

葛根素醇提工艺的优化

Optimization on extraction technology of puerarin from *Puerarialobata*

曹雄 艾芳 刘梦瑶 王童 吴爱娟
CAO Xiong AI Fang LIU Meng-yao WANG Tong WU Ai-juan
郑强 李超 尹霞 韩琴

ZHENG Qiang LI Chao YIN Xia HAN Qin

(成都医学院公共卫生系, 四川 成都 615000)

(Department of Public Health, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 615000, China)

摘要:为探究提取葛根中葛根素的最佳工艺条件,以葛根素浓度为响应值,利用单因素试验和响应面设计对葛根素的醇提工艺进行优化,并采用高效液相色谱法(HPLC)对最佳工艺条件下所得提取物进行鉴定。结果表明:葛根素的最佳提取条件为乙醇体积分数 50%、料液比 1:25(m:V)、提取时间 70 min、提取温度 60 °C,该条件下所得葛根素为预测值的 96.79%,HPLC 检测结果与葛根素标准品一致。

关键词:葛根;葛根素;醇提法;HPLC

Abstract: In order to explore the optimum conditions of puerarin, the extraction process was optimized by single factor test and response surface design. The extract was identified by high performance liquid chromatography (HPLC) for puerarin or not. The results showed that the best extraction conditions were: ethanol volume fraction 50%, solid-liquid ratio of 1:25(m:V), extraction time 70 min and extraction temperature of 60 °C. With those conditions, the expected content of puerarin is 96.79%, and the testing results of HPLC is consistent with the element standard of puerarin.

Keywords: puerarialobata; puerarin; alcohol formulation; HPLC

葛根为豆科植物野葛(*Lobata*(Willd.) Ohwi)或甘葛藤(*P. thomsonii*Benth.)的干燥根。主要成分有葛根素、大豆苷、大豆苷元等黄酮类物质。研究^[1-2]表明,以葛根素为代表的异黄酮类成分具有改善心脑血管血液循环、扩张冠状动脉、降血压、降血糖、解酒护肝、抗肝纤维化等作用。鉴于葛根中葛根素的药用价值,对葛根素的传统提取方法已有水提法、

乙醇提取和发酵提取等,发酵提取效率高但耗时长,提取工艺设计多以正交试验的数据分析为主,正交设计法无法找到整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值。近年来出现以响应面分析法对植物成分进行优化提取^[3],该法能求出各因素水平的响应值,并能分析各单因素之间的交互影响,可以预测最优值,具有试验次数少、周期短、精度高等优点。考虑目前对葛根素的提取已经采用的水提法、超声提取和发酵提取分别存在提取效率不高、对人体危害大、耗费时间长等问题,本试验拟采用恒温振荡仪醇提法提取葛根中的葛根素,并采用响应面法对各提取因素进行优化设计,结合 HPLC 法定性检测提取物是否为葛根素,为寻找一种工艺简单、快捷、效率高提取方法并为葛根素药理作用的进一步研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

干燥葛根:购自太极大药房,经成都中医药大学宋兴教授鉴定为豆科植物野葛;

葛根素标准品:纯度 99%,成都普瑞法试剂公司;

乙醇、甲醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计:UV5000 型,安徽皖仪科技股份有限公司;

电子天平:1/1000 型,北京赛多利斯仪器系统有限公司;

恒温振荡器:THZ-82 型,上海五久自动化设备有限公司;

粉碎机:FY-135 型,天津泰斯特仪器有限公司;

高效液相色谱仪:LC-20A/10A 型,杭州瑞析科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 葛根提取液的制备 将葛根粉碎后,过 16 目筛取粉

基金项目:国家级大学生创新实验项目基金(编号:201413705024);
四川省厅级川菜发展研究(编号:CC13Z08)

作者简介:曹雄(1992—),男,成都医学院在读本科生。

E-mail: 16964791@qq.com

通讯作者:韩琴

收稿日期:2015-07-28

末。称取1.000 g干燥的葛根粉末,加入一定量的乙醇溶液,在一定温度下提取一定时间,将提取液过滤,取滤液5 μL 加入到4 995 μL 的甲醇溶液中,得葛根素粗提液。

1.3.2 葛根素标准曲线的绘制 根据葛根素标准品试剂说明书将50 mg/100 mL的葛根素标准品用甲醇定容制得质量浓度为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准液。用甲醇稀释成质量浓度为5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葛根素标准系列使用液。采用紫外可见分光光度计分别测量各浓度的吸光度 $A_{250\text{ nm}}$,以葛根素浓度为横坐标, $A_{250\text{ nm}}$ 值为纵坐标绘制标准曲线(见图1),可见葛根素浓度与吸光度之间线性关系良好,可用于葛根提取液中葛根素含量的测定^[4]。

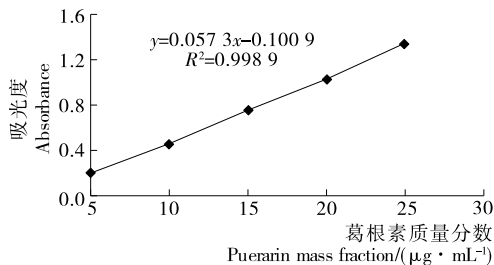


图1 葛根素标准液标准曲线

Figure 1 Puerarin standard solution standard curve

1.3.3 单因素试验

(1) 乙醇体积分数:称取7份质量为1.0 g的葛根干粉,按1:15($m:V$)的料液比分别加入体积分数为0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%的乙醇溶液,在60 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下提取30 min。取样,测定其 $A_{250\text{ nm}}$ 值,以考察乙醇体积分数对葛根素提取效果的影响。

(2) 料液比:称取5份质量为1.0 g的葛根干粉,按照1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30($m:V$)的料液比加入体积分数为70%的乙醇溶液,在60 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下提取30 min。取样,测定其 $A_{250\text{ nm}}$ 值,以考察料液比对葛根素提取效果的影响。

(3) 提取时间:称取5份质量为1.0 g的葛根干粉,按照1:15($m:V$)的料液比加入体积分数70%的乙醇溶液,在60 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,分别提取10, 30, 60, 90, 120 min。取样,测定其 $A_{250\text{ nm}}$ 值,以考察提取时间对葛根素提取效果的影响。

(4) 提取温度:称取5份质量为1.0 g的葛根干粉,固定料液比为1:15($m:V$),乙醇体积分数70%,分别在40, 50, 60, 70, 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下提取30 min。取样,测定其 $A_{250\text{ nm}}$ 值,以考察提取温度对葛根素提取效果的影响。

1.3.4 响应面优化试验 为得到最佳的提取工艺,在单因素试验结果的基础上,以提取液葛根素浓度为响应值,采用Box-Behnken设计方法^[5]对提取条件进行优化。

1.3.5 HPLC法检测 参考葛根标准品试剂说明书设置其色谱条件为: C_{18} 柱;流动相为甲醇:水80:20($V:V$);检测波长250 nm;流速0.8 mL/min;柱温25 $^{\circ}\text{C}$ 。记录提取液的出峰时间,并与葛根素标准品进行比较。

1.3.6 统计学分析 采用Design Expert 8.0.6进行响应面试验设计和分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇体积分数对葛根素提取液吸光度的影响 由图2可知,随着乙醇溶液体积分数的增加提取液的 $A_{250\text{ nm}}$ 呈先上升再下降的趋势,在70%左右出现最大值,并且50%~70%变化不大。可能是由于随着醇浓度的增大,溶剂极性减小,非极性物质溶出增多,导致葛根素的提取率降低吸光度下降^[6]。故乙醇体积分数宜控制在70%左右。

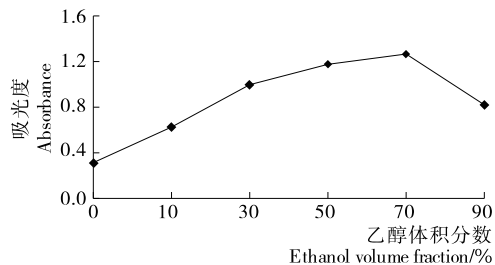


图2 乙醇体积分数对葛根素提取液吸光度的影响

Figure 2 Ethanol concentration of puerarin extract on absorbance

2.1.2 料液比对葛根素提取液吸光度的影响 由图3可知,吸光度先上升后有所降低,当料液比为1:20($m:V$)时 $A_{250\text{ nm}}$ 最大。故料液比宜控制在1:20($m:V$)左右。

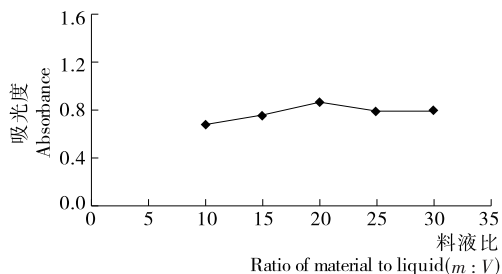


图3 料液比对葛根素提取液吸光度的影响

Figure 3 Solid-liquid ratio of puerarin extract on absorbance

2.1.3 提取时间对葛根素提取液吸光度的影响 由图4可知,葛根素提取液 $A_{250\text{ nm}}$ 随时间的变化大体呈现抛物线趋势,且随着提取时间的延长,细胞内外浓度达到平衡,活性成分不再溶出^[6],60 min后其他非葛根素成分溶出增多^[6-7],导致葛根素的提取率下降。故提取时间宜控制在60 min。

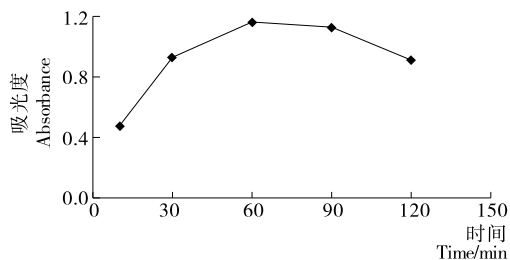


图4 提取时间对葛根素提取液吸光度的影响

Figure 4 Extraction time of puerarin extract on absorbance

2.1.4 提取温度对葛根素提取液吸光度的影响 由图 5 可知,葛根素提取液 $A_{250\text{ nm}}$ 随提取温度的升高而变化,且在 60 °C 葛根素提取液的 $A_{250\text{ nm}}$ 最大,提取温度对葛根素的影响与乙醇的溶出和葛根素熔点有关^[5],过高的温度可使葛根素降解。故提取温度宜控制在 60 °C。

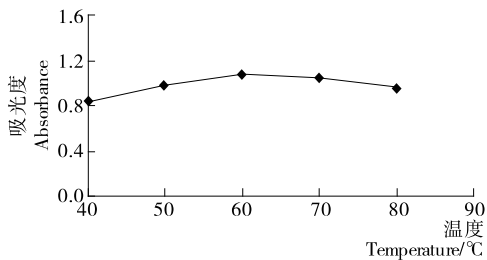


图 5 提取温度对葛根素提取液吸光度的影响

Figure 5 Extraction temperature of puerarin extract on absorbance

2.2 响应面优化试验

2.2.1 试验因素与水平选取 采用响应面设计法优化提取工艺,根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,综合单因素试验影响结果,以乙醇溶液体积分数、料液比、提取时间、提取温度 4 个对葛根素提取显著影响的因素进行设计,响应面设计因素水平见表 1。

表 1 响应面设计因素水平表

Table 1 Response surface methodology design

水平	A 乙醇体积分数/%	B 料液比 (m:V)	C 提取时间/min	D 提取温度/°C
-1	40	1:10	30	50
0	60	1:20	60	60
1	80	1:30	90	70

2.2.2 响应面设计方法与方差分析 根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理^[8-10],综合单因素试验结果,采用 Design Expert 8.0.6 软件对所得数据(表 2)进行多元回归拟合,得到葛根中葛根素提取浓度对乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取温度的二次多项回归方程为式(1):

$$Y = 15.62 - 0.75A + 0.16B + 0.29C + 0.25D - 0.60AB - 0.25AC - 0.28AD - 0.042BC - 0.66BD - 0.010CD - 1.29A^2 - 0.34B^2 - 0.50C^2 - 1.23D^2 \quad (1)$$

该模型的方差分析结果见表 3。模型的 $P < 0.0001$,表明此模型具有统计学意义,失拟项 F 被用来验证模型是否适当^[11],其值越大说明模型越好,该方程失拟项 $F = 2.56$ ($P = 0.189 > 0.05$),因此可以表明此回归方程拟合程度好,模型具有统计学意义且可靠。由表 3 可知,一次项(A, B, C, D),二次项(A^2, B^2, C^2, D^2),交互项(AB, AD, BD, AC)对结果影响显著($P < 0.05$),交互项(BC, CD)对结果影响不显著($P > 0.05$)。

2.2.3 回归模型的优化 交互项(BC, CD)对结果影响不显著($P > 0.05$),因此采用手动优化的方式优化模型^[12],优化结果见表 4。经手动优化去除交互项 BC, CD 后的方程为式(2):

表 2 响应面设计试验与结果

Table 2 Response surface methodology and results of the optimization program

试验号	A	B	C	D	葛根素浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	1	0	0	1	12.40
2	0	1	0	-1	14.57
3	0	0	0	0	15.67
4	1	-1	0	0	13.63
5	1	0	0	-1	12.47
6	-1	1	0	0	15.53
7	-1	0	-1	0	14.22
8	1	-1	0	1	14.90
9	-1	0	0	-1	13.21
10	-1	-1	0	0	14.08
11	1	0	1	0	13.00
12	0	0	-1	1	13.72
13	0	1	-1	0	14.61
14	0	-1	1	0	15.01
15	0	0	-1	-1	13.36
16	-1	0	1	0	15.04
17	0	-1	0	-1	12.87
18	0	0	0	0	15.46
19	0	0	1	1	14.36
20	0	0	0	0	15.34
21	0	0	0	0	15.58
22	0	0	0	0	15.67
23	0	1	1	0	15.30
24	1	0	-1	0	13.19
25	1	1	0	0	12.65
26	0	-1	-1	0	14.15
27	0	0	1	-1	14.05
28	0	1	0	1	13.95
29	-1	0	0	1	14.25

$$R_1 = 15.57 - 0.75A + 0.16B + 0.29C + 0.25D - 0.61AB - 0.25AC - 0.28AD - 0.66BD - 1.26A^2 - 0.32B^2 - 0.47C^2 - 1.21D^2 \quad (2)$$

由表 4 可知,模型的 $P < 0.0001$,失拟项不显著($P = 0.4337$),表明模型高度显著;同时软件分析模型复相关系数 R^2 为 94.25%,校正后的 R^2 为 97.64%。表明该模型的拟合程度好,试验误差小,适合用于葛根中葛根素的提取分析和预测。

2.2.4 响应曲面图分析 回归模型的响应面图见图 6~8。图 6 的响应曲面图显示,当提取时间为 71.46 min,提取温度为 59.31 °C,且料液比不变时,随着乙醇体积分数的增大,葛根中葛素提取液的浓度先增大后减小;当乙醇溶液体积分数不变时,葛根中葛根素提取液的浓度随着料液比的增大而增大,且当料液比大于 1:25(m:V)时变化趋于平衡。料液比

表3 方差分析表[†]
Table 3 ANOVA results

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	30.18	14	2.16	92.11	< 0.000 1
A	6.77	1	6.77	289.07	<0.000 1
B	0.32	1	0.32	13.80	0.002 3
C	1.03	1	1.03	44.12	<0.000 1
D	0.78	1	0.78	33.34	<0.000 1
AB	1.46	1	1.46	62.56	<0.000 1
AC	0.26	1	0.26	10.90	0.005 3
AD	0.31	1	0.31	13.40	0.002 6
BC	7.23E-03	1	7.23E-03	0.31	0.587 2
BD	1.74	1	1.74	74.45	<0.000 1
CD	4.00E-04	1	4.00E-04	0.017	0.897 8
A ²	10.82	1	10.82	462.25	<0.000 1
B ²	0.76	1	0.76	32.31	<0.000 1
C ²	1.62	1	1.62	69.34	<0.000 1
D ²	9.86	1	9.86	421.15	<0.000 1
残差	0.33	14	0.023		
失拟项	0.28	10	0.028	2.56	0.189 2
净误差	0.044	4	0.011		
总离差	30.51	28			

† R²为0.942 5。

表4 去掉交互项 BC、CD 后的优化结果[†]

Table 4 Removing the interaction term BC, CD after the optimization results

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	29.43	12	2.45	109.43	< 0.000 1
A	6.74	1	6.74	300.48	< 0.000 1
B	0.32	1	0.32	14.43	0.001 6
C	1.02	1	1.02	45.73	< 0.000 1
D	0.78	1	0.78	34.65	< 0.000 1
AB	1.48	1	1.48	65.86	< 0.000 1
AC	0.26	1	0.26	11.38	0.003 9
AD	0.31	1	0.31	13.74	0.001 9
BD	1.76	1	1.76	78.33	< 0.000 1
A ²	10.35	1	10.35	461.96	< 0.000 1
B ²	0.65	1	0.65	28.89	< 0.000 1
C ²	1.44	1	1.44	64.29	< 0.000 1
D ²	9.48	1	9.48	422.88	< 0.000 1
残差	0.36	16	0.022		
失拟项	0.29	12	0.024	1.30	0.433 7
净误差	0.073	4	0.018		
总离差	29.79	28			

† R²=0.976 4。

对葛根素提取的影响是先呈正相关,到 1:25(m:V)以后无明显变化。

图7的响应曲面图显示,当料液比为 1:27.24(m:V),提取时间为 71.46 min,乙醇溶液体积分数保持不变时,增大

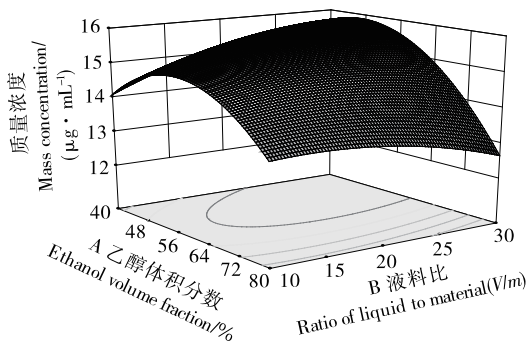


图6 乙醇溶液体积分数与料液比对葛根素提取液浓度的影响

Figure 6 Ethanol volume fraction of solid-liquid ratio of puerarin extract concentration of influence

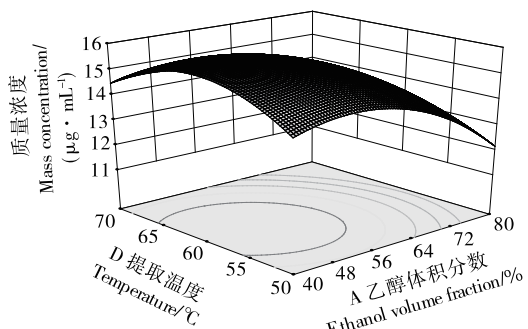


图7 乙醇溶液体积分数和提取温度对葛根中葛根素提取液浓度的影响

Figure 7 Ethanol volume fraction and extraction temperature on puerarin extract concentration of influence

提取温度,或提取温度保持不变增大乙醇溶液体积分数,两种情况葛根素提取液的浓度都呈现出相似变化趋势,都是先升高后降低。即乙醇体积分数和提取温度对葛根素提取的影响都是先呈正相关再呈负相关。

图8的响应曲面图显示,当乙醇溶液体积分数为 48.27%,提取时间为 71.46 min,提取温度不变时,葛根中葛根素提取液的浓度也是随着料液比值的增大先增大,且到一定程度后变化趋于平缓,与图6的结果一致。

2.2.5 最佳工艺条件的验证 使用 Design-Expert 8.0.6 软件进行优化,得到模型的最优工艺参数和预测值:乙醇溶液体

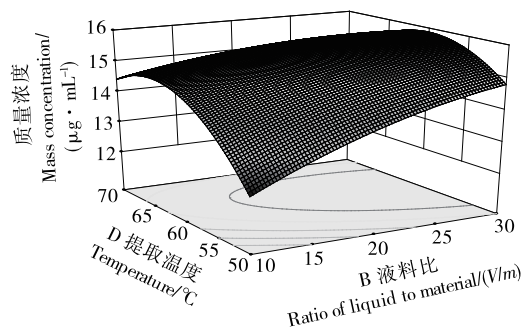


图8 料液比和提取温度对葛根中葛根素提取液浓度的影响
Figure 8 Solid-liquid ratio and extraction temperature on puerarin extract concentration of influence

积分数 48.27%、料液比 1:27.24 (m:V)、提取时间 71.46 min、提取温度 59.31 °C, 预期质量浓度为 15.882 μg/mL。为方便实际操作, 提取条件定为: 乙醇体积分数 50%、料液比 1:25 (m:V)、提取时间 70 min、提取温度 60 °C。在最佳条件下重复 3 次, 所得的葛根素提取液质量浓度的平均值为 15.373 μg/mL, 此条件下所得葛根中葛根素为预测值的 96.79%, 说明采用响应面法优化得到的提取参数可靠。

2.3 HPLC 检测葛根素提取液结果

将所得葛根素提取液进行高效液相色谱法定性检测^[12], 经与标品对比为葛根素, 和葛根素标准品出峰时间一致(见图 9), 故在最佳条件下提取液的主要有效成分是葛根素。

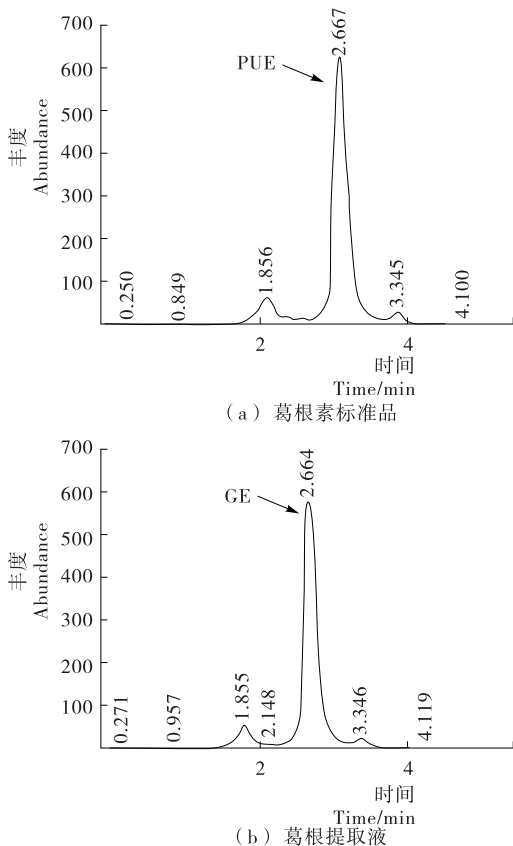


图 9 HPLC 检测结果

Figure 9 HPLC detection results

3 结论

本研究采用响应面法考察乙醇溶液体积分数、料液比、提取时间、提取温度对葛根中葛根素提取率的影响, 得出的最佳提取工艺条件为: 乙醇溶液体积分数 50%、料液比 1:25 (m:V)、提取时间 70 min、提取温度 60 °C。经 HPLC 检测确定为葛根素, 此条件下所得葛根中葛根素为预期测量值的 96.79%, 建立的回归模型能很好地预测各提取因素对提取浓度的影响, 故该试验模型合理, 获取的最优工艺参数能为快速提取葛根素提供理论参考。下一步将考虑采用超声波辅助进一步纯化葛根素的提取, 以提高葛根素浓度。

参考文献

- [1] 刘丽华, 杨志强. 正交试验—多元回归法优化葛根的乙醇提取工艺[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 331-333.
- [2] Peng Jing-hua, Cui Tuan, Huang Fu, et al. Puerarin ameliorates experimental alcoholic liver injury by inhibition of endotoxin gut leakage, kupffer cell activation, and endotoxin receptors expression[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2013(344): 646~654.
- [3] 孙术国, 罗志强. 葛根总黄酮和葛根素的提取及其分离纯化研究进展[J]. 农产品加工业, 2010(4): 30-33.
- [4] 黄彤, 李丽华, 刘蕾, 等. 利用响应面分析法优化葛渣异黄酮提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(10): 32-37.
- [5] 刘刚, 张雁南, 杜乾坤, 等. 水红花子花旗松素乙醇回流提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 134-137.
- [6] 陈帅, 王慧竹, 薛健飞, 等. 响应面法优化超声提取野葛茎中葛根素的工艺[J]. 广东农业科学, 2015(4): 60-67.
- [7] 韦学丰, 罗静. 甘薯叶黄酮微波提取工艺的响应面法优化[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(6): 1391-1394.
- [8] 费旭元, 林智, 梁名志, 等. 响应面法优化“紫娟”茶中花青素提取工艺的研究[J]. 茶叶科学, 2012, 32(3): 197-202.
- [9] 吴晖, 赖富饶, 胡筱波. 响应面分析法优化油菜花粉多糖提取工艺的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(5): 66-73.
- [10] 官波, 郑文诚. 山药多糖提取工艺的优化[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 98-101.
- [11] Wu Yan-fang, Wang Xin-sheng, En Guo-fan, et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of puerarin and total isoflavones from puerariaelobatae radix (Puerarialobata(Wild.) Ohwi) with response surface methodology[J]. Phytochemical Analysis, 2012(23): 513-519.
- [12] 王灵昭, 邓家权. 微波法提取雨生红球藻虾青素的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(12): 96-100.

(上接第 17 页)

- [8] 龙章德, 林顺顺, 田兆福, 等. 烟草多酚类化合物对卷烟品质的影响[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 41-44.
- [9] 杨红燕, 杨柳, 朱文辉, 等. 烟草中游离氨基酸的超高效液相色谱快速分析及化学计量学研究[J]. 分析科学学报, 2010, 26(3): 310-314.
- [10] 王玉林, 张峻松, 毛多斌, 等. 烟草中游离氨基酸的分析方法及研究方向[J]. 郑州轻工业学院学报, 2001, 16(2): 11-14.
- [11] 杨德廉, 王树声, 王宝华, 等. 烟草中氨基酸变化规律及其与烟叶品质关系研究进展[J]. 中国烟草科学, 1998(3): 11-13.
- [12] 刘江生. 烟草制丝过程中游离氨基酸的变化研究[J]. 福建分析测试, 2005, 14(3): 225-227.
- [13] 韩聘, 田兆福, 王宏生, 等. 基于低场核磁技术和环境扫描电镜的卷烟吸湿机制研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 14-18.