

从葛根中提取和纯化药用成分——总黄酮

李岂凡, 白兰莉, 胥永, 张彬, 蒋柏泉 (1. 南昌大学环境科学与工程学院, 江西南昌 330031; 2. 新疆石河子大学化学化工学院, 新疆石河子 832003; 3. 南昌大学食品工程中心, 江西南昌 330029)

摘要 采用微波辅助萃取和 AB8 型大孔树脂从葛根中提取和纯化总黄酮。分别考察了乙醇浓度、固液比、微波功率和辐射时间对提取率的影响; 吸附柱类型、进液浓度、进液量、进液流速和 pH 值对吸附的影响和洗脱剂乙醇浓度、洗脱剂流速和洗脱剂体积量对脱附的影响, 并分别确定了它们适宜的工艺条件。在适宜工艺条件下, 微波辅萃总黄酮提取率为 83.94%, 纯化后产品总黄酮纯度达 70%。建立了 AB8 型大孔树脂吸附葛根总黄酮的 Freundlich 等温吸附方程, 模型与实验值基本相符。

关键词 葛根; 微波萃取; 总黄酮; 大孔树脂

中图分类号 O652.62 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)27-08680-02

Extraction and Purification of Drug Component- Total Isoflavones from Pueraria

LI Qi-fan et al (School of Environmental Science and Engineering, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031)

Abstract Microwave-assisted extraction and AB8 type of microporous resin were used to separate and purify the drug component-total isoflavones from Pueraria. The effects of ethanol concentration, ratio of solid to liquid, microwave power and radiation time on the extraction rate, the effects of resin column type, feed concentration, feed volume, feed flowrate and pH value on adsorption and the effects of eluant concentration, eluant volume and eluant flowrate on desorption were investigated and their suitable technical conditions were determined, under which the extraction rate and the total isoflavones purity of the purified product were 83.94% and 70% respectively. The Freundlich isothermal adsorption equation of AB8 type resin was established which was basically in accordance with the experimental data.

Key words Pueraria; Microwave assisted extraction; Total isoflavones; Microporous resin

总黄酮是葛根的主要药用成分, 包括葛根素(Puerarin)、大豆甙(Daidzin)、大豆甙元(Daidzin)、芒柄花素、4,7-二葡萄糖大豆甙、3'-甲氧基葛根素、7-木糖葛根素、4',6'-二乙酰基葛根素等异黄酮类化合物, 约占葛根总量的 4%~10%^[1-3]。黄酮类化合物具有抗癌、抗肿瘤、防治心脑血管和高血压疾病、抗炎抑菌、抗病毒、抗氧化、抗突变、抗过敏、抗辐射以及增强免疫能力等广谱的生理活性^[4-5], 从葛根中提取总黄酮已成为国内外天然药物提取的研究热点之一。笔者采用微波辅助萃取新技术先从葛根中粗提总黄酮, 然后用 AB8 型大孔树脂进行吸附和脱附纯化。重点研究微波辅萃和树脂纯化的适宜工艺条件。

1 材料与方 法

1.1 原材料和试剂 葛根(片状)(江西横峰皇同有机葛开发有限公司); 葛根素对照品(中国药品生物制品检定所); AB8 型大孔树脂(南开大学化工厂); 工业乙醇(南昌洪都试剂化工厂); CH₃COOH(分析纯), NaOH(分析纯), CH₃OH(分析纯), CH₃Cl(分析纯), HCl(分析纯); 薄层层析硅胶 GF₂₅₄(化学纯)。

1.2 主要仪器 WD700(MG5062S1)型微波炉; FW100 型粉碎机; 53W UV/MS 型紫外分光光度计; GS12-2 型电子恒速搅拌器; HH2 型数显恒温水浴; 高效液相色谱仪等。

2 结果与分析

2.1 微波辅助萃取葛根总黄酮工艺条件的优化 以乙醇水溶液为萃取剂, 采用微波辅助法从葛根中提取总黄酮。试验取微波功率、乙醇浓度(质量)、固液比和辐射时间为考察因素, 正交实验(表 1)。

由表 1 中可知, 各因素影响大小的顺序为: 乙醇浓度 >

固液比 > 微波功率 > 辐射时间。方差分析表明, 四因素的 F 值均小于 F_{0.1}。从表 1 中选择目标函数最优的 1 组(第 7 组)的各因素水平作为微波萃取的最优工艺条件, 即: 微波功率 700 W, 乙醇浓度 60%, 固液比 1 g/25 ml, 辐射时间 40 s(3 次)。

表 1 微波辅助萃取葛根总黄酮正交试验结果

序号	A	B	C	D	提取率 %
	微波功率 W	乙醇浓度 %	固液比 g/ml	辐射 3 次 时间(s)	
1	420	60	1 15	30	76.29
2	420	70	1 20	40	74.86
3	420	80	1 25	50	71.27
4	560	60	1 20	50	78.40
5	560	70	1 25	30	80.42
6	560	80	1 15	40	69.09
7	700	60	1 25	40	83.92
8	700	70	1 15	50	75.08
9	700	80	1 20	30	69.84
均值 K ₁	74.13	79.54	73.49	75.52	
均值 K ₂	75.97	76.78	74.37	75.96	
均值 K ₃	76.28	70.07	78.54	74.92	
R	2.15	9.47	5.05	1.04	

2.2 AB8 型大孔树脂吸附葛根总黄酮工艺条件的优化 采用国产 AB8 型大孔树脂吸附纯化微波辅萃粗液中的总黄酮。试验在吸附柱类型 15 mm × 200 mm、进液流速 1.0 ml/min、进液体积量 3 BV、进液浓度 6.693 ng/ml 和 pH=7 五个因素条件中, 分别固定 4 个因素, 考察其中 1 个因素。试验在 30 下进行。

表 2 AB8 型树脂吸附的流出液浓度 ng/ml

树脂体积量 ml	吸附柱 mm × mm		进液流速 ml/min		
	15 × 200	20 × 300	1.0	1.5	2.0
5	0.125 2	0.244 3	0.125 4	0.138 6	0.147 6
15	0.695 6	0.952 4	0.695 6	0.741 2	0.747 3
25	1.247 4	1.649 6	1.247 4	1.453 9	1.533 1
35	1.788 5	2.437 3	1.788 5	2.221 3	2.437 3
45	2.284 7	3.350 0	2.840 7	2.804 5	3.321 1

资助项目 江西省教育厅 2006 年重点攻关项目(赣教技字 2006[45])。

作者简介 李岂凡(1955-), 女, 江西萍乡人, 实验师, 从事天然产物分离与纯化研究。

收稿日期 2007-06-03

2.2.1 吸附柱类型对吸附效果的影响。由表2可知,对于相同体积量的树脂,15 mm×200 mm 吸附柱的流出液浓度比20 mm×300 mm 吸附柱的低,说明前者对总黄酮的吸附量比后者要大,吸附效果更好。同时也说明前者对总黄酮的泄露时间比后者要晚。因此采用15 mm×200 mm 类型的玻璃吸附柱作为动态吸附柱,对葛根总黄酮进行分离纯化。

2.2.2 进液流速对吸附效果的影响。由表2可知,对于相同体积量的树脂,吸附流速为1.0 ml/min 时的流出液浓度均比流速为1.5 和2.0 ml/min 时的低,说明前者对总黄酮的吸附量比后两者大,吸附效果更好;同时也说明前者对总黄酮的泄露时间比后两者晚。流速慢虽有利于吸附,且泄漏较晚,但会降低吸附生产能力。因此,试验选择适宜的进液流速为1.0 ml/min。

2.2.3 进液量对吸附效果的影响。当进液体积量为10、20、30、40 和50 ml 时,流出液浓度分别为0.254 8、1.047 6、1.504 6、2.104 5 和2.566 0 ng/ml。可见,当进液体积量达20 ml 时,即2 倍树脂柱体积(2 BV) 时,就开始出现泄漏。如果进液体积量过大,会使洗脱物的纯度降低,且树脂再生困难。故该实验取适宜的进液量为30 ml,即3 BV。

2.2.4 进液浓度对吸附效果的影响。当进液浓度为6.693、6.024、5.354、4.685 和4.016 ng/ml 时,树脂吸附量为26.66、23.16、20.08、18.90 和18.12 ng/ml。表明当进液浓度为6.693 ng/ml 时,吸附量最大;随着浓度变小,吸附量也逐渐减小。

对于一定量树脂的吸附柱,较大的进液浓度,可使进液量相应减少,防止过早泄露现象发生。故试验选择适宜的进液浓度为6.693 ng/ml。

2.2.5 pH 值对吸附效果的影响。当pH 值分别为3、4、5、6、7、8 时,树脂吸附量分别为18.32、18.83、19.11、19.04、19.00 和18.12 ng/ml,可知,进液pH 值为5~7 时,树脂的吸附量均较大,且相差不大。为简便操作,该试验取适宜的pH 值为7。

2.3 AB8 型树脂吸附葛根总黄酮的等温吸附方程 在30 ℃ 时,当进液总黄酮浓度分别为6.693、5.578、4.462、3.347、2.231 和1.116 ng/ml 时,测得平衡浓度(C) 分别为3.283、2.357、1.545、0.954、0.527 和0.194 ng/ml,平衡吸附量(q) 分别为114.81、105.42、96.74、83.38、57.14 和30.82 ng/g。

用Freundlich 等温吸附方程 $q = k_f C^n$ 对上述数据进行拟合得:

$$\log q = 0.467 2 \log C + 4.294, r = 0.982 1 \quad (1)$$

式中常数: $n = 0.467 2$, $k_f = 73.240$, 则得AB8 型大孔树脂的Freundlich 吸附等温方程为:

$$q = 73.240 C^{0.467 2} \quad (2)$$

经验证,该模型与实验结果基本相符。

2.4 AB8 型大孔树脂中葛根总黄酮脱附工艺条件的优化

采用乙醇水溶液作洗脱剂从AB8 型树脂中脱附总黄酮。在30 ℃ 和pH=7.0 的条件下,分别考察洗脱剂体积量、洗脱剂流速和洗脱剂浓度三因素对脱附的影响。

表3 AB8 型树脂脱附的影响因素

因素1		因素2		因素3		
洗脱剂体 积量 ml	解吸率 %	洗脱剂流 速 ml/min	解吸率 %	洗脱剂 乙醇 浓度 %	解吸率 %	脱附液总黄 酮纯度 %
10	65.12	1.0	90.58	20	59.67	60.37
20	73.27			40	80.28	66.32
30	80.05	1.5	88.14	60	86.07	68.59
40	85.32					
50	90.58			70	90.58	70.11
60	90.65	2.0	85.55	80	90.67	70.02
70	90.73			90	90.94	69.73

由表3可知,解吸率随洗脱剂量增大而提高,当体积量为50 ml,即5 倍树脂柱体积(5 BV) 时,解吸率高达90.58%,但再增大体积量时,解吸率提高不显著,因此取适宜的洗脱剂体积量为5 BV;解吸率随洗脱剂流速增大而降低,当流速为1.0 ml/min 时,解吸率最大,为90.58%。考虑到流速太小会降低生产能力,因此取适宜的洗脱剂流速为1.0 ml/min;解吸率随洗脱剂浓度增大而提高,当浓度为70% 时,解吸率高达90.58%,但再增大浓度,解吸率提高不明显。为节约原料成本,取适宜的洗脱剂浓度为70%,此时可得到纯度为70% 的葛根总黄酮产品,适合工业化生产。

3 结论

采用微波辅助萃取新技术从葛根中分离总黄酮,其适宜的工艺条件为:微波功率最高700 W,溶剂乙醇浓度60%,固液比1 g 25 ml,辐射时间每次40 s,间歇处理3 次,在此条件下,葛根总黄酮提取率为83.92%。

采用AB8 型大孔树脂对微波辅助萃取得到的原黄酮液

进行吸附纯化,其适宜的工艺条件为:吸附柱类型15 mm×200 mm,进液浓度6.693 1 ng/ml,进液体积量3 BV,进液pH 值7 和进液流速1.0 ml/min。建立的Freundlich 等温吸附方程,与试验结果吻合度较好。对AB8 型大孔树脂吸附的总黄酮进行了脱附,其适宜的工艺条件为:洗脱剂乙醇体积量5 BV、洗脱剂流速1.0 ml/min 和洗脱剂浓度70%。脱附后产品中总黄酮纯度高达70%。

参考文献

- [1] 方起程,林茂,孙庆民,等.葛根黄酮的研究[J].中华医学杂志,1974,54(5):271-274.
- [2] 张尊听,王小玲,刘谦光,等.秦岭太白野葛根异黄酮成分的研究[J].中国药理学杂志,1999,34(5):301-302.
- [3] JUNEHINO,JUNCH FURUSAWA,JUNKO BABA,et al.Study on the constituents of pueraria lobata III isoflavone and related compounds in the roots and the volatile stems[J].Chem Pharm,1987,35(12):4846-4850.
- [4] 曹纬国,刘志勤,邵云,等.黄酮类化合物药理作用的研究进展[J].西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:化学工业出版社,2000:296.