



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105832809 A

(43)申请公布日 2016.08.10

(21)申请号 201610246298.3

A61P 43/00(2006.01)

(22)申请日 2016.04.19

A61P 31/12(2006.01)

(71)申请人 中国农业科学院草原研究所

地址 010000 内蒙古自治区呼和浩特市赛罕区乌兰察布东路120号

(72)发明人 阿拉木斯 吴洪新 常春 戴雅婷
张小庆 赵金梅 乌兰巴特儿
孙娟娟 刘洪林

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 吴开磊

(51)Int.Cl.

A61K 36/48(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A61P 39/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

(54)发明名称

一种胡枝子总黄酮的制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种胡枝子总黄酮的制备方法,包括以下步骤:萃取步骤:取胡枝子粉末,以超临界流体CO₂为萃取剂,以有机溶剂为夹带剂,采用超临界流体萃取法进行萃取,得到胡枝子萃取物;纯化步骤:采用吸附色谱法对胡枝子萃取物进行纯化,用有机溶剂混合液作为洗脱剂进行洗脱,得到洗脱液,然后再去除洗脱液中的所述洗脱剂,得到胡枝子总黄酮。该方法采用超临界流体萃取法对胡枝子粉末进行萃取,能够实现萃取和分离的双重作用,萃取效率高;采用吸附色谱法对所得的萃取物进行分离,能够有效去除上述萃取物中的杂质,保留胡枝子中的黄酮类有效物质,分离效率高,且所得的胡枝子总黄酮的纯度高。

1. 一种胡枝子总黄酮的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

萃取步骤:以超临界流体CO₂为萃取剂,以有机溶剂为夹带剂,采用超临界流体萃取法对胡枝子粉末进行萃取,得到胡枝子萃取物;

纯化步骤:采用吸附色谱法对所述胡枝子萃取物进行纯化,用有机溶剂混合液作为洗脱剂进行洗脱,得到洗脱液,然后再去除所述洗脱液中的所述洗脱剂,得到胡枝子总黄酮。

2. 根据权利要求1所述的胡枝子总黄酮的制备方法,其特征在于,所述萃取步骤中,所述夹带剂为无水乙醇或者甲醇。

3. 根据权利要求2所述的胡枝子总黄酮的制备方法,其特征在于,所述胡枝子粉末与所述夹带剂的用量关系为:萃取每克所述胡枝子粉末添加所述夹带剂1mL-5mL。

4. 根据权利要求2或3所述的胡枝子总黄酮的制备方法,其特征在于,所述超临界流体萃取法的工艺参数为:萃取压力为30MPa-60MPa、萃取温度为40°C-60°C、萃取时间为60min-120min。

5. 根据权利要求4所述的胡枝子总黄酮的制备方法,其特征在于,所述萃取压力为40MPa-50Mpa,所述萃取温度为45°C-55°C,所述萃取时间为80min-100min。

6. 根据权利要求1所述的胡枝子总黄酮的制备方法,其特征在于,所述纯化步骤中,所述吸附色谱法为大孔树脂吸附色谱法。

7. 根据权利要求6所述的胡枝子总黄酮的制备方法,其特征在于,所述纯化步骤中,所述洗脱剂为乙醇与水的混合溶液,其中乙醇的体积分数为60%-80%。

8. 根据权利要求7所述的胡枝子总黄酮的制备方法,其特征在于,所述纯化步骤中,采用所述吸附色谱法对所述胡枝子萃取物进行纯化时的进样速度为0.5mL/min-1.5mL/min,所述洗脱剂的流速为1mL/min-5mL/min。

9. 根据权利要求1所述的胡枝子总黄酮的制备方法,其特征在于,在萃取步骤之前,还包括预处理步骤,所述预处理步骤为,选择7月份-9月份采收的胡枝子全草或带根全草,洗净烘干,粉碎,得到所述胡枝子粉末。

10. 根据权利要求9所述的胡枝子总黄酮的制备方法,其特征在于,所述胡枝子为尖叶胡枝子。

一种胡枝子总黄酮的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物的分离纯化领域,具体而言,涉及一种胡枝子总黄酮的制备方法。

背景技术

[0002] 我国牧草及草地植物资源及其丰富,近年来,为了防止水土流失,有些抗性好的灌木半灌木成为水土保持的首选。目前,对这些植物还没有更好的利用,造成了资源的极大浪费。因此,从这些植物中发掘活性显著的天然化合物,进行开发利用,不仅大大提高其经济附加值,同时具有重要的生态及社会意义。

[0003] 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。另外,《全国中草药汇编》中记载尖叶胡枝子带根全草入药,味苦,微寒,可止泻利尿、止血。主治痢疾、遗精、吐血、子宫下垂。发明人已对尖叶胡枝子化学成份进行了系统分析,发现黄酮类化合物是尖叶胡枝子的主要化学成分。其中,主要含有苈草素,异苈草素、牡荆苷,异牡荆苷等碳苷黄酮,这几种化合物的含量占总黄酮含量的90%。现代药理活性研究表明,上述化合物的生物活性显著,其生物活性主要表现在:保肝作用、抗氧化作用、抗甲状腺和致甲状腺肿作用以及抗病毒活性。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种胡枝子总黄酮的制备方法。采用这种胡枝子总黄酮的制备方法,胡枝子总黄酮的提取率高,纯度大,且工艺简单,绿色环保。

[0005] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0006] 一种胡枝子总黄酮的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 萃取步骤:以超临界流体CO₂为萃取剂,以有机溶剂为夹带剂,采用超临界流体萃取法对胡枝子粉末进行萃取,得到胡枝子萃取物;

[0008] 纯化步骤:采用吸附色谱法对胡枝子萃取物进行纯化,用有机溶剂混合液作为洗脱剂进行洗脱,得到洗脱液,然后再去除洗脱液中的洗脱剂,得到胡枝子总黄酮。

[0009] 胡枝子在我国分布广泛,但目前主要作为是作为牧草,用以防止水土流失。胡枝子的主要活性成分为黄酮类化合物。目前,对胡枝子中黄酮类化合物的研究方法主要为:用有机溶剂进行萃取,回收溶剂后得到胡枝子萃取物;然后再通过正相硅胶柱色谱和聚酰胺色谱对上述胡枝子萃取物进行分离纯化。这种方法的缺陷在于,萃取效率低、提取工序复杂、对有机溶剂的使用量大、不利于工业化生产、且污染环境。

[0010] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0011] (1)采用超临界流体萃取法对胡枝子粉末进行萃取,能够实现萃取和分离的双重

作用,工艺流程简单,萃取效率高,无有机溶剂残留,产品质量好,无环境污染。

[0012] (2)采用超临界流体CO₂为萃取剂的好处在于,CO₂的化学性质不活泼,在萃取过程中CO₂不会与胡枝子中的化合物发生化学反应,且能够有效地防止在萃取过程中,胡枝子中的热敏性物质的氧化和逸散。此外,CO₂的价格便宜,纯度高,安全性好。

[0013] (3)在超临界状态下,CO₂对含有极性集团较多的化合物和分子量较大的化合物的萃取效率低。采用有机溶剂为夹带剂,能够有效改变上述两类化合物的溶解度,最大限度的萃取胡枝子中的化学成分。

[0014] (4)采用吸附色谱法对所得的萃取物进行分离,能够有效去除上述萃取物中的杂质,保留胡枝子中的黄酮类有效物质,分离效率高,且所得的胡枝子总黄酮的纯度高。

具体实施方式

[0015] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0016] 本实施方式提供一种胡枝子总黄酮的制备方法,包括以下步骤:

[0017] 预处理步骤:选择7月份-9月份采收的胡枝子全草或带根全草,洗净烘干,粉碎,得到胡枝子粉末。

[0018] 发明人研究了不同时期的胡枝子中总黄酮的含量,发现7月份-9月份采收的胡枝子全草或带根全草中黄酮的含量较高,因此,在预处理步骤中选择7月份-9月份采收的胡枝子全草或带根全草,能够提高胡枝子总黄酮的所得率。在本发明较佳的实施例中,粉碎后,胡枝子粉末的粒度为40目-60目,有利于提高萃取效率。

[0019] 胡枝子包括尖叶胡枝子、达乌里胡枝子以及二色胡枝子,本发明提供的方法适用于所有胡枝子,在本实施方式中,常选择尖叶胡枝子为研究对象,目的是为了获得更多的目标产物,使所得的胡枝子总黄酮的产量更多。

[0020] 发明人对不同时期的尖叶胡枝子、达乌里胡枝子以及二色胡枝子中的总黄酮的含量进行研究发现,7月份-9月份采收的尖叶胡枝子中总黄酮的含量高于同时期采收的达乌里胡枝子及二色胡枝子的总黄酮含量。因此,在本发明较佳的实施例中,采用尖叶胡枝子为实验对象。

[0021] 萃取步骤:以超临界流体CO₂为萃取剂,以有机溶剂为夹带剂,采用超临界流体萃取法对胡枝子粉末进行萃取,得到胡枝子萃取物。

[0022] 采用超临界流体萃取法对胡枝子粉末进行萃取,能够实现萃取和分离的双重作用,工艺流程简单,萃取效率高,无有机溶剂残留,产品质量好,无环境污染。采用超临界流体CO₂为萃取剂的好处在于,CO₂的化学性质不活泼,在萃取过程中CO₂不会与胡枝子中的化合物发生化学反应,且能够有效地防止在萃取过程中,热敏性物质的氧化和逸散。此外,CO₂的价格便宜,纯度高,安全性好。在超临界状态下,CO₂对含有极性集团较多的化合物和分子量较大的化合物的萃取效率低。采用有机溶剂为夹带剂,能够有效改变上述两类化合物的溶解度,最大限度的萃取胡枝子中的化学成分。

[0023] 在本发明较佳的实施例中,夹带剂为无水乙醇或者甲醇。甲醇和无水乙醇的极性

较大,能够提高胡枝子总黄酮的萃取率。相比于甲醇,无水乙醇具有污染小、易除去的特点。因此,夹带剂进一步优选为无水乙醇。

[0024] 在本发明较佳的实施例中,胡枝子粉末与夹带剂的用量关系为:萃取每克胡枝子粉末添加夹带剂1mL-5mL。进一步优选地,萃取每克胡枝子粉末添加夹带剂的体积为3mL。当萃取每克胡枝子粉末夹带剂时夹带剂的体积为1-5mL时,胡枝子总黄酮的萃取效率较高,尤其是当夹带剂的体积为3mL时,萃取效率最高。

[0025] 在本发明较佳的实施例中,超临界流体萃取法中的工艺参数为:萃取压力为30MPa-60MPa、萃取温度为40℃-60℃、萃取时间为60min-120min。该工艺参数进一步优选为,萃取压力为40MPa-50MPa、萃取温度为45℃-55℃、萃取时间为80min-100min。发明人采用正交试验对影响胡枝子总黄酮萃取效率的主要参数进行优化,当采用上述工艺参数进行萃取时,胡枝子总黄酮的萃取效率最大,且胡枝子总黄酮的萃取量也最大。

[0026] 纯化步骤:采用吸附色谱法对胡枝子萃取物进行分离,用有机溶剂混合液作为洗脱剂进行洗脱,得到洗脱液,然后再去除洗脱液中的洗脱剂,得到胡枝子总黄酮。采用吸附色谱法对所得的胡枝子萃取物进行分离,能够有效去除上述胡枝子萃取物中的杂质,保留胡枝子中的黄酮类有效物质,分离效率高,且所得的胡枝子总黄酮的纯度高。

[0027] 在本发明较佳的实施例中,吸附色谱法为大孔树脂吸附色谱法。大孔树脂则具有稳定性高、吸附容量大、选择性好、树脂再生方便、解吸条件温和、使用周期长、成本低等优点。采用大孔树脂吸附色谱对胡枝子萃取物进行分离纯化,分离效率高,胡枝子总黄酮的纯度高,同时,所得的胡枝子总黄酮的量。进一步的优选为,在大孔树脂吸附色谱中选用D-101型树脂。D-101型树脂对胡枝子中黄酮化合物的吸附平衡时间短,属于快速吸附色谱,能够有效缩短生产周期,降低生产成本,提高生产效率。

[0028] 在本发明较佳的实施例中,洗脱剂为乙醇与水的混合溶液,其中乙醇的体积分数为60%-80%。采用乙醇水溶液为洗脱剂,绿色环保,且对实验者的身体伤害小。采用60%-80%的乙醇水溶液为洗脱剂,洗脱率高,能够有效避免活性物质在大孔树脂上形成死吸附而降低胡枝子总黄酮的得率。

[0029] 进一步优选为,采用大孔树脂吸附色谱法对胡枝子萃取物进行纯化时的进样速度为0.5mL/min-1.5mL/min、洗脱剂的流速为1mL/min-5mL/min。当洗脱剂流速为1mL/min-5mL/min,既能保证胡枝子总黄酮的有较高的纯度,同时又具有较高的洗脱率,缩短洗脱时间,提高效率。进一步优选为,洗脱剂为70%的乙醇水溶液,进样速度为1mL/min、洗脱剂流速3mL/min。在此条件下,洗脱时间短、所得胡枝子总黄酮的纯度高,且大孔树脂对胡枝子中黄酮类成分的死吸附量小,纯化效果最佳。

[0030] 实施例1

[0031] 步骤1:选择7月份采收的尖叶胡枝子带根全草,洗净烘干,粉碎至40目,得到胡枝子粉末。

[0032] 步骤2:将步骤1所得的胡枝子粉末5g,装入24mL的萃取釜中,采用超临界流体萃取法进行萃取。其中,萃取剂为超临界流体CO₂,夹带剂为无水乙醇,萃取压力为30MPa,萃取温度为40℃,萃取时间为60min,萃取每克胡枝子粉末添加夹带剂的体积为1mL。经萃取后所得的胡枝子萃取物,采用紫外分光光度计法,测定波长为510nm处的吸光度,计算胡枝子萃取物中黄酮的提取量。

[0033] 步骤3:将步骤2所得的胡枝子萃取物溶解后,采用D-101型大孔树脂吸附色谱进行纯化,洗脱剂为60%的乙醇水溶液,进样速度为0.5mL/min、洗脱剂流速1mL/min。收集洗脱液,然后再去除洗脱液中的乙醇水溶液,得到胡枝子总黄酮。

[0034] 实施例2

[0035] 步骤1:选择8份采收的尖叶胡枝子带根全草,洗净烘干,粉碎至50目,得到胡枝子粉末。

[0036] 步骤2:将步骤1所得的胡枝子粉末5g,装入24mL的萃取釜中,采用超临界流体萃取法进行萃取。其中,萃取剂为超临界流体CO₂,夹带剂为无水乙醇,萃取压力为40MPa,萃取温度为45℃,萃取时间为80min,萃取每克胡枝子粉末添加夹带剂的体积为2mL。经萃取后所得的胡枝子萃取物,采用紫外分光光度计法,测定波长为510nm处的吸光度,计算胡枝子萃取物中黄酮的提取量。

[0037] 步骤3:将步骤2所得的胡枝子萃取物溶解后,采用D-101型大孔树脂吸附色谱进行纯化,洗脱剂为70%的乙醇水溶液,进样速度为1mL/min、洗脱剂流速2mL/min。收集洗脱液,然后再去除洗脱液中的乙醇水溶液,得到胡枝子总黄酮。

[0038] 实施例3

[0039] 步骤1:选择8份采收的尖叶胡枝子带根全草,洗净烘干,粉碎至50目,得到胡枝子粉末。

[0040] 步骤2:将步骤1所得的胡枝子粉末5g,装入24mL的萃取釜中,采用超临界流体萃取法进行萃取。其中,萃取剂为超临界流体CO₂,夹带剂为无水乙醇,萃取压力为45MPa,萃取温度为50℃,萃取时间为90min,萃取每克胡枝子粉末添加夹带剂的体积为3mL。经萃取后所得的胡枝子萃取物,采用紫外分光光度计法,测定波长为510nm处的吸光度,计算胡枝子萃取物中黄酮的提取量。

[0041] 步骤3:将步骤2所得的胡枝子萃取物溶解后,采用D-101型大孔树脂吸附色谱进行纯化,洗脱剂为70%的乙醇水溶液,进样速度为1mL/min、洗脱剂流速3mL/min。收集洗脱液,然后再去除洗脱液中的乙醇水溶液,得到胡枝子总黄酮。

[0042] 实施例4

[0043] 步骤1:选择8份采收的尖叶胡枝子带根全草,洗净烘干,粉碎至50目,得到胡枝子粉末。

[0044] 步骤2:将步骤1所得的胡枝子粉末5g,装入24mL的萃取釜中,采用超临界流体萃取法进行萃取。其中,萃取剂为超临界流体CO₂,夹带剂为无水乙醇,萃取压力为50MPa,萃取温度为55℃,萃取时间为100min,萃取每克胡枝子粉末添加夹带剂的体积为4mL。经萃取后所得的胡枝子萃取物,采用紫外分光光度计法,测定波长为510nm处的吸光度,计算胡枝子萃取物中黄酮的提取量。

[0045] 步骤3:将步骤2所得的胡枝子萃取物溶解后,采用D-101型大孔树脂吸附色谱进行纯化,洗脱剂为70%的乙醇水溶液,进样速度为1mL/min、洗脱剂流速4mL/min。收集洗脱液,然后再去除洗脱液中的乙醇水溶液,得到胡枝子总黄酮。

[0046] 实施例5

[0047] 步骤1:选择9份采收的尖叶胡枝子带根全草,洗净烘干,粉碎至60目,得到胡枝子粉末。

[0048] 步骤2:将步骤1所得的胡枝子粉末5g,装入24mL的萃取釜中,采用超临界流体萃取法进行萃取。其中,萃取剂为超临界流体CO₂,夹带剂为无水乙醇,萃取压力为60MPa,萃取温度为60℃,萃取时间为120min,萃取每克胡枝子粉末添加夹带剂的体积为5mL。经萃取后所得的胡枝子萃取物,采用紫外分光光度计法,测定波长为510nm处的吸光度,计算胡枝子萃取物中黄酮的提取量。

[0049] 步骤3:将步骤2所得的胡枝子萃取物溶解后,采用D-101型大孔树脂吸附色谱进行纯化,洗脱剂为80%的乙醇水溶液,进样速度为1.5mL/min、洗脱剂流速5mL/min。收集洗脱液,然后再去除洗脱液中的乙醇水溶液,得到胡枝子总黄酮。

[0050] 实施例6

[0051] 步骤1:选择8份采收的达乌里胡枝子带根全草,洗净烘干,粉碎至50目,得到胡枝子粉末。

[0052] 步骤2:将步骤1所得的胡枝子粉末5g,装入24mL的萃取釜中,采用超临界流体萃取法进行萃取。其中,萃取剂为超临界流体CO₂,夹带剂为甲醇,萃取压力为45MPa,萃取温度为50℃,萃取时间为90min,萃取每克胡枝子粉末添加夹带剂的体积为3mL。经萃取后所得的胡枝子萃取物,采用紫外分光光度计法,测定波长为510nm处的吸光度,计算胡枝子萃取物中黄酮的提取量。

[0053] 步骤3:将步骤2所得的胡枝子萃取物溶解后,采用D-101型大孔树脂吸附色谱进行纯化,洗脱剂为70%的乙醇水溶液,进样速度为1mL/min、洗脱剂流速3mL/min。收集洗脱液,然后再去除洗脱液中的乙醇水溶液,得到胡枝子总黄酮。

[0054] 实施例7

[0055] 步骤1:选择8份采收的二色胡枝子带根全草,洗净烘干,粉碎至50目,得到胡枝子粉末。

[0056] 步骤2:将步骤1所得的胡枝子粉末5g,装入24mL的萃取釜中,采用超临界流体萃取法进行萃取。其中,萃取剂为超临界流体CO₂,夹带剂为甲醇,萃取压力为45MPa,萃取温度为50℃,萃取时间为90min,萃取每克胡枝子粉末添加夹带剂的体积为3mL。经萃取后所得的胡枝子萃取物,采用紫外分光光度计法,测定波长为510nm处的吸光度,计算胡枝子萃取物中黄酮的提取量。

[0057] 步骤3:将步骤2所得的胡枝子萃取物溶解后,采用D-101型大孔树脂吸附色谱进行纯化,洗脱剂为70%的乙醇水溶液,进样速度为1mL/min、洗脱剂流速3mL/min。收集洗脱液,然后再去除洗脱液中的乙醇水溶液,得到胡枝子总黄酮。

[0058] 对照例1

[0059] 步骤1:选择8份采收的胡枝子带根全草,洗净烘干,粉碎至50目,得到胡枝子粉末。

[0060] 步骤2:将步骤1所得的胡枝子粉末5g,采用水煎煮法进行提取,提取三次,每次2h,得到三份提取液。合并三份提取液,减压浓缩后得到胡枝子提取物。采用紫外分光光度计法,测定波长为510nm处的吸光度,计算胡枝子萃取物中黄酮的提取量。

[0061] 步骤3:将步骤2所得的胡枝子提取物溶解后,采用D-101型大孔树脂吸附色谱进行纯化,洗脱剂为70%的乙醇水溶液,进样速度为1mL/min、洗脱剂流速3mL/min。收集洗脱液,然后再去除洗脱液中的乙醇水溶液,得到胡枝子总黄酮。

[0062] 对照例2

[0063] 步骤1:选择8份采收的胡枝子带根全草,洗净烘干,粉碎至50目,得到胡枝子粉末。

[0064] 步骤2:将步骤1所得的胡枝子粉末5g,采用乙醇回流法进行提取,提取三次,每次2h,得到三份提取液。合并三次提取液,减压浓缩后得到胡枝子提取物。采用紫外分光光度计法,测定波长为510nm处的吸光度,计算胡枝子萃取物中黄酮的提取量。

[0065] 步骤3:将步骤2所得的胡枝子提取物溶解后,采用D-101型大孔树脂吸附色谱进行纯化,洗脱剂为70%的乙醇水溶液,进样速度为1mL/min、洗脱剂流速3mL/min。收集洗脱液,然后再去除洗脱液中的乙醇水溶液,得到胡枝子总黄酮。

[0066] 实验例1

[0067] 分别采用实施例1-5(实验组)和对照例1和2(对照组)中记载的方法纯化胡枝子中的总黄酮。采用紫外分光光度计法,测定波长为510nm处的吸光度,计算胡枝子萃取物总黄酮的提取量和精制度。

[0068] 其中,胡枝子萃取物总黄酮的提取量的测定方法为:以芦丁为标准品,测定芦丁在510nm处的吸光度,做标准曲线,得到回归方程。取胡枝子萃取物,测其在510nm处的吸光度,代入上述回归方程计算相应的黄酮浓度。再乘以上述胡枝子萃取物的溶液体积得到产品中总黄酮的质量,记为A。萃取时所用胡枝子粉末的总质量,记为B。按下式求出产品中胡枝子萃取液中总黄酮的提取量:总黄酮提取量=A/B。

[0069] 精制度=步骤3中所得胡枝子总黄酮的纯度/胡枝子萃取物的纯度×100%

[0070] 上式中,胡枝子黄酮纯度测定方法为:以芦丁为标准品,测定芦丁在510nm处的吸光度,做标准曲线,得到回归方程。取胡枝子的提取液,测其在510nm处的吸光度,代入上述回归方程计算相应的黄酮浓度。再乘以提取液的体积得到产品中总黄酮的质量,记为A。然后将该提取液利用电热恒温干燥箱干燥,测得产品干燥后的质量,记为B。按下式求出产品中总黄酮的纯度:

[0071] 纯度(%)=A/B×100%。

[0072] 表1实验组和对照组中胡枝子总黄酮制备方法比较

[0073]

项目	实验组							对照组	
	实施 例 1	实施 例 2	实施 例 3	实施 例 4	实施 例 5	实施 例 6	实施 例 7	对照 例 1	对照 例 2
总黄酮提 取量 mg/g	3.27	3.42	3.69	3.48	3.16	3.53	3.49	1.02	1.45
萃取物纯 度%	10.89	11.28	11.7 5	11.09	10.54	11.76	11.70	2.51	3.47
总黄酮纯 度%	30.63	33.31	35.5 9	33.12	30.45	34.09	34.58	18.0 5	20.18
总黄酮精 制度%	281.2 7	295.3 0	302. 97	298.6 5	288.8 9	289.8 8	295.5 6	719. 12	581.56

[0074] 由表1可以看出：

[0075] 1. 相比于传统的提取工艺，如对照例1中的煎煮法和对照例2中的乙醇回流法，本发明采用的超临界流体萃取方法能够显著提高胡枝子萃取液中总黄酮提取量(实验组为1.02mg/g-1.45mg/g, 对照组为3.16mg/g-3.69mg/g)。此外，胡枝子萃取液中总黄酮纯度也得到显著提高(实验组为2.51%-3.47%，对照组为10.54%-11.79%)。

[0076] 这主要是因为胡枝子中富含大量蛋白质，采用水煎煮法提取，胡枝子中的蛋白质被浸出，使后续纯化难度增大；再者，胡枝子中的黄酮类化合物多为碳苷黄酮，而碳苷黄酮不易溶于水，所以提取率低。若采用乙醇回流法提取，则需要耗费大量的乙醇溶液，且在提取时胡枝子中的叶绿素容易被浸出，影响总黄酮的纯度。由此可见，这种超临界流体萃取方法能够集提取和分离为一体，有效的提高了胡枝子总黄酮的纯度和提取量，缩短了实验周期，有利于实现工业化生产。

[0077] 2. 采用本发明中提供的胡枝子总黄酮的制备方法，能够有效的对尖叶总黄酮的萃取液进行纯化。胡枝子的萃取液经步骤3纯化后，纯度提高约300倍(纯化前，萃取物纯度为10.54%-11.75%；纯化后，总黄酮纯度为30.45%-35.59%)。而对照例1和对照例2中的精制度高于实验组，主要是由于在该方法中萃取物的纯度较低，即使经纯化后，总黄酮纯度也仅为实验组的一半，即纯度为18.05%-20.18%。

[0078] 3. 由实施例6和7可以看出，采用该方法对达乌里胡枝子和二色胡枝子中总黄酮进行制备，所得的胡枝子总黄酮提取量分别为3.53mg/g和3.49mg/g，胡枝子总黄酮的精制度分别为289.88%和295.56%。说明该方法对达乌里胡枝子和二色胡枝子这两种植物中的总黄酮也能够进行很好的制备，得到的胡枝子总黄酮的纯度高，产量大。

[0079] 实验例2

[0080] 本实验例采用超临界二氧化碳流体萃取法提取胡枝子中总黄酮,其方法与所述实施例3相似,不同之处在于改变超临界流体萃取方法中的工艺参数的取值。通过对萃取温度、萃取压力、萃取时间、夹带剂浓度4个方面的参数进行正交实验,采用分光光度法测定提取物中黄酮含量,确定二氧化碳超临界流体萃取的最佳方案。

[0081] 实验方法:准确称取粉碎后的胡枝子草粉5g,装入24mL的萃取釜中,在CO₂超临界萃取系统中以无水乙醇作为夹带剂,在指定条件下利用超临界状态的CO₂对干胡枝子草粉进行萃取,萃取物收集后测定吸光值,并计算其黄酮的提取量。选用L₉(3⁴)正交表进行试验方案设计,其因素水平见表2,采用正交试验确定各因素不同水平对黄酮提取量的影响。从而得出萃取胡枝子中总黄酮的最佳条件。

[0082] 表2因素与水平表

[0083]

水平	因素			
	A 萃取压力/MPa	B 萃取温度/°C	C 萃取时间/min	D 夹带剂的用量 ml/g
1	25	30	30	1
2	35	40	60	2
3	45	50	90	3

[0084] 表3超临界流体萃取法正交结果表

[0085]

试验号	A 萃取压力 /MPa	B 萃取温度/°C	C 萃取时间 /min	D 夹带剂的用量 ml/g	提取量 mg/g
1	1	1	1	1	0.777
2	1	2	2	2	0.976
3	1	3	3	3	2.047
4	2	1	2	3	1.876
5	2	2	3	1	2.203
6	2	3	1	2	2.039
7	3	1	3	2	2.495
8	3	2	1	3	2.986
9	3	3	2	1	3.476
K1	3.8	5.148	5.802	6.456	
K2	6.118	6.001	6.328	5.51	
K3	8.957	7.562	6.745	6.909	
R	5.157	2.414	0.943	1.399	

[0086] 表4方差分析表

[0087]

变异来源	偏差平方和	自由度	均方	F值
A萃取压力	5.55	2	2.78	7.62
B萃取温度	0.28	2	0.138	0.379
C萃取时间	0.034	2	0.017	0.047

D夹带剂量	0.65	2	0.3262	0.896
误差	0.72	2	0.364	

[0088] 根据表3和表4所示的正交试验结果分析,各因素对总黄酮提取影响程度的大小依次是:萃取压力、萃取温度、夹带剂的用量、萃取时间,总黄酮提取的最佳工艺条件 $A_3B_3C_3D_3$,即萃取压力为45Mpa、萃取温度为50℃、萃取时间为90min、夹带剂的用量为3mL/g。据方差分析表可知萃取压力对提取量的影响达到显著水平。

[0089] 工艺验证试验:按以上方法所得最佳条件重复进行五次试验,验证试验结果列于表5。由此可见,在该工艺方法稳定,且用该方法所得的胡枝子萃取液中总黄酮的提取量大。

[0090] 表5验证试验结果表

[0091]

样品号	1	2	3	4	5	平均值	RSD%
提取量	3.689	3.702	3.695	3.689	3.692	3.6934	1.465

[0092] 实验例3

[0093] 在本实验例中采用与实施例3所述方法类似,不同之处在于将D-101型大孔树脂替换成其它8种型号的大孔树脂,即HP-20、XAD7HP、AB-8、XAD16、LS-300、LS-302、LS-303和LS-300B型的大孔树脂。采用静态吸附法考察这9种型号大孔树脂对胡枝子黄酮的吸附和解吸作用,试验表明:

[0094] 表6九种大孔树脂吸附与解吸能力表

[0095]

树脂类型	平衡浓度 (mg/mL)	静态吸附 (mg/g)	吸附率(%)	解吸浓度mg/mL	解吸率(%)
HP-20	0.433	20.35	67.8	0.816	76.61
XAD7HP	0.315	22.98	76.6	0.75	66.26
AB-8	0.372	20.95	69.8	0.792	72.19
D-101	0.418	21.39	71.3	0.816	75.18
XAD16	0.277	23.35	77.8	0.833	70.979
LS-300	0.447	20.52	68.4	0.768	75.045
LS-302	0.367	21.69	72.3	0.75	66.13
LS-303	0.357	22.21	74.0	0.783	73.75
LS-300B	0.483	18.61	62.0	0.833	78.26

[0096] 由表6可以看出,AD7HP、D-101、XAD16、LS-303型的大孔树脂有较好的吸附黄酮能力,其中XAD16型的大孔树脂吸附率最高达77.8%,但XAD7HP、XAD16型的大孔树脂的解吸能力不强。HP-20、D-101、LS-300、LS-303、LS-300B型的大孔树脂均有较好的解吸能力,但LS-300、LS-300B型的大孔树脂吸附能力不强。

[0097] 综合分析9种树脂对尖叶胡枝子黄酮的吸附与解吸能力,根据黄酮获得量大小,初步选择XAD16、D-101、LS-303型的大孔树脂三种树脂进行吸附动力学的试验。结果如表7所示:

[0098] 表7树脂的动态吸附表

[0099]

时间 h	LS-303	XAD16	D-101
	黄酮浓度 mg/mL	黄酮浓度 mg/mL	黄酮浓度 mg/mL
1	0.49	0.645	0.3225
2	0.25	0.31	0.215
3	0.19	0.155	0.155
4	0.185	0.155	0.155
5	0.18	0.145	0.15
6	0.19	0.145	0.165
7	0.18	0.14	0.16
8	0.18	0.14	0.16

[0100] 由表7, XAD16型的大孔树脂起始阶段吸附量较大, 达平衡需要6小时, 饱和吸附量较大。D-101型的大孔树脂在0-1小时内吸附量随时间延长迅速变大, 吸附平衡时间约为3个小时。LS-303、D-101型的大孔树脂对黄酮类化合物吸附平衡时间相近, 约为3小时, 但LS-303的饱和吸附量不如D-101型大孔树脂。由于D-101型大孔树脂属于快速吸附树脂, 可以节省时间, 缩短生产周期, 所以从工业化生产成本上考虑, 选择D-101型大孔树脂作为尖叶胡枝子黄酮精制工艺中的专用树脂, 可降低生产成本, 提高生产效率。

[0101] 实验例4

[0102] 本实验例采用实施例3中所述的方法,

[0103] 对D-101型大孔吸附树脂纯化尖叶胡枝子总黄酮的工艺方法进行验证。

[0104] 取尖叶胡枝子萃取液25mL (15.32mg/mL), 以1mL/min的流速通过已处理好的装有10g D-101型大孔吸附树脂的吸附柱(径高比为1:10), 进行动态吸附, 蒸馏水洗后, 用110mL百分含量为70%的乙醇溶液以3mL/min的流速进行洗脱, 收集洗脱液, 并根据含量测定方法测定洗脱液中总黄酮的含量, 将醇洗脱溶液蒸干, 测定干膏重量。平行实验3次, 计算出洗脱率和纯度, 根据相对标准偏差, 精制度(洗脱后干膏纯度/样品纯度 \times 100%), 考察重现性, 其结果如表8所示。

[0105] 表8D-101型大孔吸附树脂纯化胡枝子黄酮的工艺验证结果表

[0106]

编号	上样黄酮量 mg	洗脱黄酮量	洗脱率 %	样品干膏重 g	样品纯度 %	洗脱后干膏重 g	洗脱后干膏纯度 %	精制度 %
1	383	366.21	95.62	3.27	11.74	1.083	35.36	301.93
2	383	365.89	95.53	3.26	11.75	1.076	35.59	302.97
3	383	364.85	95.26	3.25	11.78	1.065	35.96	305.16
RSD%			0.19		0.306		0.845	0.54

[0107] 结果表明, D-101大孔吸附树脂纯化胡枝子总黄酮的效果良好, 精制度较高, 重现性好。

[0108] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明, 然而应意识到, 在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此, 这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。