

鱼腥草总黄酮的提取纯化及黄酮类型的初步鉴定

郭艳华, 许江扬

(江汉大学化学与环境工程学院, 湖北 武汉 430056)

摘 要: 研究了乙醇提取鱼腥草黄酮的最佳工艺, 并测定其含量。结果表明: 鱼腥草黄酮得率最高的提取工艺为: 用乙醇浓度为 60% 的溶液浸提, 鱼腥草干粉质量(g)与乙醇溶液体积(ml)比例为 1:50, 提取温度为 70℃, 时间为 70min, 使用聚酰胺对提取物中的黄酮类化合物进行纯化处理, 得率为 0.586%。对鱼腥草黄酮进行了理化性质、薄层色谱和紫外-可见光谱分析, 初步确定鱼腥草黄酮为黄酮醇类化合物。

关键词: 鱼腥草; 黄酮; 黄酮醇; 紫外-可见光谱

Extraction and Purification of *Houttuyniae cordata* Flavonoids and Identification of Flavonoids Type

GUO Yan-hua, XU Jiang-yang

(School of Chemistry and Environmental Engineering, Jiangnan University, Wuhan 430056, China)

Abstract: In this research, extraction of flavonoids-natural antioxidant in *Houttuyniae cordata* by alcohol was studied. Meanwhile, contents of flavonoids were assayed. Results showed that the 60% density alcohol as extraction solution, the optimum conditions are: *Houttuyniae cordata* powder quantity with alcohol solution volume 1:50, temperature 70 °C and the time 70 min. The *Houttuyniae cordata* flavonoids were purified by polyamide, and the yield of flavonoids reached 0.586%. *Houttuyniae cordata* flavonoids was identified as flavonol by physical and chemical properties analysis, TLC and UV-VIS.

Key words: *Houttuyniae cordata*; flavonoids; flavonol; UV-VIS

中图分类号: Q946.885.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)09-0287-05

鱼腥草为三白草科蕺菜属植物蕺菜的全草, 始载于《名医别录》, 是国家卫生部正式确定为“药食两用”的品种之一, 其性味辛、寒, 具有清热解毒、消肿排脓、利尿通淋的功效。鱼腥草主要含有丰富的黄酮类化合物、挥发油、有机酸及脂肪酸, 故有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、增强人体免疫力等药理作用。关于鱼腥草的研究, 国内主要集中在药用痰热喘咳、热痢热淋、痛肿疮毒及挥发油的研究上^[1-2], 而对鱼腥草黄酮提取工艺的系统研究较少。本实验研究鱼腥草总黄酮的最佳提取工艺, 对总黄酮进行定量测定, 并通过其理化性质、色谱、波谱等实验手段分析, 初步确定鱼腥草黄酮的类型。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料和试剂

鱼腥草 武汉隆泰医药公司。

聚酰胺、硅胶 G、无水乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、氨水、三氯化铝、金属钠、乙酸、镁粉、硼酸、硫酸亚铁、水杨酸、30% 过氧化氢等均为分析纯; 芸香苷(芦丁)、槲皮素、金丝桃苷等均为生化试剂。

1.1.2 仪器

2SZ15D 紫外灯(15W)、721 分光光度计、RE-S2 旋转蒸发仪、DKB-501A 超级恒温水浴锅、SHB-III 循环水式多用真空泵、DF110 型电子分析天平、KQ-250 超声波清洗器、UV-2401 紫外可见分光光度计。

1.2 方法

收稿日期: 2007-08-12

基金项目: 湖北省科技攻关项目(2004AA101c87)

作者简介: 郭艳华(1960-), 女, 副教授, 主要从事天然产物的提取及应用研究。

1.2.1 鱼腥草总黄酮提取方法

1.2.1.1 最佳提取溶剂的选择

称取8份1g的鱼腥草粉末,分别放入8个250ml的烧杯,再分别加入60ml 8种不同的溶剂:(1)蒸馏水、(2)无水乙醇、(3)30%乙醇、(4)60%乙醇、(5)95%乙醇、(6)丙酮-乙醇(1:1)、(7)丙酮、(8)乙酸乙酯;浸泡,12h后抽滤,滤液用30%乙醇定容于100ml容量瓶中,然后各取4ml提取液代替芦丁,按测定标准曲线同样的方法测定提取液中总黄酮含量。

1.2.1.2 提取工艺流程

鱼腥草→洗净→烘干→粉碎→乙醇加热回流→过滤→乙醇提取液→聚酰胺纯化→减压浓缩至膏状(回收乙醇)→干燥得黄色粉末

1.2.1.3 最佳提取条件的确定

按1.2.1.1实验选择好最佳提取溶剂,在温度、固液比、提取次数、提取时间等单因素试验的基础上,考虑各因素之间的相互影响,利用正交法“均衡分散”的特点^[3],以主要影响因素提取时间、提取温度、固液比为考察因素,选用 $L_9(3^3)$ 正交表进行工艺优化试验。因素水平见表1。

表1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A时间(min)	B温度(℃)	C固液比
1	50	50	1:50
2	60	60	1:60
3	70	70	1:70

按正交设计,称取9份1g的鱼腥草粉末,分别放入9个有标号的圆底烧瓶中,加相应体积的乙醇溶液,进行正交加热回流实验,从而确定最佳条件。

1.2.2 鱼腥草黄酮的纯化工艺研究

聚酰胺对于黄酮类物质(多元酚类)是比较理想的吸附剂,因其具有多个酰胺基,在水溶液中与酚羟基通过氢键结合而被吸附,一些不被吸附的物质则随水流去。本实验用聚酰胺新树脂吸附法对提取液进行纯化。

将聚酰胺新树脂初步处理后装柱,以每小时约3倍体积的流速,将约5倍的乙醇通过树脂层,至流出液加水不变混,再以每小时约6倍体积的流速将去离子水通过树脂层,置换出乙醇即可使用。先将初提取液进行预处理:用95%的乙醇沉淀,初步除去提取液中的多糖、蛋白质等杂质,过滤,滤液即为预处理提取液。精确称取处理后的树脂,定量加入预处理提取液,充分吸附后,过滤,测定滤液中剩余黄酮浓度,按下式计算树脂室温下的吸附量(mg/ml):

$$Q = \frac{(C_0 - C_1)V}{W}$$

式中, Q 为吸附率(mg/ml); C_0 为初始浓度(mg/ml); C_1 为剩余浓度(mg/ml); V 为溶液体积(ml); W 为树脂质量(g)。

树脂解吸方法为取吸附饱和树脂,精密加入80%乙醇,浸泡10h,过滤,滤液即为精制的鱼腥草黄酮提取液,测定黄酮浓度,计算解吸率为98.8%。

1.2.3 鱼腥草总黄酮含量的测定

采用 $Al(NO_3)_3-NaNO_2$ 比色法^[4],以芦丁为标样,在500nm处测定鱼腥草总黄酮含量。标准曲线的回归方程式: $Y=0.1499A-0.00816$, 相关系数 $r=0.9992$ 。

1.2.4 鱼腥草黄酮类化合物的性质及结构类型鉴定

1.2.4.1 物理性质

利用旋转蒸发器将提取的精制黄酮液蒸发,得到灰色浸膏,分别用蒸馏水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚及NaOH稀溶液将其进行溶解性实验,观察现象。

1.2.4.2 显色反应

取6支试管,每个试管中加入1ml 50%乙醇浸提液,在5支试管中分别加入少量氨水、 $AlCl_3$ 、碳酸钠、浓硫酸、镁粉+浓盐酸等试剂,在自然光和紫外光下观察。

1.2.4.3 薄层色谱法鉴定

精密称取标准品芸香苷(芦丁)、槲皮素、金丝桃苷各10mg,取提取物相当于标准品总黄酮10mg,分别置于10ml容量瓶中,加50%乙醇溶液并稀释至刻度,摇匀。按下列步骤操作。

(1)薄层板的制备 在100ml烧杯中放置1%(质量分数)羧甲基纤维素钠水溶液12ml,逐渐加入4g硅胶G,不断振荡调成均匀糊状,铺板,于120℃下烘干0.5h。

(2)点样 在距薄层板一端约1.5cm处轻轻画出点样的起始点标记,然后用毛细管吸取50%乙醇提取液点加到板上,点样后可吹一下点样原点,以便溶剂迅速挥发,原点直径应小于5mm。样点与标准液点应在同一薄层板的同一起始线,两相邻斑点中心之间距离应大于1.5cm,重复点几次。

(3)展开 将点上样品的薄层板分别置于装有氯仿-甲醇-水(3:5:0.25)的展开剂的层析缸中展开,原点不要浸入展开剂的液面,整个展开过程在密闭的层析缸中进行。

(4)显色 取出薄层板,待薄层板上展开剂基本挥发,用1% $AlCl_3$ 均匀喷在薄层层析处理后的薄层板上显色,风干,紫外光下观察,记录斑点位置,由 $R_f=X/L$ (式中, X 为分离出的黄酮类化合物移动的距离; L 为展开剂移动的距离), 计算 R_f 值。

表2 不同溶剂提取物的总黄酮含量
Table 2 Contents of flavonoids in extracts of different solvents

溶剂	水	无水乙醇	30% 乙醇	60% 乙醇	95% 乙醇	丙酮-乙醇(1:1)	丙酮	乙酸乙酯
浓度(mg/ml)	0.0190	0.0051	0.0326	0.0398	0.0066	0.0074	0.0057	0.0339

表4 线性回归方程的比较
Table 4 Comparison of linear regression equation

标准溶液浓度(mg/ml)	0.0144	0.0288	0.0576	0.0864	0.1151	直线回归方程	相关系数
标准曲线	0.139	0.251	0.449	0.640	0.810	$C=0.1499A-0.00816$	$r=0.9992$
工作曲线	0.140	0.247	0.441	0.625	0.788	$C=0.1550A-0.00900$	$r=0.9992$

1.2.4.4 紫外-可见光谱法鉴定

紫外-可见光谱法通常用于鉴定黄酮类型或测定它们的结构^[5,7],不同类型的黄酮I、II带的峰型、峰位和强度有所不同,可以此判定黄酮类型,再在黄酮类化合物的甲醇溶液中分别加入某些电解质甲醇钠、乙酸钠、甲醇钠+硼酸、 $AlCl_3$ 、 $AlCl_3$ +浓HCl等诊断试剂,进一步推断含氧取代基的数目与位置。

(1)制备溶液 ①取50%甲醇提取液10ml,加水稀释至100ml;②甲醇稀释液:取10ml50%甲醇加水稀释至100ml;③在小烧杯中加入20ml甲醇,放入米粒大小金属钠,得到甲醇钠;④同上制备乙酸钠;⑤取④10ml,加少量硼酸,得甲醇钠+硼酸;⑥用50%甲醇配制1% $AlCl_3$ 20ml;⑦取⑥10ml,加入10滴浓盐酸,得 $AlCl_3$ +HCl。

(2)测紫外-可见光谱以②试剂为参比液。(I)取①5ml测紫外光谱,得图2曲线①;(II)取①5ml+10滴③试剂,测紫外光谱,得图2曲线②;(III)取①5ml+10滴④试剂,测紫外光谱,得图3曲线③;(IV)取①5ml+10滴⑤试剂,测紫外光谱,得图3曲线④;(V)取①5ml+10滴⑥试剂,测紫外光谱,得图4曲线⑤;(VI)取①5ml+10滴⑦试剂,测紫外光谱,得图4曲线⑥。

2 结果与分析

2.1 鱼腥草黄酮类化合物的最佳提取工艺

2.1.1 最佳提取剂的选择

根据实验1.2.1.1的操作步骤,得到不同提取剂提取的总黄酮结果见表2。

由表2可知,60%乙醇为最佳提取溶剂,故本实验选择60%乙醇为提取剂。

2.1.2 最佳提取工艺条件的确定

按1.2.1.3进行 $L_9(3^3)$ 正交试验,结果见表3。

由极差的大小可以知道,其影响因素大小为:温度>时间>固液比,故最佳提取工艺为 $A_3B_3C_1$,即时间70min,温度70℃,固液比1:50,用60%乙醇为提取剂加热回流提取。

表3 $L_9(3^3)$ 正交试验结果
Table 3 Results of $L_9(3^3)$ orthogonal test

实验号	因素			
	A时间(min)	B温度(℃)	C固液比	总黄酮含量(mg/ml)
1	50(1)	50(1)	1:60(2)	0.0420
2	50(1)	60(2)	1:50(1)	0.0598
3	50(1)	70(3)	1:70(3)	0.0866
4	60(2)	50(1)	1:50(1)	0.0604
5	60(2)	60(2)	1:70(3)	0.0697
6	60(2)	70(3)	1:60(2)	0.0742
7	70(3)	50(1)	1:70(3)	0.0609
8	70(3)	60(2)	1:60(2)	0.0812
9	70(3)	70(3)	1:50(1)	0.0990
K_1	0.0628	0.0544	0.0731	
K_2	0.0681	0.0702	0.0658	
K_3	0.0804	0.0866	0.0724	
极差 R	0.0176	0.0322	0.0073	

2.2 鱼腥草粗黄酮的纯化方法

实验发现,聚酰胺是黄酮类物质(多元酚类)比较理想的吸附剂,用聚酰胺吸附粗黄酮提取液,以除去与黄酮物质共存的其它杂质。但经聚酰胺处理后,对黄酮含量有无影响未知。为此,设计了以下实验:以芦丁为标准,对标准曲线逐点式按样液处理操作,经聚酰胺吸附后测定,以此制作工作曲线,其标准曲线法与工作曲线法对比实验结果见表4和图1。

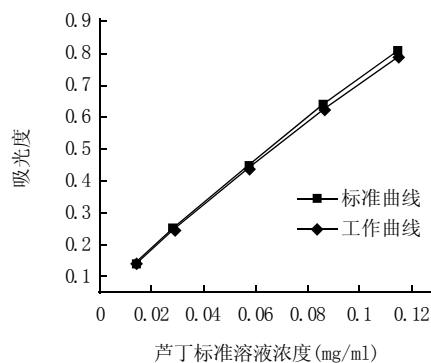


图1 标准曲线与工作曲线的比较
Fig.1 Comparison of normal curve and working curve

由此可见,两曲线的斜率和截距接近,曲线几乎

重叠, 相关系数均为 0.9992 这说明提取液经聚酰胺处理后对黄酮含量没有影响。将样液处理后的聚酰胺用正丁醇洗脱, 洗脱液减压蒸发至膏状, 以 30% 乙醇溶解测定黄酮含量, 结果未检出, 证明经本法处理后黄酮已基本全部回收。按最佳提取工艺条件, 根据 1.2.1.2 提取工艺流程, 精制黄酮得率为 0.586%。

2.3 鱼腥草黄酮类化合物的性质及结构类型

2.3.1 物理性质

鱼腥草提取物其浸膏呈灰黄色, 微溶于蒸馏水, 可溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚及 NaOH 稀溶液, 这说明鱼腥草提取物可能属于黄酮醇、黄酮化合物^[5]。因为黄酮醇、黄酮化合物存在共轭体系且为平面型分子, 分子间作用力大, 在水中的溶解性较小。易溶于稀碱的原因是这类化合物多有酚羟基取代, 故显酸性。

2.3.2 显色反应结果

根据 1.2.4.2 的操作方法, 得到提取液中加入各种显色剂的显色反应实验结果见表 5。

表 5 显色反应结果
Table 5 Results of chromogenic reaction

甲醇提取液	氨水	AlCl ₃	碳酸钠	浓硫酸	盐酸镁粉
可见	紫外	可见	紫外	可见	紫外
灰黄	黄绿	黄	亮黄	黄	绿荧光
			黄棕	黄橙	黄

由实验结果可知, 提取液显色反应现象与黄酮醇和黄酮化合物相似^[5-6]。黄酮醇和黄酮化合物可经盐酸镁粉还原生成花色素而显色; 能与铝盐反应生成有颜色的配合物, 是因为黄酮醇和黄酮化合物分子中有邻二酚羟基。能与酸和碱的反应也是与分子内酚羟基及 γ -吡喃酮环有关。

2.3.3 薄层色谱法鉴定结果

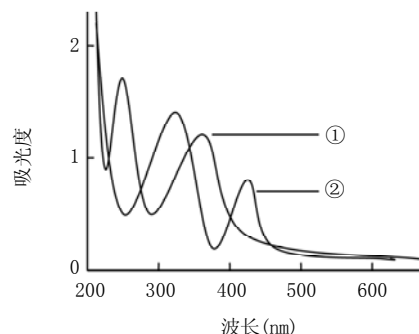
按 1.2.4.3 的操作方法, 鱼腥草提取物经硅胶薄层层析, 得到 6 个斑点, 其中有 2 个斑点最为明显, 说明提取物中含量较大。6 个斑点的 R_f 值均小于 0.6, R_f 值的范围在 0.441~0.532 之间, 说明提取物中主要含槲皮素及衍生物(黄酮苷)^[5,7]。用 3 个标准品(缺其它标准品)对比实验得到, R_f 值为 0.532 的为槲皮素, R_f 值为 0.447 的为芸香苷(芦丁), R_f 值为 0.449 的为金丝桃苷。槲皮素的斑点最为明显, 含量最多。由于芸香苷、金丝桃苷都为槲皮素衍生物, 另 3 个斑点的 R_f 值也在黄酮苷的范围内, 因此可能还含槲皮素的另 3 个衍生物: 槲皮苷、异槲皮苷、瑞诺苷。槲皮素及衍生物属于黄酮类化合物中的黄酮醇类化合物。

2.3.4 紫外-可见光谱鉴定与分析

2.3.4.1 紫外-可见光谱测定结果

按 1.2.4.4 的操作方法, 测定了鱼腥草提取物的甲醇

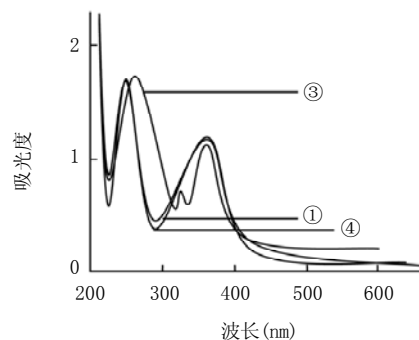
溶液及加入各种诊断剂后的紫外-可见光谱, 结果见图 2~4、表 6。



① 稀释的甲醇提取液; ② 稀释的甲醇提取液 + 甲醇钠。

图 2 吸收光谱(I)

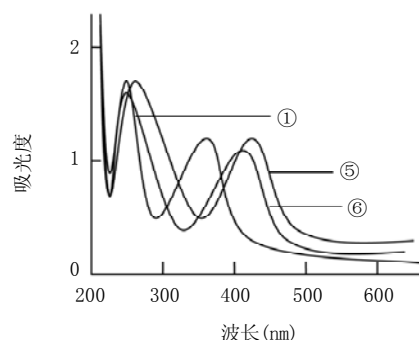
Fig.2 Absorption spectra (I)



① 稀释的甲醇提取液; ③ 稀释的甲醇提取液 + 乙酸钠; ④ 稀释的甲醇提取液 + 乙酸钠 + 硼酸。

图 3 吸收光谱(II)

Fig.3 Absorption spectra (II)



① 稀释的甲醇提取液; ⑤ 稀释的甲醇提取液 + 三氯化铝; ⑥ 稀释的甲醇提取液 + 三氯化铝 + 浓盐酸。

图 4 吸收光谱(III)

Fig.4 Absorption spectra (III)

2.3.4.2 分析与讨论

(1) 鱼腥草提取物的甲醇溶液的紫外-可见光谱即图 2 中曲线①的吸收峰值是: 峰 II 是 256nm, 在 240~280nm 之间, 峰 I 是 369nm, 在 352~385nm 之间, 这说明鱼

表6 鱼腥草提取物的甲醇溶液及加入各种诊断剂后的
紫外-可见光谱的变化

Fig.6 Changes of UV-VIS spectra in CH₃OH extraction of
Houttuynia cordata and enter diagnosis

试剂	λ_{max} (nm)			试剂	λ_{max} (nm)	
	谱带I	谱带II	谱带III		谱带I	谱带II
甲醇	369	256		乙酸钠+硼酸	370	257
甲醇钠	420	315		三氯化铝	428	271
乙酸钠	370	270	327	三氯化铝+浓盐酸	415	257

腥草提取物主要是黄酮类化合物中的黄酮醇类物质^[5], 这与显色反应和薄层色谱的结果一致。

(2) 鱼腥草提取物的甲醇溶液中加入各种诊断剂后的紫外-可见光谱的变化都发生了红移。曲线②中因为甲醇钠的强碱性, 使黄酮的所有酚羟基解离, 引起相应的吸收峰红移, 根据红移的差值判断, 是由于3, 3', 4' OH的存在, 或有3位O-糖苷键; 曲线③中因为乙酸钠的碱性较弱, 而且在327nm处出现小峰, 指示分子中可能有7位OH的存在; 曲线④中加入乙酸钠+硼酸, 在乙酸钠的碱性下, 硼酸可以和黄酮类化合物中邻二酚羟基络合, 使吸收带红移, 根据峰1红移数值, 进一步证明了B环上有邻二酚羟基存在。曲线⑤中加入氯化铝, 提取液中的黄酮类物质可能含有3羟基或5羟基, 或邻二羟基, 与氯化铝形成二螯合物, 使吸收带红移; 曲线⑥与曲线⑤比较曲线⑥中又加入盐酸后, 螯合物分解, 光谱图又相对紫移, 说明黄酮类物质含有3', 4' OH。综合以上分析鱼腥草提取物中物质的分子结构与槲皮素及衍生物相似, 黄酮化合物母核及槲皮素结构见图5, 当槲皮素中3-OH被糖基取代后即成为槲皮素衍生物。这说明鱼腥草提取物主要是黄酮醇类物质槲皮素及

衍生物^[5-7]。

3 结 论

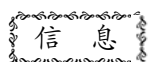
3.1 经正交试验得到鱼腥草黄酮的最佳提取工艺条件为提取剂为60%的乙醇加热回流法提取, 时间70min、温度70℃、固液比1:50, 影响因素温度>时间>固液比。

3.2 鱼腥草黄酮的纯化方法采用聚酰胺新树脂吸附法。实验证明: 聚酰胺对于鱼腥草黄酮是比较理想的吸附剂, 用吸附提取液的饱和树脂解吸, 解吸率约98.8%, 且对黄酮含量的测定没有影响。按最佳提取工艺条件提取, 经纯化, 精制黄酮得率为0.586%。

3.3 综合鱼腥草提取液的理化性质、薄层色谱鉴定和紫外光谱鉴定与分析得知: 鱼腥草中的黄酮类化合物主要物质是黄酮醇类化合物, 主要有槲皮素及衍生物, 含槲皮素、芸香苷(芦丁)、金丝桃苷; 可能含槲皮苷、异槲皮苷、瑞诺苷等。

参考文献:

- [1] 钟地长, 张淑凤, 陈振锋, 等. 天然产物黄酮类化合物的提取、纯化及其金属配合物的研究进展[J]. 化学世界, 2006(9): 561-564.
- [2] 吴佩颖. 鱼腥草的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(3): 64-67.
- [3] 丁利君, 吴振辉, 蔡畅海, 等. 金银花中黄酮类物质最佳提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 62-66.
- [4] 范维刚, 解成喜, 李峰, 等. 罗布麻中总黄酮含量的测定[J]. 光谱实验室, 2005, 22(3): 464-466.
- [5] 陈业高. 植物化学成分[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 223-239.
- [6] 徐任生. 天然产物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 91-97.
- [7] 哈成勇. 天然产物化学与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 338-343.



美科学家: 克隆家畜的肉奶产品是安全的

美国食品和药物管理局近日宣布, 科学家长期研究得出结论, 克隆家畜以及它们后代的肉和奶产品是安全的, 人们可以放心食用。

美药管局的科学家在一份报告中说, 克隆动物以及它们后代的肉、奶产品可以进入市场销售而不用贴上特别标签。这表明, 该机构将会在下周发表的安全评估报告中, 支持使用克隆技术来繁殖牛、羊和猪。

报告指出, 所有的研究显示, 克隆家畜的肉及奶制品的成分并未超出美国民众食用的普通家畜的肉及奶制品的成分。这份报告将刊登在《国际动物繁殖杂志》上。

美药管局的这份报告引起食品安全人士的反响。华盛顿食品安全中心执行主任金布雷尔指出, 美药管局一直试图将这种“糟糕的科学”强加给人们, “在许多美国人对克隆食品仍心存疑虑时, 得出这样的结论过于草率”。

美国的许多农场主实际上已经在为获取肉和奶制品而克隆家畜。尽管在美药管局的要求下, 农场主们曾一度自愿暂停向市场提供克隆家畜制品, 但近两年, 一些克隆家畜的后代仍被拉到屠宰厂宰杀。

据调查, 64%的美国人对于克隆动物感到不舒服, 43%的人相信来自克隆动物的食物制品不安全。