

葛根总黄酮不同提取工艺的探讨

解放军第二军医大学药学院(上海 200433) 郭建平* 孙其荣 周 全

赵彤英 高玉田

摘要 对葛根总黄酮不同提取工艺进行了探讨,并用葛根素作指标测定了葛根总黄酮的含量。结果表明:冷浸法较铅盐沉淀法、回流法简便,得率高,甲醇冷浸提取后再用水饱和的正丁醇萃取及硅胶柱层析,其含量前后无显著性差异。

关键词 葛根 黄酮 提取工艺

葛根为豆科植物的块根,以野葛 *Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi 和粉葛 *P. thomsoni* Benth. 分布最广,产量最高^[1]。其根中含有多钟有效成分,主要为异黄酮。具有降低心肌耗氧量,增加冠脉脑血管血流量,缓解心绞痛,抗心律失常,抗氧化,增强机体免疫力,生津止渴^[2]等多种药理作用。本文对葛根黄酮的提取工艺进行了探讨。

1 实验材料

野葛根,安徽产,上海虹桥饮片厂;葛根素对照品,北京生物制品研究所。751分光光度计,UV-3000紫外分光光度计。硅胶,薄层层析用。

2 方法与结果

对野葛根不同提取工艺得到的黄褐色粉末得量、总黄酮含量、收得率进行了比较。

2.1 铅盐沉淀法:称取野葛根100g,加70%乙醇加热回流3次,每次1h(乙醇用量第1次1:5,第2、3次均为1:4)过滤,合并滤液,70℃以下减压浓缩,浓缩放置过夜。滤液,加饱和醋酸铅水溶液去杂质,过滤,滤液加饱和碱式醋酸铅溶液沉淀总黄酮,过滤,沉淀,干燥,悬浮于甲醇中,通H₂S,脱Pb,过滤,滤液加NH₄OH调pH6.5~7.0,减压浓缩至干,得总黄酮,棕色粉末^[3]。

2.2 回流热提取法:分别称取野葛根100g,分别加70%乙醇、95%乙醇、甲醇,各500ml,加热回流3次,每次2h,趁热过滤,合并3次滤液,减压回收乙醇,药液浓缩至干,得褐色干膏。

2.3 冷浸法: a) 分别称取野葛根100g,分别加70%的乙醇、95%乙醇、甲醇,各500ml,浸泡24h以上,过滤,回收乙醇、甲醇,药液减压浓缩至干,得黄褐色粉末。

b) 水饱和正丁醇萃取法^[4]:取冷浸法a) 甲醇提取的总黄酮,加水饱和的正丁醇萃取,丁醇层浓缩,减压干燥,得黄褐色粉末。

c) 水饱和正丁醇萃取-硅胶柱层析^[4]:取冷浸法-水饱和正丁醇萃取法提取的葛根总黄酮,上硅胶柱,洗脱液为氯仿-甲醇(95:5,v/v),收集洗脱液,得黄褐色粉末。

3 葛根黄酮含量测定^[5]

3.1 标准曲线绘制:精密称取干燥至恒重的葛根素5mg,于25ml容量瓶中,加95%乙醇溶解,并稀释至刻度,精密吸取0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml置10ml容量瓶中,以1.0ml 95%乙醇精密加水至10ml,摇匀。同时以上述溶剂做空白对照,在250nm波长处测定吸收度。回归方程: $A = 0.3620 + 0.0642C$, $r = 0.9996$

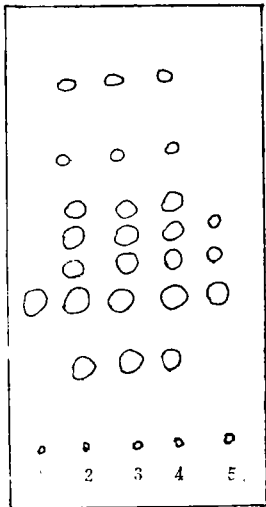
3.2 葛根提取物中总黄酮的测定:精密称取各法提取物,相当于葛根黄酮5mg,置25ml容

*Address: Guo Jianping, Pharmacy College, Second Military Medical University, Shanghai,
现在天津中国人民解放军272医院工作

量瓶中，加95%乙醇溶解，加95%乙醇至10ml，再加水至刻度摇匀，同时以1.0ml95%乙醇精密加水至10ml的溶液做空白对照，在250nm波长处测定吸收度。从标准曲线上换算出葛根黄酮的含量。结果见表1、表2。

4 葛根不同提取工艺的薄层层析^[4,6,7]

4.1 样品液及对照品溶液的制备：精密称取葛根素标准品10mg及供试品约相当于葛根总黄酮10mg，置10ml容量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，分别点样1μl于高效硅胶板上，以 氯仿-甲醇-水，（7：2.5：0.5）为展开剂，展开，在254nm紫外灯下观察荧光。薄层色谱图见图。



图葛根总黄酮层析图

1-葛根素对照品 2-甲醇冷浸提取物 3-甲醇冷浸正丁醇萃取物 4 甲醇-醇回流提取物 5-甲醇冷浸正丁醇萃取硅胶柱层析

表1 野葛根不同提取工艺黄褐色粉末得量、总黄酮含量、收得率

方法	提 取 物			
	葛根(均100g)	黄褐色粉末得量(g)	收得率(%)	总黄酮(%)
回 95%乙醇		10.69	10.69	48.23
流 70%乙醇		13.78	13.78	30.12
法 甲 醇		11.78	11.78	49.38
冷 95%乙醇		9.52	9.52	60.03
浸 70%乙醇		12.36	12.36	35.20
法 甲 醇		10.58	10.58	62.33
甲醇冷浸水饱和正丁醇萃取		8.03	8.03	68.86
甲醇冷浸-水饱和正丁醇萃取碳酸柱层析		6.32	6.32	90.53
铝盐沉淀法		8.70	8.70	10.10

表2 回流法提取野葛和粉葛中总黄酮含量

溶剂	野葛根提取物			粉葛提取物		
	外 观	得 量 (g)	总黄酮含量 (%)	外 观	得量 (g)	总黄酮 (%)
95%乙醇	黄棕色粉末	10.69	48.23	黑褐色干膏	29.85	4.0
70%乙醇	黄棕色粉末	13.78	30.12	黑褐色干膏	22.53	8.32
甲 醇	黄棕色粉末	11.78	49.38	黑褐色干膏	40.02	3.50

5 小结与讨论

5.1 表1表明：冷浸法、回流法较铝盐沉淀法收得率高且操作简便，冷浸法又较回流法简便，收得率高。含量高，因此，采用冷浸法作为葛根总黄酮的提取工艺。

5.2 提取溶剂对葛根总黄酮的影响：从表2中可以看出甲醇与95%乙醇提取总黄酮无显著性差异（ $P>0.05$ ）。采用70%乙醇提取收得率高些，但葛根黄酮的含量低。干燥后，吸湿性大，疏松度低，不利于制剂生产。因此，采用95%乙醇或甲醇作为葛根总黄酮的提取溶媒。

5.3 葛根品种的影响：从表2可以看出，野葛中总黄酮的含量要高于粉葛，且粉葛提取后呈膏状，不利于制剂的生产，因此，以野葛作为葛根总黄酮的提取原料。

（下转第539页）

可能与供试的植物种类和诱导材料有关。细胞分裂素对体细胞的诱导有较为显著的促进作用,1mg/L BA与1mg/L ZT配合,诱导率为5%~6%这与红豆草^[6]体细胞胚的诱导结果相一致。1mg/L NAA+2mg/L BA+3mg/L ZT+3mg/LGA₃配合使用,可将诱导率提高到12%~20%,达到最佳诱导效果。在体细胞胚的发生中激素起着非常重要的作用,这一点已由大量的报道所证实。但对于不同的植物种类及不同的诱导材料来说,诱导体细胞胚所要求的激素种类、组合和用量都不相同。

2.3.2 蔗糖、水解乳蛋白(LH)、MS有机物和维生素及FeSO₄(Na₂-EDTA)对体细胞胚发生的影响:以下胚轴来源的愈伤组织为材料,选用诱导效果最好的激素组合,然后分别加入蔗糖等4类物质,结果见表3。蔗糖浓度从3%提高到6%,可使体细胞胚诱导率从20%提高到42%。效果极为显著。已有报道阐明高浓度蔗糖对体细胞胚的发生有显著的促进作用^[9]。500mg/L LH,3倍MS有机物和维生素和3倍FeSO₄(Na₂-EDTA)的加入对体细胞胚的发生有明显的促进作用。4种物质配合使用,可使诱导率提高到51%。复合添加物质对体细胞胚发生的促进作用已在许多实验中得到证实^[6]。培养基中常常加入各种生长辅助物质如肌醇、烟酸、VB₁、VB₆等,对培养未分化的幼胚是必须的^[7]。

2.3.3.体细胞胚植株的形成:将形成体细胞胚的愈伤组织转入无激素的MS培养基中,2周后成形1cm左右的具根小苗(图,5)。外源激素的加入对体细胞胚的进一步发育不利。Al-Abta等^[10]认为从细胞决定到球形胚阶段依赖于外源激素的存在,但球形胚以后的发育受到外源激素的抑制。粗茎秦艽的体细胞胚的发育符合上述规律,形成的体细胞胚在无激素的MS培养基上分化成苗率可达90%以上。

致谢:粗茎秦艽种子由西北高原生物研究所刘建全同志赠送,在此深表谢意。

参 考 文 献

- 1 王晓燕.中草药,1993,24(4):189
- 2 宋振玉,等.生理学报,1958,22:201
- 3 张治国,等.浙江人民卫生实验院报,1983(34):217
- 4 刘伟华,等.遗传,1992,14(5):27
- 5 庄承纪,等.实验生物学报,1985,18(3):275
- 6 谷祝平,等.实验生物学报,1988,21(2):149
- 7 胡适宜,著.被子植物胚胎学.北京:人民教育出版社,1983.198
- 8 Evans D A, et al. *Planta Tissue Culture, Methods and Application in Agriculture*. New York: Academic Press, 1981.45
- 9 Lu C Y, et al. *J. Planta Physiol*, 1984, 115:237
- 10 Al-Abta S, et al. *New Physiologist*, 1979,82:29

(1994-05-16收稿)

(上接第523页)

5.1 紫外吸收光谱图一致,层析图谱,除了冷浸正丁醇萃取、硅胶柱层析外,其余层析图谱一致。因此,用甲醇冷浸法一步提取就可作为葛根总黄酮的提取工艺。

5.5 通过对葛根总黄酮薄层析中,5种展开溶媒的比较说明,以氯仿-甲醇-水(7:2.5:0.25)为最佳展开溶媒。因此,可作为葛根总黄酮分离时的展开溶媒。

参 考 文 献

- 1 李树珍,等.中草药,1994,25(9):496
- 2 郭建平,等.中草药,1995,26(3):163
- 3 顾学裘主编.药物制剂注解.北京:人民卫生出版社,1981.163
- 4 Kinjo J F, et al. *Chem Pharm Bull*, 1981,35(12):4846
- 5 中国医学科学院药物研究所.药学通报,1980,15(7):40
- 6 野原稔弘,他.现代东洋医学,1992,18(3):79
- 7 中国药典,1990.299

(1995-02-15收稿)