

红车轴草中总异黄酮提取精制工艺研究

李崇明, 向阳, 翟莉, 曾庆恢

(湖北省暨武汉市中药现代化工程技术研究中心, 湖北 武汉 430052)

红车轴草 *Trifolium pratense* L. 为豆科车轴草属多年生草本植物, 又名红三叶、红花苜蓿, 三叶草。全国大部分地区均产。有抗肿瘤(胃癌、乳腺癌)和治疗骨质疏松、更年期综合症等作用^[1], 红车轴草中异黄酮具有双向调节作用^[2]。因此开发红车轴草中异黄酮作为临床用药具有广阔的市场前景。为了找到红车轴草的最佳提取工艺, 本实验采用 HPLC 法、正交试验及大孔树脂精制制备红车轴草中总异黄酮。

1 仪器与试剂

HP-Agilent 1100(自动进样器)、MWD 检测器。染料木素、大豆素、鹰嘴豆芽素 A 和 B 对照品购自美国 Sigma 公司, 纯度均为 99%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 进样量: 5 μL; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 室温; 流动相: 乙腈-水(47:53); 检测波长: 260 nm。采用外标法计算染料木素、大豆素、鹰嘴豆芽素 A、B 的含量, 并将其结果相加, 得总异黄酮。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取染料木素、大豆素、鹰嘴豆芽素 A、B 对照品适量, 加甲醇制成 0.02 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取提取物固体物 0.05 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 35 mL, 超声处理 20 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 提取溶剂的选择: 红车轴草中异黄酮类物质易溶于甲醇、乙醇、醋酸乙酯和稀碱溶液, 不溶于水。取红车轴草粗粉 50 g, 用规定量的甲醇、乙醇、醋酸乙酯、稀 NaOH 溶液提取规定的次数和时间, 浓缩提取液, 得固体物, 测定, 结果总异黄酮的质量分数分别为 7.56%、8.15%、8.10%、5%。可见, 甲醇、乙醇和醋酸乙酯提取效果优于碱水提取, 可能碱水提取过程中有效成分被分解, 但甲醇毒性大、醋酸乙酯因腐蚀及使用没有乙醇方便、安全, 因此选用乙醇作为提取溶媒。

2.5 因素水平的考察: 提取过程中, 乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)、提取温度(D)是影响提取效果的主要因素, 对上述因素各取 3 个水平, 因素水平安排见表 1。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A/%	B/倍	C/h	D/℃
1	50	12	1	50
2	65	15	2	65
3	80	18	3	80

2.6 提取条件的考察: 称取相同粉碎度的红车轴草药材 9 份, 每份 50 g, 按 L₉(3⁴) 正交试验安排, 乙醇提取 3 次后收集提取液。精密量取试验提取液各 100 mL, 置于已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干后, 置于 105 ℃ 烘箱中干燥 3 h, 称重, 计算固体物得率, 并测定总异黄酮含量, 结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

序号	A	B	C	D	收率/%	总异黄酮/%
1	1	1	1	1	1.69	4.119
2	1	2	2	2	0.80	6.899
3	1	3	3	3	2.00	3.147
4	2	1	2	3	1.27	4.471
5	2	2	3	1	0.97	6.391
6	2	3	1	2	0.93	7.242
7	3	1	3	2	0.78	14.176
8	3	2	1	3	0.85	5.457
9	3	3	2	1	0.68	12.120
K ₁	14.165	22.758	16.818	22.630		
K ₂	18.104	18.747	23.490	28.317		
K ₃	31.753	22.517	23.714	13.075		
R	17.588	4.011	6.896	15.242		

表 3 方差分析表

Table 3 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	56.89	2	28.45	30.6	P<0.05
B(误差)	1.86	2	0.93		
C	10.28	2	5.14	5.5	
D	39.47	2	19.74	21.2	P<0.05

$$F_{0.05}(2,2)=19.0 \quad F_{0.01}(2,2)=99.0$$

以总异黄酮质量分数为评价指标,由直观分析可知,影响红车轴草中总异黄酮提取效果的因素为 A>D>C>B,B 误差最小,故以 B 为误差方差,经方差分析,提取溶媒浓度和提取温度对提取效果的影响具有显著性,因此最佳工艺条件为 A₃B₁C₃D₂。

2.7 大孔吸附树脂法精制:采用最佳工艺条件,小试 3 批红车轴草,结果固形物收率约为 1%,总异黄酮质量分数约为 12%,得红车轴草粗提物 800 g。由于其质量分数达不到新药开发的要求,仍需进一步精制。实验对溶剂精制法和大孔吸附树脂分离方法进行了对比试验,虽然溶剂精制以后总异黄酮质量分数能达到 50%以上,但其母液里仍有大量的有效成分,并且残渣提取不完全。因此,选用大孔吸附树脂法精制。

2.7.1 预处理:取市售大孔吸附树脂,用乙醇浸泡 24 h,并用乙醇洗两次,以乙醇湿法装柱,用乙醇洗至与纯水混合不呈白色混浊为止,再用纯水洗至无醇味。经酸碱处理后洗至中性,备用。

2.7.2 精制:取已处理的提取物,于热水中调 pH 值 9~11,使其充分溶解,放冷至室温,离心。取上清液上已处理好的大孔树脂(干粉与树脂比例为 1:10~15),控制体积流量 2 mL/(cm²·min),并用检测试剂检测其是否吸附饱和,吸附完后,用 3~4 倍量纯水交换至水清后,用 20%~60%乙醇梯度洗脱,收集 60%乙醇部分,浓缩至无醇味后充分冷却,静置,取沉淀部分干燥,得黄白色提取物。以鹰嘴豆

芽素 A、B 及染料木素、大豆素计的总异黄酮质量分数在 80%以上,收率为 15%,色谱图见图 1。

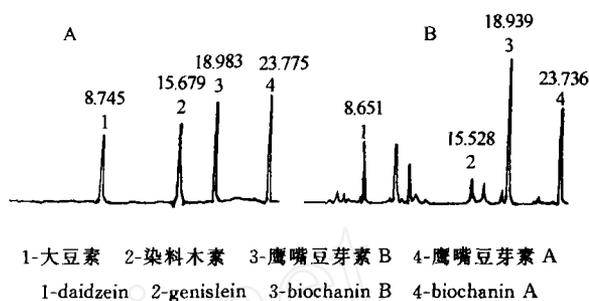


图 1 混合对照品(A)和红车轴草提取物(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *T. pratense* extract (B)

3 讨论

3.1 选择溶媒时,高体积分数的乙醇提取的成分较高,但其中大量的叶绿素及油脂被提取出来,不便于分离,须充分脱除油脂,才能干燥。

3.2 使用溶剂精制的时候,虽然含量能达到,但其须有配套设施,其最大的缺点就是残渣及母液不便于处理,降低成品收率且含量低,使用大孔树脂富集总异黄酮效果较理想,含量高,干燥较好。

References:

[1] Liaoning Institute of Forestry and Land. *North-eastern Flora of Herbs* (东北草木植物志) [M]. Vol 5. Beijing: Science Press, 1976.
 [2] Adlereretz H. Mazur W. Phytoestrogens and western medicine [J]. *Arch Invest*, 1997, 29:95-120.

山东药圣生物科技(平邑)有限公司荣誉推出“药圣 1+1[®]天然澄清剂”

“药圣 1+1[®]天然澄清剂”主要用于:1. 传统中药“水提醇沉”工艺中乙醇的替代;2. 传统中药提取物(如银杏叶干浸膏、山楂叶黄酮、叶绿素等)工艺中有机溶媒的水溶媒替代;3. 中药水针、粉针、冻干粉针的澄清处理;4. 无菌、无热原的中医药原料、生化原料澄清处理;5. 中草药、生化药品、保健食品、口服液、果汁、茶饮料、啤酒等产品的澄清处理;6. 氨基酸类、维生素类、有机酸类、抗生素类发酵液的澄清处理;7. 对重金属污染的工业废液(水)及其他工业废水的澄清处理;8. 对出口食品、药品、药材、保健品重金属农药残留超标的有效处理。

收得率分别提高 30%~10 倍;含量提高 10%~50%;工厂成本下降 30%~80%;还生产硫酸软骨素、黄连素系列、注射用黄芩苷(95%),双花连翘苷,银杏叶干浸膏、丹参素、丹参川芎浸膏等,以及口服级中药提取物,可根据客户要求生产,亦可进行相应品种的技术转让。

地 址:山东平邑县浚河路 78 号

江西公司地址:江西苍源药业四楼

四川公司地址:雅安鸿龙大厦三楼

电 话(传真):(0539)4088727 4089366 13573927737

电 话(传真):(0794)8231658 13307040029

电 话(传真):(0835)7632956 13320931132