

亚临界水提取葛根中总异黄酮的研究

周 丽¹, 张博雅¹, 张永忠^{1,2*}

1. 东北农业大学理学院 应用化学系, 黑龙江 哈尔滨 150030

2. 教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030

摘要: **目的** 考察亚临界水提取葛根总异黄酮的最佳提取工艺。**方法** 通过单因素试验和正交试验, 以总异黄酮提取率为指标, 优选出葛根总异黄酮的提取工艺参数。**结果** 当提取温度为 120 ℃, 提取时间为 30 min, 料液比为 1:25, 压力为 1.1 MPa 时, 葛根总异黄酮的提取率和质量分数分别为 7.83%、24.9%。**结论** 与传统的提取方法相比, 亚临界水提取技术是新发展起来的一种新型提取技术, 具有提取时间短、效率高、环境友好等优点。

关键词: 亚临界水提取技术; 葛根; 总异黄酮; 单因素试验; 工艺优化

中图分类号: R284.2; R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)03-0492-04

Study on total isoflavone from *Puerariae Radix* by subcritical water extraction

ZHOU Li¹, ZHANG Bo-ya¹, ZHANG Yong-zhong^{1,2}

1. Department of Applied Chemistry, College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2. Key Laboratory of Soybean Biology, Ministry of Education, Harbin 150030, China

Abstract: **Objective** To optimize the extracting condition of total isoflavone from *Puerariae Radix* by subcritical water extraction. **Methods** Taking isoflavones yield as index, the technology parameter of subcritical water extraction of *Puerariae Radix* total isoflavone was optimized by single factor test and orthogonal test. **Results** The optimum extraction parameters were as follows: temperature 120 ℃, extraction time 30 min, solid-liquid ratio 1:25, pressure 1.1 MPa. The yield of *Puerariae Radix* total isoflavone in the extracts was 7.83%, and the purity of the isoflavone was 24.9%. **Conclusion** Compared with traditional extracting methods, subcritical water extraction is a new developing technology in recent years. Its advantage is fast, effective, and environmental friendly.

Key words: subcritical water extraction; *Puerariae Radix*; total isoflavones; single factor test; technology optimization

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi 的干燥根, 葛根中的主要生物活性成分为异黄酮类化合物, 包括葛根素 (puerarin, 黄豆苷元-8-C-葡萄糖苷)、黄豆苷 (daidzin, 黄豆苷元-7-O-葡萄糖苷)、黄豆苷元 (daidzein) 等, 其中以葛根素的量最高^[1-2]。葛根中总异黄酮的量为 0.40%~15.87%, 并且受品种和产地的影响较大。国内外已有大量研究报道及临床实验表明葛根异黄酮具有雌激素活性、抗氧化及抗肿瘤活性, 能够降低血糖、调整血压、改善脑及冠脉循环, 对心脑血管系统、神经系统、血糖紊乱、酒精中毒等多方面疾病具有积极防治作用^[3-6]。

亚临界水提取技术(subcritical water extraction)是目前国内外研究较热的一种提取技术。亚临界水也被称为过热水、高温水、高压热水或热液态水, 是指在一定压力下, 将水加热到 100 ℃以上临界温度 374 ℃以下的高温, 水体仍然保持在液体状态^[7]。亚临界水提取技术就是通过对亚临界水温度和压力的控制改变水的极性、表面张力和黏度, 从而增加水对待提物质的溶解能力。与其他提取方法相比, 亚临界水法具有提取率高, 提取时间短, 成本低, 安全无毒, 环境友好等特点^[8-9]。本研究以亚临界水为溶剂, 应用高纯氮气加压, 以葛根总异黄酮提取率为指标, 通过单因素试验优化提取葛根总异黄酮

收稿日期: 2011-08-28

基金项目: 国家“863”计划课题(2008AA10Z331)

作者简介: 周 丽(1986—), 女, 硕士研究生, 山东省禹城人, 研究方向为食品科学。Tel: 13945143447 E-mail: water_1022050306@163.com

*通讯作者 张永忠 Tel: 13359993588 E-mail: zyz1953@sohu.com

的工艺条件。

1 仪器与材料

Mettler Toledo AG135 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), FW 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司), 高压磁力搅拌反应釜(烟台高新区科立自控设备研究所), LG10—24 A 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂), TU—1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), SHB III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司), 真空旋转蒸发器(上海医械专机厂有限公司)。

野葛购于哈尔滨三棵树药材市场, 经东北农业大学胡宝忠教授鉴定为 *Pueraria labata* (Wild.) Ohwi 的干燥根, 洗净, 烘干后用粉碎机粉碎过 40 目筛, 备用。黄豆苷元对照品(质量分数为 99.0%, Sigma 公司); 高纯氮气(体积分数为 99.999%, 北京市亚南气体有限公司); 95%乙醇和无水乙醇均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 葛根总异黄酮的测定方法

2.1.1 标准曲线的建立 精确称取黄豆苷元对照品 6.0 mg, 溶解于 95%乙醇中, 并定容至 100 mL, 得到 60 $\mu\text{g/mL}$ 黄豆苷元对照品储备液。精密移取 1、2、3、4、5、6 mL 储备液于 50 mL 量瓶中, 用 95%乙醇稀释至刻度, 采用分光光度法在 250 nm 处测定吸光度(A)值, 以 A 值为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程为 $A=0.1001 C+0.0078$, $r^2=0.9996$, 表明黄豆苷元在 1.2~7.2 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.2 葛根总异黄酮的测定和提取率的计算 提取液趁热减压滤过, 吸取 2 mL 滤液定容至 50 mL 量瓶中, 用 95%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 3 000 r/min 离心 10 min, 取 2 mL 上清液定容至 50 mL 量瓶中, 以 95%乙醇为对照, 进行葛根总异黄酮的测定, 计算葛根提取液中总异黄酮的质量和提取率。

提取率=提取液中总异黄酮的质量 / 葛根的质量

2.2 葛根总异黄酮的提取工艺

准确称取野葛粉 6 g 于高压反应釜中, 加入不同体积的蒸馏水, 氮气加压, 设置磁力搅拌速率为 200 r/min, 按单因素试验中设计的温度、时间和压力条件进行提取。提取完毕后, 提取液趁热滤过, 弃去滤渣, 加热浓缩滤液至 5 mL, 加入 200 mL 无水乙醇, 使浓缩液中乙醇体积分数大于 95%。由于

葛根多糖不溶于乙醇, 会以不溶物的形式析出, 静置 30 min 待沉淀完全后, 减压滤过分离乙醇液和不溶物。将乙醇液在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下减压浓缩成膏状物, 真空干燥, 即得葛根总异黄酮提取物, 计算提取物中总异黄酮的质量分数。

质量分数=提取物中总异黄酮的质量 / 提取物的质量

2.3 单因素试验

2.3.1 提取时间的选择 在料液比 1:20, 温度 120 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 选取提取时间分别为 5、10、15、20、25、30、40 min 进行亚临界水提取, 结果见表 1。在 5~30 min 葛根总异黄酮提取率随提取时间延长而增加, 在 30 min 时达到最大值, 30 min 后总异黄酮提取率开始下降, 因此选择 30 min 为最佳提取时间。

表 1 提取时间对总异黄酮提取率的影响

Table 1 Effect of extracting time on yield of total isoflavone

提取时间	提取率 / %	提取时间	提取率 / %
5 min	5.49	25 min	6.27
10 min	5.55	30 min	6.68
15 min	5.59	40 min	6.39
20 min	6.02		

2.3.2 料液比的选择 在温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 提取时间 30 min 条件下, 选择料液比分别为 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 进行亚临界水提取, 结果见表 2。当料液比为 1:15~1:25 时, 总异黄酮提取率呈显著增加趋势, 在 1:25 时达到最大值, 1:25 后提取率有所下降并趋于平缓。料液比过小, 会出现糊底现象, 容易使浸出的总异黄酮粘在反应釜内壁上, 不好转移, 造成损失。而料液比过大时, 由于亚临界水在提取总异黄酮的同时还会提出很多水溶性多糖和蛋白, 这些物质会产生大量泡沫, 容易使提取液从反应釜中溢出。此外, 料液比过大还会导致后续脱溶处理困难, 消耗更多的能源, 因此综合考虑选择最佳提取料液比为 1:25。

2.3.3 提取温度的选择 在料液比 1:25, 提取时

表 2 料液比对总异黄酮提取率的影响

Table 2 Effect of solid to liquid ratio on yield of total isoflavone

料液比	提取率 / %	料液比	提取率 / %
1:15	5.52	1:30	6.58
1:20	6.05	1:35	6.56
1:25	6.90		

间 30 min 条件下, 选择提取温度分别为 100、110、120、130、140 °C 进行亚临界水提取, 结果见表 3。当温度为 100~120 °C 时, 总异黄酮提取率随温度升高而增加, 在 120 °C 达到最大值。在 120 °C 以后随温度的升高, 总异黄酮提取率呈逐渐下降趋势。这可能是由于高温使葛根部分成分降解, 使多糖、蛋白质等非提取成分浸出形成泡沫, 包裹在原料表面, 导致不能充分提取。因此选择最佳提取温度为 120 °C。

表 3 提取温度对异黄酮提取率的影响

Table 3 Effect of temperature on yield of total isoflavone

提取温度	提取率 / %	提取温度	提取率 / %
100 °C	5.61	130 °C	6.63
110 °C	6.45	140 °C	6.27
120 °C	6.83		

2.3.4 提取压力的选择 在料液比 1:25, 提取时间 30 min, 提取温度 120 °C 的条件下, 选择加压压力分别为 0.5、0.7、0.9、1.1、1.3 MPa 进行亚临界水提取, 结果见表 4。葛根总异黄酮提取率随亚临界水加压压力的增大而增加。在 0.5~1.1 MPa 压力下, 总异黄酮提取率一直呈上升趋势, 在 1.1 MPa 时达到最大值, 在 1.1 MPa 以后开始略有下降, 其原因还有待于深入研究。本研究选择最佳加压压力为 1.1 MPa。

表 4 压力对总异黄酮提取率的影响

Table 4 Effect of pressure on yield of total isoflavone

压 力	提取率 / %	压 力	提取率 / %
0.5 MPa	6.02	1.1 MPa	7.45
0.7 MPa	6.23	1.3 MPa	7.28
0.9 MPa	6.87		

2.4 正交试验

在单因素试验的基础上, 以总异黄酮提取率为考察指标, 对影响葛根总异黄酮亚临界水提取效果的因素: 提取时间 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C)、提取压力 (D) 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验优化。准确称取野葛粉 6 g 于高压反应釜中, 加入不同体积的蒸馏水, 氮气加压, 设置磁力搅拌速率为 200 r/min, 进行正交试验。试验设计及结果见表 5, 方差分析见表 6。

从极差分析结果得出影响葛根总异黄酮提取效率的因素主次顺序为 $C>A>B>D$, 即温度对葛根

表 5 正交试验设计与结果

Table 5 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A / min	B	C / °C	D / MPa	提取率 / %
1	20 (1)	1:20 (1)	110 (1)	0.9 (1)	5.945
2	20 (1)	1:25 (2)	120 (2)	1.1 (2)	6.469
3	20 (1)	1:30 (3)	130 (3)	1.3 (3)	6.881
4	30 (2)	1:20 (1)	120 (2)	1.3 (3)	6.400
5	30 (2)	1:25 (2)	130 (3)	0.9 (1)	7.734
6	30 (2)	1:30 (3)	110 (1)	1.1 (2)	6.825
7	40 (3)	1:20 (1)	130 (3)	1.1 (2)	6.538
8	40 (3)	1:25 (2)	110 (1)	1.3 (3)	6.328
9	40 (3)	1:30 (3)	120 (2)	0.9 (1)	5.869
K_1	6.432	6.294	6.366	6.516	
K_2	6.986	6.844	6.246	6.611	
K_3	6.245	6.525	7.051	6.536	
R	0.741	0.550	0.805	0.095	

表 6 方差分析

Table 6 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.892	2	89.2	$P<0.05$
B	0.457	2	45.8	$P<0.05$
C	1.132	2	113.2	$P<0.01$
D (误差)	0.01	2		

$$F_{0.05}(2, 2)=19.0 \quad F_{0.01}(2, 2)=99.0$$

异黄酮提取率影响最大, 其次是时间和液料比, 压力最小; 方差分析表明, 相对于因素 D, 因素 A、B、C 具有显著性, 故选取的最佳提取组合为 $A_2B_2C_3D_2$, 即提取温度为 120 °C, 提取时间为 30 min, 料液比为 1:25, 提取压力为 1.1 MPa。

2.5 验证试验

正交试验中获得的最佳提取工艺参数: 提取温度为 120 °C, 提取时间为 30 min, 料液比为 1:25, 提取压力为 1.1 MPa。

取 6 g 野葛粉以最佳工艺参数进行 3 次验证试验, 结果野葛总异黄酮的提取率分别为 7.86%、7.81%、7.82%, 平均提取率为 7.83%, 产品中总异黄酮的质量分数分别为 25.2%、25.0%、24.5%, 平均质量分数为 24.9%。

2.6 不同提取方法的对比试验

应用本课题组前期研究的超声辅助提取法和加热回流提取法^[10]所确定的最佳试验条件与亚临界水提取法的提取效果进行比较, 试验条件和结果见

表 5。在这 3 种方法中,亚临界水提取法提取葛根总异黄酮的提取率最高,虽然提取温度较高,但是提取时间最短,以水为溶剂安全环保且廉价易得,可以降低成本;而超声提取法和加热回流提取法均使用一定体积分数的乙醇做提取剂,有机溶剂用量较大且用时长,提取率低。说明亚临界水提取法提取葛根总异黄酮更省时、更高效、更环保。

表 5 不同提取方法对总异黄酮提取率的影响
Table 5 Effect of different extraction methods
on total isoflavone

提取方法	提取溶剂	温度 / ℃	料液比	时间 / min	提取 率 / %
亚临界水	水	120	1 : 25	30	7.83
超声辅助	70%乙醇	50	1 : 30	45	5.93
加热回流	50%乙醇	80	1 : 20	120	5.69

3 讨论

由于葛根素在葛根中的量最高,国内研究测定葛根总异黄酮的量时多以其为对照品,而本实验选用黄豆苷元作对照品,主要是因为从化学结构上来看,葛根总异黄酮中的各个组分基本上都是黄豆苷元的衍生物。黄豆苷元化学结构中含有大的共轭 π 键,在紫外光区有吸收且摩尔吸光系数比葛根素大,测定灵敏度更高,而本实验仅需测定葛根总异黄酮的量,因此选用黄豆苷元作为对照品。

本研究应用目前研究较热的亚临界水提取技术,以水为溶剂,通过升温升压使水处于亚临界状态,降低了水的极性和黏度,增大总异黄酮在水中的溶解度,且高纯氮气加压还可以防止高温提取过程中葛根异黄酮被氧化,提高葛根总异黄酮提取率。利用异黄酮类化合物易溶于乙醇,而多糖不易溶于乙醇的性质,将提取液中的总异黄酮和多糖分离开来,提高总异黄酮的质量分数。通过将亚临界水提取法同传统加热回流提取法和超声提取法的比较可

知,亚临界水提取法具有省时、高效、环保的优点,国内利用亚临界水提取法提取葛根总异黄酮的研究尚未见报道,本研究将亚临界水提取技术应用于葛根总异黄酮提取上,是一种新的探索,对葛根总异黄酮的生产具有重要意义。

参考文献

- [1] 肖培根. 新编中药志 (第 1 卷) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] 刘 娜, 张贵君, 金哲雄, 等. 葛根解表药效组分分析 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 294-296.
- [3] 郭 蕊, 张 云, 刘雅静, 等. 野葛花醇提物中异黄酮含量及其抗氧化活性测定 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(6): 1259-1263.
- [4] Lin C M, Lin R D, Chen S T, *et al.* Neurocytoprotective effects of the bioactive constituents of *Pueraria thomsonii* in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(17/18): 2147-2156.
- [5] Ma T C, Campana A, Lange P S, *et al.* A large-scale chemical screen for regulators of the arginase 1 promoter identifies the soy isoflavone daidzeinas a clinically approved small molecule that can promote neuronal protection or regeneration via a cAMP-independent pathway [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(2): 739-748.
- [6] Han R M, Tian Y X, Becker E M, *et al.* Puerarin and conjugate bases as radical scavengers and antioxidants: molecular mechanism and synergism with beta-carotene [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(6): 2384-2391.
- [7] Smith R M. Extraction with superheated water [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 975(1): 31-46.
- [8] Zhang S Q, Zhu J J, Wang C Z. Novel high pressure extraction technology [J]. *Int J Pharm*, 2004, 278(2): 471-474.
- [9] 丛艳波, 张永忠, 刘 潇. 亚临界水提取槐角中总异黄酮的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 717-720.
- [10] 李海涛. 葛根有效成分的提取工艺及其解酒功效的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006.