

会泽葛根中黄酮提取的优化工艺及含量测定

沈燕琼^{1*}, 李启彭²

(1. 昭通市农产品质量安全中心, 昭通 657000; 2. 昭通学院化学与生命科学学院, 昭通 657000)

摘要: **目的** 优化提取会泽葛根中的黄酮并测定其含量。**方法** 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验优化提取会泽葛根中的粗黄酮, 并用大孔树脂吸附法纯化以及紫外分光光度法测定会泽葛根中黄酮含量。**结果** 最佳提取工艺为: 碱性水溶液提取法、碱性水溶液浓度为4%、料液比1:15(m/V)、微波炉功率为350 W、提取时间4 min、提取次数3次, 以芦丁为标准溶液在波长357 nm处, 测定会泽葛根中黄酮含量为7.8617%。**结论** 该方法可作为葛根中黄酮提取及含量测定的新方法。

关键词: 会泽葛根; 黄酮; 碱性水溶液提取法; 优化工艺

Optimization of extraction technology and determination of flavonoid in Huize radix puerariae

SHEN Yan-Qiong^{1*}, LI Qi-Peng²

(1. Agricultural Product Quality and Safety Center of Zhaotong, Zhaotong 657000, China; 2. School of Chemistry and Life Science, Zhaotong University, Zhaotong 657000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction of flavonoid in Huize radix puerariae and measure its content. **Methods** The extraction of crude flavonoid from Huize radix puerariae was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal experiments, which was purified by the macro-porous resin adsorption and then the content of flavonoid was determined by the ultraviolet spectrophotometry. **Results** The optimum extraction method was the alkaline extraction method, the lye concentration was 4%, the solid-liquid ratio was 1:15(m/V), the power of micro-wave oven was 350 W, the extraction time was 4 min and the extraction times was 3 times. With rutin as standard solution, the flavonoid content was 7.8617% at 357 nm. **Conclusion** This method may be a novel method for the extraction and determination of the flavonoid in Huize radix puerariae.

KEY WORDS: huize radix puerariae; flavonoid; alkaline extraction method; optimization process

1 引言

葛根为豆科植物野葛或甘葛藤(*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi)的根, 又名鹿藿和鸡齐根, 具有食用价值和药用价值, 主要产于云南、广西、广东、四川和

贵州等地。葛根中含有葛根素、黄酮、 β -谷甾醇、淀粉、多种氨基酸和维生素等营养物质, 此外还含铁、钙、磷、锌、铜、硒等10多种人体必需的矿物质和微量元素^[1,2]。其中, 黄酮对高血压、高血脂和高血糖有一定疗效, 同时也具有扩张冠状动脉和脑血管、降

基金项目: 国家自然科学基金项目(21503230)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (21503230)

*通讯作者: 沈燕琼, 硕士, 助理农艺师, 主要从事特色农产品营养成分及农残研究。E-mail: 184696105@qq.com

*Corresponding author: SHEN Yan-Qiong, Assistant Agronomist, Agricultural Product Quality and Safety Center of Zhaotong, No.47, Fengxia Road, Zhaoyang District, Zhaotong 657000, China. E-mail: 184696105@qq.com

低心肌耗氧量和增强机体免疫力等功效^[3-9]。目前有大量关于黄酮的提取方法、提取工艺、粗黄酮的纯化以及黄酮含量测定的报道,然而仍需建立提取工艺简单、价格低廉、重复性好、结果准确且适用于基层实验室的新方法^[10-13]。鉴于葛根中黄酮具有良好的食用价值和药用价值,以及云南地区的实验条件,本研究探索了葛根中黄酮高效快捷的提取工艺和快速准确的测定方法,为会泽葛根中黄酮的开发利用提供了一定的理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

葛根(采自云南会泽县),葛根→洗净→切片→自然阴干→粉碎(过40目筛)→备用。

NaOH、NaNO₂、Al(NO₃)₃、浓盐酸、95%乙醇(分析纯,天津市化学试剂厂);聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(分析纯,上海化学试剂厂);大孔树脂(天津允开树脂科技有限公司);芦丁(中国药品生物制品检定所);蒸馏水(自制)。

紫外分光光度计(Unico UV/VIS 2802PCS,尤尼科上海仪器有限公司产品);旋转蒸发器(巩义宇翔仪器);微波炉(P70F23P-G5,格兰仕电器实业有限公司);真空泵(SHZ-3III型,河南省予华仪器有限公司);电子天平(Ohaus CP214)。

2.2 葛根中黄酮的提取

2.2.1 不同溶剂对葛根中黄酮提取率的影响

称取葛根粉5g,以50mL蒸馏水或95%乙醇或4%的碱性水溶液浸泡10min,用微波炉350W处理8min后,抽滤,洗涤残渣,合并滤液,旋蒸,真空干燥得黄酮粗品,称重,计算得率。

称取葛根粉5g,以50mL4%的碱性水溶液浸泡10min,用微波炉功率为350W处理8min后,抽滤,洗涤残渣,合并滤液,用10%的盐酸分别调节上述滤液的pH=2.3,再加表面活性剂(聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯)5mL促进黄酮析出,静置30min使沉淀完全,离心、洗涤、旋蒸,真空干燥得黄酮粗品,直接称重,计算得率。

2.2.2 不同碱液浓度对葛根中黄酮提取率的影响

分别配制2%、4%和6%浓度的NaOH溶液100mL。称取葛根粉5g,分别以50mL上述碱液浸泡10min,再用微波炉功率为350W处理8min后,抽滤,

洗涤残渣,合并滤液,旋蒸,真空干燥得黄酮粗品,直接称重,比较得率,确定碱液的最佳浓度。

2.2.3 正交实验

根据初步实验,确定料液比(A)、提取时间(B)、微波炉功率(C)、提取次数(D)为主要考察因素,每个因素确定3个水平,A因素各水平数依次为1:10、1:15和1:20;B因素的各水平数依次为4、6、8min;C因素的各水平数依次为700、350、10W;D因素的各水平数依次为1、2、3次。选用L₉(3⁴)表安排实验,以测得黄酮粗品的得率作为考察指标,确定最佳的提取工艺(见表1)。

表1 L₉(3⁴)正交实验因素与水平设计
Table 1 The factors and level design of orthogonal experiment in L₉(3⁴)

水平	A 料液比	B 提取时间 (min)	C 微波炉功率 (W)	D 提取次数
1	1:10	4	700	1
2	1:15	6	350	2
3	1:20	8	70	3

2.3 定量分析

准确称取10.00mg芦丁标准品,用95%乙醇溶解并定容于50mL,该标准溶液的浓度为0.2mg/mL。分别量取0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、8.00mL芦丁标准溶液于7只25mL容量瓶中,各加入NaNO₂溶液1mL,摇匀,放置6min;再各加入Al(NO₃)₃溶液2mL,摇匀,放置6min;再各加入NaOH溶液10mL,用95%乙醇定容,放置15min后,以空白溶液做对照在300~600nm之间进行分光扫描测试。取各最大吸收波长处的吸光度A为纵坐标,芦丁标准溶液的浓度C(μg/mL)为横坐标,绘制标准工作曲线。

2.4 粗黄酮的纯化及重复性实验

称取2g葛根粉,按最佳提取工艺得黄酮粗品提取液。同时将大孔树脂用95%的乙醇浸泡24h,使其充分膨胀,然后用95%的乙醇洗至流出液加适量水无白色浑浊现象,再用去离子水洗尽乙醇,直至流出液无浑浊为止^[14,15]。称取上述处理过的大孔树脂50g,去除表面水后,置于三角瓶中,加入黄酮粗品提取液,振荡12h,使树脂充分吸附后用四层纱布过滤,抽滤,滤液以及洗脱液进行减压蒸发浓缩至干。用

95%乙醇溶解, 并定容到 50 mL 备用。量取 0.5 mL 葛根提取液于 25 mL 容量瓶, 按绘制芦丁标准曲线时的步骤显色并在 357 nm 处测定溶液的吸光度 A 。依上述方法重复提取和测试 5 次, 计算测定结果的相对标准偏差。

3 结果与讨论

3.1 葛根中黄酮的提取结果

3.1.1 不同溶剂对葛根中黄酮提取率的影响结果

黄酮粗品的提取方法较多, 其中微波水提取法、微波乙醇提取法和稀碱性水溶液微波提取法由于成本低、提取工艺简单, 比较适合在实验室提取黄酮粗品。实验结果表明: 碱性水溶液提取法所得黄酮提取得率高于水提法及乙醇提法(见表 2)。

表 2 3 种提取方法的比较
Table 2 Comparison of 3 extraction methods

提取方法	粗黄酮质量/g	黄酮粗品得率/%
水提取法	0.3270	6.54
乙醇提取法	0.3676	7.35
碱性水溶液提取法	0.4247	8.49

3.1.2 不同碱液浓度对葛根中黄酮提取率的影响

通过实验测试不同浓度碱性水溶液提取黄酮得率, 表明当碱性水溶液的浓度为 4% 时葛根黄酮粗品的得率最高, 因此采用浓度为 4% 的碱性水溶液作为溶剂(见表 3)。

表 3 不同浓度碱性水溶液提取结果比较
Table 3 Comparison of the extraction results of alkaline aqueous solution at different concentrations

碱性水溶液浓度/%	黄酮粗品质量/g	黄酮粗品得率/%
2	0.4369	8.74
4	0.4964	9.93
6	0.4116	8.23

3.1.3 正交实验结果

实验结果表明, 各因素对黄酮提取得率影响的大小为 $A > D > C > B$, 即料液比(A)为主要因素, 其次为提取次数(D)、提取功率(C)和提取时间(B)(见表 4)。以得率作为考察指标优选黄酮粗品的提取工艺条件, 可以得最优组合为 $A_2B_1C_2D_3$, 即料液比为 1:15、微波炉功率为 350 W、提取时间 4 min, 提取次数 3 次, 此

时得率为 11.88%。

表 4 正交实验结果及分析

Table 4 Results and analysis of orthogonal experiment

实验号	因素及水平				黄酮粗品得率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	8.65
2	1	2	2	2	9.38
3	1	3	3	3	10.54
4	2	1	2	3	11.88
5	2	2	3	1	10.85
6	2	3	1	2	11.09
7	3	1	3	2	11.15
8	3	2	1	3	11.58
9	3	3	2	1	10.95
K_1	28.57	31.68	31.32	30.45	
K_2	33.82	31.81	32.21	31.62	
K_3	33.68	32.58	32.54	34.00	
R	1.75	0.30	0.41	1.18	

3.2 最大吸收波长扫描及标准曲线的绘制

芦丁标准溶液的紫外光谱如图 1a 所示, 随着扫描波长增加, 吸光度值单调递增, 357 nm 波长处测定最大吸收峰; 再增加扫描波长, 吸光度开始降, 然后逐渐增加, 在 510 nm 处有一个弱的吸收峰, 故确定 357 nm 为黄酮的最大吸收波长。在 357 nm 处测定一系列标准溶液的吸光度, 根据芦丁溶液的浓度及吸光度值 A 可绘制标准曲线图 1b, 并将上述数据进行线性回归处理, 得到芦丁浓度-吸光度标准曲线的回归方程为: $A=0.01004C+0.06201$, $r^2=0.99994$ 。

3.3 粗黄酮的纯化及重复性实验结果

根据最优提取条件, 提取会泽葛根中粗黄酮, 进一步纯化得黄酮, 并采用紫外分光光度法, 在最大吸收波长 357 nm 处, 测定葛根提取样品溶液的吸光度, 由回归方程求出葛根中黄酮得率平均值为 7.8617%, RSD 为 0.89%(见表 5)。实验结果表明会泽葛根中黄酮的得率, 在相关文献中处于中上水平^[11,14]。该方法提取操作简单、价格低廉和重复性好, 测定结果准确和精确度高, 进一步证实了该提取及检测方法的可行性。

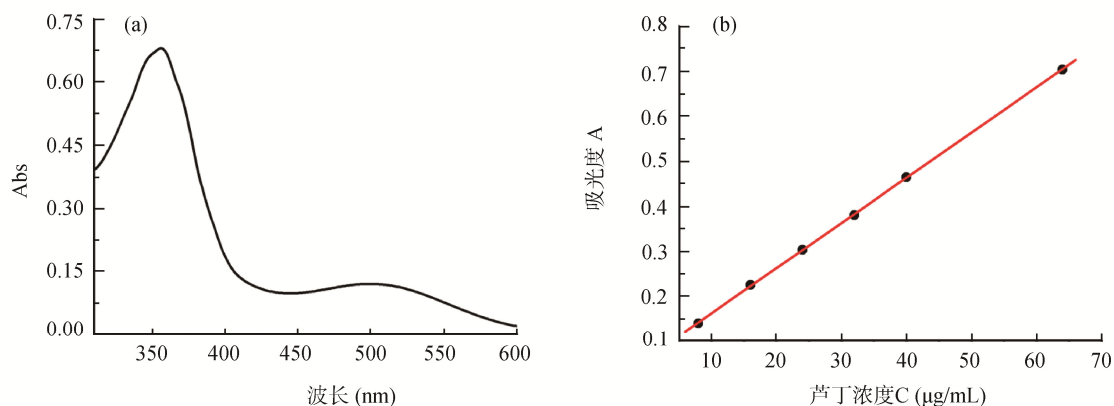


图1 芦丁溶液的紫外光谱图和芦丁溶液标准曲线图
Fig. 1 The UV spectra and rutin standard curve of rutin solutions

表5 粗黄酮的纯化及重复性实验结果
Table 5 Purification and repeated experimental results of crude flavonoids

样品	吸光度 A	平均浓度($\mu\text{g/mL}$)	纯黄酮得率(%)	平均得率(%)
1	0.6986	63.4054	7.9257	
2	0.6869	62.2400	7.7800	7.8617
3	0.6975	63.2958	7.9120	
4	0.6878	62.3297	7.7912	RSD=0.89%
5	0.6965	63.1962	7.8996	

4 结论

采用正交实验优化提取会泽葛根中粗黄酮, 进一步用大孔树脂法纯化, 以芦丁为标准溶液在波长为 357 nm 处测定会泽葛根中黄酮含量。实验结果表明: 碱性水溶液提取法、碱性水溶液的浓度为 4%、料液比为 1:15、微波炉功率为 350 W、提取时间为 4 min、提取次数为 3 次, 为最优提取条件, 该条件下测定会泽葛根中总黄酮得率为 7.8617%, RSD 为 0.89%。

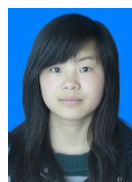
参考文献

- [1] 杨旭东, 王爱勤, 何龙飞. 葛根种质资源及其开发利用研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(24): 11-16.
Yang XD, Wang AQ, He LF. Research progress of radix puerariae germplasm and its utilization [J]. Chin Agric Sci Bull, 2014, 30(24): 11-16.
- [2] 郑皓. 葛根的研究与开发现状[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(2): 24-26.
Zheng H. Research and development of the radix puerariae [J]. Amino Acid Biol Res, 2006, 28(2): 24-26.
- [3] 楚纪明, 马树运, 李海峰. 葛根有效成分及其药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2015, 17(2): 142-146.
Chu JM, Ma SY, Li HF. Research progress of effective components and pharmacological effects of puerarin [J]. Food Drug, 2015, 17(2): 142-146.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia 2010 edition of the people's Republic of China [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010.
- [5] Ye L, Wang H, Duncan S E, et al. Antioxidant activities of vine tea (*Ampelopsis grosedentata*) extract and its major component dihydromyricetin in soybean oil and cooked ground beef [J]. Food Chem, 2015, 172: 416-422.
- [6] Ying Z, Han X, Li J. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves [J]. Food Chem, 2011, 127(3): 1273-1279.
- [7] Zhao S, Kwok K C, Liang H. Investigation on ultrasound assisted

- extraction of saikosaponins from radix bupleuri [J]. Sep Purif Technol, 2007, 55(3): 307–312.
- [8] Nishizawa C, Takeshita K, Ueda J, *et al.* Hydroxyl radical generation caused by the reaction of singlet oxygen with a spin trap, DMPO, increases significantly in the presence of biological reductants [J]. Free Radic Res, 2004, 38(4): 385–392.
- [9] 赵勇. 葛根中总黄酮的提取条件优化及含量测定[J]. 氨基酸和生物资源, 2015, 37(4): 57–60.
Zhao Y. Optimization of extraction conditions and content determination of total flavonoids in radix [J]. Amino Acid Biol Res, 2015, 37(4): 57–60.
- [10] Pan J, Niu G, Liu Z. Microwave-assisted extraction of tanshinones from salvia miltiorrhiza Bunge with analysis by high-performance liquid chromatography [J]. Chromatogr A, 2001, 922: 371–375.
- [11] 魏凤华, 倪艳, 宋强. 响应曲面法优化葛根总黄酮的提取工艺研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化技术应用研究, 2015, 17(1): 262–266.
Wei FH, Ni Y, Song Q. Study on optimization of extraction technology of total flavonoids from radix puerariae by response surface methodology [J]. World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med Materia Med, 2015, 17(1): 262–266.
- [12] 任雪琴, 陈新, 吴兵. 葛根黄酮的提取工艺及三波长-分光光度法测定其含量[J]. 武汉工业学院学报, 2011, 30(4): 32–36.
Ren XQ, Chen X, Wu B. Study on extracting technology of flavonoids from *Pueraria Lobata Ohwi* and determination of flavonoids by three-wavelength spectrophotometry [J]. J Wuhan Poly Univ, 2011, 30(4): 32–36.
- [13] 梁丽娟, 王汝上. 葛根总黄酮提取工艺优化研究[J]. 今日药学, 2014, 24(12): 866–869.
Liang LY, Wang RS. Optimization of total flavonoids extract of pueraria [J]. Pharm Today, 2014, 24(12): 866–869.
- [14] 朱德艳. 葛根黄酮不同提取方法比较[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 265–267.
Zhu DY. Comparison of different extraction methods of flavonoids from radix [J]. Jiangsu Agric Sci, 2015, 43(5): 265–267.
- [15] 李扬, 李梦耀, 袁胜, 等. 葛根中黄酮的提取与纯化研究[J]. 应用化工, 2015, 44(9): 1691–1693.
Li Y, Li MY, Yuan S, *et al.* Study on the extraction and purification of total flavones from Kudzu root [J]. Appl Chem Ind, 2015, 44(9): 1691–1693.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



沈燕琼, 硕士, 助理农艺师, 主要研究方向为农产品营养成分及农残研究。
E-mail: 184696105@qq.com