

湘西土家药葛巴活性成分提取及优化研究*

张 洁, 黄小飞, 莫政松, 王 芳, 侯 娟

(吉首大学医学院, 湖南 吉首 416000)

摘 要: 超声波辅助乙醇提取湘西土家药葛巴的活性成分并优化其提取工艺。本项目首先采用超声波辅助乙醇对葛巴中的活性成分进行提取, 然后再利用正交试验法对其提取工艺进行优化, 从而提高黄酮类物质的提取率。通过本研究, 我们首先提取了葛巴中的主要活性成分——黄酮类化合物, 并优化了提取葛巴中黄酮类物质的工艺。结果表明: 用体积是 40 倍于其重量的 70% 乙醇浸泡, 在功率为 300 W 的超声波作用下提取 20 min 为最佳工艺。

关键词: 葛巴; 提取; 工艺优化

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-9677(2017)08-0102-03

Study on Extraction and Optimization of Active Components from Pueraria Lobota in Xiangxi*

ZHANG Jie, HUANG Xiao-fei, MO Zheng-song, WANG Fang, HOU Juan
(Medical College, Jishou University, Hunan jishou 416000, China)

Abstract: The extraction and optimization of active components from Pueraria lobota in Xiangxi Tujia medicine by ultrasonic and alcohol and its extraction method were studied. The ultrasonic assisted ethanol extraction was used to extract flavonoids from Pueraria, and then orthogonal test was used to optimize the extraction process. Through this study, it was verified that the active component of Pueraria was flavonoids, and the extraction method was optimized. Results showed that soak in 70% ethanol with a volume of about 40 times its weight, the best process was extracted for 20 min under the action of ultrasonic power of 300 W.

Key words: GeBa; extraction; optimization

葛巴 Pueraria lobata(Willd.) Ohwi 为豆科葛属植物, 其干燥块根入药^[1]。葛巴富含人体必需的 13 种氨基酸和铁、钙、硒、锌、锗等微量元素^[2], 还含有丰富的黄酮类物质^[3]。葛巴又名野葛, 山葛, 黄葛, 土家语名为阿不夜那。葛巴为豆科葛属多年生落叶草质藤本植物, 其药用价值较高, 是一种重要的野生植物资源。经查阅资料可知, 黄酮类化合物广泛存在于植物体中, 有重要的生理活性, 如抗肿瘤作用及消除自由基和抗氧化性活性, 可作为抗氧化剂、酶抑制剂、色素及光屏蔽物、植物生长调节剂及植物抗毒素^[4]。近年来, 从植物体中分离出来的黄酮类化合物有多种药理作用: 抗脑缺血、抗自由基、抗肿瘤、镇痛、预防心脑血管疾病^[5]。

通过查阅文献并咨询相关学者, 我们发现湘西土家族地区地处武陵山片区, 药物资源丰富, 目前湘西土家族特色药物葛巴在豆科植物学方面已经有所研究, 目前国内主要对葛巴的加工局限在只提取葛粉或总黄酮^[6-8]。但对其提取方法优化缺乏深入研究, 在此基础上, 本项目利用现代化技术从葛巴中提取黄酮物质, 并对其提取方法进行优化, 为开发其在医药方面的研究价值提供理论支持, 也为开发以葛巴为原料的降血糖血脂、防癌抗癌的药物提供上游技术和前导体。

* 基金项目: 吉首大学医学类专业大学生创新训练项目(JDYXC201603)。

第一作者: 张洁(1998-), 女, 吉首大学临床医学大二学生。

通讯作者: 侯娟(1979-), 女, 高级实验师, 研究方向: 民族医药研究。

1 材料与方法

1.1 原料及试剂

葛巴, 采自湘西武陵山片区永顺县(由湘西民族医药研究所杨德胜教授鉴定), 60℃干燥后粉碎备用。

芦丁标准品, 中国药品生物制品鉴定所; 甲醇、乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠, 均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器

SP-723 型可见分光光度计; AUY120 电子天平; HH.GF-1 干燥箱; SHH.W21 恒温水浴锅; KQ-250DE 数控超声波清洗器; RE-52 旋转蒸发器; 玻璃棒、烧杯、研钵、刻度试管、移液管、橡胶手套等。

1.3 实验方法^[9]

1.3.1 原料预处理

将干葛巴, 粉碎过 40 目筛, 60℃干燥 2 h, 备用。

1.3.2 芦丁标准液

精密称取芦丁 15.0 mg, 加甲醇溶解并定容至 100 mL, 配

制成 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的芦丁标准溶液, 作为对照品溶液。

1.3.3 芦丁标准曲线的绘制。

分别精密吸取芦丁标准液 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 mL 相当于含芦丁 0、150、300、450、600、750 μg , 置于 25 mL 容量瓶中, 各加水至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 混匀, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 混匀, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至 25 mL 放置 15 min。不加芦丁的试剂作空白对照。按照 10 nm 的梯度在 300~600 nm 测一系列标准溶液的吸光度, 得到在 510 nm 时吸光度最好。数据经一元回归处理, 得到回归方程为: $A=0.001733+10.0743C$, 相关系数 $R=0.9999$ 。

2 结果与讨论

2.1 方法比较

2.1.1 醇提法

称取葛根样品 1.000 g 于磨口瓶中, 加入 100 mL 70% 乙醇封口, 置于台式恒温培养摇床恒温 50 $^{\circ}\text{C}$ 提取 2 h, 趁热过滤, 减压蒸馏回收乙醇, 并将提取液定容至 100 mL。

2.1.2 超声波辅助醇提

称取葛根样品 1.000 g, 以 100 mL 70% 乙醇提取, 恒温 50 $^{\circ}\text{C}$ 300 W 超声作用 0.5 h, 过滤得葛巴黄酮提取液, 将滤液定容至 100 mL, 测吸光度。

表 1 不同提取法对应的总黄酮的提取率

Table 1 Extraction rate of total flavonoids from different extraction methods

方法	时间/h	提取率/($\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
醇提法	2	90.43
超声提法	0.5	111.52

2.2 单因素实验

2.2.1 乙醇浓度

分别称取葛巴样品 1 g 共 6 份, 分别以 40 mL 的 40%、50%、60%、70%、80%、90% 乙醇溶液在 50 $^{\circ}\text{C}$, 300 W 超声作用 0.5 h 的条件下提取, 随乙醇浓度的增加, 黄酮的提取率提高, 并呈现先急后缓的趋势。浓度也并非越大越好, 而有一个最佳值。在浓度为 70% 时, 提取最佳, 超过此值, 提取率增加不明显, 且增加成本。

表 2 不同乙醇浓度的黄酮提取率

Table 2 Extraction rate of flavonoids with different ethanol concentration

乙醇浓度/%	黄酮提取率/($\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
40	76.34
50	81.51
60	93.27
70	114.57
80	103.61
90	93.48

2.2.2 料液比

分别称取葛巴样品 1 g 共 6 份, 用 70% 乙醇分别以料液比 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40 混合后, 在 50 $^{\circ}\text{C}$, 300 W 超声作用 0.5 h 的条件下提取, 随料液比的增加, 提取率增加, 但当料液比(质量: 体积) > 1:35 时, 提取率增加缓慢, 增加液料比提取率变化不大, 这时黄酮类化合物的提取已经比较充分了。得提取的最佳料液比为 1:40。

表 3 不同料液比的黄酮提取率

Table 3 Extraction rate of flavonoids with different ratio of material to liquid

料液比	黄酮提取率/($\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
20	97.62
25	104.46
35	115.31
40	115.71
45	115.73
50	115.81

2.2.3 超声功率

分别称取葛巴样品 1 g 共 6 份, 用 70% 乙醇以料液比 1:40 混合后, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别以 50 W、100 W、150 W、200 W、250 W、300 W 的超声波功率提取 0.5 h。在超声波频率增大, 作用增强, 提取率增加。

表 4 不同超声波功率的黄酮提取率

Table 4 Extraction rate of flavonoids with different ultrasonic power

超声波功率/W	黄酮提取率/($\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
50	46.53
100	81.34
150	93.81
200	107.35
250	113.18
300	120.56

2.2.4 超声波作用时间

随提取时间的增加, 黄酮的提取率呈正态分布, 时间超过 20 min 后, 提取率有下降趋势。因为提取时间延长黄酮提取物也可能被氧化。最佳时间确定为 20 min。

作用时间/min	黄酮提取率/($\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
5	102.46
10	114.82
15	118.39
20	122.41
25	119.63
30	114.25

2.3 正交实验的设计

表5 因素水平表
Table 5 Factor level table

水平	A	B	C	D
1	65	1:25	200	15
2	70	1:30	250	20
3	75	1:35	300	25

表6 超声提取的正交实验结果

Table 6 Orthogonal experiment results of ultrasonic extraction

实验号	A	B	C	D	黄酮提取率/ (mg · 100 g ⁻¹)
1	1	1	1	1	148.943
2	1	2	2	2	119.462
3	1	3	3	3	154.193
4	2	1	2	3	142.304
5	2	2	3	1	171.619
6	2	3	1	2	130.435
7	3	1	3	2	161.493
8	3	2	1	3	108.173
9	3	3	2	1	160.436
K ₁	145.456	154.433	132.153	162.758	
K ₂	152.342	136.542	143.905	143.905	
K ₃	143.137	147.056	164.323	135.562	
极差	9.205	17.891	32.170	27.196	

2.4 讨论

正交方法确定过程是在以上单因素实验的基础上,设计了表1的正交实验。表1的四个因素为:乙醇浓度(A)、料液比(B)、超声波频率(C)、浸提时间(D)。由正交实验结果可知,葛巴粉末(60℃干燥2h)利用超声振荡辅助提取葛巴黄酮的最佳提取条件A₂B₃C₁D₂为:用体积是40倍于其重量的70%乙醇浸泡,在功率为300W的超声波作用下提取20min,为最佳提取工艺。对以上数据进行方差分析(置信度=95%),结果

如下:影响超声波辅助提取的诸因素中,对提取效果的影响大小依次是:乙醇浓度>超声波频率>超声波作用时间>料液比。

为进一步证实乙醇回流提取和超声波辅助提取葛巴黄酮的可靠性和合理性,我们对所优选的工艺条件作了验证试验。重复3次。考虑到生产成本,确定乙醇回流提取的条件为:乙醇浓度70%,作用时间2h,料液比1:40;超声波辅助提取的正交试验的验证结果为4.203%,4.312%,4.410%,平均为4.308%,可见本试验所选择的工艺条件是适宜的。

3 结论

本实验通过超声波辅助醇提对湘西土家药葛巴活性成分进行了提取,研究结果显示我们能有效提取葛巴的活性成分并证明活性成分为黄酮类物质,经正交试验法对葛巴提取工艺进行优化,得出用体积是40倍于其重量的70%乙醇浸泡,在功率为300W的超声波作用下提取20min为最佳工艺,本项研究有效地提高了黄酮类物质的提取率。同时,为开发其在医药方面的研究价值提供理论支持,也为开发以葛巴为原料的降血糖血脂、防癌抗癌的药物提供上游技术和前导体。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典. 一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:312-313.
- [2] 中国预防医学科学院营养与食品研究所. 食物成分表[M].北京:人民卫生出版社,1992:287.
- [3] 范淑英,吴才君. 野葛主要营养和药用成分的分析[J].江西农业大学学报,1998,20(4):460-462.
- [4] 王卫东,赵志鸿,张小俊,等. 陈皮提取物中黄酮类化合物及抗氧化性的研究[J].食品工业科技,2007,28(9):98-100.
- [5] 叶雪芳. 植物黄酮类化合物的生物学功能及其在动物生产上的应用研究// Process in Functional Amino Acids and Carbohydrates for Animal Production[C].Proceedings of 4th International Symposium on Animal Nutrition and Feed Additive,2009.
- [6] 邵兰兰,赵燕. 葛根异黄酮、淀粉的提取及葛产品开发研究进展[J].食品工业科技,2012,33(6):452-455.
- [7] 野葛粉保健食品的加工方法[J].中国农村小康科技,2002(10):34-35.
- [8] 陈莉华,张艳勤,杨祖贤,等. 湘西野生葛根系列深加工产品的制作工艺[J].湖南农业科学,2010(13):102-105,109.
- [9] 岳秀洁,李超,扶雄. 超声提取辣木叶黄酮优化及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2016,37(1):226-231.

(上接第81页)

参考文献

- [1] 张辉,战德松,孙晓菊,等. 医用不锈钢材料的磨蚀、磨损及其生物相容性[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(34):6377-6380.
- [2] 史胜凤,林军,周炳,等. 医用钴基合金的组织结构及耐腐蚀性能[J].稀有金属材料与工程,2007,36(1):39-41.
- [3] 孙建华,刘金龙,王庆良,等. 医用316L不锈钢表面改性的研究进展[J].材料导报A(综述篇),2011,25(5):95-98.
- [4] 杨化娟,杨柯,张炳春. 含La医用316L不锈钢在生理盐水中的腐蚀行为[J].中国腐蚀与防护学报,2006,26(5):303-307.
- [5] 赵淑娴. 基于SECM技术研究铁基金属的阳极溶解过程[D].徐州:江苏师范大学,2015.