

高良姜中黄酮类化合物的提取及精制研究

罗小平, 梁兆强, 杨晓红* (海南大学材料与化工学院, 海南儋州 571737)

摘要 [目的] 探索提取高良姜中黄酮类化合物的最佳方法。[方法] 通过单因素试验及正交试验确定乙醇浸提高良姜中黄酮类化合物的最佳提取条件, 并利用双水相体系萃取精制黄酮类化合物。[结果] 高良姜中黄酮类化合物提取工艺的最佳单因素水平为提取温度70℃, 溶剂浓度40%, 固液比1:300, 提取时间4 h。正交试验结果显示影响高良姜中黄酮类化合物提取的各因素的顺序为固液比>温度>提取时间>酶用量>乙醇浓度。最佳提取条件为固液比1:450, 温度80℃, 提取时间5 h, 酶用量3%, 乙醇浓度50%。最佳双水相萃取条件为: PEG浓度24%, 硫酸铵浓度12%, 温度25℃, pH值7.00。[结论] 试验结果可为高良姜中黄酮类化合物的提取分离及纯化提供技术参数。

关键词 高良姜; 黄酮类化合物; 提取; 精制

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)33-14593-03

Study on Extraction and Refining of Flavonoids from *Alpinia officinarum* Hance

LUO Xiao-ping et al (College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract [Objective] The aim was to explore the optimum method for the extraction of flavonoids from *Alpinia officinarum* Hance. [Method] The optimum extraction condition for flavonoids from *A. officinarum* extracted by ethanol was determined by single factor experiment and orthogonal experiment, and the flavonoids were refined by aqueous two-phase system. [Result] The optimum single factor level of the extraction technology for flavonoids from *A. officinarum* were as follows: the extraction temperature of 70℃, the concn. of solvent of 40%, the ratio of solid to liquid of 1:300 and the extraction time of 4 h. The result of orthogonal experiment showed that the order of the factors affecting the extraction of flavonoids from *A. officinarum* was ratio of solid to liquid > temperature > extraction time > enzyme concn. > ethanol concn. The optimum extraction condition were the ratio of solid to liquid of 1:450, the temperature of 80℃, the extraction time of 5 h, the enzyme concn. of 3% and the ethanol concn. of 50%. The optimum aqueous two-phase extraction condition were the PEG concn. of 24%, the ammonium sulfate concn. of 12%, the temperature of 25℃ and the pH value of 7.00. [Conclusion] The test results could provide technical parameters for the extraction, separation and purification of flavonoids from *A. officinarum*.

Key words *Alpinia officinarum* Hance; Flavonoids; Extraction; Refining

高良姜为姜科植物高良姜的干燥根茎, 性热味苦, 具有温胃散寒、消食止痛的功效, 主产广东、海南、广西、云南、台湾等地。其中黄酮类化合物含量高达3.44%, 是功能主治的有效成分^[1]。目前对高良姜中黄酮类化合物的研究中, 主要的提取方法为溶剂提取、热水提取等传统方法。关于在传统方法中辅助新的提取技术及提取物精制纯化方面的报道较少, 而双水相萃取具有活性损失小、分离步骤少、操作条件温和, 且不存在有机溶剂残留问题等优点, 为此, 笔者研究了乙醇浸提(辅助添加纤维素酶)对高良姜中黄酮类化合物提取的影响, 并利用双水相体系^[2-3]对粗提液进行精制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试材。芦丁($C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$), 分子量664.57, 含量>98%(成都思科华生物技术有限公司)。高良姜(海南儋州广安堂药店)。PEG600, 分析纯(广州盛强化工有限公司); 其他试剂为分析纯试剂。

1.1.2 仪器。Anke TGL-16C离心机(上海安亭科学仪器厂); TU1901紫外分光光度计(北京普析通用仪器公司); 雷磁pHS-25数显pH计(上海精密科学仪器有限公司); 恒温磁力搅拌器(江苏金坛富华仪器有限公司); 电热恒温水浴锅(余姚市东方电工仪器厂)。

1.2 提 取 方 法

1.2.1 标准曲线的制作^[4-5]。分别精密吸取标准溶液0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20 ml于7个10 ml棕色容量瓶中, 然后加入0.60 ml的5% NaNO₂溶液, 摇匀, 放置6 min后

加入0.80 ml的10% Al(NO₃)₃溶液, 摇匀, 放置6 min后加入4.00 ml的5% NaOH溶液, 最后加入70%乙醇溶液定容至刻度, 摇匀, 放置15 min, 以试剂空白作为参比液。用1 cm比色皿在510 nm波长处测定吸光度。得芦丁标准曲线, 曲线方程为: $Abs = 14.02836C - 0.00991$, $R = 0.9997$, 相关性良好。

1.2.2 高良姜黄酮类化合物的提取。取经过40目筛的高良姜粉末0.3 g, 在石油醚中浸泡30 h后转入单口烧瓶, 加入一定浓度的乙醇溶液, 在一定温度下回流提取一定时间, 将提取液过滤、离心, 并吸取3 ml滤液按照标准曲线的制作方法, 在紫外可见分光光度计上测定吸光度, 计算提取率: 黄酮类化合物提取率(%) = $C \times V / M$, 式中, C为黄酮类化合物浓度(ng/ml); V为粗提液体积(ml); M为姜粉质量(ng)。

1.2.3 双水相体系的配制^[6]。在一小烧杯中加入一定比例的PEG, 一定量的盐和蒸馏水, 3 ml的粗提液, 双水相的总质量为20 g。磁力搅拌5 min, 调节pH值, 放入分液漏斗中分层, 后用移液管吸取上下相溶液进行分析, 分别测定上、下相体积, 双水相中的高良姜黄酮的含量。

有关计算公式为: 相比 $R = V_a / V_b$, 式中 V_a 、 V_b 分别是上、下相体积; 分配系数 $K = C_a / C_b$, 其中 C_a 、 C_b 分别是上、下相高良姜黄酮的浓度; 收率 $Y = 1 / (1 + 1 / RK) = 1 / (1 + 1 / Q)$ 。

2 结 果 与 分 析

2.1 醇法提取的单因素分析

2.1.1 温度对提取率的影响。以40%的乙醇90 ml浸提0.3 g高良姜粉末, 于水浴锅中在不同温度下回流提取2 h, 提取液经过滤、离心, 吸取上清液1 ml于10 ml容量瓶中, 加入显色剂, 并用30%乙醇定容, 在紫外可见分光光度计上于510 nm处测定吸光度, 计算相应提取率(图1), 结果表明随着温度升高提取率明显增大, 高于70℃后提取率基本不变。在所考察的温度条件下, 最低的提取率为1.26%, 最高为

基金项目 海南大学科技基金项目(Rnd0506)。

作者简介 罗小平(1985-), 男, 江西上饶人, 本科生, 专业: 应用化学。* 通讯作者, 讲师, E-mail: wyxiaohong@163.com。

收稿日期 2008-09-22

1.62%，提取率提高了28.6%。

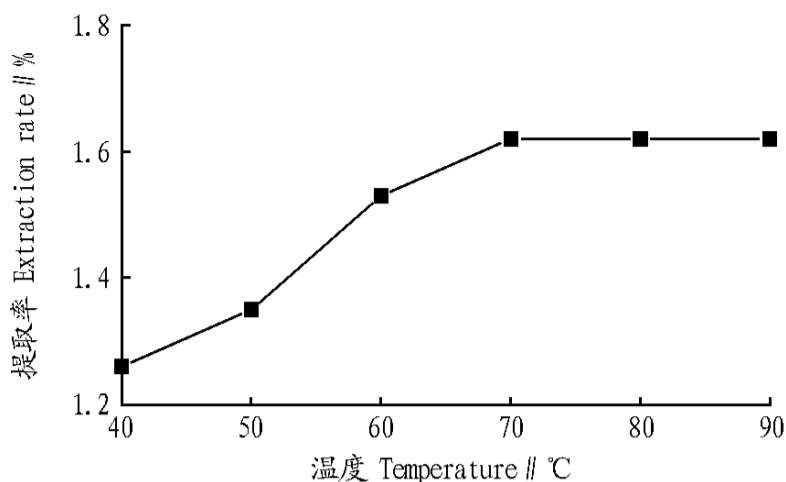


图1 浸提温度对提取率的影响

Fig.1 Effects of extraction temperature on the extraction rate

2.1.2 乙醇浓度对提取率的影响。固定提取液的体积为90 ml，分别用纯水、20%、40%、60%、80%、100%乙醇溶液，在70℃对高良姜粉末0.3 g进行回流提取2 h，将抽滤、离心后的提取液于10 ml容量瓶中定容，并测定其吸光度，计算提取率，结果表明(图2)：随着乙醇浓度的增加，吸光度值随之增加，但乙醇浓度太高时吸光度反而减小，即纯水和无水乙醇作为提取溶剂时，提取率分别为0.99%、0.54%，当乙醇浓度为40%时提取率最高为1.5%，较纯水的提取率提高了51.5%。这主要是由于高良姜中黄酮类化合物的结构上有羟基基团，具有亲水性，而黄酮母核是疏水的。故单纯用强极性的水和弱极性的无水乙醇提取率都不太高。

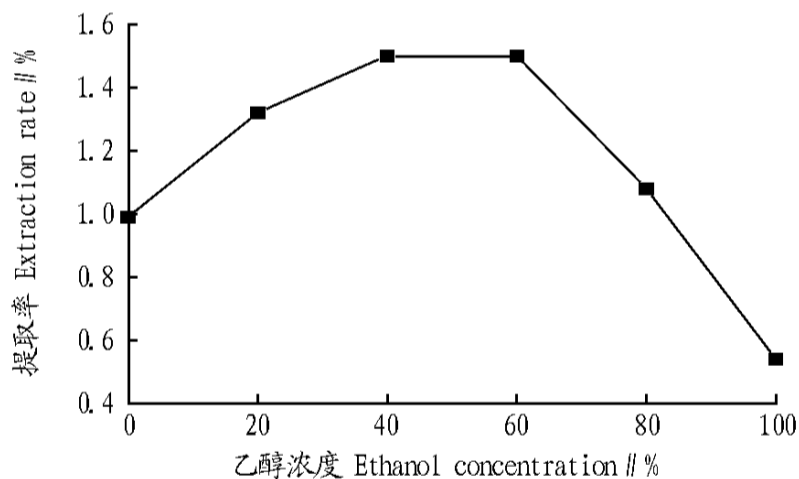


图2 乙醇浓度对提取率的影响

Fig.2 Effects of ethanol concentration on the extraction rate

2.1.3 固液比对提取率的影响。固定乙醇溶液浓度为40%，溶液体积为90 ml，分别以固液比1:75、1:150、1:300、1:450、1:600、1:750进行回流提取2 h，结果表明(图3)：随着溶媒量的增加，提取率随之增加。考虑到溶剂及经济因素，取固液比为1:300即可，溶液的提取率为1.59%。

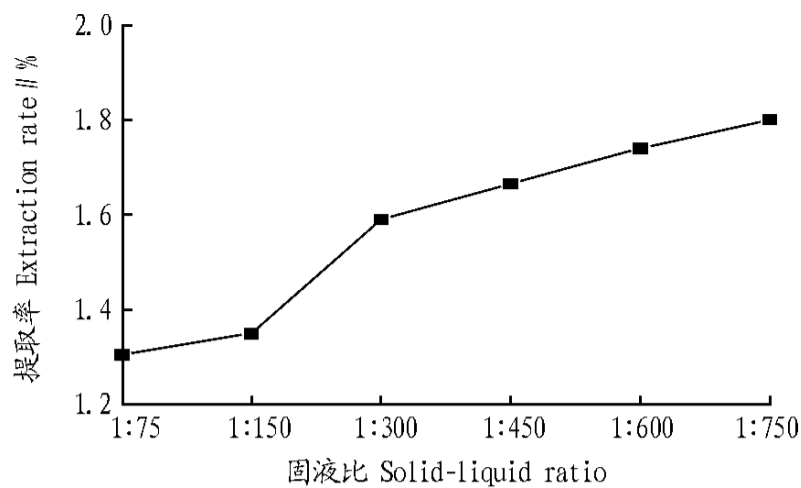


图3 固液比对提取率的影响

Fig.3 Effects of solid-liquid ratio on the extraction rate

2.1.4 提取时间对提取率的影响。固定乙醇溶液的浓度为40%，溶液的体积为90 ml，固液比为1:300分别提取1、2、3、4.5、6、8 h，结果表明(图4)：随着提取时间的增加，吸光度值随之增加，但当提取时间超过4 h后，吸光度值增加的幅度越来越小。从节约能源的角度来看，提取时间定在4 h为宜。

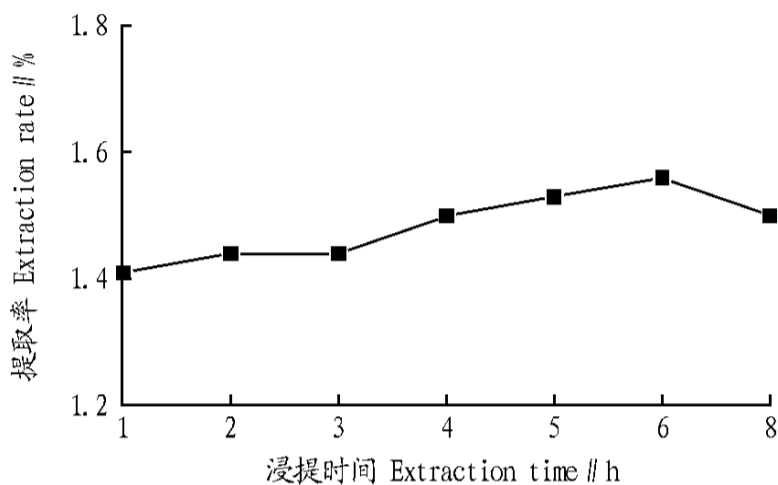


图4 浸提时间对提取率的影响

Fig.4 Effects of extraction time on the extraction rate

表1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

水平 Level	A 温度 Temperature	B 乙醇浓度 % Ethanol concentration	C 固液比 Solid-liquid ratio	D 酶用量 % Enzyme dosage	E 提取时间 h Extraction time
1	50	30	1:75	3	2
2	60	40	1:150	4	3
3	70	50	1:300	5	4
4	80	60	1:450	6	5

2.2 正交试验 在单独讨论各个因素对提取效果影响的基础上，根据实际在试验或生产过程中各个因素是共同起作用的，因此需综合考虑各个因素，通过试验设计和优化来找出最佳的提取条件。

根据正交试验结果的极差分析可知(表2)：影响高良姜中黄酮类化合物提取的各因素的主次顺序为C固液比>A温度>E提取时间>D酶用量>B乙醇浓度。由此可考虑最佳提取条件为A₄B₃C₄D₁E₄，即固液比1:450，温度80℃，提取时间5 h，酶用量3%，乙醇浓度50%。

2.3 精制高良姜中黄酮类化合物的最佳双水相体系 将PEG和硫酸铵制成一定浓度原液，准确称量一定量PEG原液，加入试管中，然后加入无机盐原液，混合，直至试管开始出现浑浊为止，称量加入无机盐量，算出PEG和无机盐在系统中的重量百分浓度，再加入适量水，使体系变澄清，计算加入的水，并继续加入无机盐，使系统再次变浑浊，如此反复操作，计算达到浑浊时PEG和无机盐在系统中的重量百分含量，得出PEG和无机盐的双水相图(图5)。

根据初步试验结果，选取了对提取率有影响的5个因素，每个因素确定为4个水平(表1)。

2.3.1 PEG浓度对高良姜黄酮在双水相中分配的影响。3 ml粗提液，(NH₄)₂SO₄浓度20%，温度25℃，pH值7.0。在不同PEG浓度下进行萃取测定，结果表明(表3)：随PEG浓度的增加相比逐渐增加、K值变小、收率提高，浓度为24%时收率最高。因此，PEG浓度选择为24%。

表2 正交试验结果分析

Table 2 Results analysis of the orthogonal experiment

水平	因素 Factor					提取率 %
Level	A	B	C	D	E	Extraction rate
1	50	30	1 75	3	2	1.252 5
2	50	40	1 150	4	3	1.215 0
3	50	50	1 300	5	4	1.440 0
4	50	60	1 450	6	5	1.575 0
5	60	30	1 150	5	5	1.350 0
6	60	40	1 75	6	4	1.357 5
7	60	50	1 450	3	3	1.665 0
8	60	60	1 300	4	2	1.500 0
9	70	30	1 300	6	3	1.470 0
10	70	40	1 450	5	2	1.575 0
11	70	50	1 75	4	5	1.417 5
12	70	60	1 150	3	4	1.380 0
13	80	30	1 450	4	4	1.665 0
14	80	40	1 300	3	5	1.650 0
15	80	50	1 150	6	2	1.440 0
16	80	60	1 75	5	3	1.335 0
∑	1.370 6	1.434 4	1.340 6	1.486 2	1.441 9	
∑	1.468 1	1.449 4	1.346 2	1.449 4	1.421 3	
∑	1.460 6	1.490 6	1.515 0	1.468 8	1.460 6	
∑	1.522 5	1.447 5	1.620 0	1.460 6	1.498 1	
R	0.151 9	0.056 2	0.279 4	0.037 5	0.076 8	

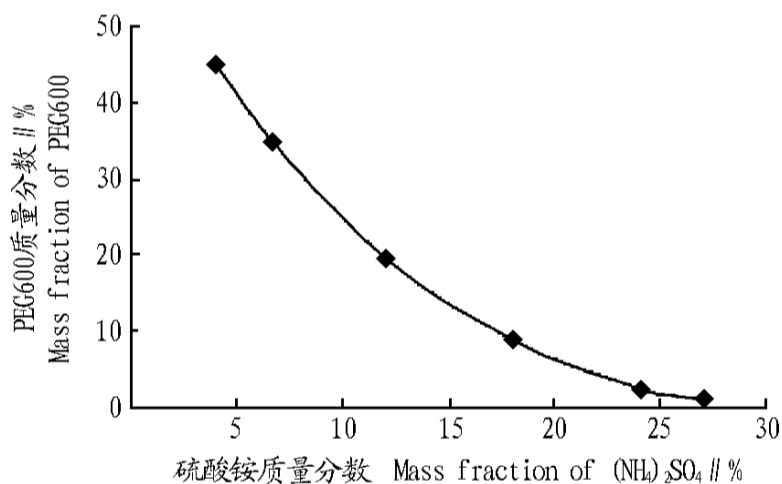
图5 PEG600/(NH₄)₂SO₄ 体系相Fig.5 The phase of PEG600/(NH₄)₂SO₄ system

表3 PEG 浓度对高良姜黄酮在双水相中分配的影响

Table 3 Effect of PEG concentration on the distribution of flavone from *Apinia officinarum* in aqueous two phase system

PEG 浓度 %	上相V ml	下相V ml	R	K	G	Y %
PEG concentration	Top phase V	Bottom phase V				
8	2.7	14.6	0.18	49	8.82	89.82
12	5.8	11.2	0.52	31	16.12	94.16
16	7.0	9.7	0.72	27	19.44	95.11
20	8.5	8.5	1.00	25	25.00	96.15
24	9.7	8.0	1.21	24	29.04	96.67

注: R. 相比; K. 分配系数; G. RK; Y. 收率。下表同。

Note: R stands for phase ratio; K stands for distribution coefficient; G stands for the product of R and K; Y stands for yield. The same as below.

2.3.2 硫酸铵浓度对高良姜黄酮在双水相中分配的影响。3 ml 粗提液, PEG 浓度 20%, 温度 25℃, pH 值 7.0。在不同 (NH₄)₂SO₄ 浓度下进行萃取测定, 结果表明(表4): 随硫酸铵浓度的增加, 相比逐渐减小、K 值变大、收率变小。硫酸铵浓度为 12% 时收率最高。因此, 硫酸铵浓度选择 12%。

表4 硫酸铵浓度对高良姜黄酮在双水相中分配的影响

Table 4 Effects of (NH₄)₂SO₄ concentration on the distribution of flavone from *A. officinarum* in aqueous two phase system

(NH ₄) ₂ SO ₄ 浓度 %	上相V ml	下相V ml	R	K	G	Y %
(NH ₄) ₂ SO ₄ concentration	Top phase V	Bottom phase V				
12	13.5	3.5	3.86	14	54.04	98.18
15	10.6	6.3	1.68	18	30.24	96.80
18	8.6	8.6	1.00	22	22.00	95.65
21	7.6	9.1	0.84	25	21.00	95.45
24	7.1	9.7	0.73	27	19.71	95.17

2.3.3 温度对高良姜黄酮在双水相中分配的影响。3 ml 粗提液, (NH₄)₂SO₄ 浓度 12%, PEG 浓度 24%, pH 值 7.0。在不同温度下进行萃取测定, 结果表明(表5): 随温度的升高相比降低, K 值变化不大, 收率大体上降低。温度为 25℃ 时收率最高。因此温度选择 25℃。

表5 温度对高良姜黄酮在双水相中分配的影响

Table 5 Effect of temperature on the distribution of flavone from *A. officinarum* in aqueous two phase system

温度	上相V ml	下相V ml	R	K	G	Y %
Temperature	Top phase V	Bottom phase V				
25	13.5	4.8	2.81	19	53.39	98.16
35	12.4	6.0	2.07	19	39.33	97.52
45	12.2	6.4	1.91	19	36.29	97.32
55	12.1	6.5	1.86	19	35.24	97.25
65	11.7	6.8	1.72	21	36.12	97.31

2.3.4 NaCl 添加量对高良姜黄酮在双水相中分配的影响。3 ml 粗提液, (NH₄)₂SO₄ 浓度 12%, PEG 浓度 24%, 温度 25℃, pH 值 7.0, 添加不同计量的 NaCl 进行萃取测定, 结果表明(表6): 随 NaCl 添加量的增加相比降低、K 值稍变大, 影响不明显, 收率稍有降低, 但变化不明显。因而选择不添加 NaCl。

表6 NaCl 添加量对高良姜黄酮在双水相中分配的影响

Table 6 Effects of NaCl addition on the distribution of flavone from *A. officinarum* in aqueous two phase system

NaCl 浓度 %	上相V ml	下相V ml	R	K	G	Y %
NaCl Concentration	Top phase V	Bottom phase V				
0	13.1	5.0	2.62	19	49.78	98.03
1	12.4	6.0	2.07	19	39.33	97.52
2	12.1	6.4	1.89	20	37.80	97.42
3	12.0	6.5	1.85	20	37.00	97.37
4	12.0	6.5	1.85	20	37.00	97.37

2.3.5 pH 值对高良姜黄酮在双水相中分配的影响。3 ml 粗提液, (NH₄)₂SO₄ 浓度 12%, PEG 浓度 24%, 温度 25℃, 在不同 pH 值下进行萃取测定, 结果表明(表7): 随 pH 值的升高相比下降, K 值先上升后下降, 收率也是先上升后下降, pH 值 7.00 时收率达到最大值。因此选择 pH 值 7.00。

3 结论与讨论

(1) 高良姜黄酮类化合物提取工艺的最佳单因素水平为

(下转第 14599 页)

植物秦艽、麻花艽和小秦艽的粉末分别呈黄白色、棕褐色和黄褐色,气皆特异,味苦微涩。厚壁网纹细胞壁增厚木化。草酸钙针晶细小,散在于薄壁细胞内。栽培植物秦艽厚壁网纹细胞较为少见,野生和栽培麻花艽厚壁网纹细胞壁木化增厚均不明显。

表1 野生和栽培秦艽中龙胆苦苷的含量($n=5$)

Table 1 The content of gentiopicroside in wild and cultivated *Gentiana macrophylla*

样品 Samples	产栽培地 Producing areas	品种 Cultivas	生长年限 年 Growth years	集时间 Acquisition time	含量 % Content	RSD %
野生 Wild	原州区	植物秦艽	2~5	秋季	12.45	0.86
		麻花艽	2~5		13.15	0.94
		小秦艽	2~5		11.75	1.26
	隆德县	植物秦艽	2~5		13.25	0.68
		麻花艽	2~5		13.47	0.76
		小秦艽	2~5		11.93	1.12
栽培 Cultivated	彭阳县	植物秦艽	1	秋季	13.68	0.91
			2		16.13	1.24
			3		15.26	2.01
	原州区	麻花艽	1		15.94	1.28
			2		16.85	0.94
		小秦艽	2		14.23	1.97
		3	14.02	1.67		

3 结论与讨论

通过对栽培和野生植物秦艽、麻花艽及小秦艽的药材性状、显微特征以及其中龙胆苦苷(gentiopicroside)含量测定方面进行对比研究表明:宁夏六盘山区栽培与野生品之间无明显质量差异,野生和栽培秦艽中龙胆苦苷含量均远远高于药典规定,且栽培秦艽含量明显高于野生秦艽。在野生品药源不足的情况下,可发展人工栽培以扩大药源。

试验还表明,秦艽中龙胆苦苷含量高低似乎与当地气候条件及生长期有关。试验也显示,相对海拔低,气候湿润的隆德县、彭阳县采集的秦艽中龙胆苦苷含量较高,宁夏六盘山区人工栽培秦艽时以2年最为合适。

秦艽作为六盘山区一种重要的道地中药材,其开发利用尚处于起步阶段。相信随着对其药理作用的深入研究,将会

2.3 龙胆苦苷含量测定结果 以龙胆苦苷(gentiopicroside)为含量测定指标,按《中国药典》2000年版一部秦艽项下的高效液相色谱法制备对照品溶液及供试品溶液,测定结果见表1。

有更多以秦艽为原材料的药品涌入市场。所以研究其现代化人工栽培途径,为解决目前供需矛盾有一定的现实意义。该研究为栽培品的广泛应用提供了可靠的理论依据。

参考文献

- [1] 夏光成, 萧培根. 中药秦艽原植物的研究[J]. 药学学报, 1995(6): 399.
- [2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典一部2000年版[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 222.
- [3] 黄爽辑. 神农本草经[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1982: 5.
- [4] 中科院西北植物研究所. 植物志: 秦岭植物志, 第一卷, 第四册: 种子植物[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 112.
- [5] 邢世瑞. 宁夏中药资源[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1987: 101.
- [6] 张恩迪, 郑汉臣. 中国濒危野生药用动植物资源的保护[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2000: 28.
- [7] 李家实. 中药鉴定学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 159-163.
- [8] 刘丽莎, 张西玲, 黄晓萍. 栽培和野生秦艽及麻花秦艽中龙胆苦苷的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(2): 75-76.

(上接第14595页)

提取温度70℃、乙醇浓度40%、固液比1:300,提取时间4h。

表7 pH值对高良姜黄酮在双水相中分配的影响

Table 7 Effects of pH value on the distribution of flavone from *A. officinarum* in aqueous two phase system

pH值 pH value	上相V ml Top phase V	下相V ml Bottom phase V	R	K	G	Y %
3.00	13.0	5.3	2.45	17	41.65	97.66
5.00	13.0	5.5	2.36	21	49.56	98.02
7.00	12.9	5.4	2.39	22	52.58	98.13
9.00	12.8	5.7	2.25	21	47.25	97.93
10.45	11.9	6.6	1.80	13	23.40	95.90

(2) 正交试验表明,影响高良姜中黄酮类化合物提取的各因素主次顺序为固液比>温度>提取时间>酶用量>乙

醇浓度。最佳提取条件为:温度80℃、乙醇浓度50%、固液比1:450、酶用量3%、提取时间5h。

(3) 由各个单因素试验可知,最佳纯化高良姜黄酮的双水相体系为:PEG浓度24%、硫酸铵浓度12%、温度25℃、pH值7.00。

参考文献

- [1] 罗辉, 张建和, 莫丽儿. 不同产地及不同生长期高良姜中总黄酮的测定[J]. 化学研究与应用, 1997, 9(3): 109-111.
- [2] 董军芳, 林金清, 陈钦, 等. 双水相萃取技术在分离提纯生物物质中的应用[J]. 江西化工, 2002(2): 3-6.
- [3] 陆强, 邓修. 提取与分离天然产物中有效成分的新方法——双水相萃取技术[J]. 中成药, 2000, 22(9): 55-57.
- [4] 陈在新, 李俊凯, 陈义全. 分光光度法测定板栗黄酮含量[J]. 果树学报, 2003, 20(2): 149-151.
- [5] 田新玲, 晏佩霞, 全殿荣. 分光光度法测定天然植物中黄酮含量[J]. 仪器仪表与分析监测, 2003(3): 25-26.
- [6] 赵晓莉. 柿叶黄酮类化合物提取分离研究[D]. 西安: 西北工业大学, 2005.