

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810150710.7

A61K 36/48 (2006.01)
A61P 11/14 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 39/02 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月11日

[11] 公开号 CN 101361786A

[22] 申请日 2008.8.25

[21] 申请号 200810150710.7

[71] 申请人 中国农业科学院草原研究所

地址 010010 内蒙古自治区呼和浩特市乌兰察布东路120号

[72] 发明人 吴洪新 阿拉木斯 孙启忠 刘雅学
王育青 夏明 那日苏 戴雅婷

[74] 专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务所
代理人 李郑建

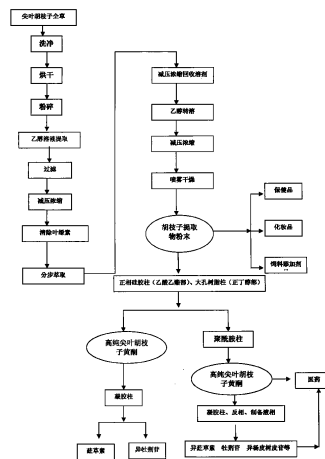
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 14 页

[54] 发明名称

从牧草尖叶胡枝子中提取和纯化总黄酮及其单体分离方法

[57] 摘要

本发明公开一种从牧草尖叶胡枝子中提取和纯化总黄酮及其单体分离的方法，该方法将尖叶胡枝子全草洗净，烘干，粉碎，乙醇加热回流提取，提取液浓缩为稀酒精溶液，石油醚萃取法清除叶绿素，将萃取后的溶液减压浓缩除去残余的酒精后，依次用乙酸乙酯与正丁醇萃取，回收溶剂，乙醇转溶，减压浓缩，喷雾干燥得到尖叶胡枝子提取物。然后分别过正相硅胶柱，聚酰胺柱，得黄色沉淀即为尖叶胡枝子总黄酮，并对总黄酮进行了单体化合物的分离，经质谱仪与核磁共振色谱对其结构进行了鉴定，分别是荭草素、异荭草素、牡荆苷、异牡荆苷、异杨梅树皮苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷。本发明流程简单，设计合理，提取效率高，得到的产品纯度高，有利于工业化生产。



1、一种从牧草尖叶胡枝子中提取和纯化总黄酮及其单体分离方法，其特征在于，包括如下步骤：

步骤一，选择9~10月采收的尖叶胡枝子全草或带根全草，洗净烘干，粉碎至60~100目，得到尖叶胡枝子草粉；

步骤二，对尖叶胡枝子草粉放入多功能提取罐内加热回流提取，溶剂选择浓度70%的乙醇水溶液，尖叶胡枝子草粉与乙醇水溶液的比例为1:20、提取三次，每次提取时间为2h，合并乙醇提取液，减压浓缩到原体积的1/2；

步骤三，将乙醇提取液与等体积石油醚连续萃取5次，清除其中叶绿素；

步骤四，将除完叶绿素的提取液70℃下减压浓缩，除去乙醇，浓缩至原体积的1/3；

步骤五，浓缩后的提取液用乙酸乙酯萃取至乙酸乙酯层无色；合并乙酸乙酯萃取液，减压浓缩得乙酸乙酯萃取液浸膏；

步骤六，乙酸乙酯萃取后的水层继续用正丁醇萃取，萃取至正丁醇部无色，合并正丁醇萃取液，减压浓缩得正丁醇萃取液浸膏；

步骤七，将乙酸乙酯浸膏过正相硅胶柱，以氯仿：甲醇为80:20进行洗脱，蒸干溶剂，乙醇转溶，洗脱过滤得到黄色沉淀和滤液两部分，其中：

黄色沉淀中含有的黄酮纯度达98%，TCL结果显示该黄色沉淀为两个化合物的共沉物，将黄色沉淀上凝胶柱，得到两个黄酮单体，分别为化合物荭草素和牡荆苷；

将滤液浓缩成浸膏，上80~100目的聚酰胺柱，依次用不同浓度的乙醇水溶液梯度洗脱，据TCL结果，黄酮集中于30%和50%的乙醇水溶液部，合并浓缩30%和50%乙醇水溶液部，得黄色粉末，该黄色粉末的黄酮纯度为95%；

步骤八，将正丁醇萃取液浸膏过大孔吸附树脂，用不同浓度的乙醇水梯

度溶液洗脱，根据 TCL 结果显示，黄酮部集中于 30%与 50%浓度的乙醇水溶液部，合并 30%流分、50%流分，浓缩得黄色粉末，该黄色粉末的黄酮纯度高达 95%；

步骤九，分别对步骤七、步骤八两部分的黄色粉末沉淀，点板，据 TCL 结果合并，取此黄色粉末，依次通过凝胶柱、反相柱及高效液相制备色谱得到的化合物经结构鉴定分别是异荛草素，异牡荆苷、异杨梅树皮苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷。

从牧草尖叶胡枝子中提取和纯化总黄酮及其单体分离方法

技术领域

本发明属于一种牧草的深开发与利用领域，具体地说是一种从优质牧草尖叶胡枝子中提取及纯化总黄酮并将总黄酮进行单体分离的方法，并将分离得到的总黄酮单体通过核磁共振光谱及质谱进行结构鉴定。

背景技术

胡枝子属 (*Lespedeza Michx*) 是豆科 (*Leguminosae*) 蝶形花亚科中一个较大的属，全世界约 60 余种，分布于东亚至澳大利亚东北部及北美。我国产 26 种，除新疆外，广布于全国各省区。该属植物中约有一半以上的种作为民间草药使用。有清热解毒、润肺止咳、利尿消肿、活血止痛之功，主要用于治疗感冒发烧、肺热咳嗽、跌打损伤、风湿痹痛、淋症、遗尿及蛇伤等。其中，胡枝子 (*L. bicolor*)、截叶铁扫帚 (*L. cuneata*) 等，早在《救荒本草》、《分类草药性》、《滇南本草》中就有记载。胡枝子属植物含黄酮、生物碱、萜类、甾醇、有机酸、鞣质等多种化学成分，具有抗炎、抗过敏、抗早孕、镇痛等药理活性，特别是黄酮类化合物对，肾功能不全的治疗作用尤为显著。上世纪六、七十年代国内外就有科研人员开展了对其化学成分的研究，发现黄酮类是主要的次生代谢产物，并已从该属的圆叶胡枝子、兴安胡枝子、截叶铁扫帚、头状胡枝子、短梗胡枝子、大叶胡枝子、山豆花、美丽胡枝子中分离出 64 种黄酮类化合物。

尖叶胡枝子 (*Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag.) 为中旱生草本状小半灌木，在森林和森林草原带的草甸草原群落中常成为优势种或伴生种，为草原带的山地灌丛伴生成分。由于尖叶胡枝子具有抗旱、耐寒、耐瘠薄及适应性广等特性，是良好的水土保持植物，并且具有返青早、枯黄晚、叶量

大、营养价值高、适口性好等特点，是改良干旱、半干旱区退化草地和建植人工草地的优良牧草，作为生态草和优良牧草，近年来受到格外重视。《全国中草药汇编》中记载尖叶胡枝子全株入药，苦，微寒，可止泻利尿，止血，主治痢疾，遗精，吐血，子宫下垂。

发明内容

本发明的目的在于，提供一种从牧草尖叶胡枝子中提取和纯化总黄酮及其单体分离方法，该方法的总黄酮提取率高，工艺简单，为优质牧草尖叶胡枝子进一步深开发提供技术路线；同时对总黄酮进行单体的分离，为尖叶胡枝子的深开发提供药理活性依据。

为了实现上述任务，本发明采取如下的技术解决方案：

一种从牧草尖叶胡枝子中提取和纯化总黄酮及其单体分离方法，其特征在于，包括如下步骤：

步骤一，选择 9~10 月采收的尖叶胡枝子全草或带根全草，洗净烘干，粉碎至 60~100 目，得到尖叶胡枝子草粉；

步骤二，对尖叶胡枝子草粉放入多功能提取罐内加热回流提取，溶剂选择浓度为 70% 的乙醇水溶液，尖叶胡枝子草粉与乙醇水溶液的比例为 1:20、提取时间 2h，提取三次，合并乙醇提取液，减压浓缩到原体积的 1/2；

步骤三，将乙醇提取液与等体积石油醚连续萃取 5 次，清除其中叶绿素；

步骤四，将除完叶绿素的提取液 70℃ 下减压浓缩，除去乙醇，浓缩至原体积的 1/3；

步骤五，浓缩后的提取液用乙酸乙酯萃取至乙酸乙酯层无色；合并乙酸乙酯萃取液，减压浓缩得乙酸乙酯萃取液浸膏；

步骤六，乙酸乙酯萃取后的水层继续用正丁醇萃取，萃取至正丁醇部无色，合并正丁醇萃取液，减压浓缩得正丁醇萃取液浸膏；

步骤七，将乙酸乙酯浸膏过正相硅胶柱，以氯仿：甲醇为 80:20 进行洗

脱，蒸干溶剂，乙醇转溶，过滤洗脱得到黄色沉淀和滤液两部分，其中：

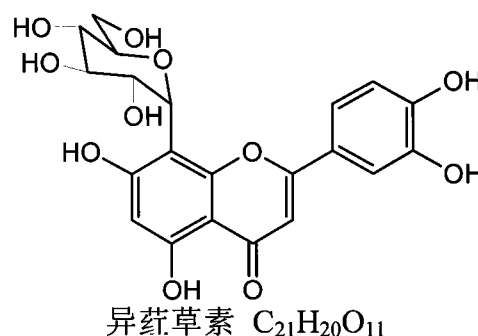
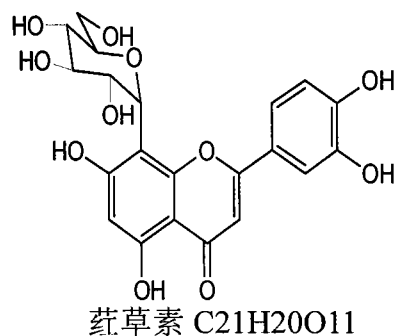
黄色沉淀中含有的黄酮纯度达 98%，TCL 结果显示该黄色沉淀为两个化合物的共沉物，将黄色沉淀上凝胶柱，得到两个黄酮单体，经核磁与质谱鉴定分别为化合物荭草素和牡荆苷；

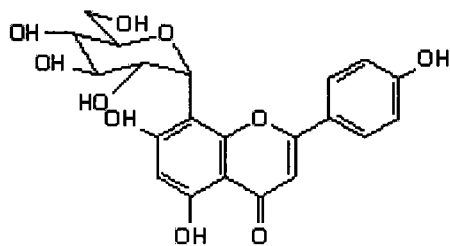
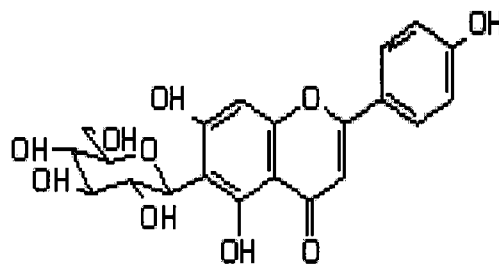
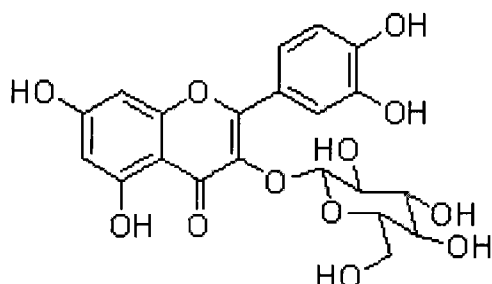
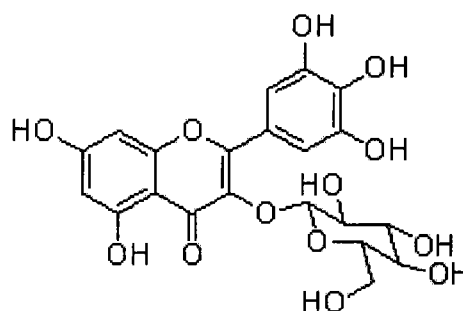
将滤液浓缩成浸膏，上 80~100 目聚酰胺柱，依次用不同浓度的乙醇水溶液梯度洗脱，据 TCL 结果，黄酮集中于 30%和 50%的乙醇水溶液部，合并浓缩得黄色粉末，该黄色粉末的黄酮纯度高达 95%；

步骤八，将正丁醇萃取液浸膏过大孔吸附树脂，乙醇水梯度洗脱，TCL 结果显示，黄酮部集中于 30%与 50%乙醇部，合并浓缩，上 80~100 目聚酰胺柱，乙醇水梯度洗脱，据 TCL 结果合并 30%流分、50%流分，浓缩得黄色粉末，该黄色粉末的黄酮纯度高达 95%；

步骤九，分别对步骤七、步骤八两部分的黄色粉末沉淀，点板，据 TCL 结果合并，取此黄色粉末，依次通过凝胶柱、反相柱及高效液相制备色谱得到的化合物，经结构鉴定分别是异荭草素，异牡荆苷、异杨梅树皮苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷。

本发明选取分布于内蒙古自治区的尖叶胡枝子以黄酮的生理功能为出发点，对尖叶胡枝子的总黄酮提取的工艺进行研究，并对其总黄酮进行了单体分离，并对得到的化合物进行了结构鉴定。结果表明：尖叶胡枝子中的总黄酮主要含有荭草素，异荭草素、牡荆苷，异牡荆苷的碳苷黄酮，其中含量占总黄酮含量的 90%。另外异杨梅树皮苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷等氧苷黄酮，占总黄酮的比例较小。其具体结构如下：



牡荆苷 vitexin $C_{21}H_{20}O_{10}$ 异牡荆苷 isovitexin $C_{21}H_{20}O_{10}$ 槲皮素-3-O-葡萄糖苷 $C_{21}H_{20}O_{12}$ 异杨梅树皮苷 $C_{21}H_{20}O_{13}$

碳苷黄酮是指糖直接与黄酮以C-C键联结。迄今为止从自然界中分离到的黄酮碳苷有几十种，碳苷黄酮的药理活性为：

(1) 保肝作用 1992年，K. Hoffmann-bohm等从*Allophyllus edulis*的叶中分类到一系列黄酮碳苷，且第一次发现黄酮碳苷对 CCL_4 和半乳糖胺诱导的肝脏毒性具有保护作用。2003年，Didem DO等也以 CCL_4 诱导小鼠肝脏毒性模型评价*Gentiana olivieri* Criseb的保肝作用，并以此为活性追踪的方法分离到碳苷黄酮异荭草素，在 $15mg \cdot kg$ 的剂量下具有显著保肝作用。

(2) 抗氧化作用 1991年，J. Budzianowski等研究了荭草素、牡荆素等10种碳苷黄酮的抗氧化活性，结果表明荭草素、异荭草素具有显著的抗氧化作用。

(3) 抗甲状腺和致甲状腺肿作用 1989年，E. Gaitan等在调查半干旱热带地区甲状腺肿病流行的证据过程，发现粟是该地区主要的事物来源，于是同年和1995年在离体和活体上研究了粟与甲状腺的关系。研究结果表明碳苷黄酮异荭草素、荭草素、牡荆素具有抑制甲状腺过氧化酶活性，尤其粟中

主要碳苷黄酮牡荆素 $60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下抑制活性与 $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MML相当，具有抗甲状腺和致甲状腺肿作用。

(4) 杀虫作用 maysin (玉米的可凝性球蛋白)，是玉米中分离到的碳苷黄酮，Guo BZ等在研究玉米的可凝性球蛋白时发现它具有杀虫活性。

(5) 抗病毒活性 2002年，Yao-lan li等评价了*Trollius chinensis Bunge*的总黄酮及其分离到的单体的抗病毒活性，结果表明60%乙醇粗提物、总黄酮对Para3病毒具有弱活性，黄酮碳苷牡荆苷 (Vitexin) 和荭草素 (Orientin) 显示中等的抗Para3病毒活性。

附图说明

图 1 是通过不同类型大孔吸附树脂容量比较图；

图 2 是不同类型大孔吸附树脂解析黄酮比较图；

图 3 是本发明的生产工艺技术路线图；

图 4 是化合物提取技术路线图；

图 5 为化合物荭草素的氢谱图；

图 6 为化合物荭草素的碳谱图；

图 7 为化合物牡荆苷的氢谱图；

图 8 为化合物异牡荆苷的碳谱图；

图 9 是化合物异牡荆苷的氢谱图；

图 10 是化合物异杨梅树皮苷的氢谱图；

图 11 是化合物异杨梅树皮苷的碳谱图；

图 12 为化合物槲皮素-3-O-葡萄糖苷的氢谱图；

图 13 为化合物槲皮素-3-O-葡萄糖苷的碳谱图；

图 14 化合物异荭草素的氢谱图；

图 15 为化合物异荭草素的氢谱图。

以下结合附图和具体实施例对本发明作进一步的详细说明。

具体实施方式

本发明是从牧草尖叶胡枝子中提取和纯化总黄酮及其单体分离方法，步骤包括：

1、选料及其处理：

选择 9~10 月采收的尖叶胡枝子全草或带根全草，洗净烘干，粉碎至 60~100 目；

2、尖叶胡枝子的黄酮提取：

尖叶胡枝子提取物的采用加热回流提取法，根据相似相溶原理，按黄酮类化合物的极性来选择所用的溶剂。尖叶胡枝子所含的有效活性物质主要为黄酮苷类，具有较大的极性和亲水性，故可以选择水、甲醇，乙醇、丙酮等溶剂进行浸提。但在实际生产中由于水的极性过大，易于将蛋白、糖类的易溶于水的成分浸提出来，且水提法得到的提取物在存放过程易发霉，从而影响黄酮类化合物的分离；而甲醇有较大的毒性，不易用于生产，故一般选用较经济的乙醇水溶液作为浸提与洗脱溶剂。

加热乙醇回流提取，分别考查了提取时间、物液比、提取次数、提取温度及乙醇浓度对尖叶胡枝子黄酮的得率的影响。在以上单因素实验的基础上，对提取时间、固液比、乙醇浓度、及提取温度进行正交试验， $L_{16}(4^5)$ 实验设计，通过单因素的结果确定了正交试验水平如下表所示：

正交试验的因素水平表

因素	A (乙醇浓度)	B (温度) °C	C (料液比)	D (时间) H
水平	A ₁ (50%)	B ₁ (40)	C ₁ (1:20)	D ₁ (2)
	A ₂ (60%)	B ₂ (50)	C ₂ (1:30)	D ₂ (2.5)
	A ₃ (70%)	B ₃ (60)	C ₃ (1:40)	D ₃ (3)
	A ₄ (80%)	B ₄ (70)	C ₄ (1:50)	D ₄ (4)

正交结果表

试验号	因素					试验指标			
	A	B	C	D	空列	I	II	III	和 T
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	1	5.94	5.39	5.71	17.04
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	2	4.62	4.79	4.32	13.73
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	3	4.81	4.80	4.47	14.08
4	A ₁	B ₄	C ₄	D ₄	4	4.52	4.44	4.75	13.71
5	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	4	3.99	4.28	4.35	12.62
6	A ₂	B ₂	C ₁	D ₄	3	5.30	5.34	5.18	15.82
7	A ₂	B ₃	C ₄	D ₁	2	5.27	5.32	5.75	16.34
8	A ₂	B ₄	C ₃	D ₂	1	5.91	5.73	5.83	17.47
9	A ₃	B ₁	C ₃	D ₄	2	5.90	5.86	5.57	17.32
10	A ₃	B ₂	C ₄	D ₃	1	5.82	5.63	5.90	17.35
11	A ₃	B ₃	C ₁	D ₂	4	5.57	6.03	5.87	17.47
12	A ₃	B ₄	C ₂	D ₁	3	5.68	5.73	5.60	17.02
13	A ₄	B ₁	C ₄	D ₂	3	5.81	5.51	5.30	16.62
14	A ₄	B ₂	C ₃	D ₁	4	5.60	5.74	5.68	17.02
15	A ₄	B ₃	C ₂	D ₄	1	5.79	6.02	5.84	17.65
16	A ₄	B ₄	C ₁	D ₃	2	5.50	5.97	5.79	17.26
K ₁	58.57	63.61	67.60	67.42					
K ₂	62.26	63.92	61.03	65.30					
K ₃	69.15	65.55	65.89	61.31					
K ₄	68.56	65.46	64.02	64.51					
k ₁	14.64	15.90	16.90	16.86					
k ₂	15.56	15.98	15.26	16.33					
k ₃	17.29	16.39	16.47	15.33					
k ₄	17.14	16.36	16.01	16.13					
R	2.65	0.49	1.64	1.53					

由正交表直观分析结果：影响提取量的因素从大到小依次为 $A > C > D > B$ ，即乙醇浓度对提取量的影响程度最大，其次为物液比及提取时间，而提取温度对黄酮提取量的影响最小。其中 A 中以 A₃ 数值最高，B 中以 B₃ 最好，C 因素中以 C₁ 为最佳，D 以 D₁ 最好。由于不考虑交互作用，故处理 A₃B₃C₁D₁ 为最佳提取工艺参数组合，即选择乙醇浓度为 70%、提取温度为 60℃、物液比 1: 20、提取时间为 2h。

方差分析结果见下表：

方差来源	df	SS	MS	F	F_{α}
A	3	6.523	2.174	17.164**	$F_{0.05(3,35)}=2.288$
B	3	0.257	0.086	0.675	$F_{0.01(3,35)}=4.40$
C	3	1.980	0.660	5.209**	
D	3	1.607	0.536	4.228*	
误差 e_1	3	3.293			
误差 e_2	32	1.141			
误差 e	35	4.434			
总和	47	19.234			

由方差分析表可知： $F_A > F_{0.01}(3, 35)$ 、 $F_B < F_{0.05}(3, 35)$ 、 $F_C = F_{0.01}(3, 35)$ 、 $F_{0.05}(3, 35) < F_D < F_{0.01}(3, 35)$ ，即乙醇浓度、物液比对提取量的影响达到极显著水平；提取时间对提取量的影响达显著水平；而提取温度对提取量没有显著影响。

即乙醇浓度 70%、提取温度 60℃、物液比 1: 20、提取时间 2h 为提取工艺的最佳参数。

3. 萃取法清除叶绿素

将乙醇提取液减压浓缩到原体积的 1/2，与等体积石油醚连续萃取 5 次（注意：由于脂溶性叶绿素不溶于水，如浓缩体积过小叶绿素以沉淀的形式析出来，使萃取无法进行）。

4. 尖叶胡枝子黄酮的分部

依据黄酮的分子结构、极性大小及溶解性，所选择的萃取剂为乙酸乙酯和正丁醇。将除完叶绿素的提取液浓缩至无醇，依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取，减压浓缩得到乙酸乙酯萃取液浸膏和正丁醇萃取液浸膏。

5. 正丁醇萃取液浸膏过大孔树脂除杂质及粗分

大孔吸附树脂柱色谱是以大孔吸附树脂为固定相，使天然提取物提取液通过其树脂柱，其中有效成分有选择性地吸附在树脂上，而杂质成分不被吸附，再经过适当的溶剂洗脱，收集含有效成分的流出液，合并浓缩，回收溶剂，便可除掉天然物提取液中的杂质成分，达到有效成分与提取液中糖类、

色素等杂质分离的目的。

对国产的五种树脂与四种进口的大孔树脂依次进行了静态吸附与解吸实验，通过树脂的吸附容量与解析率初选了四种进口的大孔吸附树脂（sp700、hp20、hp2mg、sp825），对这四种大孔吸附树脂进行了静态吸附动力学曲线、与动态解吸动力学曲线，树脂的选型时，通过不同类型大孔吸附树脂容量比较（图1）以及不同类型大孔吸附树脂解析黄酮比较（图2），据试验结果最终选择出了一种吸附与解吸黄酮效果均较好的一种树脂 sp700。

将称取已处理好的干树脂 sp700 湿法装柱，用蒸馏水洗涤平衡，上样后吸附 12h 后洗脱，洗脱速度为 1.5 ml/min，用蒸馏水洗至无色，TCL 跟踪至有黄酮液流出，然后换用 30%浓度的乙醇和 50%浓度的乙醇分别进行洗脱，分别收集 30%浓度乙醇的洗脱液、50%的乙醇洗脱液，洗脱液在 70℃下减压浓缩待上聚酰胺柱进一步纯化。

6. 乙酸乙酯萃取液浸膏过正相硅胶柱

将乙酸乙酯萃取液浸膏过正相硅胶柱，氯仿和甲醇以 80:20 配比洗脱至无色。依据 TCL 合并，收集洗脱流分，有黄色沉淀析出反复洗沉，过滤得到纯度高达 98%的黄酮，取 30mg 此沉淀过凝胶柱得到二个化合物，经结构鉴定分别为荛草素及牡荆苷。滤液浓缩待上聚酰胺柱纯化。

7. 聚酰胺柱精制

将上述步骤 5 过大孔树脂后的 30%、50%的醇洗脱液与步骤 6 正相硅胶柱后洗脱沉淀的滤液浓缩后分别上聚酰胺柱（80-100 目）以 30%浓度的乙醇与 50%浓度的乙醇梯度洗脱，浓缩洗脱液得黄色沉淀，经紫外及硫酸显色后的结果表明为黄酮类化合物，反复洗沉其纯度可达到 98%。

将得到的黄酮依次用凝胶柱，反相柱及液相制备色谱手段，最后得到个黄酮类化合物经结构鉴定（鉴定结果附图）分别为异荛草素、异牡荆苷、异杨梅树皮苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷。

采用本发明的方法带来的优点是：

1、总黄酮提取及纯化工艺低毒且成本低

提取尖叶胡枝子的总黄酮是工艺流程的关键技术之一，根据尖叶胡枝子黄酮类化合物极性选择适宜的提取溶剂，全部提取过程中，所采用的试剂均为毒性较低的试剂，避免了现行国外生产过程中大量采用的有毒试剂。由于黄酮类化合物的种类很多，性质也千差万别，主要利用其极性的大小、酸性的强弱及分子中能否螯合金属离子的结构进行分离。硅胶柱色谱与聚酰胺柱色谱交替用于尖叶胡枝子黄酮的分离与纯化，此法方便、操做性强、成本低。

2、原料优势：

黄酮类化合物广泛存在于高等植物中，但受含量、资源与成本的限制，真正用于开发黄酮的植物资源有限，尖叶胡枝子作为黄酮的提取原料具有黄酮含量高、资源丰富、价格低廉的优势。申请人已进行了种子苗期抗旱性研究，表明在内蒙古地区均适宜种植，且栽培技术成熟，为产业化提供原料成为可能。本发明所述的从尖叶胡枝子中提取分离总黄酮的方法充分利用了尖叶胡枝子资源，其经济效益、社会效益显著，生态效益巨大。

3、能够实现生产尖叶胡枝子总黄酮的植物资源的综合利用

尖叶胡枝子中不仅含有丰富的黄酮，而且含有大量的其它代谢产物，如多糖，生物碱等这些次生代谢产物往往是重要的生理活性物质，有些已被开发成药物或功能性食品添加剂，在人们的生活中有非常重要的意义，另外，提取完的残渣可以制成草颗粒用于畜养的饲料，减少了原料的浪费，使资源得到了更好的利用，因此，本发明的提取和纯化总黄酮及其单体分离方法，能够在不影响黄酮的产量和质量的情况下，成功的提取并保留住植物中的有效成分，实现植物资源的综合开发利用。

4、得到的黄酮纯度高且富含碳苷黄酮

本发明的方法得到的尖叶胡枝子总黄酮纯度高达 95%以上，从总黄酮分离到了四种碳苷黄酮与二种氧苷黄酮，且碳苷黄酮为尖叶胡枝子总黄酮的主

要成分，占有较大的比例。据资料表明，碳苷黄酮的功能因子主要是黄酮糖苷，并以 C-糖苷为主。四种主要的尖叶胡枝子碳苷黄酮分别是荭草素（Orientin）、异荭草素（Homorientin）、牡荆苷（Vitexin）和异牡荆苷（Isovitexin）。碳苷黄酮与普通的氧苷黄酮相比，具有以下几方面的突出优点：（1）结构稳定，不易被降解；（2）能深入病灶部位，直接发挥药效；（3）亲水性增强，有利于食品和药物的开发。国际学术界从 90 年代起开始关注碳苷黄酮，此领域属最新研究前沿。

5、实现黄酮单体的分离技术并进行了结构的鉴定

可以利用富含碳苷黄酮的尖叶胡枝子总黄酮进一步纯化得到荭草素、异荭草素、牡荆苷及异牡荆苷、异杨梅树皮苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷等单体化合物。

6、本发明的方法精简、科学、容易操作，得到的中间产物或最终产物用途广泛，具有一定的开发价值。具体如下：

1、膳食补充剂

主要功效：抗自由基，抗氧化，抗衰老；降低血脂和血胆固醇，保护心脑血管；抗菌，抗炎，抗前列腺增生；增强免疫力等。

主要用途：保健食品原料，用于开发具有调节血脂、增强免疫力、辅助降血压、抗病毒、抗炎等功效的保健食品。

2、化妆品

主要功效：抗自由基、抗氧化、抗辐射；抗炎、抑菌、除口臭；保湿、润肤、祛豆、祛色斑、防晒、美白等。

主要用途：作为功能性成分，添加至护肤品和牙膏、洗发液、沐浴液等个人护理用品。

3、天然饲料添加剂

主要功效：提高免疫力、抗应激；抗氧化、防霉、保鲜；改善肉质和商品性。主要用途：用于水产、家禽、家畜饲料等。

4. 医药

主要功效：抗自由基，抗氧化，抗衰老；抗血小板聚集，扩张冠状动脉，改善心肌缺血，降低血脂、血胆固醇和血压，保护心脑血管；抗菌，抗肿瘤；抗炎，利尿，抗前列腺增生等。

主要用途：心脑血管药物及保健品；前列腺疾病的治疗药物及保健品。

以下是发明人给出的实施例

实施例 1:

1、原料及其预处理:

原料选择尖叶胡枝子的全草或带根的全草，9~10月采收，洗净烘干，粉碎至60~100目，得尖叶胡枝子草粉。

2、乙醇加热回流提取:

取尖叶胡枝子草粉2.5kg，放入多功能提取罐内，加入50L的70%乙醇水溶液，加热至60℃，每次提取时间为2h，共提取三次。

3、过滤，浓缩:

合并三次提取液，过滤，将残渣晾干，制成草颗粒，用作家畜的饲料。滤液在70℃下减压浓缩为原来体积的1/2。

4、叶绿素的清除:

将浓缩后的提取液用等体积的石油醚萃取5次。石油醚可回收反复使用。

5、将除完叶绿素的提取液在70℃下减压浓缩，除去乙醇，浓缩至原体积的1/3。

6、乙酸乙酯萃取：将上述浓缩后的提取液，用乙酸乙酯萃取至乙酸乙酯层无色，合并乙酸乙酯萃取液，减压浓缩得乙酸乙酯萃取液浸膏。

7、正丁醇萃取：乙酸乙酯萃取后的水层继续用正丁醇萃取，萃取至正丁醇部无色，合并正丁醇萃取液，减压浓缩得正丁醇萃取液浸膏。

8、将乙酸乙酯萃取液浸膏过正相硅胶柱，以氯仿：甲醇=98:2~70:30进行梯度洗脱，收集洗脱流分，每份收集 500mL，根据 TCL 结果显示，黄酮部集中于氯仿：甲醇=80:20 部分，故对 80:20 部分的流分进行点板，据 TCL 结果进行合并，蒸干溶剂，乙醇转溶，洗脱过滤得到黄色沉淀，滤液浓缩成浸膏待上聚酰胺柱进一步纯化，该黄色沉淀含有的黄酮纯度达 98%。TCL 结果显示证明，黄色沉淀是两个化合物共沉物。取 30 毫克黄色沉淀上凝胶柱，得到两个黄酮单体，通过质谱仪与磁核共振仪对其进行结构鉴定，证明它们分别为荭草素及牡荆苷，其图谱参见图 5、图 6、图 7。

将过滤液浓缩的浸膏溶解，上聚酰胺（80~100 目）柱依次用乙醇水溶液梯度洗脱，据 TCL 结果，黄酮集中于乙醇浓度为 30%及乙醇浓度为 50%流分中，合并上述两部分流分，浓缩得黄色粉末，该黄色粉末中的黄酮纯度高达 95%。

9、将正丁醇萃取液浸膏过大孔吸附树脂，上聚酰胺柱（80~100 目），乙醇水梯度洗脱，据 TCL 结果显示，黄酮部集中于乙醇浓度为 30%与乙醇浓度为 50%的流分中，合并上述两部分流分，浓缩得黄色粉末，该黄色粉末的黄酮纯度高达 95%。

10、将步骤 8 中的滤液过聚酰胺柱后得到的总黄酮与步骤 9 中得到的总黄酮，据 TCL 结果，依次通过凝胶柱、反相柱及高效液相制备色谱得到单体化合物，经结构鉴定分别是异荭草素，异牡荆苷、异杨梅树皮苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷。

实施例 2:

称取尖叶胡枝子草粉 2.5kg，在 60℃的提取温度下，以 70%的乙醇作为提取溶剂，提取固液比为 1:20，提取 3 遍，每次提取 2 小时，合并提取液，过滤并减压浓缩至原来体积的 1/2。

将浓缩后的提取液用等体积的石油醚萃取 5 次，除去乙醇，浓缩至原体

积的 1/3;

用乙酸乙酯萃取至乙酸乙酯层无色,合并乙酸乙酯部,减压浓缩成乙酸乙酯萃取液浸膏。

将乙酸乙酯萃取液浸膏萃取后的水部用正丁醇萃取至正丁醇无色,合并浓缩得正丁醇萃取液浸膏。

将乙酸乙酯萃取液浸膏过正相硅胶柱,氯仿:甲醇为 80:20 洗脱,TCL 跟踪,据 TCL 结果将黄酮集中部分的进行合并,洗脱过滤得到黄色沉淀,黄酮纯度达 97%。将滤液浓缩成浸膏,上聚酰胺(80-100 目)柱依次用乙醇水溶液 30%与 50%梯度洗脱,据 TCL 结果,黄酮集中部合并浓缩得黄色粉末,黄酮纯度高达 96.5%。

将正丁醇萃取液浸膏,过大孔吸附树脂,用 30%与 50%浓度的乙醇溶剂水梯度洗脱,据 TCL 结果将黄酮部合并浓缩,上聚酰胺柱(80-100 目),30%、50%乙醇水梯度洗脱,据 TCL 合并流分,浓缩得黄色粉末,其黄酮纯度达 98%。

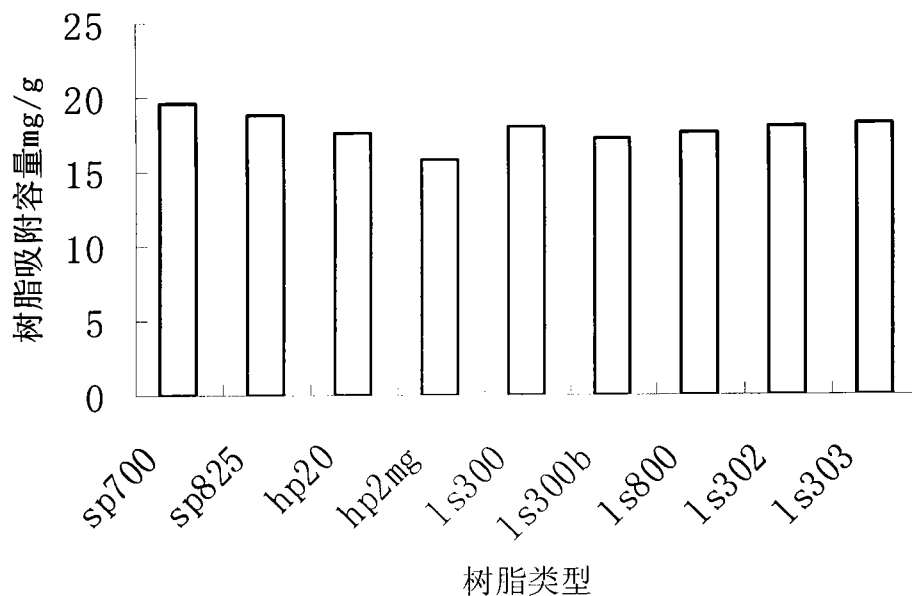


图 1

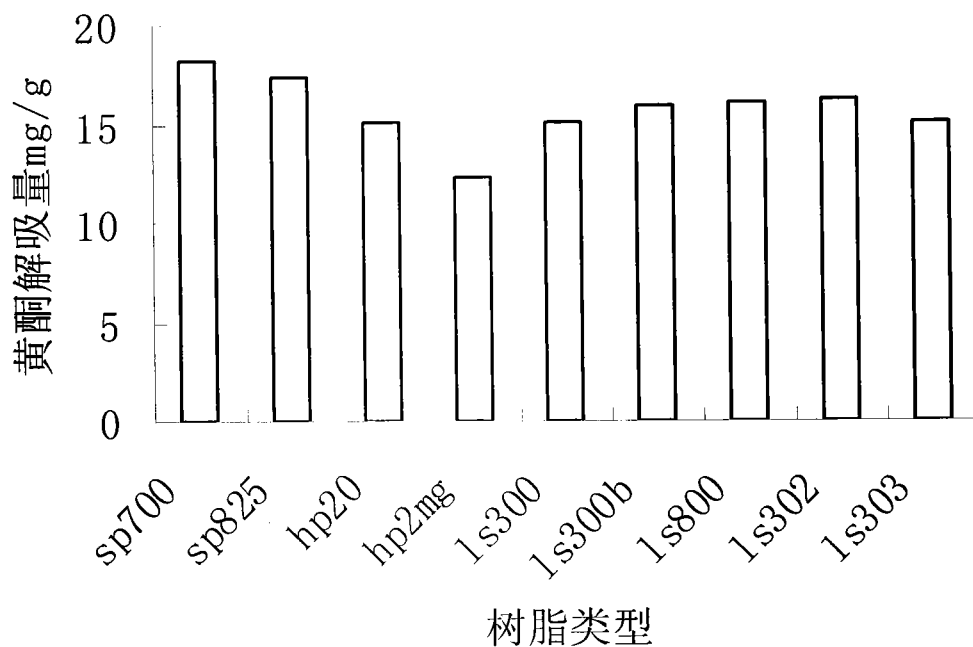


图 2

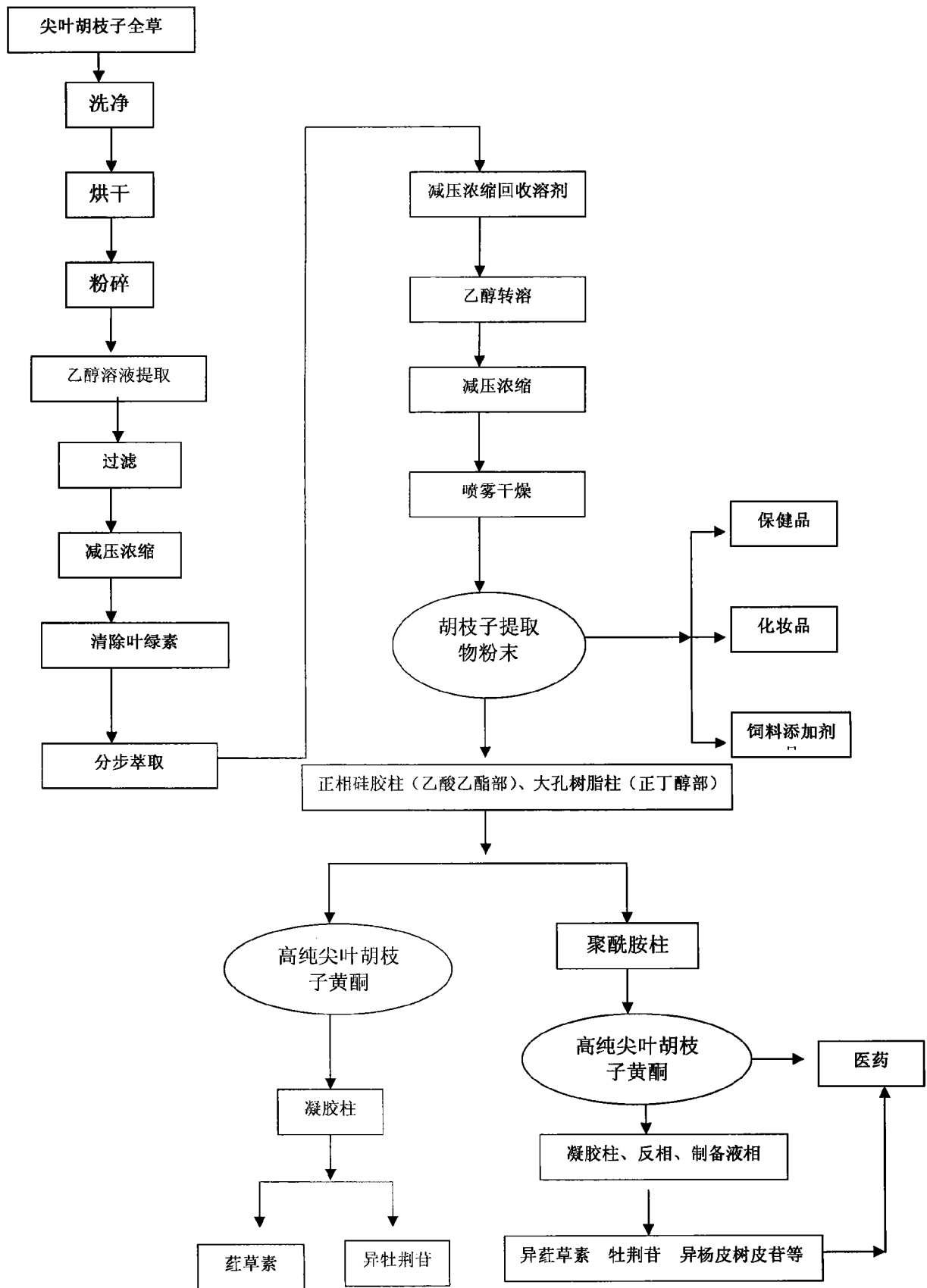


图 3

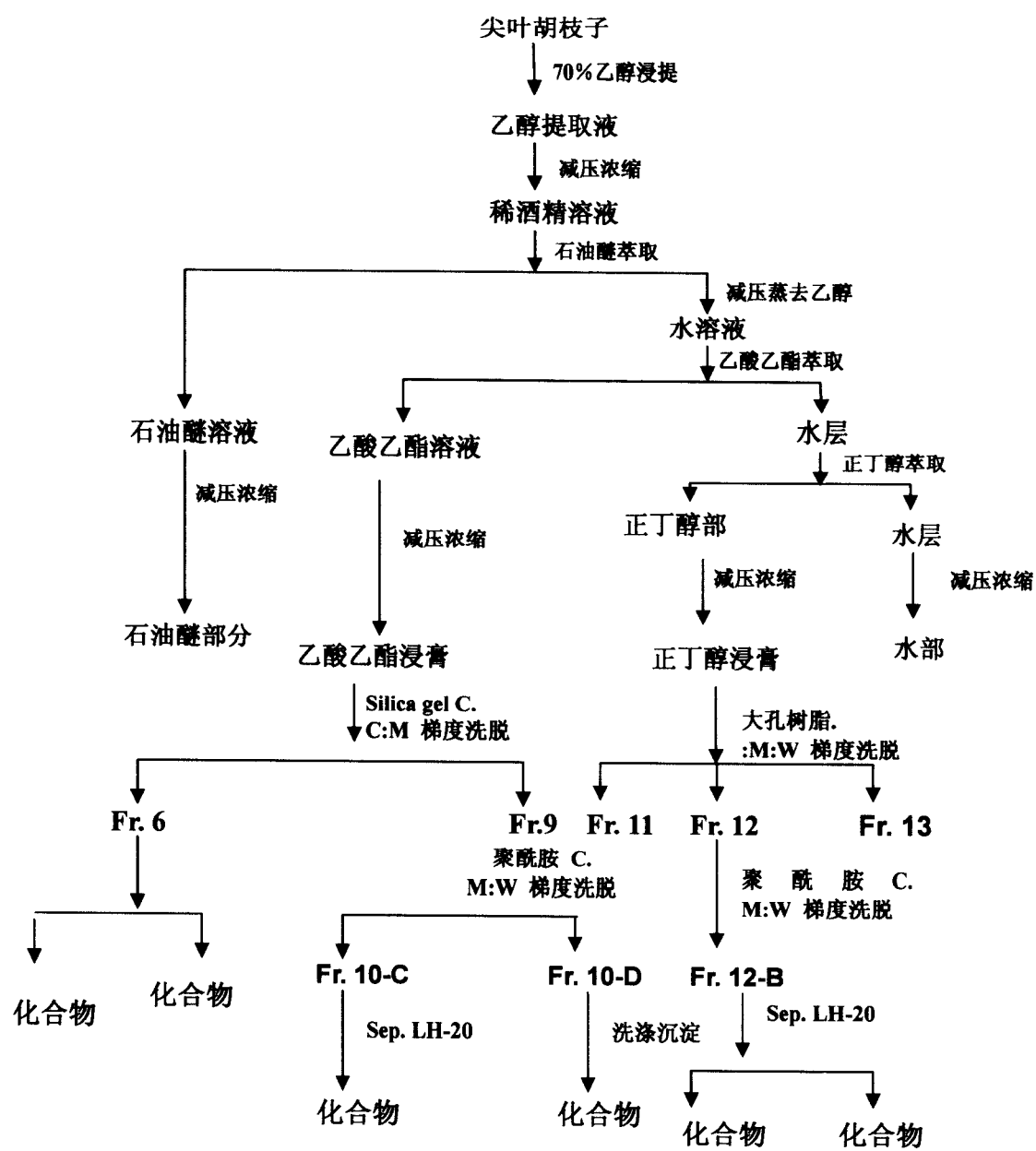
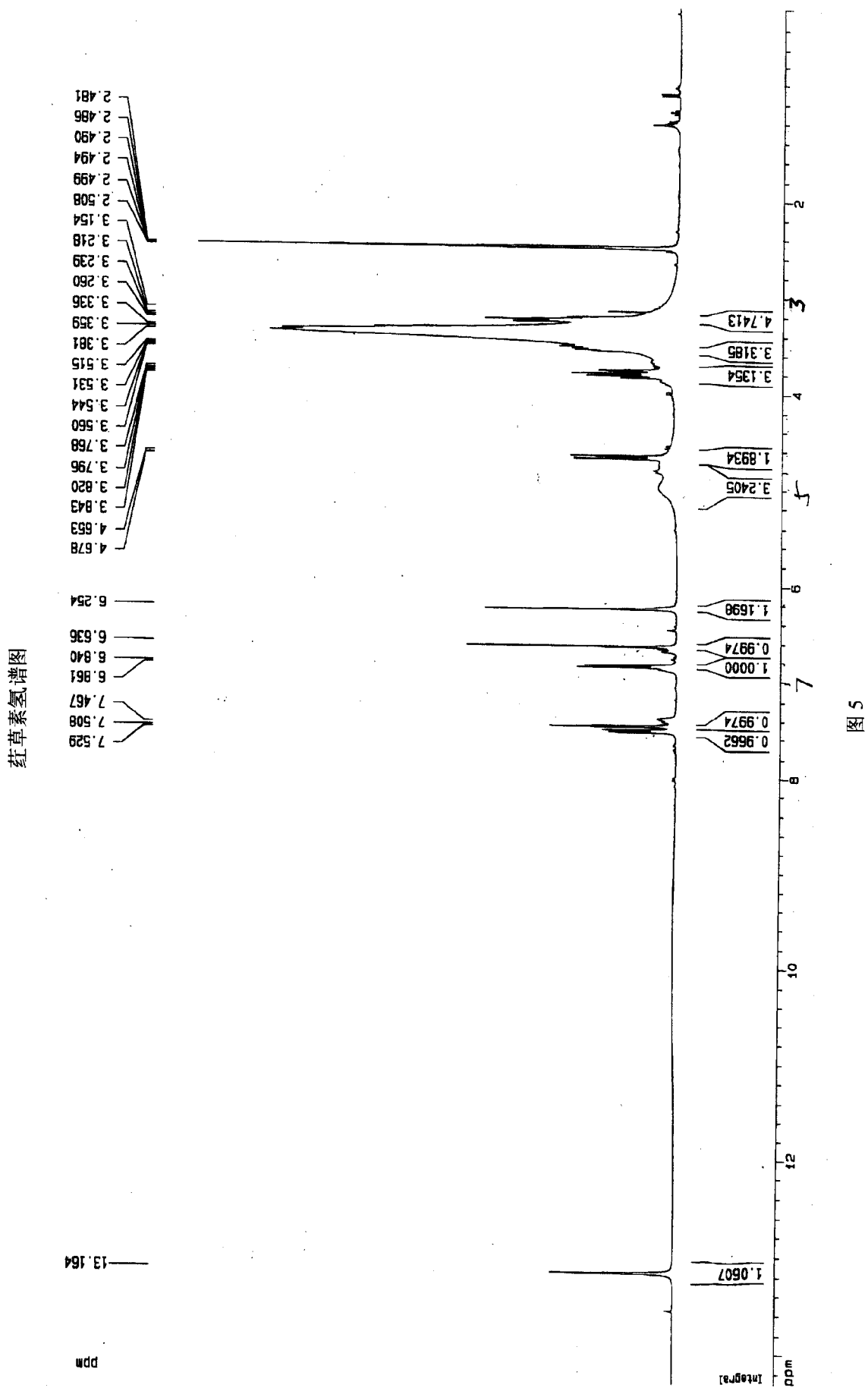


图 4



红草素碳谱图

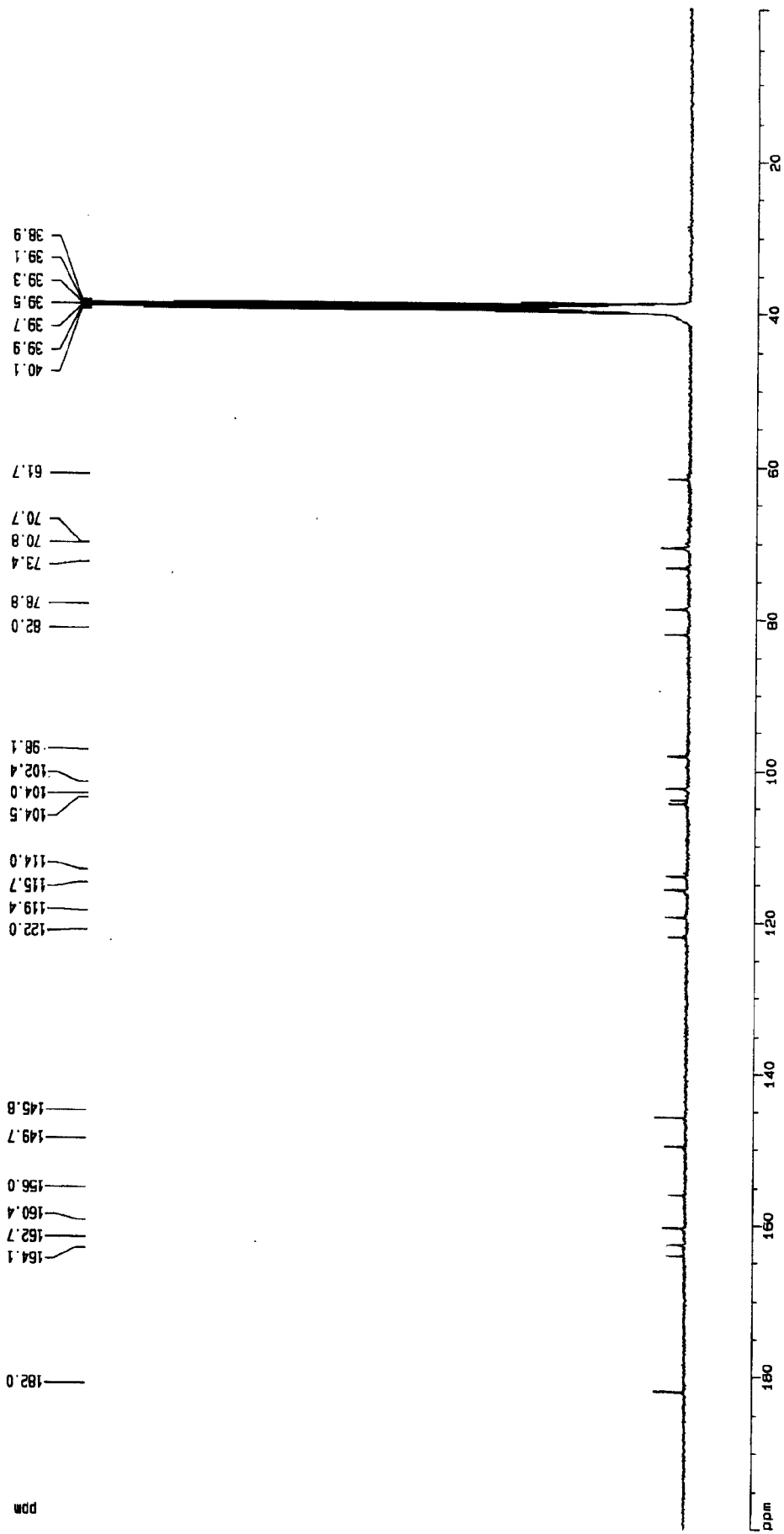


图 6

牡荆苷的氢谱图

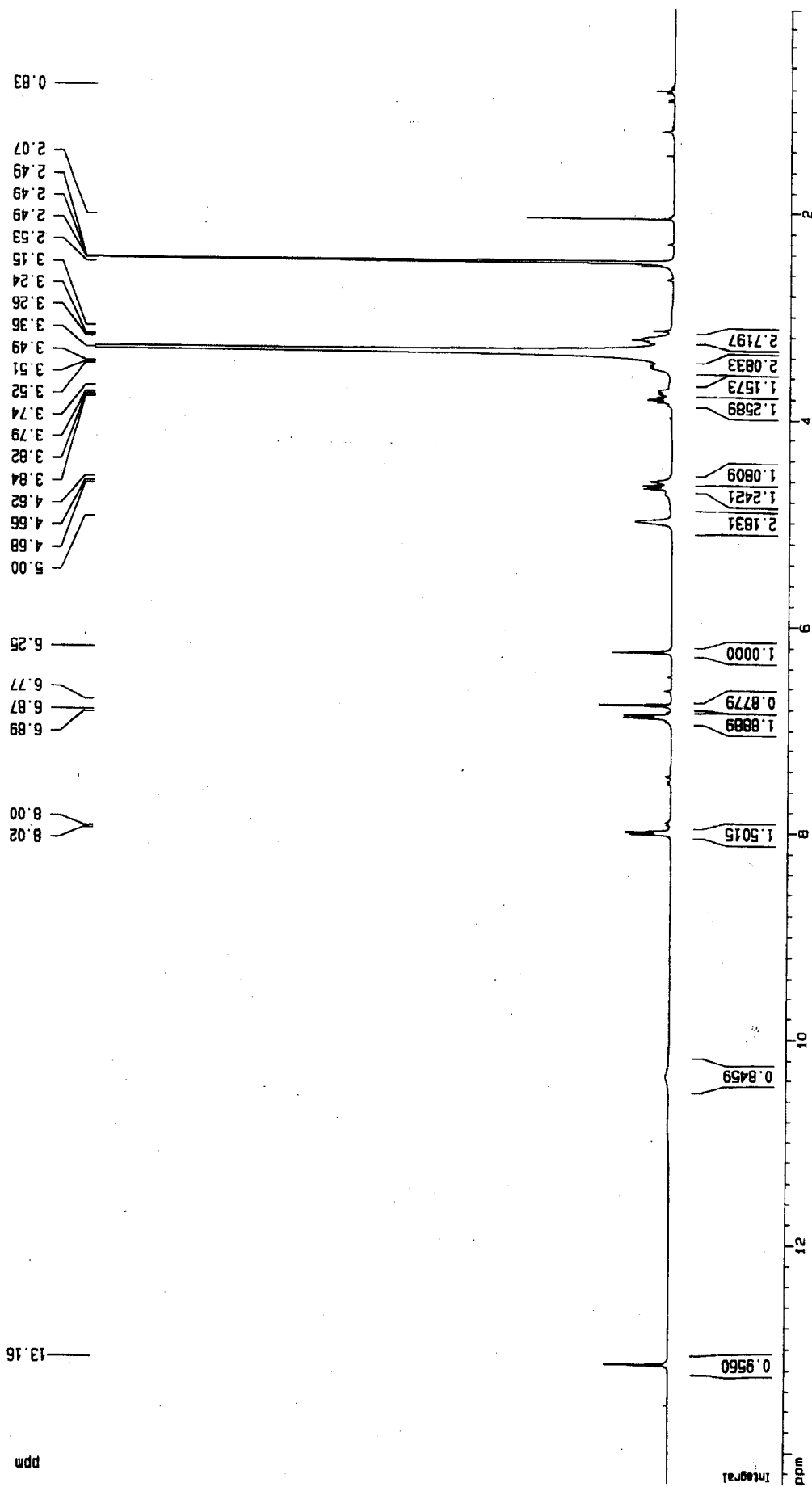


图 7

异牡荆苷的碳谱图

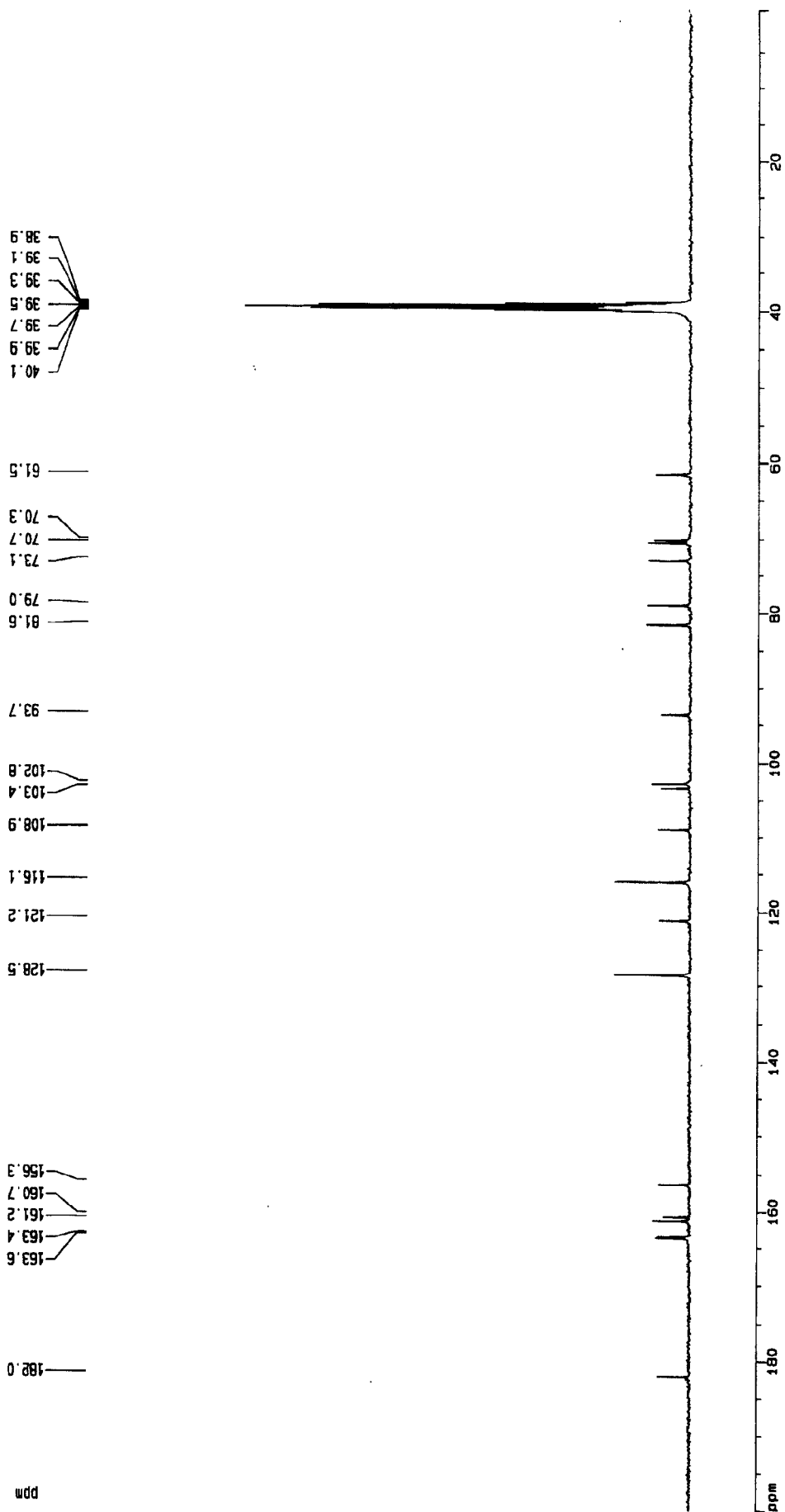
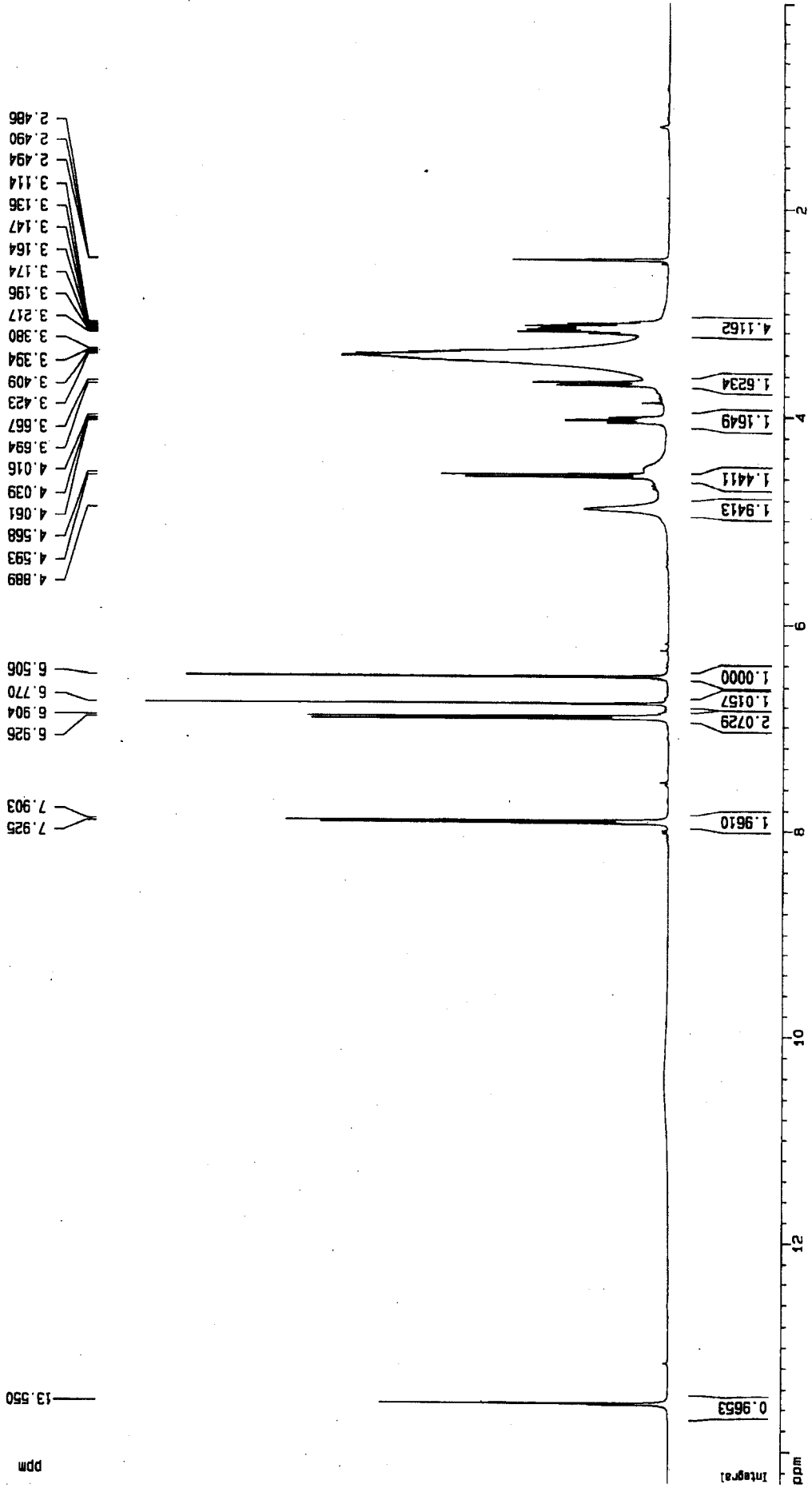


图 8

异牡荆苷的氢谱图



6图

异杨梅树皮苷氢谱图

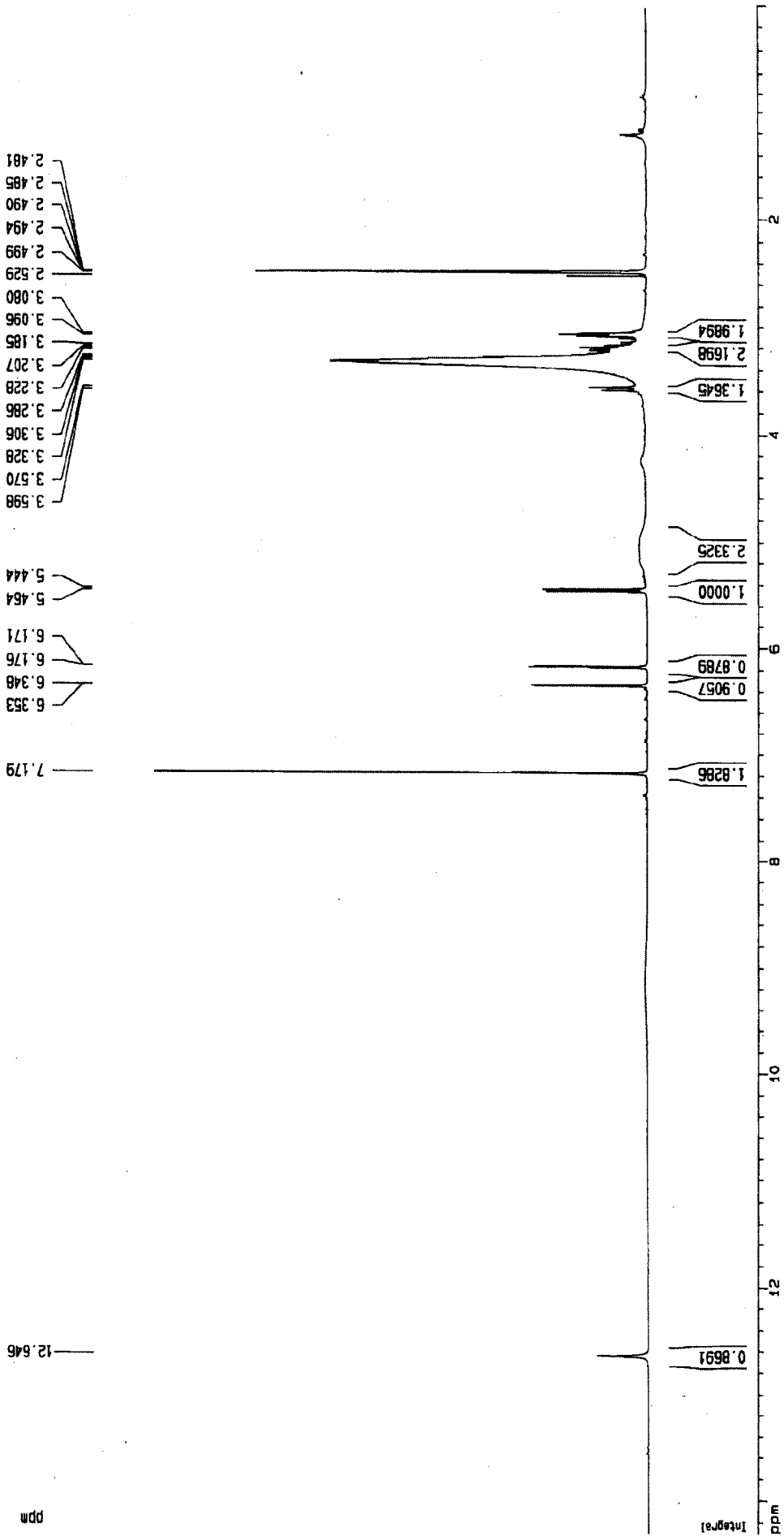


图 10

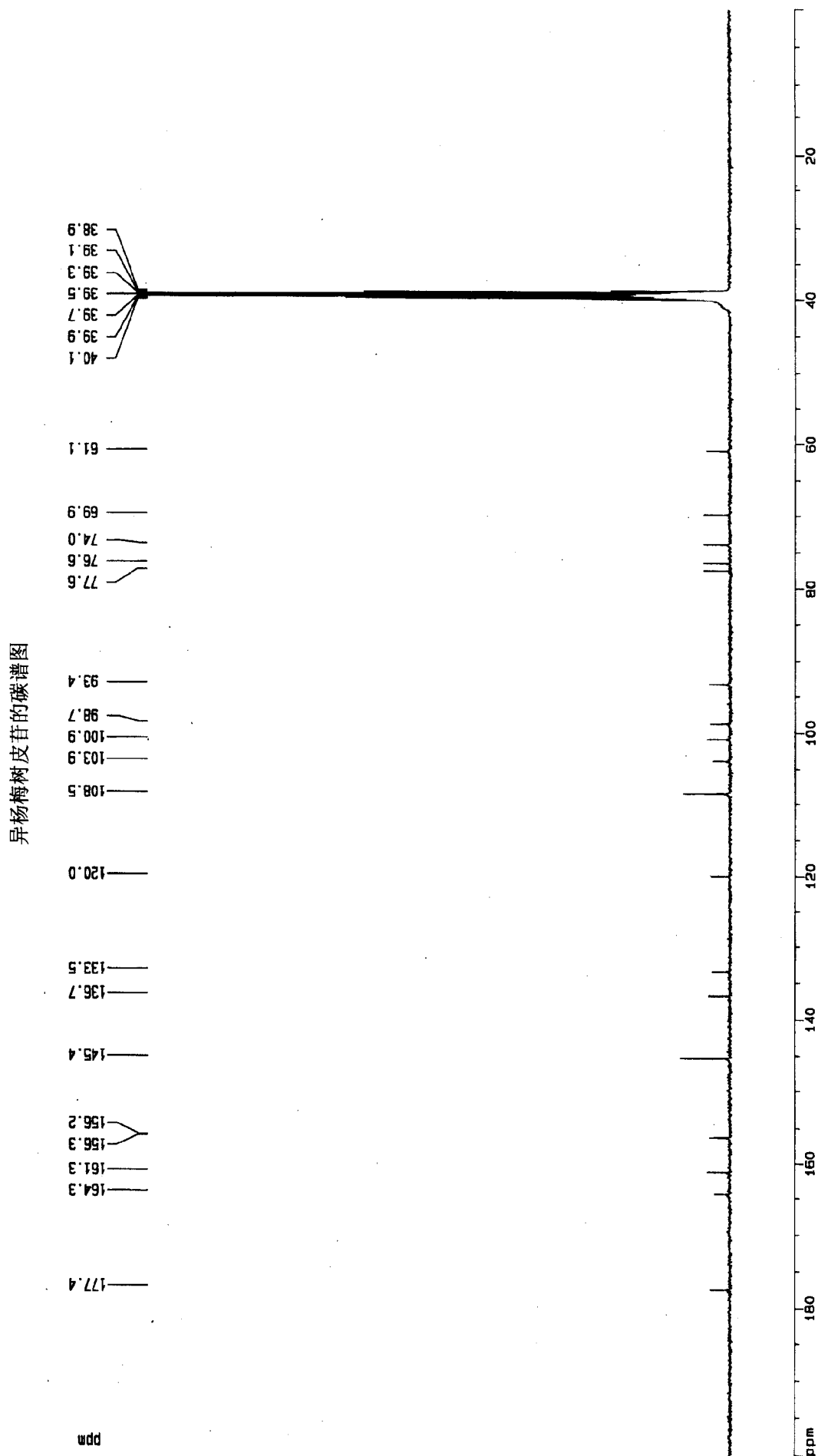


图 11

槲皮素-3-O-葡萄糖苷的氢谱图

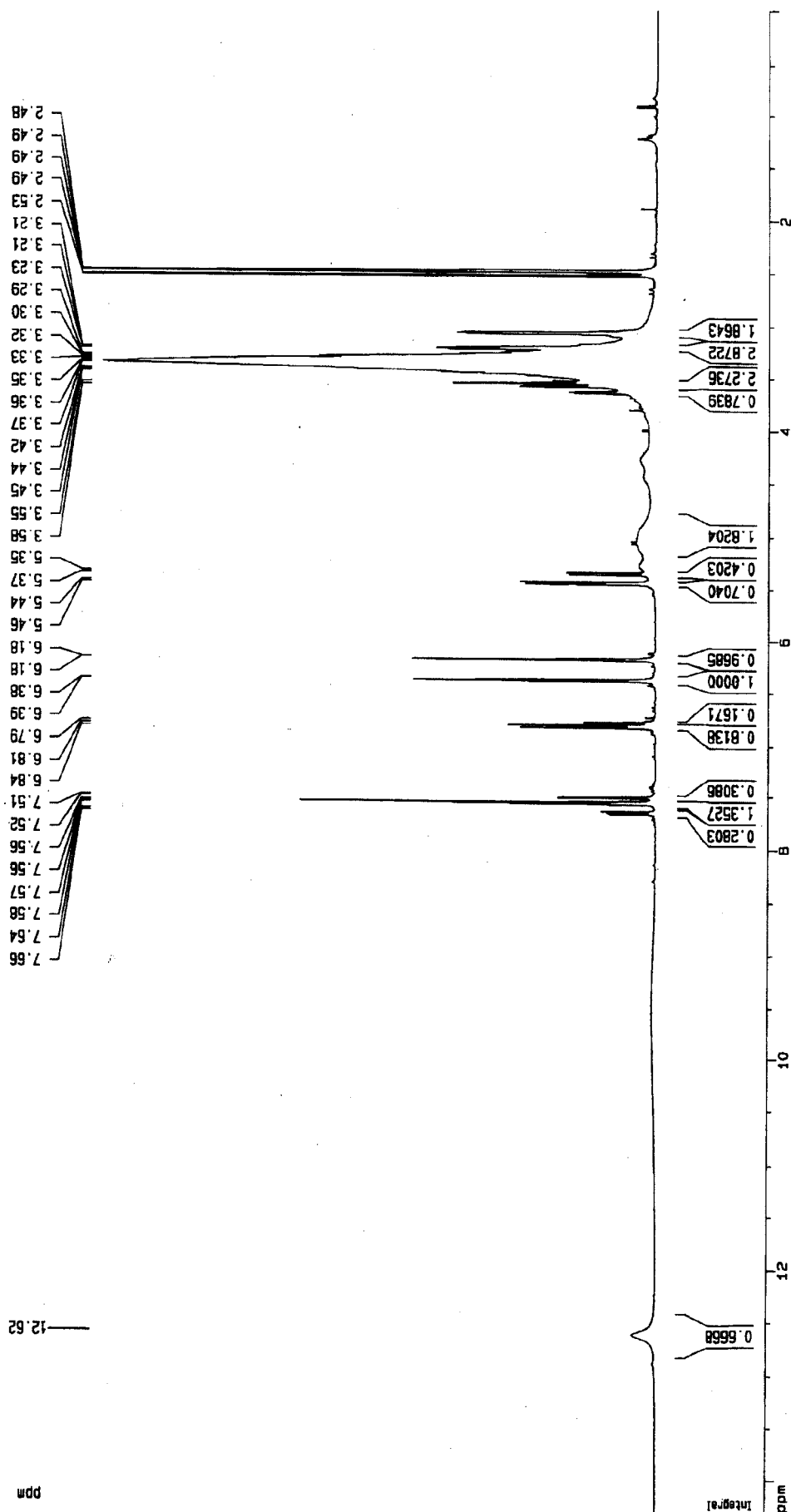


图 12

槲皮素-3-O-葡萄糖苷的碳谱图

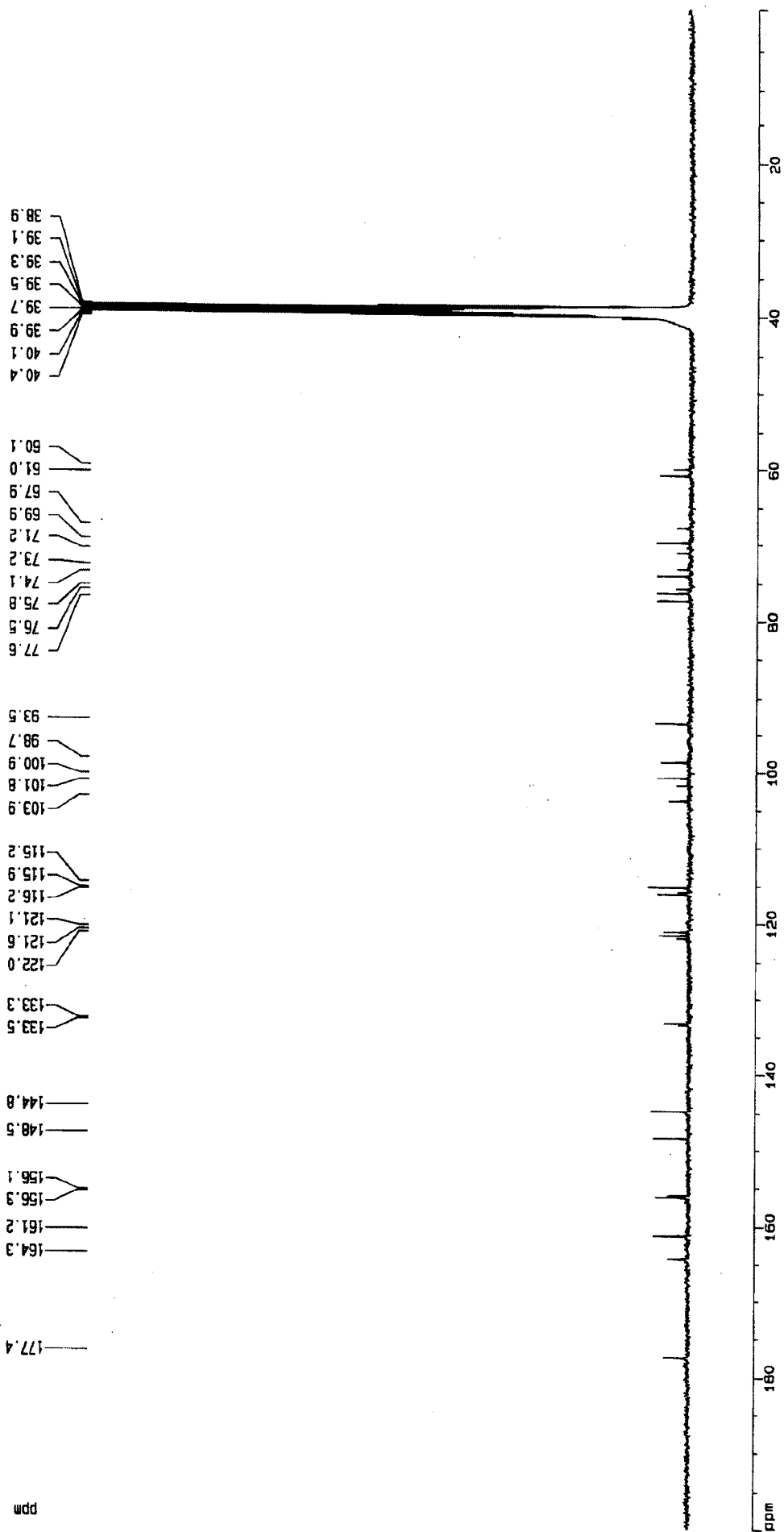


图 13

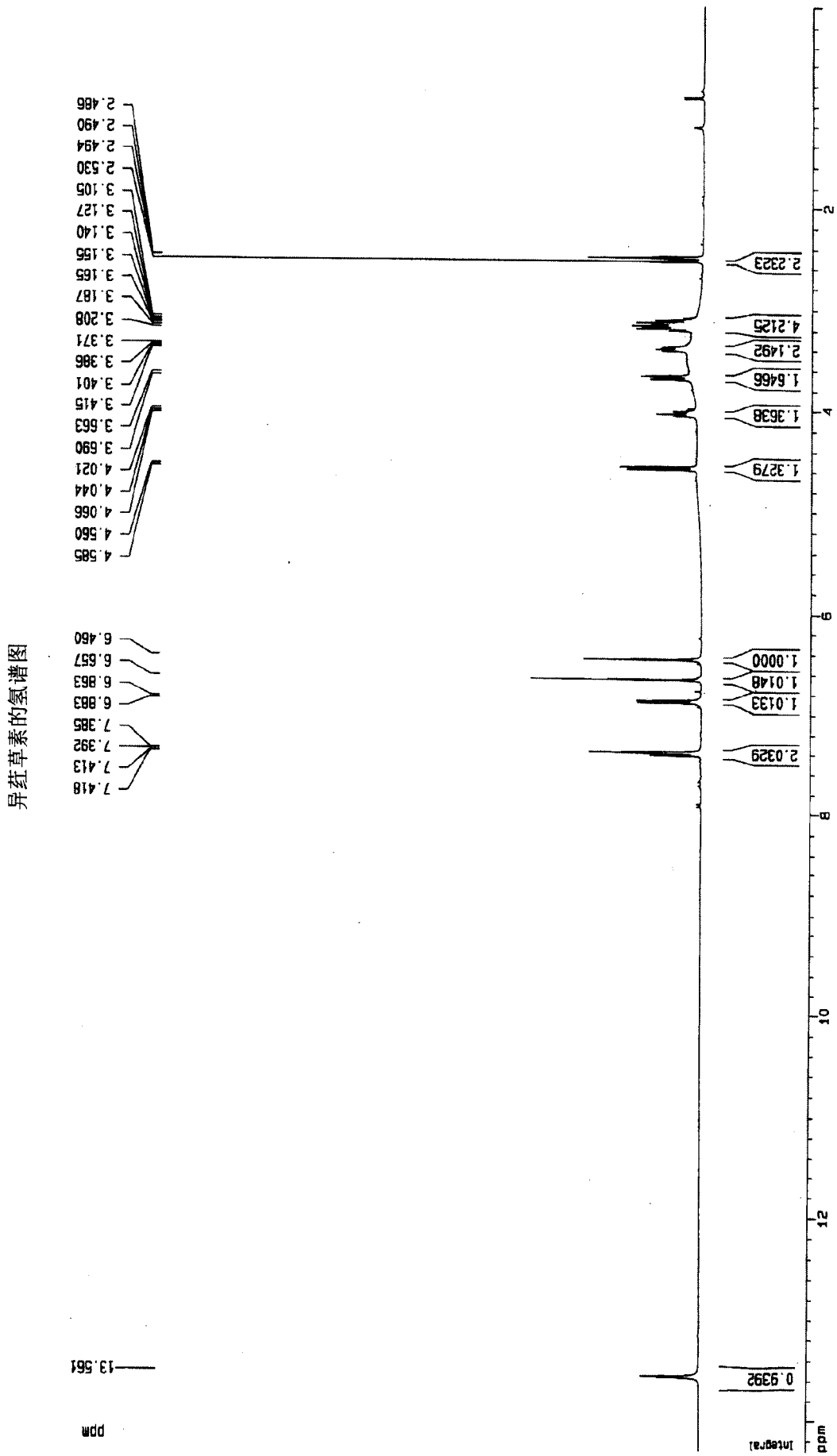


图 14

异荭草素的碳谱图

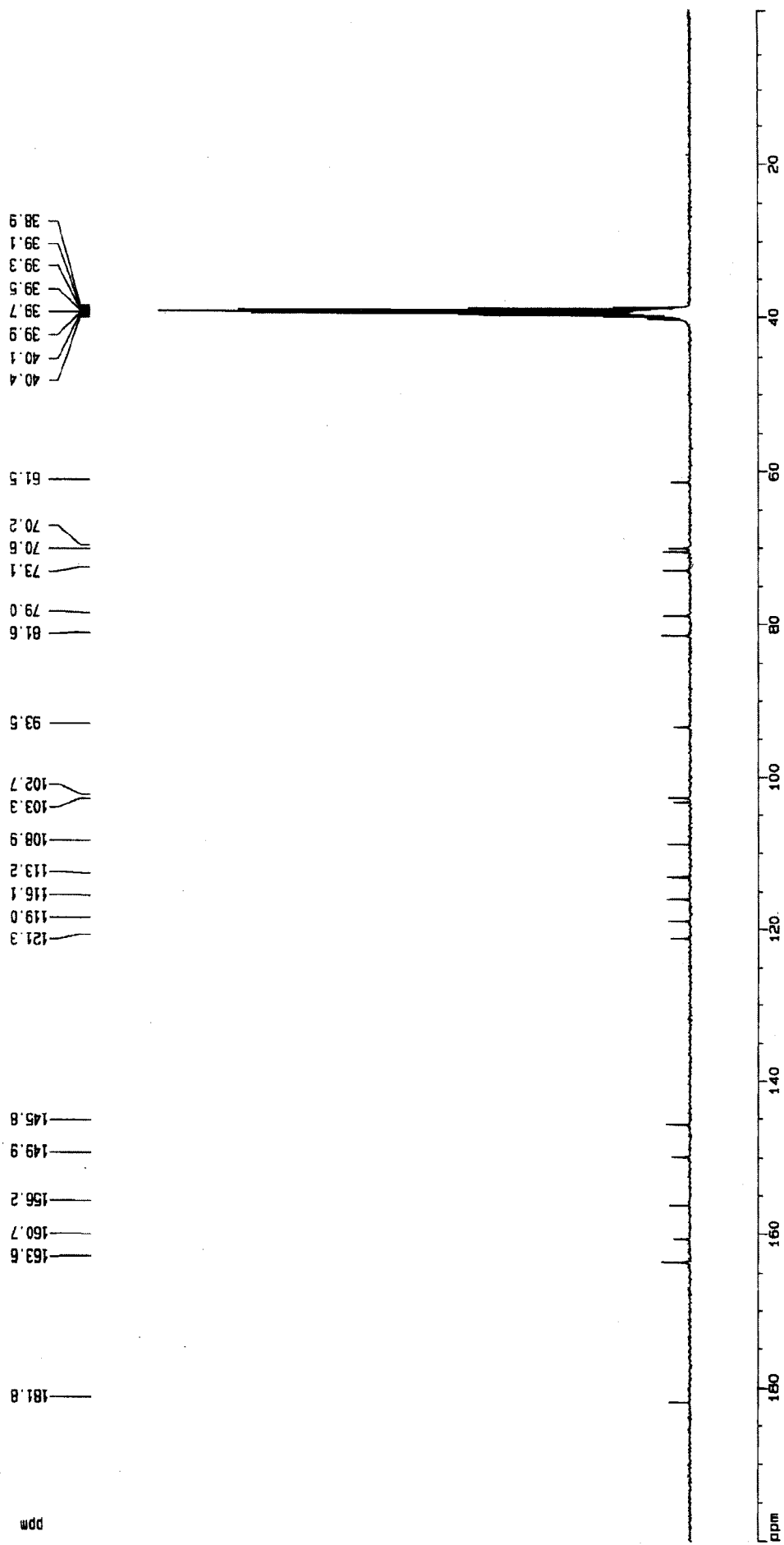


图 15