、药理作用、临床应用等方面进行了较深入的研究^[1], 但对其生理活性成分研究尚十分有限, 不能完全明确其保健机理, 制约了其多元化及精深加工的开发与利用。大量实验证明植物中的黄酮类化合物具有良好的抗氧化等保健功效^[2], 其分离提取已成为农产品深加工的重要方向。传统的黄酮类化合物层析分离及鉴定的效率和灵敏度不高, 利用微乳液来进行层析可以提高灵敏度和分离效率^[3-4]。本研究将初步建立桑叶黄酮类化合物分离鉴定的微乳薄层层析法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

收稿日期: 2007-07-19

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(05100575)

作者简介: 李升锋(1976-), 男, 助理研究员, 研究方向为果蔬深加工。E-mail: risemount@sina.com.cn

2006 年 5 月采摘, 供试桑叶于广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所花都基地, 60℃烘干至恒重, 粉碎, 过 60 目筛。

正丁醇、正庚烷、乙醇、盐酸、甲酸、乙酸、三氯化铝均为分析纯; 十二烷基硫酸钠(SDS)为化学纯; 标准品芦丁、槲皮素 中国药品生物制品检定所。

色谱用聚酰胺薄膜 台州四青生物化学材料厂; 点样毛细管 华西医科大学仪器厂; ZF-1 三用紫外分析仪 上海精密仪器厂。

1.2 微乳液的配制

按照表面活性剂、助表面活性剂正丁醇和正庚烷的质量比为 3.9:5.2:0.9, 混合后加适量纯净水搅拌溶解, 再加一定比例的纯净水配成含水量分别为 10%、30%、50%、70% 和 90%(V/V, 下同)的微乳液, 混匀后静置 24 h 备用^[4]。

1.3 微乳层析液的配制

将以上配成的各含水量的微乳液加甲酸, 分别配成 10.0:0、9.5:0.5、9.0:1.0(V/V)的微乳层析液。

1.4 桑叶溶液配制

按溶剂与桑叶粉末的质量比为 10:1 的比例, 用 70% 乙醇, 在 80℃ 条件下回流提取 2h, 过滤, 滤液为待分离的桑叶溶液。

1.5 标准品溶液的配制

称取标准品 10mg, 分别用无水乙醇配制成芦丁 2mg/ml, 槲皮素 0.5mg/ml 的标准品溶液。

1.6 薄层色谱分离鉴定

分别用毛细管吸取标准芦丁和槲皮素的标准品溶液、桑叶乙醇提取液, 在聚酰胺薄膜上点样, 点样直径为 1~2mm, 用微乳层析液为展开剂, 室温下展开 8cm, 取出晾干, 喷 1%(质量分数)三氯化铝甲醇溶液显色晾干后置于 365nm 紫外灯下检测荧光斑点。以常用展开剂正丁醇-乙酸-水(4:1:5, V/V)进行聚酰胺薄层色谱分离实验, 比较两种展开剂对桑叶黄酮类化合物的分离效果。

2 结果与分析

2.1 微乳展开剂含水量对层析效果的影响

以芦丁和槲皮素标准品进行聚酰胺薄膜微乳层析实验, 结果见图 1。

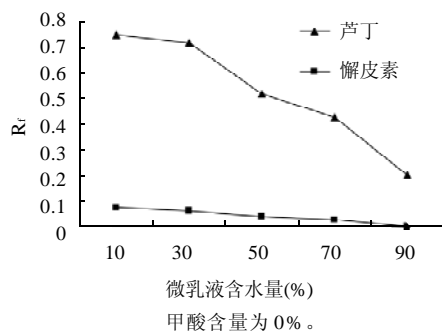


图1 芦丁和槲皮素的R_f值与微乳液含水量的关系

Fig.1 Relationship between R_f of both rutin and quercetin and water content of microemulsion

从图 1 中可以看出, 微乳液的含水量可显著影响黄酮化合物的分离效果, 标准品芦丁和槲皮素的 R_f 值(比移值, 下同)随着微乳液中的含水量增加而逐渐减小, 与梁淑芳等^[3-4]报道的结果基本一致。

2.2 微乳展开剂含水量对层析时间的影响

将标准芦丁、槲皮素点样于聚酰胺薄膜, 测定其在不同含水量的微乳液中层析 8cm 距离所需要的时间, 结果见表 1。

表1 聚酰胺薄膜在不同含水量的微乳液中的层析时间

Table 1 Thin-layer chromatography time of microemulsion with different water contents

含水量(%)	10	30	50	70	90
层析时间(h)	15.3	12.3	4.7	3.3	0.8

注: 甲酸含量 0%。

由表 1 可见, 微乳液的含水量对层析时间有显著的影响, 含水量越低, 层析 8cm 距离所需的时间越长。综合考虑含水量与 R_f 值的关系, 选择含水量为 70% 的微乳液作为展开剂较为合适, 这与韩明^[5]报道的结果基本一致。

2.3 微乳展开剂酸度对层析效果的影响

将标准品芦丁和槲皮素点样于聚酰胺薄膜, 测定其在不同含酸量的微乳层析液中层析 8cm 距离所需要的时间, 结果见表 2。

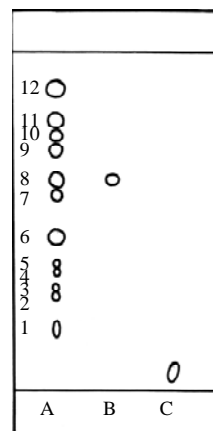
表2 聚酰胺薄膜在不同甲酸含量的微乳液中的层析效果

Table 2 Thin-layer chromatography effect of microemulsion with different methanoic acid contents

甲酸含量(%)	0	5	10
芦丁 R _f 值	0.425	0.524	0.613
槲皮素 R _f 值	0.025	0.026	0.028
层析时间(h)	3.3	2.7	2.3
拖尾现象	严重	有拖尾	无拖尾

注: 含水量 70%。

由表 2 可见, 微乳层析液含酸量越低, 层析 8cm 距离所需的时间越长, R_f 值也越小, 同时发现不加甲酸和含酸量为 5% 的层析点都有明显拖尾, 含酸量为 10% 的层析点没有发现拖尾现象, 这与韩明^[5]报道的一致。综合以上结果, 选择甲酸含量 10%、含水量 70% 的微



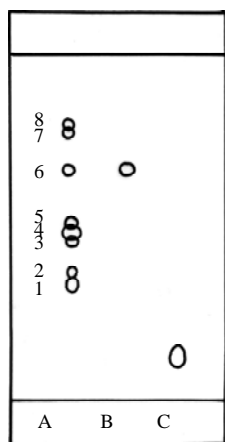
A. 桑叶样品; B. 芦丁标准品; C. 槲皮素标准品。

图2 桑叶黄酮的微乳薄层色谱图

Fig.2 Miroemulsion thin-layer chromatogram of flavonoids from mulberry leaves

乳层析液作为展开剂较为合适。

2.4 桑叶黄酮类化合物微乳色谱分析效果



A. 桑叶样品; B. 芦丁标准品; C. 槲皮素标准品。

图3 桑叶黄酮的常规薄层色谱图

Fig.3 Normal thin-layer chromatogram of flavonoids from mulberry leaves

将桑叶的乙醇提取液在聚酰胺薄膜上用甲酸体积分数为10%、含水量为70%的微乳层析液于室温下进行展开,结果见图2。由图2可见,桑叶乙醇提取液中的黄酮类化合物能被微乳液较好地分离,共得到12个斑点。所有的斑点的 R_f 与标准品芦丁和槲皮素的 R_f 值比较可见,斑点8的 R_f 值与标准品芦丁的 R_f 值一样,说明桑叶的醇提取物含有芦丁,本研究没有从桑叶乙醇提取物中分离到槲皮素。

将标准品和桑叶提取液点样于聚酰胺薄膜上,用常规的展开剂正丁醇-乙酸-水(4:1:5, V/V/V)进行层析时,

实验结果见图3。由图3可见,桑叶醇提取物得到8个斑点,得到的斑点拖尾现象很严重,部分斑点彼此分开界限不明显。因此,利用调酸后微乳液作为展开剂进行聚酰胺薄膜色谱分离黄酮化合物的方法要优于常规使用的黄酮分离法。

3 结 论

3.1 桑叶乙醇提取物的黄酮类化合物可用体积分数为10%的甲酸调酸后的十二烷基硫酸钠-正丁醇-正庚烷-水(质量比为11.7:15.6:2.7:70.0)组成的微乳层析液,通过聚酰胺薄膜色谱法能得到较好的分离。

3.2 利用调酸后的微乳薄层层析色谱法可从桑叶乙醇提取物中分离出12个斑点。从标准品与样品的 R_f 比较及斑点的亮度来看,桑叶乙醇提取物中含有较多的芦丁,没有分离到槲皮素。从斑点的位置和数量来看,各组分中还含有其它黄酮类化合物,需要进一步的研究。

3.3 调酸后的微乳薄层析法分离桑叶黄酮类化合物效果优于常规的薄层层析法,并且操作简便、准确。

参考文献:

- [1] 刘学铭,肖更生,陈卫东. 桑叶的研究与开发进展[J]. 中药材, 2001, 24(2): 144-178.
- [2] 梁桂荣,郭海明. 黄酮苷类化合物分离鉴定的研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(4): 310-312.
- [3] 梁淑芳,马耀光,马柏林. 山楂黄酮的薄层色谱分离鉴定研究[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(4): 86-88.
- [4] 梁淑芳,马绒利,马柏林. 火棘黄酮类化合物的提取及微乳薄层色谱分离鉴定[J]. 西北林学院学报, 2003, 18(3): 60-62.
- [5] 韩明,曾庆孝,肖更生,等. 微乳层析分离鉴定青梅提取物中的黄酮类成分[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2005, 33(6): 85-88.