

•制剂工艺•

# 委陵菜黄酮类化合物的提取与纯化工艺研究

闵运江<sup>1</sup>, 周守标<sup>2\*</sup>, 张银萍<sup>1</sup>, 高琼<sup>1</sup>, 张晓雷<sup>1</sup>

(1. 皖西学院化学与生命科学系, 安徽六安 237012; 2. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽芜湖 241000)

[摘要] 目的: 研究了委陵菜黄酮类化合物的提取与纯化工艺条件。方法: 采用正交设计研究了4因素4水平的委陵菜黄酮提取条件, 并从最适样品浓度、上样量、乙醇洗脱液浓度、乙醇洗脱用量等方面对AB-8型大孔树脂纯化委陵菜黄酮的工艺条件进行了研究。结果: 最适提取条件为: 在70℃条件下, 乙醇浓度为40%, 固液比为1g:100mL, 提取3次的效果最佳。最适纯化条件为: 当黄酮液浓度为0.4mg·mL<sup>-1</sup>时, 吸附速率最佳; 洗脱液为70%的乙醇; 乙醇的洗脱用量达到4倍床体积数时, 解吸率较高。其粗黄酮粉的黄酮含量为17.98%, 经AB-8型大孔吸附树脂纯化后的委陵菜精黄酮粉中黄酮含量约达48.36%。

[关键词] 委陵菜; 黄酮; 提取; 纯化; 正交设计

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)05-0031-05

## Study on the Technology of Extraction and Purification of Flavonoids from *Herba Potentillae Chinensis*

MIN Yun-jiang<sup>1</sup>, ZHOU Shou-biao<sup>2\*</sup>, ZHANG Yin-ping<sup>1</sup>, GAO Qiong<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-lei<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry and Biology, West Anhui University, Lu'an 237012, China;

2. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the technology of extraction and purification of flavonoids from *Potentilla chinensis*. **Methods:** The optimal extracting conditions of flavonoids from *Potentilla chinensis* were screened with a 4-factor-four-level orthogonal test and AB-8 macroporous resin was selected for purification conditions. **Results:** The best extracting conditions were as follows. The sample was extracted at 70℃ with 40% ethanol (the solid-liquid ratio 1g:100mL), for 3 times. The concentration of the sample solution suitable for purification was 0.4mg·mL<sup>-1</sup>. The portion eluted with 70% ethanol and 4 times volume of the resins was collected. The flavonoid content of crude flavonoid powder was 17.98%. After being purified with AB-8 macroporous resin, the flavonoid content could reach to 48.36%.

[Key words] *Potentilla chinensis* Ser.; flavonoids; extraction; purification; orthogonality design

委陵菜为少常用中药, 全草含黄酮类、三萜类、有机酸等药用成分<sup>[1]</sup>。本研究采用正交设计对委陵菜黄酮类化合物的提取最佳条件进行了研究, 并进一步对影响大孔吸附树脂纯化委陵菜中黄酮类化合

物的因素进行了探讨, 为委陵菜黄酮的提取与纯化提供了参考数据。

### 1 材料、仪器与试剂

委陵菜于2007年3月25日, 采自皖西学院桃园内小路边杂草丛, 由安徽师范大学生命科学学院植物教研室周守标教授鉴定为蔷薇科植物委陵菜 *Potentilla chinensis* Ser. 的全草。

TU-1201 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器设备有限公司), HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器

[收稿日期] 2007-08-20

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金重点项目(2006KJ060A)和安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ 2007B290)。

[通讯作者] \*周守标, Tel: (0553) 5670467; E-mail: zhoushoubiao@vip.163.com

有限公司), GL-20G- II 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂), RE-520 旋转蒸发器(上海浦沪仪器厂), KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), FA1004 电子天平(上海精科天平), 101AS-2 型不锈钢数显电热鼓风干燥箱(上海浦东跃欣科学仪器厂), 层析柱, 索式提取器, 标准检验筛等。

芦丁(国药集团化学试剂有限公司), AB-8 型大孔吸附树脂(天津市光复精细化工研究所), 乙醇(徐州试剂二厂), 乙醚(开封化学试剂总厂), 盐酸(合肥医药站化玻部), 亚硝酸钠(中国医药上海化学试剂公司), 硝酸铝(上海科昌精细化学品公司)等, 以上试剂为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 黄酮类化合物的提取<sup>[2]</sup>

**2.1.1 样品处理** 取采回的新鲜带根委陵菜全草, 洗净, 103℃烘至约八成干, 剪成长约 1 cm 长度小段, 粉碎, 再用 103℃烘至恒重。采用 Soxhlet 提取法, 以无水乙醚为脱脂剂, 于 43℃水浴中除去样品中脂类和脂溶性色素。取出样品滤纸包, 先置通风处凉干, 再将滤纸包置烘箱中 103℃烘干至恒重, 放入干燥器中备用。

**2.1.2 标准曲线制作** 称取约 20 mg 芦丁对照品于称量瓶中, 置 103℃烘箱下烘干至恒重, 干燥器中冷却, 精确称取 10 mg 芦丁, 用 70% 乙醇定容至 100 mL 为标准液。精确吸取芦丁标准液 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 分别置于 6 支具塞试管中, 加 70% 乙醇至 5 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min 后, 加 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min 后, 再加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL, 加水 0.4 mL, 摇匀, 放置 15 min 后, 在 510 nm 处测吸光度。得出回归方程:  $A = 12.721C - 0.02903$ ,  $r = 0.9998$ 。式中:  $A$  表示吸光度;  $C$  表示黄酮浓度。

### 2.1.3 委陵菜黄酮类化合物提取单因素试验<sup>[3]</sup>

**①温度单因素试验** 取已脱脂的委陵菜粉末 6 份, 每份 1.00 g, 分别放在 250 mL 锥形瓶中, 温度设定为: 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃和 80℃6 个组, 其他条件不变, 即固液比为: 1 g: 100 mL, 提取剂乙醇浓度为: 70% 浸提时间为 2 h。

**②乙醇浓度单因素试验** 取已脱脂的委陵菜粉末 4 份, 每份 1.00 g, 分别放在 250 mL 锥形瓶中, 提取剂乙醇浓度设定为: 30%, 50%, 70% 和 90% 4 个组, 其他条件不变, 即固液比为 1 g: 100 mL, 温度为

70℃, 浸提时间为 2 h。

**③固液比单因素试验** 取已脱脂的委陵菜粉末 6 份, 每份 1.00 g, 分别放在 250 mL 锥形瓶中, 固液比(g: mL) 设定为: 1: 20, 1: 40, 1: 60, 1: 80, 1: 100 和 1: 120 等 6 个组, 其他条件不变, 即提取剂乙醇浓度为 50% 温度为 70℃, 浸提时间为 2 h。

**④浸提次数单因素试验** 取已脱脂的委陵菜粉末 4 份, 每份 1.00 g, 分别放在 250 mL 锥形瓶中, 提取次数设定为: 1, 3, 5, 7 次, 其他条件不变, 即提取剂乙醇浓度为 50% 温度为 70℃ 浸提时间为 2 h。

**⑤试验数据分析** 按上述各种操作条件回流提取委陵菜黄酮类化合物, 测定浸提液中的黄酮含量 ( $n = 3$ ), 方差分析 LSD 多重比较。

### 2.1.4 正交实验设计 见表 1。

表 1 乙醇正交试验因素水平

水平	因素			
	水浴温度 A (℃)	乙醇浓度 B (%)	固液比 C (g: mL)	提取次数 D
1	40	40	40	2
2	50	50	60	3
3	60	60	80	4
4	70	70	100	5

### 2.2 委陵菜黄酮类化合物的纯化方法<sup>[4]</sup>

**2.2.1 AB-8 大孔吸附树脂的动态吸附实验** 取预处理的 AB-8 大孔吸附树脂装柱, 装柱约 5 cm, 测得其树脂湿量为 10 g。将样液上柱, 水洗, 再洗脱, 然后测定吸附率和解吸率。按下列公式计算:

$$\text{吸附率} = [(m - m_1) / m] \times 100\%;$$

$$\text{解吸率} = [m_2 / (m - m_1)] \times 100\%$$

其中:  $m$ : 样液中含有的黄酮总量(mg);  $m_1$ : 吸附流出液中含有的黄酮总量(mg);  $m_2$ : 洗脱液中含有的黄酮总量(mg)

**2.2.2 样液浓度对吸附率的影响** 取一定量的粗黄酮粉, 以水为溶剂, 在 90℃水浴加热条件下充分溶解, 6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液定容到 100 mL, 测量其浓度为 0.899 mg·mL<sup>-1</sup>。均分成 5 份, 分别配制成 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的黄酮样液, 分别上柱, 以 1 mL·min<sup>-1</sup> 的流速吸附后, 各用 3 倍床体积的水洗柱, 收集所有吸附及洗柱流出液, 测定其中黄酮含量, 计算黄酮的吸附量及吸附率。

**2.2.3 上样量对吸附率的影响** 配制含黄酮 30, 40, 50, 60 和 70 mg, 且浓度均为 0.3 mg·mL<sup>-1</sup> 黄酮水

溶液 5 份, 同 2.2.2 项的方法上柱、洗柱等, 测定黄酮的吸附量及吸附率。

**2.2.4 洗脱剂浓度对解吸率的影响** 同 2.2.2 项方法配制浓度  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的黄酮水溶液 5 份, 每份 160 mL, 分别上柱, 以  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率进行吸附, 再用 3 倍床体积的水洗柱, 然后分别用 4 倍床体积的浓度分别为 30%、50%、70%、80% 和 90% 的乙醇以  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率洗脱, 收集洗脱液测定黄酮含量, 计算解吸出的黄酮量及解吸率。

**2.2.5 洗脱剂用量对解吸率的影响** 同 2.2.4 项方法上柱、水洗柱, 然后分别用 2、3、4、5 和 6 倍床体积, 浓度为 70% 的乙醇, 以  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率洗脱, 测定黄酮解吸量及解吸率。

**2.2.6 大孔吸附树脂柱层析纯化委陵菜总黄酮效果的测定** 按 2.2.2~2.2.5 项中得到的委陵菜黄酮类化合物的最佳纯化条件, 纯化提取所得的粗黄酮粉, 测定纯化后的精制黄酮粉中的黄酮含量。

### 3 结果与分析

#### 3.1 乙醇提取法单因素试验结果与分析

**3.1.1 温度单因素试验结果** 从表 2 中可以看出, 选择  $70^\circ\text{C}$  较适宜。

表 2 温度单因素试验结果表( $\bar{x} \pm s$ )

试验号	温度 ( $^\circ\text{C}$ )	乙醇浓度 (%)	固液比 (g: mL)	浸取时间 (h)	提取液中黄酮含量 (mg)
1	30				$55.31 \pm 0.98$
2	40				$58.13 \pm 1.72$
3	50	70	1: 100	2	$63.27 \pm 0.32$
4	60				$64.26 \pm 2.42$
5	70				$69.17 \pm 2.95$
6	80				$70.68 \pm 0.28$

**3.1.2 乙醇浓度单因素试验结果** 从表 3 中可以看出, 乙醇浓度为 50% 时, 提取效果最好。

表 3 乙醇浓度单因素试验结果表( $\bar{x} \pm s$ )

试验号	乙醇浓度 (%)	温度 ( $^\circ\text{C}$ )	固液比 (g: mL)	浸取时间 (h)	提取液中黄酮含量 (mg)
1	30				$56.74 \pm 0.43$
2	50	50	1: 100	2 h	$67.22 \pm 0.96$
3	70				$60.27 \pm 1.13$
4	90				$33.66 \pm 0.55$

**3.1.3 固液比单因素试验结果** 从表 4 可以看出, 固液比为 1 g: 100 mL 时提取效果最好。

表 4 固液比单因素试验结果表( $\bar{x} \pm s$ )

试验号	固液比 (g: mL)	温度 ( $^\circ\text{C}$ )	乙醇浓度 (%)	浸取时间 (h)	提取液中黄酮含量 (mg)
1	1: 20				$43.08 \pm 0.41$
2	1: 40				$58.10 \pm 0.52$
3	1: 60	50	50	2	$62.08 \pm 0.60$
4	1: 80				$71.12 \pm 0.11$
5	1: 100				$73.12 \pm 1.20$
6	1: 120				$71.88 \pm 2.20$

**3.1.4 浸提次数单因素试验结果** 从表 5 可以看出, 当提取次数增加至 3 次时提取液中黄酮含量明显增加, 但当提取次数继续增加时, 取液中黄酮含量并无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 确定提取次数为 3 次宜。

表 5 浸提次数单因素试验( $\bar{x} \pm s$ )

试验号	浸提次数	温度 ( $^\circ\text{C}$ )	乙醇浓度 (%)	固液比 (g: mL)	提取液中黄酮含量 (mg)
1	1				$30.33 \pm 0.95$
2	3	70	50	1: 100	$40.72 \pm 1.14$
3	5				$41.98 \pm 1.93$
4	7				$43.19 \pm 1.27$

**3.2 乙醇提取法正交试验结果与分析** 从表 6 和表 7 可见, 提取委陵菜黄酮含量最大的是处理 13, 即  $A_4B_1C_4D_2$  达 3.81%, 表明委陵菜黄酮的最佳提取条件是: 水浴温度为  $70^\circ\text{C}$ 、乙醇浓度为 40%、固液比为 1 g: 100 mL、提取次数为 3 次。

表 6 极差  $R$ 、表 7 中的  $F$  值和  $P$  值均表明, 影响委陵菜提取效果因素的主次顺序为:  $A > C > B > D$ , 即提取温度影响最大, 固液比与乙醇浓度的影响次之, 提取次数影响最小。

进一步进行方差分析得: 本实验所选取的  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$  4 个因素对提取委陵菜中黄酮含量影响, 提取温度  $A$  和固液比  $C$  达到极显著 ( $P < 0.01$ ); 乙醇浓度  $B$  影响显著 ( $P < 0.05$ ); 而提取次数  $D$  的影响无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

#### 3.3 黄酮类化合物的纯化试验结果与分析

**3.3.1 样液浓度对吸附率的影响** 从图 1 中可以看出, 当样液浓度为  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 吸附率最大, 黄酮液浓度过大或过小都影响吸附效果, 即样液浓度是  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时吸附效果最佳。

**3.3.2 上样量对吸附率的影响** 从图 2 可以看出: 上样量的多少对吸附率有影响, 当上样量在 (30~50) mg 时吸附率均较高, 但当上样量超过 50 mg 时,

吸附率明显下降, 因此, 以大孔吸附树脂用量为 10 g 计算, 每 g 大孔吸附树脂上样的黄酮量不宜超过 5 mg。

表 6 L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>) 乙醇提取法正交实验结果与分析

处理	水浴温度	乙醇浓度	固液比 C	提取次数	黄酮含量均值 (%, $\bar{x} \pm s$ )
	A(°C)	B(%)	(g: mL)	D	
1	1	1	1	1	2.03 ± 0.05
2	1	2	2	2	2.66 ± 0.02
3	1	3	3	3	2.83 ± 0.03
4	1	4	4	4	2.52 ± 0.10
5	2	1	2	3	2.82 ± 0.04
6	2	2	1	4	2.83 ± 0.02
7	2	3	4	1	3.04 ± 0.08
8	2	4	3	2	2.79 ± 0.04
9	3	1	3	4	3.52 ± 0.06
10	3	2	4	3	3.58 ± 0.05
11	3	3	1	2	3.03 ± 0.03
12	3	4	2	1	2.99 ± 0.04
13	4	1	4	2	3.81 ± 0.05
14	4	2	3	1	3.53 ± 0.03
15	4	3	2	4	3.61 ± 0.04
16	4	4	1	3	2.91 ± 0.22
k <sub>1</sub>	2.822 5	3.287 5	3.017 5	3.222 5	
k <sub>2</sub>	3.160 0	3.442 5	3.285 0	3.357 5	
k <sub>3</sub>	3.505 0	3.317 5	3.480 0	3.305 0	
k <sub>4</sub>	3.742 5	3.182 5	3.447 5	3.345 0	
R	0.920 0	0.260 0	0.462 5	0.135 0	
较优水平	A <sub>4</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>4</sub>	D <sub>2</sub>	

表 7 L<sub>16</sub>(4<sup>4</sup>) 乙醇提取法正交方差分析表

变异来源	平方和 SS	自由度 df	均方 s/f	F	P 值
A	1.940 9	3	0.647 0	153.426 9	0.000 9
B	0.137 4	3	0.045 8	10.861 7	0.040 5
C	0.535 9	3	0.178 6	42.359 7	0.005 9
D	0.044 6	3	0.014 9	3.521 7	0.164 3
误差	0.012 7	3	0.004 2		
总和 T	2.671 3				

**3.3.3 洗脱剂浓度对解吸率的影响** 从图 3 看出: 乙醇浓度 ≤ 70% 时, 随乙醇浓度的增加, 解吸率增大, 当浓度大于 70% 时解吸率呈下降趋势。因此用 70% 乙醇洗脱剂解吸率最大。

**3.3.4 洗脱剂用量对解吸率的影响** 从图 4 中可

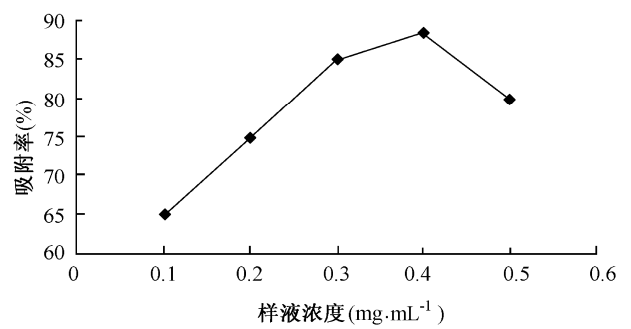


图 1 样液浓度对吸附率的影响

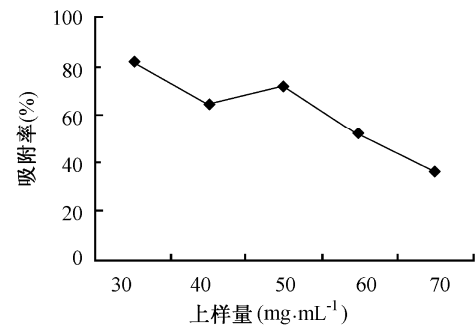


图 2 上样量对吸附率的影响

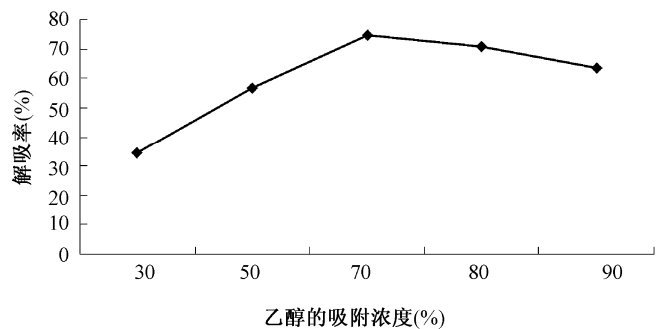


图 3 乙醇浓度对解吸率的影响

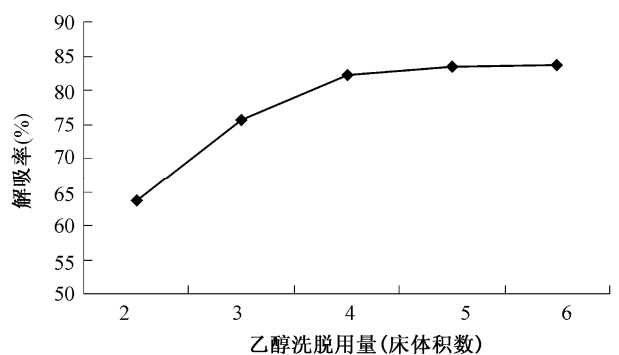


图 4 洗脱剂用量对解吸率的影响

以看出: 当乙醇的洗脱用量达到 4 倍床体积数后, 解吸率基本不再增加。因此乙醇的最佳洗脱用量为 4 倍床体积。

**3.3.5** 大孔吸附树脂柱层析纯化委陵菜总黄酮的效果 经测定纯化后的精制黄酮粉中,总黄酮含量达到 48.36%,与纯化前的粗黄酮粉中黄酮含量 17.98%相比,纯度提高约 3.7 倍,说明纯化效果较为显著。

#### 4 小结

本文对委陵菜的提取和纯化工艺条件进行了研究。在提取条件研究中,先分别以温度、乙醇浓度、固液比和提取次数四组单因素试验,确定了正交设计的因素和水平范围,并用 4 因素 4 水平正交设计实验,结果表明,委陵菜黄酮的最佳提取条件是:提取温度为 70℃、乙醇浓度为 40%、固液比为 1 g:100 mL、提取次数为 3 次。

AB-8 型大孔吸附树脂对委陵菜黄酮有较好的纯化效果。当黄酮液浓度为  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,吸附速

率最佳;70%的乙醇对委陵菜黄酮的解吸附有很好的效果;当乙醇的洗脱用量达到 4 倍床体积数时,解吸附率最高。在上述条件下,AB-8 型大孔吸附树脂柱层析纯化委陵菜效果较好,纯度由纯化前的 17.98%到纯化后的 48.36%,提高了约 2.7 倍。

#### [参考文献]

- [1] 肖培根.新编中药志[M].第三卷,北京:化学工业出版社,2002. 166-168.
- [2] 陈乃富,张莉.金樱子黄酮类化合物的初步研究[J].中国林副特产,2005,(5):2-4.
- [3] 刘新国,魏元锋,韩建伟,等.正交实验法优选三叶委陵菜渗漉提取的工艺条件[J].医药导报,2007,26(6):652-654.
- [4] 贝伟剑,彭文烈,罗杰.柿叶黄酮的大孔吸附树脂分离提纯富集[J].中成药,2005,(3):257-261.