(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107982296 B
(45)授权公告日 2021.02.02

(21)申请号 201711204771.2

(22)申请日 2017.11.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107982296 A

(43)申请公布日 2018.05.04

(73)专利权人 河南城建学院
地址 467000 河南省平顶山市新城区龙翔大道

(72)发明人 洪军 胡建业 董召锋 杜海霞 王超华

(74)专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所(普通合伙) 41120
代理人 狄干强

(51)Int.Cl.
C07D 311/30(2006.01)
A61K 36/28(2006.01)
B01D 11/02(2006.01)
A61K 125/00(2006.01)

(56)对比文件
Wellington Santos Fava, etal.Development and characterization of microsatellite markers.《Biochemical Systematics and Ecology》.2016,第19-23页.

审查员 沈小春

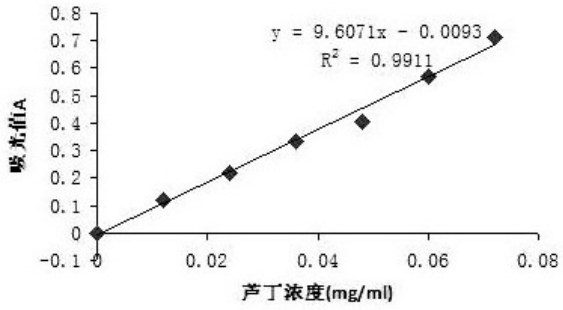
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺

(57)摘要

一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺，将禹州漏芦原料先进行酶解处理，再进行超声波破碎和萃取，分离纯化后得到禹州漏芦总黄酮，提取环境模拟人体消化道环境酸碱度。本发明所述的一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺，以禹州漏芦为原料，经过一系列工序提取禹州漏芦总黄酮，在模拟人体胃、小肠、大肠的体液酸度环境下能够最大限度的保留总黄酮的有效成分，同时超声波叠加酶解细胞壁的处理方式最大限度的溶出总黄酮，并结合ODS开放柱、中压柱分离纯化技术，提高总黄酮中有效成分提取产率。



CN 107982296 B

1.一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺,其特征在于:将禹州漏芦原料先进行酶解处理,再进行超声波破碎和萃取,分离纯化后得到禹州漏芦总黄酮,提取环境模拟人体消化道环境酸碱度,其中在酶解处理时环境pH值为4.8,超声波破碎时环境pH值为2.0,超声波萃取时环境pH值为7.5-8.3;

所述酶解处理为每1g的禹州漏芦原料干料,清洗干燥并粉碎后加入体积分数为60%的乙醇20mL和5mg水解酶配置成的8mL水解酶液,水解酶液中酶的活性>400u/mg,使用水杨酸调整环境pH值为4.8在50℃下微波水浴90min,微波功率为300W, 过滤留上清液A和滤渣A,在滤渣A中加入体积分数为60%的乙醇20mL和5mg水解酶液,使用水杨酸调整环境pH值为4.8在50℃下微波水浴120min,得到上清液B和滤渣B,合并上清液A和 上清液B得到上清液C,将上清液C和滤渣B留取备用;

所述水解酶为半纤维素酶、真菌淀粉酶、纤维素酶中的一种或是它们的组合物;

所述酶解过的禹州漏芦原料进行超声波破碎、萃取、分离纯化的过程为:

步骤一、将滤渣B加入体积分数为60%的乙醇20mL,使用水杨酸调整环境pH值为2.0在60℃下超声波破碎50min,超声波功率为100W,离心4000r/min,10min,得到上清液D和残渣C备用;

步骤二、在残渣C中加入体积分数为60%的乙醇20mL,使用氢氧化钠调整环境pH值为7.5在60℃下超声波破碎25min,超声波功率为100W,离心4000r/min,10min,得到上清液E和残渣D备用;

步骤三、在残渣D中加入体积分数为60%的乙醇20mL,使用氢氧化钠调整环境pH值为8.3在60℃下超声波破碎25min,得到上清液F和残渣E;

步骤四、合并上清液C、上清液D、上清液E和上清液F,得到禹州漏芦总黄酮粗提液;

步骤五、将粗提液减压浓缩烘干,得到粗提物Ⅰ;

步骤六、将步骤五烘干得到的粗提物Ⅰ用乙醇溶解后上硅胶柱,用含甲醇的氯仿溶液进行洗脱,收集黄绿色洗脱液并风干,得到粗提物Ⅱ;

步骤七、将步骤六得到的粗提物Ⅱ用乙醇溶解后上ODS开放柱,用乙醇水溶液进行洗脱,收集黄绿色洗脱液并减压浓缩烘干,得到粗提物Ⅲ;

步骤八、用中压柱分离纯化:将步骤七得到的粗提物Ⅲ上中压柱,用乙醇水溶液洗脱,从出峰开始收集洗脱液,至峰下降后停止收集,洗脱液并减压浓缩烘干,得到粗提物Ⅳ;

步骤九、过滤结晶:将步骤八得到的粗提物Ⅳ用甲醇溶解,用滤膜过滤后缓慢加入水进行结晶,边加入边搅拌至出现黄色絮状物时停止搅拌,静置50min,滤纸过滤,将留在滤纸上的黄色药物挥干,收集挥干后的黄色药物既为禹州漏芦总黄酮。

2.如权利要求1所述的一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺,其特征在于:所述步骤六中含甲醇的氯仿溶液为含5%甲醇的氯仿溶液。

3.如权利要求1所述的一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺,其特征在于:所述步骤六中使用硅胶柱进行洗脱时的流速为1.0mL/min。

4.如权利要求1所述的一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺,其特征在于:所述步骤七、八中的的乙醇水溶液为体积分数为80%的乙醇水溶液。

一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺

技术领域

[0001] 本发明属于有机物提取制备工艺领域，具体为一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺。

背景技术

[0002] 禹州漏芦为菊科蓝刺头属植物蓝刺头及华东蓝刺头的干燥根，具有清热解毒、排脓止血、消痈下乳的功效，为《中华人民共和国药典》(后称药典)收载品种。此前，禹州漏芦曾与祁州漏芦一起作为漏芦收载于药典中。近年的研究证明两者的化学成分及疗效差异较大，因此药典1995年版将祁州漏芦称漏芦，禹州漏芦另列作为独立中药品种。禹州漏芦一般用于治疗疮痈脓肿、皮肤热毒和乳汁不通等症。已从禹州漏芦中分离鉴定了噻吩类、挥发油类、三萜类、甾体类、芳香类、有机酸类及酯类、糖类等大量化合物并筛选到相应的活性部位，这些化合物具有多种生物活性，如抗肿瘤、抗脂质过氧化、抗HIV、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗衰老以及护肝、免疫调节及抗炎作用等。近年来研究表明禹州漏芦的抗类风湿性关节炎作用主要与其总黄酮具有抑制关节炎的Wnt信号作用有关。

[0003] 黄酮类化合物是广泛存在于药用植物中的一类化合物，大多与糖类结合为苷存在，多具有调血脂、扩张冠脉、止血、镇咳、祛痰、降低血管脆性等活性。银杏、红花、黄芩、陈皮等常用中药中都含有此类成分。此外，黄酮类化合物具有多种多样的生物学功能，如调节植物生长、保护植物免受紫外线的损伤以及作为植物抗毒素和活性氧清除剂等。目前药用植物黄酮类化合物的研究主要集中在提取工艺、成分分析及药理作用方面。随着分子生物学的迅速发展，分子生物学也开始涉及到药用植物有效成分的生物合成及调控机制的研究，并取得了较大进展。

[0004] 总黄酮作为禹州漏芦中一种主要成分，它的分离、结构鉴定、有效成分提取、纯化及药理作用研究相对较少。为了更好的开发其药用价值，生产上尝试使用酶解法、半仿生法、超声波法等传统提取黄酮类物质的方法对禹州漏芦中黄酮类化合物进行提取，但是都存在一定的缺陷。

发明内容

[0005] 为了解决禹州漏芦中黄酮类化合物提取效率低的问题，本发明的目的是提出一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺，通过使用特定工艺参数的半仿生提取法、酶辅助提取法和超声波提取法相互叠加配合，使得在禹州漏芦中提取黄酮类化合物更加高效、活性好、操作简单、重现性好，节能。

[0006] 本发明为了解决上述问题所采取的技术方案为：

[0007] 一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺，将禹州漏芦原料先进行酶解处理，再进行超声波破碎和萃取，分离纯化后得到禹州漏芦总黄酮，提取环境模拟人体消化道环境酸碱度，其中在酶解处理时环境pH值为4.8，超声波破碎时环境pH值为2.0，超声波萃取时环境pH值为7.5-8.3。

[0008] 一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺，制备工艺包括：

[0009] 酶解处理为每1g的禹州漏芦原料干料，清洗干燥并粉碎后加入体积分数为60%的乙醇20mL和5mg水解酶配置成的8mL水解酶液，水解酶液中酶的活性>400u/mg，使用水杨酸调整环境pH值为4.8在50℃下微波水浴90min，微波功率为300W，过滤留上清液A和滤渣A，在滤渣A中加入体积分数为60%的乙醇20mL和5mg水解酶液，使用水杨酸调整环境pH值为4.8在50℃下微波水浴120min，得到上清液B和滤渣B，合并上清液A和上清液B得到上清液C，将上清液C和滤渣B留取备用。

[0010] 作为优选的，所述水解酶为半纤维素酶、真菌淀粉酶、纤维素酶中的一种或是它们的组合物，复合酶相对效果更好。

[0011] 所述酶解过的禹州漏芦原料进行超声波破碎、萃取、分离纯化的过程为：

[0012] 步骤一、将滤渣B加入体积分数为60%的乙醇20mL，使用水杨酸调整环境pH值为2.0在60℃下超声波破碎50min，超声波功率为100W，离心4000r/min，10min，得到上清液D和残渣C备用；

[0013] 步骤二、在残渣C中加入体积分数为60%的乙醇20mL，使用氢氧化钠调整环境pH值为7.5在60℃下超声波破碎25min，超声波功率为100W，离心4000r/min，10min，得到上清液E和残渣D备用；

[0014] 步骤三、在残渣D中加入体积分数为60%的乙醇20mL，使用氢氧化钠调整环境pH值为8.3在60℃下超声波破碎25min，得到上清液F和残渣E；

[0015] 步骤四、合并上清液C、上清液D、上清液E和上清液F，得到禹州漏芦总黄酮粗提液；

[0016] 步骤五、将粗提液减压浓缩烘干，得到粗提物I；

[0017] 步骤六、将步骤五烘干得到的粗提物I用乙醇溶解后上硅胶柱，用含甲醇的氯仿溶液进行洗脱，收集黄绿色洗脱液并风干，得到粗提物Ⅱ；

[0018] 步骤七、将步骤六得到的粗提物Ⅱ用乙醇溶解后上ODS开放柱，用乙醇水溶液进行洗脱，收集黄绿色洗脱液并减压浓缩烘干，得到粗提物Ⅲ；

[0019] 步骤八、用中压柱分离纯化：将步骤七得到的粗提物Ⅲ上中压柱，用乙醇水溶液洗脱，从出峰开始收集洗脱液，至峰下降后停止收集，洗脱液并减压浓缩烘干，得到粗提物Ⅳ；

[0020] 步骤九、过滤结晶：将步骤八得到的粗提物Ⅳ用甲醇溶解，用滤膜过滤后缓慢加入水进行结晶，边加入边搅拌至出现黄色絮状物时停止搅拌，静置50min，滤纸过滤，将留在滤纸上的黄色药物挥干，收集挥干后的黄色药物既为禹州漏芦总黄酮。

[0021] 进一步的，所述步骤六中含甲醇的氯仿溶液为含5%甲醇的氯仿溶液。

[0022] 进一步的，所述步骤六中使用硅胶柱进行洗脱时的流速为1.0mL/min。

[0023] 进一步的，所述步骤七、八中的的乙醇水溶液为体积分数为80%的乙醇水溶液。

[0024] 本发明的有益效果：

[0025] 第一、半仿生提取法是近几年提出的新方法。它是从生物药剂学的角度，将整体药物研究法与分子药物研究法相结合，模拟口服药物经胃肠道转运吸收的环境，采用活性指导下的导向分离方法，具有有效成分损失少、成本低、生产周期短的特点。在操作中，根据仿生学原理，人体胃、小肠、大肠的体液酸度最佳pH分别为2.0，7.5和8.3，先将原料用一定pH的酸水提取，继以一定pH的碱水提取，提取液分别过滤、浓缩；

[0026] 第二、对于一些黄酮类化合物被细胞壁包围不易提取的原料，传统的热水、碱、有

机溶剂提取法，受细胞壁主要成分纤维素的阻碍，往往提取效率较低。恰当地利用酶处理这些植物材料，可改变细胞壁的通透性，提高有效成分的提取率。根据传质理论，溶剂向固体表面扩散，渗透固体表面，进入固体内部及固体内部微孔隙内，溶解黄酮类化合物，通过固体微孔隙向固体表面扩散，在表面与溶剂主体间，由于浓度差作用力，黄酮类化合物向溶剂主体扩散，完成提取传质过程。采用酶解法却能使细胞壁疏松、破裂，减小传质阻力，从而提高提取效率；

[0027] 第三、用超声波提取黄酮类物质，是目前比较新的方法。原理是利用超声波所具有的空化作用破坏植物的细胞壁，从而有助于黄酮类物质快速溶解于溶剂中。同时，利用超声波的机械效应促使提取溶剂不断震荡有助于溶质扩散，超声波的热效应对原料还具有水浴作用。另外，还利用其次效应，如机械振动、扩散、击碎等，使其加速被提取成分的扩散、释放。超声波提取法具有设备简单，操作方便，提取时间短，产率高，无需加热，同时有利于保护热不稳定成分，省时，节能，提取率高的优点；

[0028] 综上所述，本发明所述的一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺，以禹州漏芦为原料，经过一系列工序提取禹州漏芦总黄酮，在模拟人体胃、小肠、大肠的体液酸度环境下能够最大限度的保留总黄酮的有效成分，同时超声波叠加酶解细胞壁的处理方式最大限度地溶出总黄酮，节约有机溶剂和酶的量有助于减少环境污染，并结合ODS开放柱、中压柱分离纯化技术，提高总黄酮中有效成分提取产率。

附图说明

[0029] 图1为本发明所述的芦丁的标准曲线图。

具体实施方式

[0030] 结合以下具体实施例，对本发明作进一步的详细说明，本发明的保护范围不局限于以下实施例。实施本发明的过程、条件、试剂、实验方法等，除以下专门提及的内容之外，均为本领域的普遍知识和公知常识，本发明没有特别限制内容。

[0031] 一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺，将禹州漏芦原料先进行酶解处理，再进行超声波破碎和萃取，分离纯化后得到禹州漏芦总黄酮，提取环境模拟人体消化道环境酸碱度，其中在酶解处理时环境pH值为4.8，超声波破碎时环境pH值为2.0，超声波萃取时环境pH值为7.5-8.3。

[0032] 一种半仿生酶辅助超声波法提取禹州漏芦总黄酮的工艺，制备工艺包括：

[0033] 酶解处理为每1g的禹州漏芦原料干料，清洗干燥并粉碎后加入体积分数为60%的乙醇20mL和5mg水解酶配置成的8mL水解酶液，使用水杨酸调整环境pH值为4.8在50℃下微波水浴90min，微波功率为300W，过滤留上清液A和滤渣A，在滤渣A中加入体积分数为60%的乙醇20mL和5mg水解酶液，使用水杨酸调整环境pH值为4.8在50℃下微波水浴120min，得到上清液B和滤渣B，合并上清液A和上清液B得到上清液C，将上清液C和滤渣B留取备用。

[0034] 作为优选的，所述水解酶为半纤维素酶、真菌淀粉酶、纤维素酶中的一种或是它们的组合物。

[0035] 所述酶解过的禹州漏芦原料进行超声波破碎、萃取、分离纯化的过程为：

[0036] 步骤一、将滤渣B加入体积分数为60%的乙醇20mL，使用水杨酸调整环境pH值为2.0

在60℃下超声波破碎50min，超声波功率为100W，离心4000r/min，10min，得到上清液D和残渣C备用；

[0037] 步骤二、在残渣C中加入体积分数为60%的乙醇20mL，使用氢氧化钠调整环境pH值为7.5在60℃下超声波破碎25min，超声波功率为100W，离心4000r/min，10min，得到上清液E和残渣D备用；

[0038] 步骤三、在残渣D中加入体积分数为60%的乙醇20mL，使用氢氧化钠调整环境pH值为8.3在60℃下超声波破碎25min，得到上清液F和残渣E；

[0039] 步骤四、合并上清液C、上清液D、上清液E和上清液F，得到禹州漏芦总黄酮粗提液；

[0040] 步骤五、将粗提液减压浓缩烘干，得到粗提物I；

[0041] 步骤六、将步骤五烘干得到的粗提物I用乙醇溶解后上硅胶柱，用含甲醇的氯仿溶液进行洗脱，收集黄绿色洗脱液并风干，得到粗提物Ⅱ；

[0042] 步骤七、将步骤六得到的粗提物Ⅱ用乙醇溶解后上ODS开放柱，用乙醇水溶液进行洗脱，收集黄绿色洗脱液并减压浓缩烘干，得到粗提物Ⅲ；

[0043] 步骤八、用中压柱分离纯化：将步骤七得到的粗提物Ⅲ上中压柱，用乙醇水溶液洗脱，从出峰开始收集洗脱液，至峰下降后停止收集，洗脱液并减压浓缩烘干，得到粗提物Ⅳ；

[0044] 步骤九、过滤结晶：将步骤八得到的粗提物Ⅳ用甲醇溶解，用滤膜过滤后缓慢加入水进行结晶，边加入边搅拌至出现黄色絮状物时停止搅拌，静置50min，滤纸过滤，将留在滤纸上的黄色药物挥干，收集挥干后的黄色药物既为禹州漏芦总黄酮。

[0045] 作为优选的，所述步骤六中含甲醇的氯仿溶液为含5%甲醇的氯仿溶液。

[0046] 作为优选的，所述步骤六中使用硅胶柱进行洗脱时的流速为1.0mL/min。

[0047] 作为优选的，所述步骤七、八中的乙醇水溶液为体积分数为80%的乙醇水溶液。

[0048] 禹州漏芦总黄酮含量的测定

[0049] 1、标准曲线的绘制方法

[0050] 采用$NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$比色法测定总黄酮含量，即利用乙醇提取黄酮类化合物，以芦丁为标准品在510nm处测定吸光度。

[0051] 精确称取15mg芦丁标准品，以50%乙醇溶解，移入50mL容量瓶中定容，即得0.3mg/mL的芦丁标准液。分别准确吸取0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL与25mL容量瓶中；再分别加入5%的$NaNO_2$ 1.0mL摇匀后放置5min；再分别加入10%的$Al(NO_3)_3$ 1.0mL摇匀放置5min；加入4%的NaOH溶液10mL，摇匀放置10min；最后用30%乙醇定容至25mL。于 510 nm波长处测定吸光值。根据标准曲线回归方程，由吸光度求出提取液中的芦丁含量，按下列公式计算出待测样中总黄酮的含量。

[0052] 总黄酮的提取量m_1(mg) = C × V_1× V_2

[0053] 总黄酮的得率% =m_1 /m_2×100

[0054] 式中: C 为测得吸光值，带入回归方程计算出的总黄酮浓度(mg/mL)。V_1 为总黄酮提取液体积(mL)，V_2 为测量总黄酮含量时的定容体积(mL)。m1为粗提取物中黄酮的重量(mg)，m_2 为漏芦样品重量(mg)。

[0055] 芦丁的标准曲线见说明书附图

[0056] 根据不同浓度芦丁标准液测得的吸光值，得回归方程y=9.6071X-0.0093，R^2=0.9911。

[0057] 2、总黄酮的提取方法

[0058] 原料处理:禹州漏芦放入烘箱60℃烘干至恒重,粉碎过60目筛备用。

[0059] 方法一、超声波提取法准确称取1.00g禹州漏芦放入烧杯中,按料液比1g:60mL,加入体积分数为60%的乙醇作为提取剂,摇匀,在50℃恒温下水浴浸泡90min;再放入超声波清洗仪超声波处理100min,设置为60℃,100W;最后以4000r/min离心10min,得提取液A。取提取液A1mL并采用$NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$比色法定性定量检测总黄酮含量。

[0060] 方法二、酶辅助超声波提取法 准确称取1.00g禹州漏芦放入烧杯中,加入5mg酶,按料液比1g:60mL,加入体积分数60%的乙醇作为提取剂,调至pH4.8,摇匀;在50℃恒温下水浴浸泡90min;最后放入超声波清洗仪超声波处理100min,设置为60℃,100W;最后以4000r/min离心10min,得提取液B。取提取液B1mL并采用$NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$比色法定性定量检测总黄酮含量。

[0061] 方法三、半仿生酶辅助超声波提取法 酶解处理为每1g的禹州漏芦原料干料,清洗干燥并粉碎后加入体积分数为60%的乙醇20mL和5mg水解酶配置成的8mL水解酶液,使用水杨酸调整环境pH值为4.8在50℃下微波水浴90min,微波功率为300W,过滤留上清液A和滤渣A,在滤渣A中加入体积分数为60%的乙醇20mL和5mg水解酶液,使用水杨酸调整环境pH值为4.8在50℃下微波水浴120min,得到上清液B和滤渣B,合并上清液A和上清液B得到上清液C,将上清液C和滤渣B留取备用。将滤渣B加入体积分数为60%的乙醇20mL,使用水杨酸调整环境pH值为2.0在60℃下超声波破碎50min,超声波功率为100W,离心4000r/min,10min,得到上清液D和残渣C备用;在残渣C中加入体积分数为60%的乙醇20mL,使用氢氧化钠调整环境pH值为7.5在60℃下超声波破碎25min,超声波功率为100W,离心4000r/min,10min,得到上清液E和残渣D备用;在残渣D中加入体积分数为60%的乙醇20mL,使用氢氧化钠调整环境pH值为8.3在60℃下超声波破碎25min,得到上清液F和残渣E;合并上清液C、上清液D、上清液E和上清液F,得到提取液C。取提取液C1mL并采用$NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$比色法定性定量检测总黄酮含量。

[0062] 由以上三种方法提取总黄酮结果比较如下表,得出在同一条件下采用半仿生酶辅助超声波提取法总黄酮得率最高。

[0063]

	超声波提取法	酶辅助超声波提取法	半仿生酶辅助超声波提取法
总黄酮得率(%)	6.71	9.33	10.99

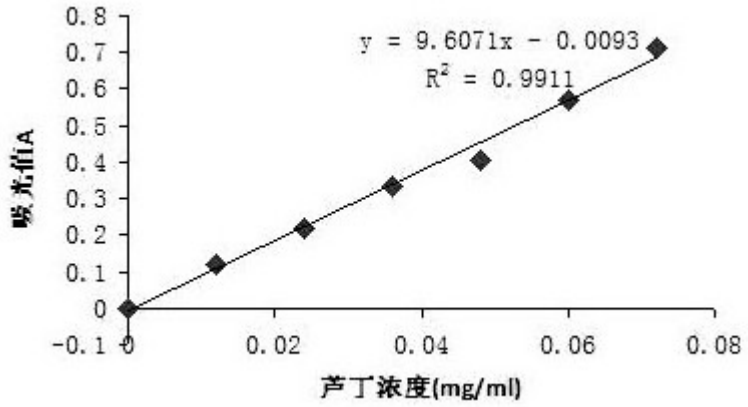

y = 9.6071x - 0.0093
R² = 0.9911
吸光值A
芦丁浓度(mg/ml)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
0
0.02
0.04
0.06
0.08

图1