

拳卷地钱总黄酮的提取与纯化

朱 华¹, 邹登峰², 肖建波^{3,*}, 谢爱泽², 何翠薇²

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西中医学院, 广西 南宁 530001;

3. 中南大学化学化工学院, 湖南 长沙 410083)

摘 要: 本文系统地研究了溶剂、浓度、温度、时间对拳卷地钱总黄酮提取的影响, 优化了工艺, 得到了最佳条件: 80% 乙醇、74℃、提取 2h, 提取率达 1.90%; 并对拳卷地钱总黄酮的提取物进行纯化, 选择了溶剂萃取-硅胶柱层析纯化拳卷地钱总黄酮提取物, 纯度达 95.63%, 总收率 94.47%。

关键词: 拳卷地钱; 总黄酮; 提取; 纯化

Extraction and Purification of Flavones from *Marchantia convoluta*

ZHU Hua¹, ZOU Deng-feng², XIAO Jian-bo^{3,*}, XIE Ai-ze², HE Cui-wei²

(1. Guilin Medical College, Guilin 541004, China;

2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: A method for leaching and purifying the flavones from *Marchantia convoluta* was established. The article studied four different solvents to extract flavones from *Marchantia convoluta* with different concentration, temperature and time. The optimum conditions were: 80 %ethanol at 74℃ extracted for 1 hour. The average yield of flavones from *Marchantia convoluta* was 1.90 %.

Key words: *Marchantia convoluta*; flavones; leaching and purifying

中图分类号: Q949.751.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)10-0156-04

地钱又名地衣, 广泛分布于各地, 多生于阴暗潮湿的地方^[1]。地钱的药用始载于《名医别录》,《本草纲目》中谓之“石衣”, 味淡, 性凉, 归肝经^[2]。具有清热利湿、解毒敛疮之功效。资源调查表明广西境内存在 3 种地钱科植物, 其中以拳卷地钱(*Marchantia convoluta*)为主^[3]。民间常用拳卷地钱来治疗急性肝炎。目前国内外对拳卷地钱的研究报道较少, 拳卷地钱的化学成分主要包括黄酮和挥发油等^[4~7]。

天然药用植物中黄酮类化合物的提取常用有机溶剂提取法、碱提法、水提法、超临界萃取法、微波法、超声法等方法^[8~12]。拳卷地钱总黄酮的提取和纯化国内外文献尚未见报道。本文用甲醇、乙醇、丙酮和水在不同浓度、温度、时间下提取拳卷地钱总黄酮, 采用铝盐显色可见分光光度法测定总黄酮含量, 得到了最佳工艺条件: 80% 乙醇、74℃、提取 2h, 提取率达

1.90%; 并对拳卷地钱的黄酮提取物进行纯化化工艺研究, 最后选择了溶剂萃取-硅胶柱层析法纯化拳卷地钱总黄酮提取物, 纯度达 95.63%, 总收率 94.47%。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

旋转蒸发器 上海申生仪器厂; 紫外可见分光光度计 756MC 上海分析仪器厂; 甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇等试剂均为 AR 级, 硅胶 青岛海洋化工厂、硅藻土、AB-8 树脂和聚酰胺均为 AR 级。拳卷地钱药材 广西中医学院提供。

1.2 拳卷地钱总黄酮的测定

移取 40.00 μg/ml 芦丁乙醇溶液 0、2、3、4、5、6、7ml 于 25ml 容量瓶中, 加入 0.50mol/L NaNO₂ 溶液 1ml, 摇匀, 静置 5min 后, 加入 0.30mol/L AlCl₃ 溶液

收稿日期: 2004-02-16

* 通讯作者

基金项目: 广西壮族自治区科技攻关项目(桂科攻 0235022—1B); 广西壮族自治区回国人员科技基金项目(桂科回 0009004)

作者简介: 朱华(1959-), 男, 教授, 博士, 主要从事中草药开发方面研究。

1ml, 摇匀, 加入 1.00mol/L NaOH 溶液 5ml, 60% 乙醇定容至刻度, 用 1cm 比色皿, 以 60% 乙醇作参比, 于波长 525nm 处测其吸光度, 得到芦丁标准溶液的工作曲线。用最小二乘法进行回归, 得到吸光度值 A 与芦丁标准溶液的浓度 C(μg/ml)的关系曲线:

$C = -0.0153 + 0.03003A$, 回归系数 $r = 0.9997$, $RSD = 0.16\%$ 。
校准曲线如图 1 所示。

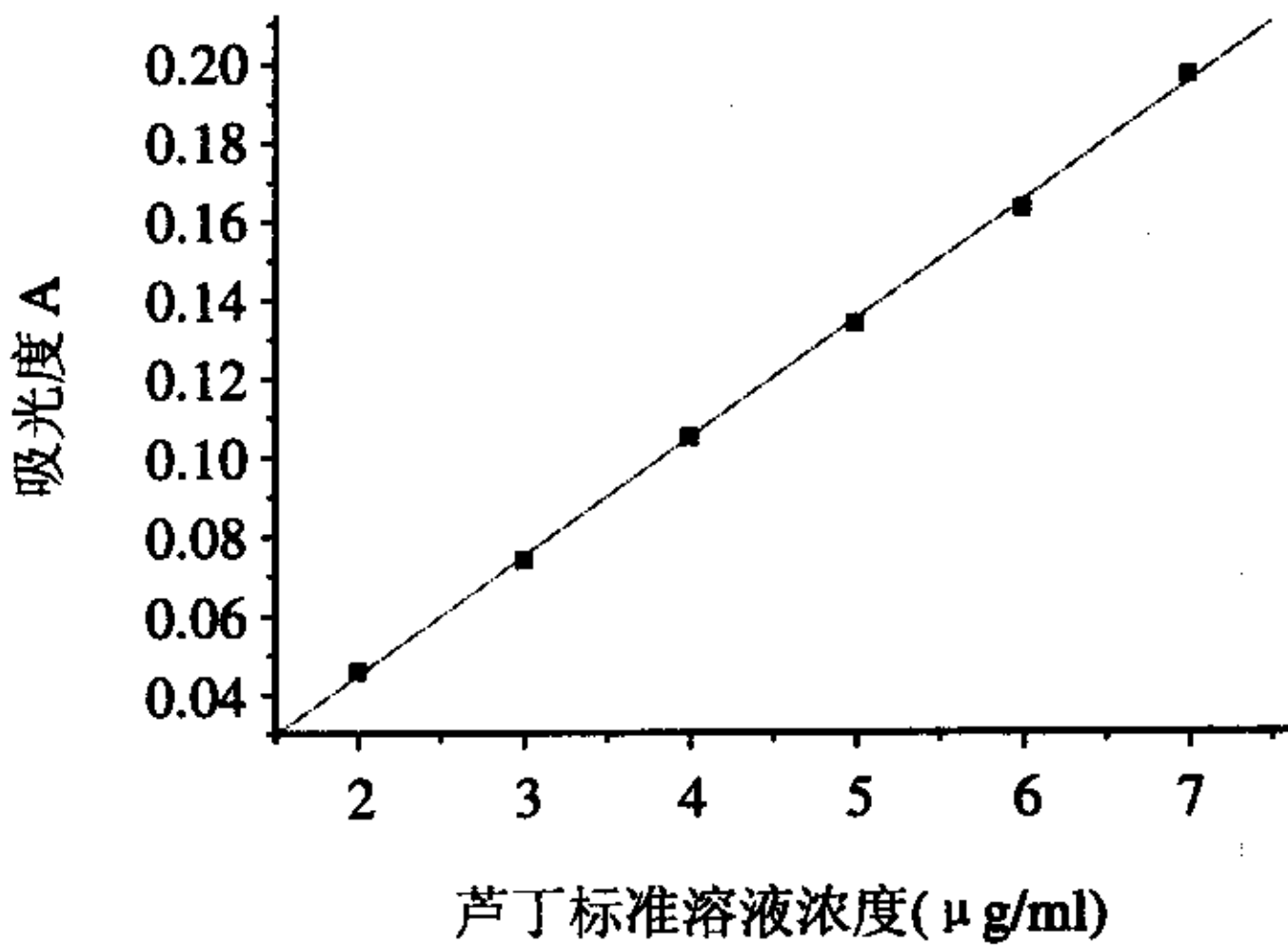


图1 校准曲线
Fig.1 Calibration curve

1.3 拳卷地钱总黄酮的提取

1.3.1 有机溶剂提取

准确称取 1g 粉碎后的拳卷地钱, 分别用不同浓度

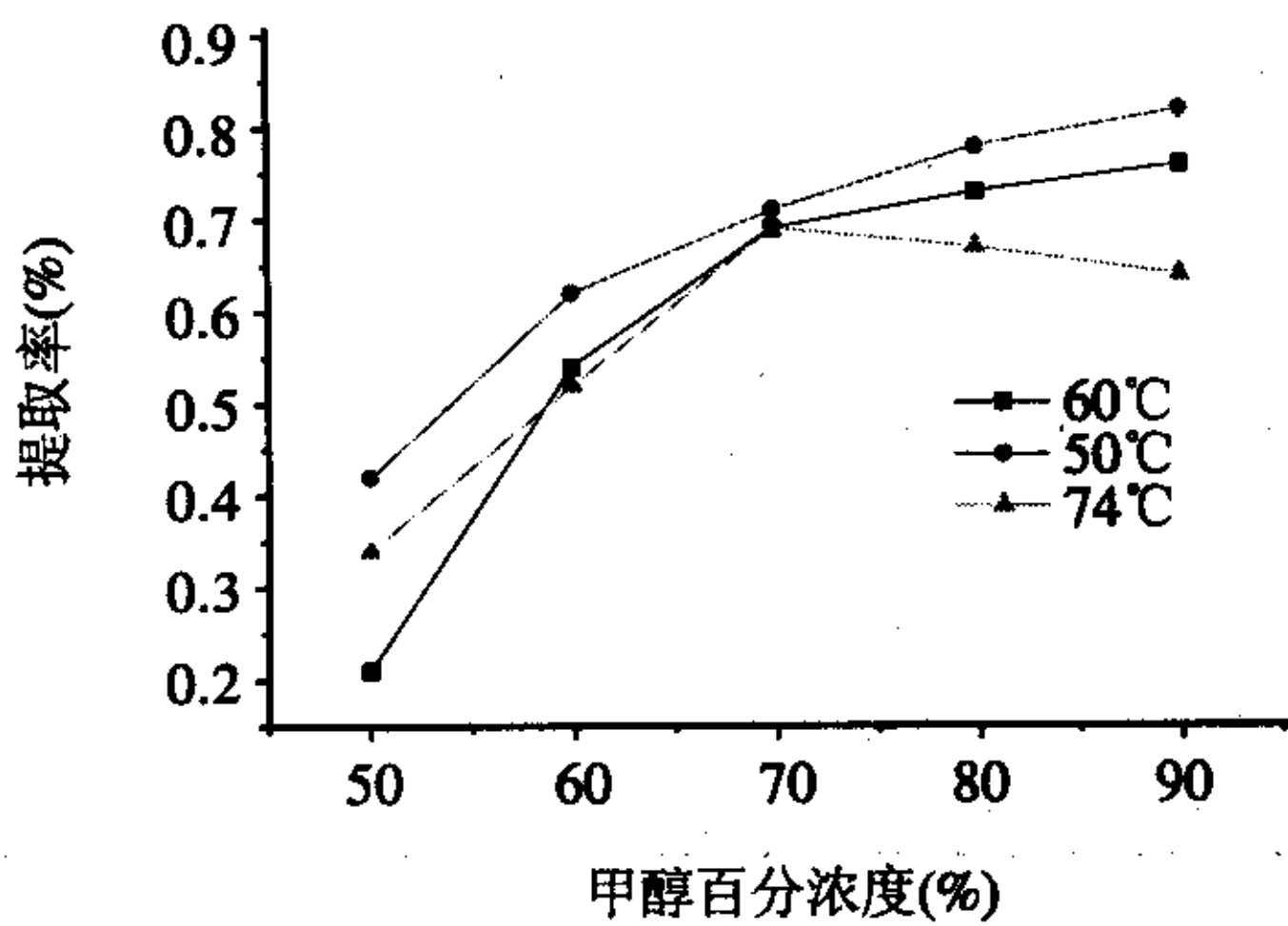


图2 甲醇提取试验结果
Fig.2 Result of extraction with methanol

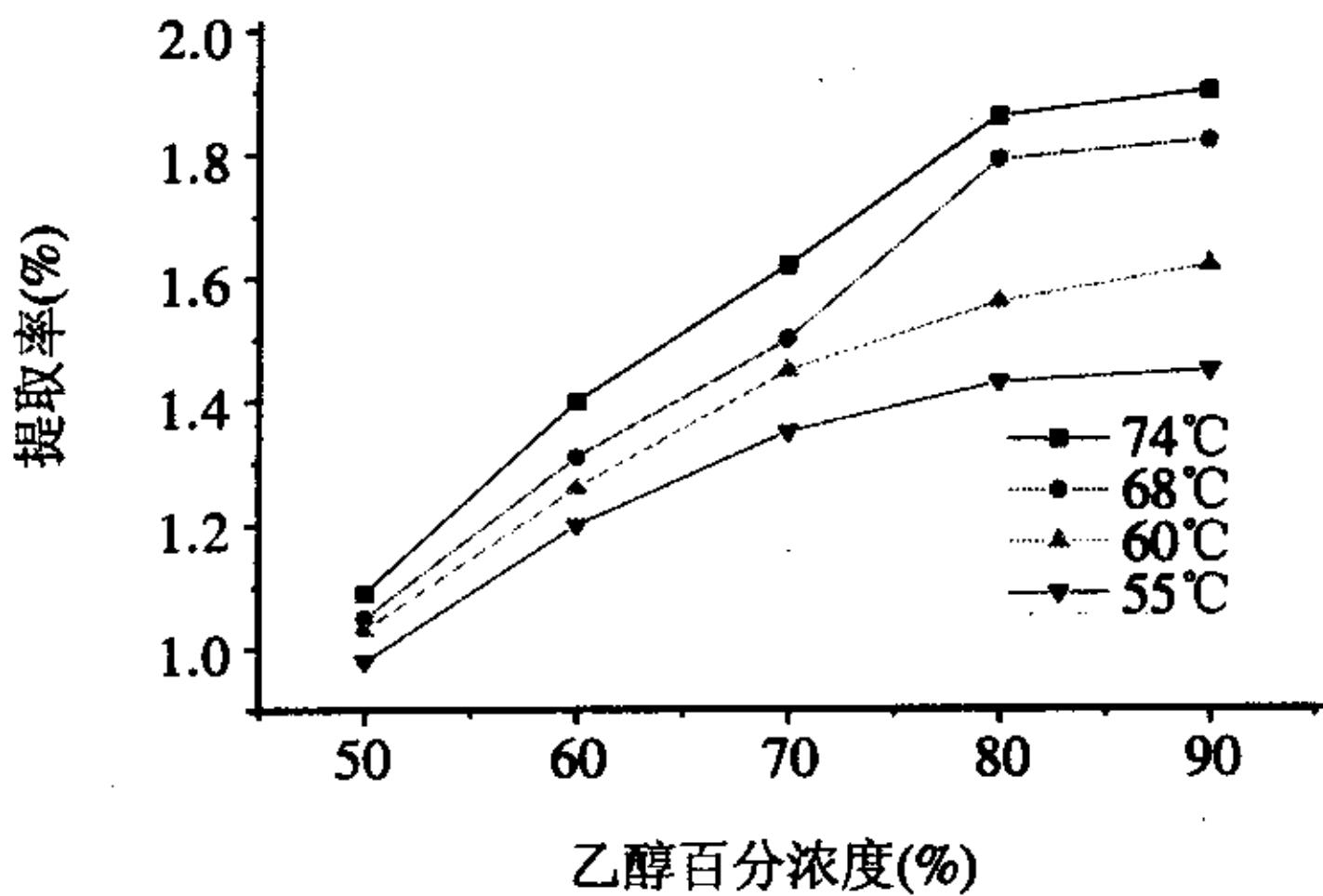


图3 乙醇提取试验结果
Fig.3 Result of extraction with ethanol

的甲醇、乙醇、丙酮水溶液 30ml, 在不同温度下提取 1h, 流水冷却, 定容至 50ml, 过滤, 取滤液 5.00ml, 按 1.2 法测定总黄酮含量, 计算提取率, 结果见图 2、3、4。

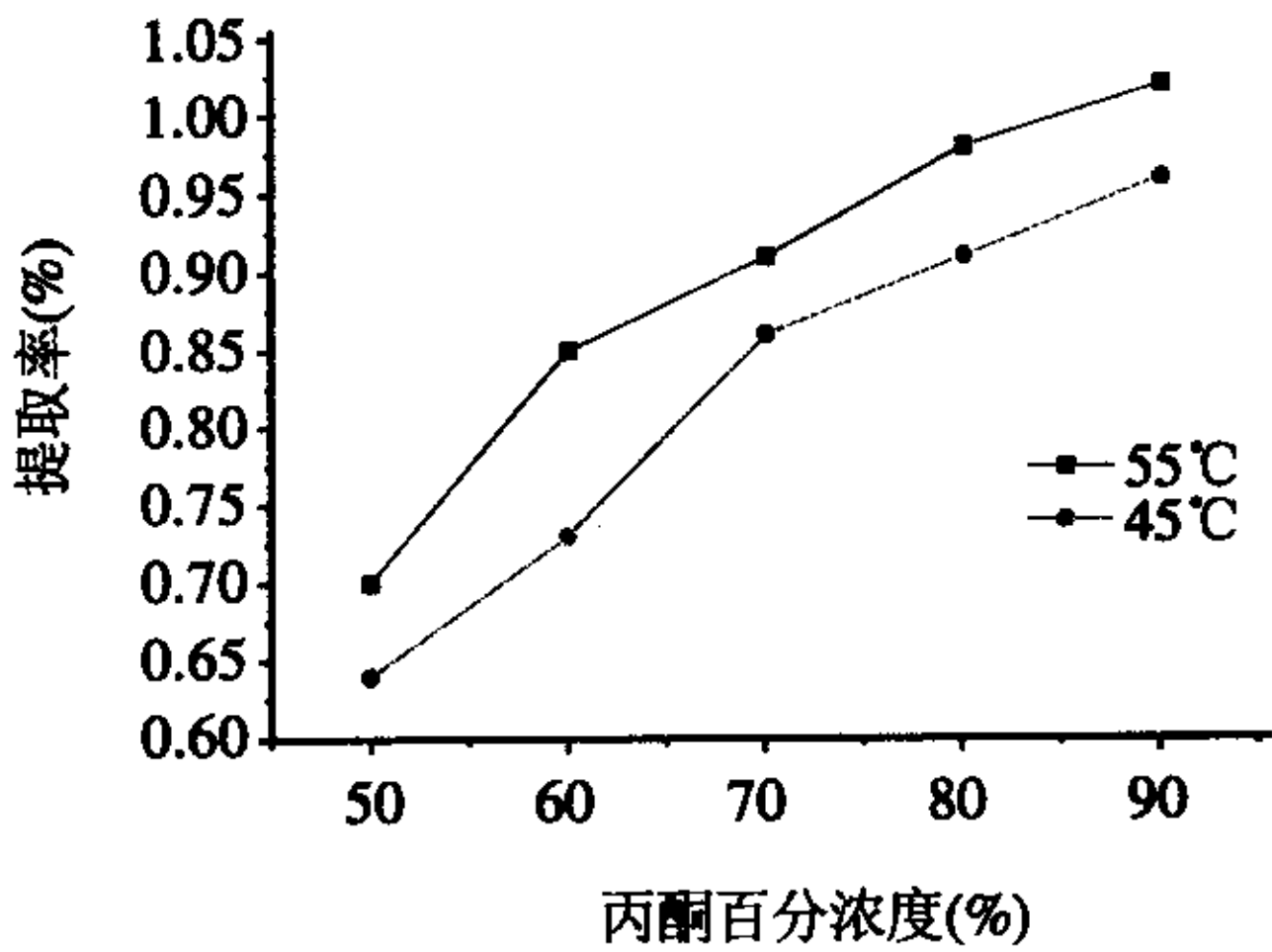


图4 丙酮提取试验结果
Fig.4 Result of extraction with acetone

1.3.2 水提取实验

准确称取 1g 拳卷地钱五份, 各加入水 30ml, 在 50、60、70、80、90℃下分别提取 1、2、3h, 流水冷却, 定容至 50ml, 过滤, 取滤液 5.00ml, 按 1.2 法测定总黄酮含量, 计算提取率, 结果见图 5。

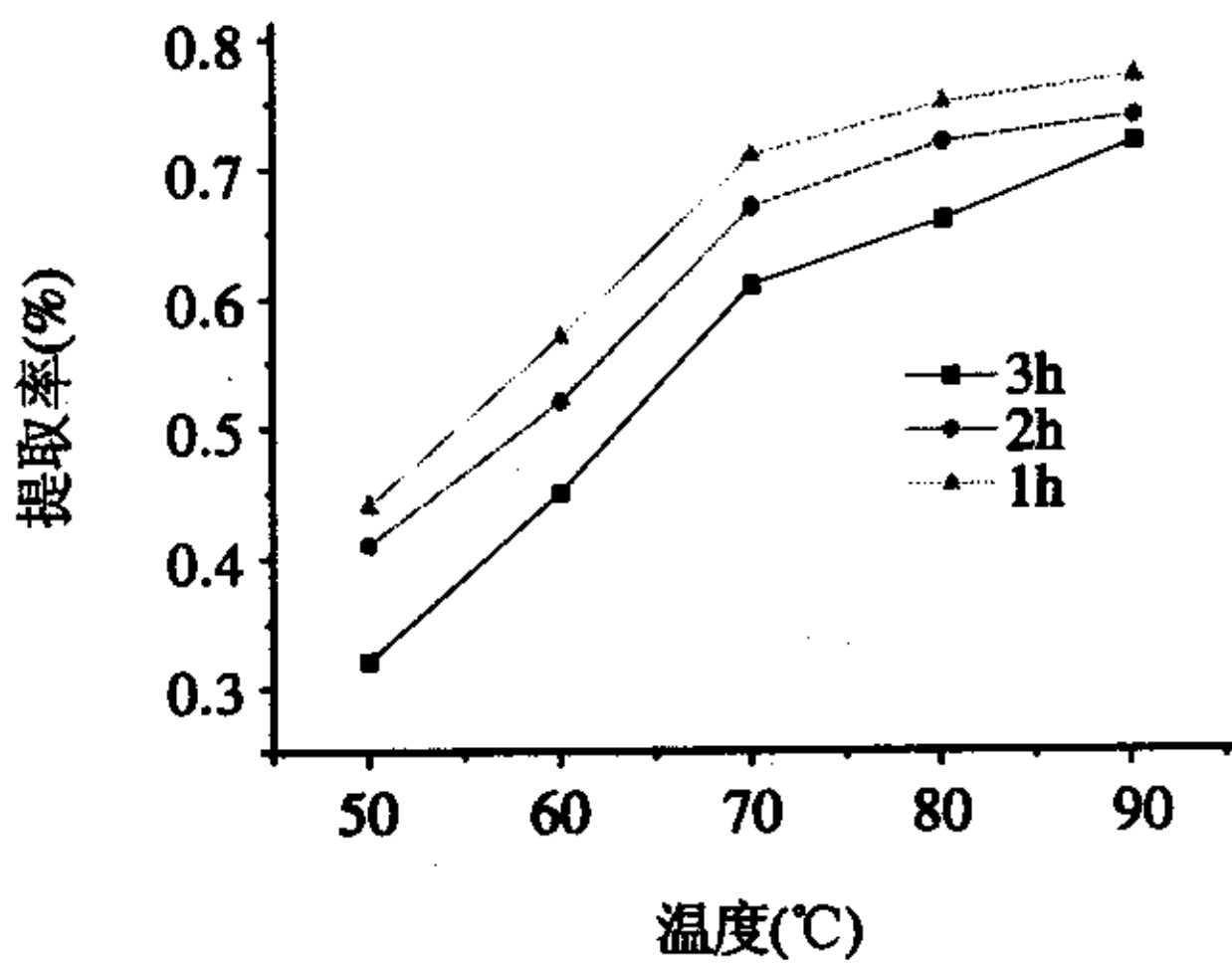


图5 水提取试验结果
Fig.5 Result of extraction with water

1.4 黄酮提取物的纯化

1.4.1 拳卷地钱总黄酮的提取

广西中医学院提供之拳卷地钱干燥品 200g, 加入 80% 的乙醇水溶液 1000ml, 在 74℃下回流提取 2h, 过滤, 重复三次, 合并滤液, 减压蒸馏回收乙醇, 蒸至约 400ml, 待用。取该提取液 3.00ml 五份, 按 1.2 法测定总黄酮含量, 利用标准曲线计算总黄酮提取率。

1.4.2 溶剂萃取硅胶柱层析法纯化总黄酮

取 1.4.1 提取液 50ml, 用 50ml 石油醚萃取 3 次, 50ml 乙酸乙酯萃取 3 次, 萃余液拌入硅胶, 干法装柱, 用

500ml 70% 甲醇洗脱, 减压蒸馏回收甲醇, 浓缩至约 50ml, 定容后取滤液 3.00ml 三份, 按 1.2 法测定总黄酮含量, 利用标准曲线计算总收率。冷冻干燥后测定纯度。

1.4.3 硅藻土吸附法纯化总黄酮

取 1.4.1 提取液 50ml, 拌入约 30g 硅藻土, 水浴蒸干, 依次用 50ml 石油醚, 50ml 乙酸乙酯, 150ml(50ml × 3) 乙醇洗脱, 乙醇洗脱液减压蒸馏至 50ml, 取滤液 3.00ml 三份, 按 1.2 法测定总黄酮含量, 在标准曲线上查找, 计算总黄酮含量, 利用标准曲线计算总收率。冷冻干燥后测定纯度。

1.4.4 大孔树脂吸附法纯化总黄酮

取 1.4.1 提取液 50ml 三份于分液漏斗中, 分别加入 AB-8 树脂 10、20、30g, 振荡 1h, 放去上清液, 用 50ml 水洗, 合并上清液和水洗液, 定容至 100ml, 取 10.00ml 按 1.2 法测定总黄酮含量, 在标准曲线上查找, 计算吸附率。再将 AB-8 树脂用 150ml(50ml × 3) 70% 乙醇水溶液淋洗, 取淋洗液 5.00ml, 按 1.2 法测定总黄酮含量, 在标准曲线上查找, 计算洗脱率。冷冻干燥后测定纯度。

1.4.5 聚酰胺吸附法纯化总黄酮

取 1.4.1 提取液 50ml 于烧杯中, 拌入聚酰胺 20g, 蒸干, 取 60g 处理过的聚酰胺装入玻璃柱底部, 将蒸干的 20g 聚酰胺装在玻璃柱上部, 用 10%、20%、30%... 90% 的乙醇水溶液各 50ml 淋洗, 合并淋洗液, 减压蒸馏至 50ml, 取滤液 3.00ml 三份, 按 1.2 法测定总黄酮含量, 利用标准曲线计算总收率。冷冻干燥后测定纯度。

2 结果与讨论

2.1 各种溶剂对拳卷地钱总黄酮的提取比较

从图 2~5 可知相同时间下 80% 乙醇 74℃ 提取率最高, 丙酮次之, 甲醇、水最差。甲醇的极性与黄酮类化合物极性相差较大, 提取率不高, 又因甲醇沸点低, 易挥发, 不易操作, 温度上升(> 64℃) 提取率反而下降。水提法总黄酮提取率低, 且提取液存放易腐败变质, 后继的过滤、浓缩等操作困难且费时, 这可能是水的极性大, 作溶剂时, 易把蛋白质、糖类、鞣质等易溶于水的成分提出来, 因此易霉变。水只能提取极性较大的黄酮甙, 而且提取率低。

随温度上升水浸提总黄酮提取率有所提高, 但提取

率仍较低(与其它溶剂相比), 增加提取时间提取率亦提高不多。乙醇、丙酮克服了水提法存放易腐败变质的缺点, 丙酮极性小, 提取率比水提法高, 后继的过滤等操作较容易, 但价格昂贵。乙醇极性较小, 80% 乙醇水溶液既可提取黄酮甙元又能提取黄酮甙, 故提取率高, 随温度上升提取率有所提高, 但 80℃ 以后提取率上升不明显; 且乙醇提取液的过滤、溶剂回收、干燥等过程容易进行。蛋白质、糖类等杂质在乙醇中不溶或难溶, 实际应用的关键是操作过程中回收乙醇、减少乙醇的损失, 降低成本。

2.2 提取时间对提取率的影响

准确称取 1g 粉碎后的拳卷地钱四份, 加入 80% 的乙醇溶液 20ml, 在 74℃ 下回流提取 1、2、3、4h, 照上法测定拳卷地钱总黄酮, 结果见表 1。从表 1 数据可知, 该条件下, 提取 2h 后提取率变化不大, 故提取时间选择 2h。

表 1 乙醇提取时间对提取率的影响
Table 1 Effect of time on extraction rate

时间(h)	1	2	3	4
提取率(%)	1.74	1.90	1.92	1.94

2.3 AB-8 树脂纯化结果

AB-8 树脂纯化结果见表 2 所示。

表 2 AB-8 树脂纯化试验结果
Table 2 Result of purification with AB-8 resin

树脂质量(g)	原液总量(g)	吸附后总量(g)	吸附率(%)	洗脱后总量(g)	洗脱率(%)	总收率(%)
10	0.475	0.278	41.47	0.180	91.37	37.89
20	0.475	0.099	79.14	0.331	88.03	69.66
30	0.475	0.094	80.21	0.328	86.01	68.98

从表 2 可知, 对于 0.475g 总黄酮, 20g AB-8 树脂的总收率最高, 树脂质量大于 20g 时, 虽然吸附率稍有提高, 但洗脱率下降, 增加了洗脱难度。

2.4 不同纯化工艺的比较

不同方法对黄酮提取物的纯化数据见表 3。

表 3 不同纯化工艺的比较
Table 3 Compare of different techniques

方法	原液总黄酮量(g)	纯化后总黄酮量(g)	总收率(%)	纯度(%)
溶剂萃取硅胶柱层析	0.475	0.450	94.47	95.63
硅藻土吸附	0.475	0.382	80.42	93.12
AB-8 树脂吸附	0.475	0.331	69.66	97.63
聚酰胺吸附	0.475	0.421	88.63	92.58

从表3可知,此四种纯化工艺中,总收率以溶剂萃取-硅胶柱层析为最高,且总黄酮纯度也较高,操作简单,后处理方便,而AB-8树脂吸附纯化工艺虽然产品纯度很高,但总收率低,吸附率和洗脱率都不高,不宜工业应用,可作分离单体物质用;聚酰胺吸附纯化工艺,吸附、洗脱速度慢,溶剂消耗大,由于聚酰胺易碎成小分子,产品中残存大量聚酰胺小分子,影响总黄酮的纯度和后处理;硅藻土吸附操作繁琐,硅藻土不能带有水份,每次要烘干,且硅藻土洗脱速度慢,后处理不方便,总收率不高。经筛选,采用溶剂萃取分离,硅胶柱纯化,70%甲醇洗脱,可得到纯度为95.63%的拳卷地钱总黄酮,总收率94.47%,设备简易,操作简单,易实现工业化生产。

3 结 论

干燥拳卷地钱用80%的乙醇水溶液在74℃回流提取2h,提取率达1.90%,采用溶剂萃取和硅胶柱层析相结合的方法纯化拳卷地钱的总黄酮提取物,纯度达95.63%,总收率94.47%,设备简单,后处理方便,易实现工业化生产。

参考文献:

[1] 胡人亮. 苔藓植物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987. 2.

- [2] 夏征农. 辞海[M]. 上海: 上海辞书出版社, 1999. 639.
- [3] 朱华. 广西地钱属药用植物资源调查和形态构造研究[A]. 见中国中医药学会编, 第7届全国中药标本馆专业学术讨论会论文集[C]. 成都: 成都中医药大学, 2002, 161-165.
- [4] 曹慧, 肖建波, 周春山, 等. 拳卷地钱不同提取部位的GC-MS分析比较和部分生物活性研究[J]. 质谱学报, 2005, 26(1): 1-5.
- [5] 肖建波, 周春山, 朱华, 等. 反相高效液相色谱法用于拳卷地钱中黄酮类化合物的分离和测定[J]. 分析试验室, 2005, 24(4): 17-19.
- [6] Zhu Hua, Xiao Jian-bo, Zou Dengfeng, et al. Isolation, purification and identification of apigenin-7-O-D- glucuronide in *Marchantia convoluta* with Silica Column Chromatography, RP-HPLC and LC-ESI-MS[J]. Nature Product R & D, 2005, 17(1): 38-41.
- [7] 曹慧, 肖建波, 周春山, 等. 拳卷地钱中黄酮类化合物的含量测定[J]. 中南药学, 2005, 3(1): 7-9.
- [8] 李维莉, 马银海, 彭永芳, 等. 蜂胶总黄酮提取方法研究[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 100-101.
- [9] 周德庆, 曾骆. 黄芩总黄酮的提取工艺研究[J]. 华西药学杂志, 2003, 18(1): 78-79.
- [10] 罗伟强, 黄润均, 邓光辉, 等. 苦买菜茎黄酮类化合物提取方法研究[J]. 广西民族学院学报, 2003, 9(1): 31-32.
- [11] 孙志萍. 大车前叶中总黄酮的微波提取及含量测定[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(1): 48-49.
- [12] 许勇, 范捷. 正交设计研究补骨脂中总黄酮提取工艺[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(2): 144-146.

《食品科技》

——食品行业 良师益友

2006年

- ☐ 内容更加丰富, 更贴近市场, 更贴近需求;
- ☐ 专家队伍广泛指导、业务团队不断壮大;
- ☐ 编辑出版《市场导航》, 打造平台共谋发展。

《食品科技》资历深厚, 行业资源丰富。现为国家科技中文核心期刊, 被《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、《万方数据库》全文收录、并为国家“九五”重点科技攻关项目“万方数据—数字化期刊群”的上网期刊。《食品科技》立足食品行业科技发展前沿, 致力于推广创新实用技术。正刊定位于食品科技成果、信息互动交流, 可为企业和相关部门研发、决策提供依据; 副刊面向市场, 沟通供求、搭建行业服务平台。是具有广泛的读者群和业务合作群体, 在业界中较大影响力的行业媒体。

2004荣获年北京市科技期刊质量奖

展望2006年,《食品科技》将组织和参与更多的专业展会及专题活动; 加强与国内外企业 and 专业机构的合作; 为《食品科技》的伙伴提供更多延伸服务。

2006年大幅增加内容, 全书200页, 精致印刷。每期单价15元, 全年180元; 中国标准连续出版物号: ISSN 1005-9989/CN 11-3511/TS; 全国邮政局(所)均可订阅(邮发代号: 2-681), 也可直接向本刊编辑部订阅。团体订阅, 享受优惠。

《食品科技》—提高生活品质

杂志社地址: 北京市广内大街316号京粮大厦520、525、531室
 邮编: 100053
 编辑部电话: 010-83557685 63538885-3050
 业务传真: 010-83557838
 e-mail: shipinkj@vip.163.com