

葛根黄酮提取工艺优化

诸爱士

(浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023)

摘要: 为研究葛根黄酮的提取工艺,对多个影响因素进行了单因素考察,并选择乙醇质量分数、提取时间、液固比与提取温度4个因素采用响应面法进行了优化,建立了数学模型并进行了方差分析。结果表明,所得模型能很好地描述提取率与各因素之间的关系,黄酮提取的最佳工艺为:乙醇质量分数63.9%、提取时间138.0 min、液固比11.3 mL/g、提取温度72.9℃、1次提取;提取时溶液pH值不需调整;乙醇回收循环使用可行。采用该工艺条件,黄酮理论提取率可达到1 842.6 $\mu\text{g/g}$,实际为1 821.3 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词: 葛根;黄酮;提取工艺;响应面法;工艺优化

中图分类号: TQ028.96; TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2013)05-0366-07

Optimum extracting technology of flavonoids from radix pueraria

ZHU Aishi

(School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China)

Abstract: The multiple influence factors were investigated through the single factor for researching the extraction technology of flavonoids from radix pueraria. Four factors of quality fraction of ethanol, extraction time, liquid-solid ratio and extraction temperature were chosen to optimize with response surface methodology(RSM). A mathematical model was established and the analysis of variance was carried out. The result shows that the obtained model is significant and the optimum extraction conditions are as follows: 63.9 % of quality fraction of ethanol, 138.0 min of extraction time, 11.3 mL/g of liquid-solid ratio, 72.9℃ of extraction temperature and one time extraction; when extracting the pH value of solution does not need to adjust; the recycle use of ethanol is feasible. Using the process conditions, the theoretical extraction yield of flavonoids is 1 842.6 $\mu\text{g/g}$; the practical extraction yield is 1 821.3 $\mu\text{g/g}$.

Key words: radix pueraria; flavonoids; extraction technology; response surface methodology; technology optimization

葛根是一种富含异黄酮的食用草本植物,以“葛根”的条目被正式列入2010年版中国药典,在传统中药中广泛使用,常被用作解热剂、发汗剂、止吐剂等;另外,葛根还具有改善血液循环、解痉、降血糖等功效^[1-5]。理化分析发现,发挥这些效用的主要活性成分是异黄酮(葛根素、大豆苷),因此对黄酮的提取也随之受到许多研究者的关注。许多因素,如提取剂种类与含量、提取时间、液固比、提取温度、体系酸碱度、提取次数等都会影响提取过程,不同的变量会对这个过程有不同的影响,并且因素之间可能还会有相互作用。然而,传统的优化多因素系统的方法实验数量大,非常耗时,也难于分析因素之间存在的相互作用,很难找到真正最佳条件。响应面方法(RSM)可以有效地用于评估多因素的影响和它们对一个或多个响应值的相互作用,既可以通过合理的实验设计减少实验数量,又可以通过建立数学模型优化出可能处于所考察点之间的最佳条件^[6]。本实验研究了葛根黄酮的提取工艺,系统研究了提取剂—乙醇水溶液的乙醇质量分数、提取时间、液固比(萃取液体积与葛根质量之比, mL/g, 全文同)、提取温度、溶液 pH 值、提取次数及回收乙醇等对黄酮提取率的影响。在单因素研究基础上,对乙醇质量分数、提取时间、液固比、提取温度 4 个因素,进行 3 水平的响应面法优化,得到提取率与因素间关系的数学模型,可为工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

原料:葛根,粉状(100目),重庆慧远药业有限公司。

主要试剂:芦丁(标准品,中国医药(集团)上海化学试剂公司),亚硝酸钠(分析纯,上海振欣试剂厂);硝酸铝(分析纯,上海振欣试剂厂),氢氧化钠(分析纯,杭州萧山化学试剂厂),盐酸(分析纯,杭州化学试剂有限公司),乙醇(分析纯,杭州长征化学试剂有限公司)。

主要仪器:DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司),BS124S 型电子天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司),DK-S24 电热恒温水浴锅(上海精宏试验设备有限公司),SHZ-III B 型循环水真空泵(浙江临海市精工真空设备厂),722E 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 黄酮的提取

将恒温水浴锅设置到需要的温度,称取 5.0 g 于 60 °C 干燥箱已恒质量的葛根置于 500 mL 烧瓶中,加入某一体积某一质量分数的乙醇水溶液,润湿摇匀后将烧瓶固定于恒温水浴,装上回流冷凝管,提取某一段时间。提取结束后对混合料液进行真空过滤,得滤液;测定滤液体积,取样按标准方法测定吸光度;计算溶液中的黄酮含量及黄酮的提取率。

研究不同乙醇质量分数、提取时间、液固比、提取温度、溶液 pH 值、提取次数、回收乙醇等因素对黄酮提取率的影响。在此基础上,选择相关因素进行响应面法优化。

1.2.2 分析方法

黄酮含量采用硝酸铝-亚硝酸钠法在波长 506 nm 下测定,用芦丁质量浓度表示^[3,7]。

实验得到吸光度与黄酮质量浓度的关系为:

$$A=0.0046C-0.0034 \quad (1)$$

式(1)中:A—506 nm 处溶液吸光度;C—黄酮的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.3 提取率表达

葛根黄酮的提取率 Y 依照式(2)计算:

$$Y=\frac{5 \times V \times (A+0.0034)}{0.0046 \times m} \quad (2)$$

式(2)中:V—滤液体积, mL; m—葛根取样量, g; Y—黄酮的提取率, $\mu\text{g/g}$ 。

2 结果与讨论

2.1 单因素考察及其分析

2.1.1 乙醇质量分数对提取率的影响

设定提取温度 80 ℃、液固比 12 mL/g、提取液原始酸碱度 pH 7、1 次提取 120 min, 分别考察萃取剂乙醇水溶液的乙醇质量分数为 30%、50%、70%、90%、100% 时黄酮提取率的变化, 结果见图 1。

图 1 显示, 随着乙醇质量分数从 30% 增大至 70%, 黄酮提取率也随之增大, 到 70% 达到最大值, 而乙醇质量分数进一步增大, 反而使提取率快速减小。这是由于葛根黄酮分子结构的特殊性所致, 结构中既有易溶于水的葡萄糖基又有易溶于醇的羟基, 在乙醇质量分数较低时, 易溶于乙醇的成分未被完全提取, 当乙醇质量分数较高时, 又会使易溶于水的成分未被完全提取, 或者兼而有之时牵引力不足于将有效成分转移至提取液中^[8]。因此, 当乙醇与水的比例达到适宜时, 会使提取率最高。对于葛根黄酮提取, 在以上条件下 70% 为最佳乙醇质量分数。

2.1.2 提取时间对提取率的影响

在乙醇质量分数 70%、液固比 12 mL/g、提取温度 80 ℃、pH 7 条件下对葛根分别 1 次提取 30、60、90、120、150 min, 黄酮提取率的结果见图 2。

图 2 表明, 随着提取时间的延长, 黄酮提取率先明显增大, 到 120 min 时增速变缓, 趋于平稳。传质过程具有一定的速度, 要使黄酮从葛根中完全传递至提取液中需要一定的时间, 又由于传质推动力逐渐变小, 使得得到一定时间后, 传质趋于平衡, 净的传递量不再增加, 有时还会由于分解而使提取率降低; 而提取时间延长亦会增加操作成本。综合考虑各因素, 认为提取时间 120 min 比较合理。

2.1.3 液固比对提取率的影响

由于液固比的大小是决定传质推动力的重要因素, 直接影响提取效果, 所以进行了不同液固比的对比实验, 其他条件如下: 乙醇质量分数 70%、提取时间 120 min、提取温度 80 ℃、pH 7、1 次提取, 所得结果见图 3。

从图 3 可以看出, 液固比从 4 mL/g 增大至 10 mL/g, 提取率几乎成线性增大, 液固比到 10 mL/g 后再增大至 12 mL/g, 图线几乎水平, 说明提取率增大有限。增大液固比即减小了液体的黄酮浓度, 加大了两相间的浓度差。液固比到一定值后, 由于葛根中的黄酮几乎全部被提出, 使得再增大液固比, 提取率不再有明显提高。从工业角度来考虑, 液固比大, 会使设备与操作成本增大, 故就该现象而言, 合适的液固比应取 10 mL/g。

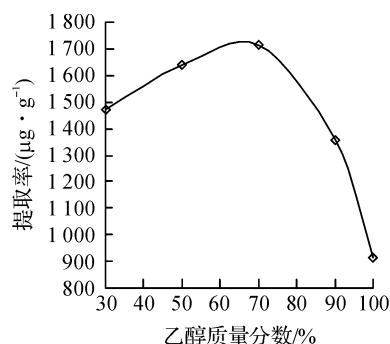


图 1 乙醇质量分数对提取率的影响

Fig. 1 Effects of quality fraction of ethanol on extraction yield

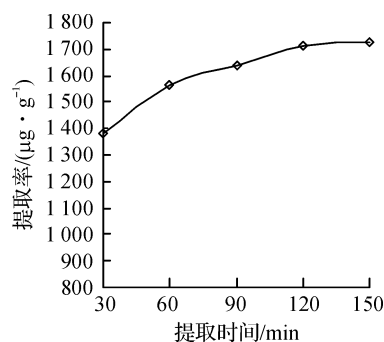


图 2 提取时间对提取率的影响

Fig. 2 Effects of extraction time on extraction yield

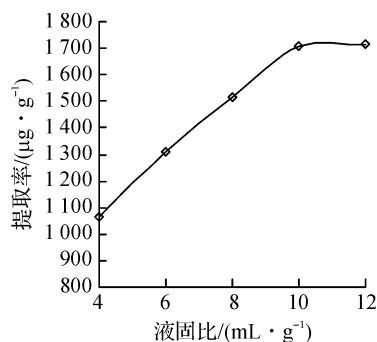


图 3 液固比对提取率的影响

Fig. 3 Effects of liquid-solid ratio on extraction yield

2.1.4 提取温度对提取率的影响

固定乙醇质量分数 70%、提取时间 120 min、液固比 10 mL/g、pH 7、提取 1 次,比较了不同的提取温度对黄酮提取率的影响,结果见图 4。

温度的影响具有双重性,升高温度可以降低液体黏度,使传质阻力减小,同时可以促进分子热运动,提高扩散系数,并增加溶质的溶解度,两者均加快了传质速度,有利于提取率的提高;但温度的升高又会使物质分解变性,降低提取率^[9]。图 4 证实了这一点,并看到在 70 °C 下提取率出现最高点,温度过低或过高均会使提取率减小,所以 70 °C 有利于葛根黄酮的提取。

2.1.5 溶液 pH 值对提取率的影响

原始的提取体系酸碱度在 7 左右,为了研究体系的酸碱度对黄酮提取率的影响,用酸或碱调整体系的 pH 值,比较了在不同的酸碱环境下的提取效果,结果见图 5。其他条件为乙醇质量分数 70%、提取时间 120 min、液固比 10 mL/g、提取温度 70 °C、提取 1 次。

研究发现,pH 值在 7 附近提取率最大,体系酸性对提取率影响不大,而体系碱性会使提取率明显降低,这可能是在酸性条件下酸中和了黄酮中碱性成分形成盐而在碱性加热的条件下黄酮类化合物母核被破坏所致。因此葛根黄酮提取时无须调整体系的酸碱度。

2.1.6 提取次数对提取率的影响

葛根提取 1 次黄酮后,由于固液两相浓度达到平衡使固相中的黄酮有可能没有被完全提出,所以在乙醇质量分数 70%、提取时间 120 min、液固比 10 mL/g、提取温度 70 °C、pH 7 下进行第二次提取,实验重复 3 次,结果第二次提取的平均提取率仅为第一次的 2.9%。虽提取 2 次提高了黄酮提取率,但操作费成倍增加,因此基于工业化生产,可行的方案仍是提取 1 次。

2.1.7 回收乙醇对提取率的影响

提取剂中的乙醇提取过黄酮后,有少量乙醇被葛根浸润而带走,大量乙醇仍留于提取液中,获得黄酮后将其废弃浪费严重且污染环境,工业化生产肯定不行。基于此,实验探讨了提取液中乙醇的减压蒸发回收,并将回收液重新配制成所需乙醇质量分数的提取剂用于提取,即乙醇的循环使用,使实验室研究更接近于工程。结果得到乙醇回收率可达 94.3%,其损失除上面提到的外,还有提取、回收系统密封性不够所造成的损失。采用回收乙醇用于提取时黄酮的提取率比用新鲜乙醇的平均低 1.7%,这说明乙醇回收循环使用可行。

2.2 响应面法优化提取工艺

2.2.1 实验设计与结果

由于单因素考察时水平取值有一定的步长,所得最佳水平不一定是真实的最好水平,为了进一步优化条件,以单因素考察所得最佳水平为中心,以黄酮提取率为响应值 $Y(\mu\text{g/g})$,选取乙醇质量分数、提取时间、液固比和提取温度 4 个因素,采用 Box-Behnken 实验设计,进行 4 因素 3 水平的响应面法优化。实验因素见表 1,所得结果见表 2。

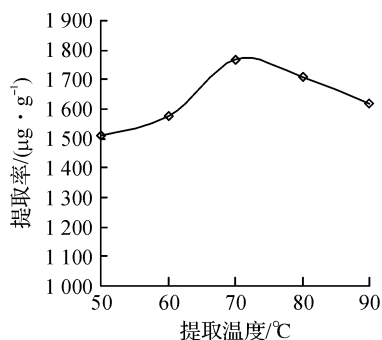


图 4 提取温度对提取率的影响

Fig. 4 Effects of extraction temperature on extraction yield

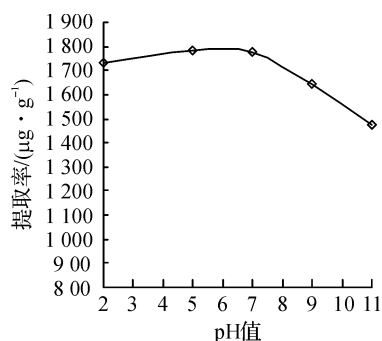


图 5 pH 值对提取率的影响

Fig. 5 Influence of pH on extraction yield

表 1 实验因素水平编码

Table 1 Codes and levels of experimental factors

编码值	乙醇质量分数(X_1)/%	提取时间(X_2)/min	液固比(X_3)/(mL·g ⁻¹)	提取温度(X_4)/°C
-1	50	90	8	60
0	70	120	10	70
1	90	150	12	80

表 2 实验方案及结果分析

Table 2 Experimental design and results analysis

实验编号	X_1	X_2	X_3	X_4	$Y/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
1	-1	-1	0	0	1 650
2	1	-1	0	0	1 313
3	-1	1	0	0	1 700
4	1	1	0	0	1 424
5	0	0	-1	-1	1 507
6	0	0	1	-1	1 587
7	0	0	-1	1	1 540
8	0	0	1	1	1 710
9	-1	0	0	-1	1 502
10	1	0	0	-1	1 214
11	-1	0	0	1	1 631
12	1	0	0	1	1 328
13	0	-1	-1	0	1 561
14	0	1	-1	0	1 587
15	0	-1	1	0	1 705
16	0	1	1	0	1 762
17	-1	0	-1	0	1 518
18	1	0	-1	0	1 209
19	-1	0	1	0	1 716
20	1	0	1	0	1 428
21	0	-1	0	-1	1 493
22	0	1	0	-1	1 592
23	0	-1	0	1	1 633
24	0	1	0	1	1 727
25	0	0	0	0	1 775
26	0	0	0	0	1 763
27	0	0	0	0	1 782
28	0	0	0	0	1 759
29	0	0	0	0	1 785

2.2.2 模型拟合与方差分析

将各实验的提取率用 Design-Expert7.1.6 软件进行处理,得到了用因素实际值表示的葛根黄酮提取率与各因素间关系的数学模型:

$$\begin{aligned}
 Y = & -8\,625.454 + 68.657X_1 + 6.875X_2 + 299.438X_3 + 167.598X_4 + 0.025X_1X_2 + \\
 & 0.131X_1X_3 + 0.019X_1X_4 + 0.213X_2X_3 - 0.004X_2X_4 + 1.125X_3X_4 - \\
 & 0.566X_1^2 - 0.038X_2^2 - 18.548X_3^2 - 1.224X_4^2
 \end{aligned} \quad (3)$$

方差分析的结果见表 3。由表 3 中数据可得,模型的 F 值为 97.17、 $p < 0.000\,1$ 、 $R^2 = 0.989\,8$ 、Adj. $R^2 = 0.979\,6$ 与 Pred. $R^2 = 0.944\,1$,这些均说明由实验数据所拟合的模型能很好地描述提取率与各因素间的关系,由此模型可以预测考察范围内其他条件下的提取率。 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 与 X_1^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对 Y 的影响非常显著($p < 0.000\,1$); X_2^2 对 Y 的影响显著($p < 0.05$);而 4 因素间的 6 项交互项对 Y 的影响不显著($p > 0.05$);这些说明因素对提取率的影响不是简单一次项关系。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	Pr>F
模型	7.949E+005	14	58 775.37	97.17	<0.000 1
X_1	2.703E+005	1	2.703E+005	462.61	<0.000 1
X_2	17 404.08	1	17 404.08	29.79	<0.000 1
X_3	84 336.33	1	84 336.33	144.34	<0.000 1
X_4	37 856.33	1	37 856.33	64.79	<0.000 1
$X_1 X_2$	930.25	1	930.25	1.59	0.227 6
$X_1 X_3$	110.25	1	110.25	0.19	0.670 6
$X_1 X_4$	56.25	1	56.25	0.096	0.760 9
$X_2 X_3$	650.25	1	650.25	1.11	0.309 3
$X_2 X_4$	6.25	1	6.25	0.011	0.919 1
$X_3 X_4$	2 025.00	1	2 025.00	3.47	0.083 8
X_1^2	3.322E+005	1	3.322E+005	568.61	<0.000 1
X_2^2	7 750.41	1	7 750.41	13.26	0.002 7
X_3^2	35 704.24	1	35 704.24	61.11	<0.000 1
X_4^2	97 245.16	1	97 245.16	166.43	<0.000 1
残差	8 180.05	14	584.29		
失拟项	7 655.25	10	765.53	5.83	0.051 9
误差	524.80	4	131.20		
总离差	80.30E+005	28			
系数	$R^2=0.989\ 8$ Adj. $R^2=0.979\ 6$ Pred. $R^2=0.944\ 1$				

2.2.3 最优值与响应面描述

由 Design-Expert7. 1. 6 程序可预测到在 $X_1=63.8\%$ 、 $X_2=138.0\text{ min}$ 、 $X_3=11.3\text{ mL/g}$ 、 $X_4=72.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下有 $1\ 842.6\text{ }\mu\text{g/g}$ 的最大黄酮提取率。

固定其中两个因素于 0 位,另两个因素的 3D 图见图 6。

图 6(a、b、c)显示,乙醇质量分数对提取率的影响比提取时间、液固比与提取温度显著,具有相同的趋势,即提取率均先随乙醇质量分数增大而升高,到某一点出现最大值,而后随乙醇质量分数的继续增大出现急剧下降;其他三因素的影响强弱依次是提取温度、液固比、提取时间,并且提取时间与液固比的影响不像单因素考察时的趋势,而显示出有交互影响。图 6(d)表明提取率有随提取时间或液固比增大而先升高后降低的现象,但液固比的影响明显大于提取时间。图 6(e)描述了与图 6(d)相类似的结果,提取温度的影响比提取时间的大。图 6(f)的图形与图 6(e)相像,说明具有相似的作用,不过提取温度对提取率的作用稍强于液固比。

2.2.4 验证实验

在乙醇质量分数 63.8% 、提取时间 138.0 min 、液固比 11.3 mL/g 、提取温度 $72.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行 3 次平行提取实验,测得平均提取率为 $1\ 821.3\text{ }\mu\text{g/g}$ ($n=3$, $\text{RSD}=9.1\%$),与 $1\ 842.6\text{ }\mu\text{g/g}$ 的预测值相比,相对误差是 -1.16% ,说明所得模型能比较准确地预测葛根黄酮提取实验结果。

3 结 语

单因素考察发现:乙醇质量分数、提取时间、液固比、提取温度等因素对葛根黄酮提取率有非常显著的影响,中性条件有利于提取,提取 1 次就基本完全,回收的乙醇循环使用基本不影响提取效果。

葛根黄酮提取的理想条件是:乙醇质量分数 63.8% 、提取时间 138.0 min 、液固比 11.3 mL/g 、提取温度 $72.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体系原有的酸碱度下提取 1 次,预测最大提取率为 $1\ 842.6\text{ }\mu\text{g/g}$,验证实验得到实际提取率为 $1\ 821.3\text{ }\mu\text{g/g}$,相对误差是 -1.16% 。

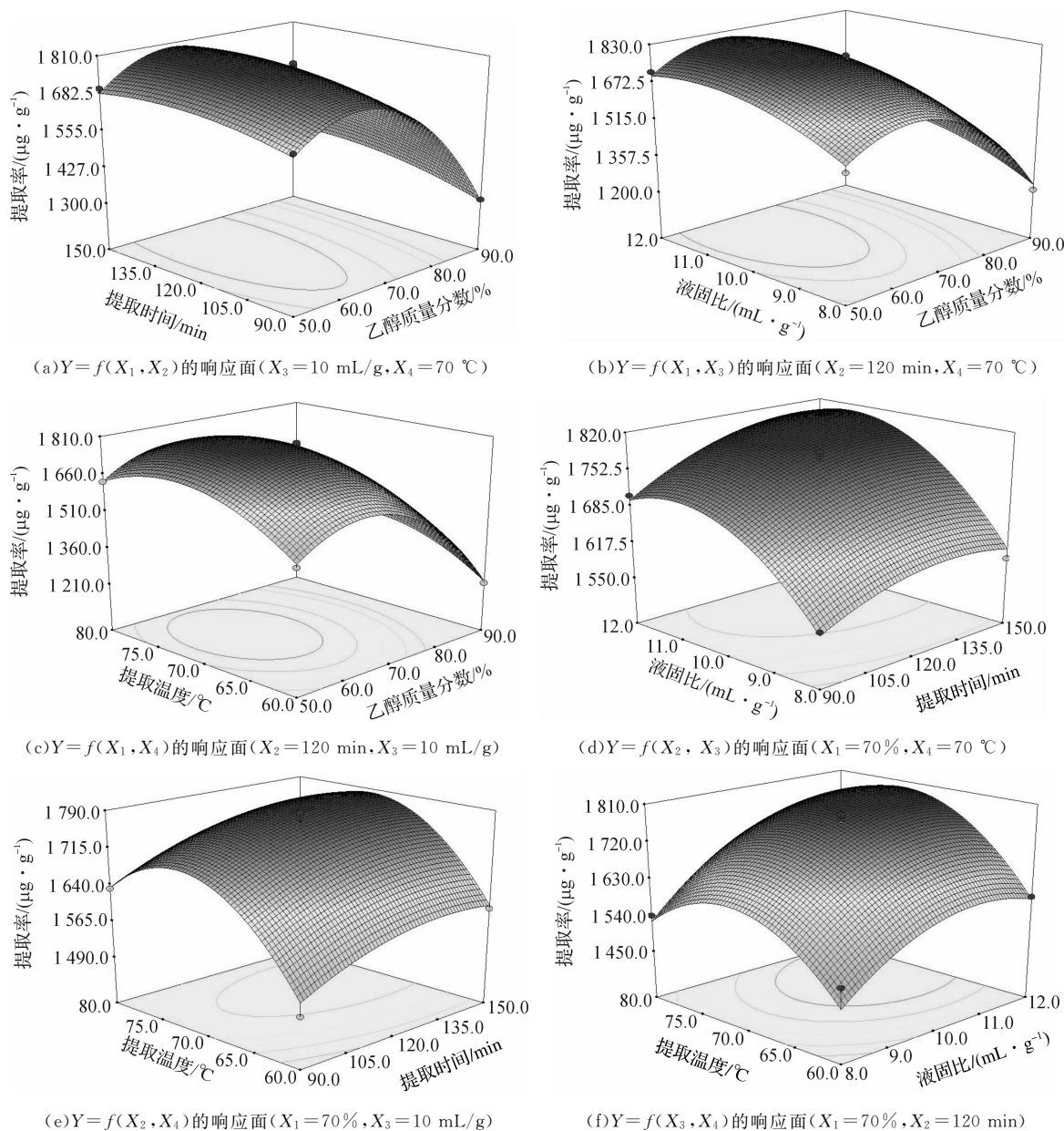


图 6 不同条件下的响应面图

Fig. 6 Response surface plots of yield as function of different conditions

参考文献:

- [1] 李杏元, 陈国安. 微波辅助提取葛根黄酮工艺优化[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(16): 3572-3574.
- [2] 雷小丹, 邱朝坤, 刘晓宇, 等. 葛根黄酮提取工艺条件优化的响应面分析[J]. 食品科技, 2011, 36(9): 223-226.
- [3] 张喜梅, 李琳, 陈玲, 等. 葛根总黄酮提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(1): 42-45.
- [4] Fan J P, Cao J, Zhang X H, et al. Optimization of ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of puerarin from Radix Puerariae Lobatae by response surface methodology [J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 2299-2306.
- [5] Cai R L, Li M, Xie S H, et al. Antihypertensive effect of total flavone extracts from Puerariae Radix [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 133(1): 177-183.
- [6] Xu Q, Shen Y Y, Wang H F, et al. Application of response surface methodology to optimise extraction of flavonoids from fructus sophorae[J]. Food Chemistry, 2013, 138(4): 2122-2129.
- [7] Shan B, Xie J H, Zhu J H, et al. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from Momordica charantia L. and its antioxidant activity[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 90(3): 579-587.
- [8] 陈钢, 苏同福, 赵士举. 萃取剂的极性对葛根总黄酮提取率影响的研究[J]. 河南科学, 2012, 30(11): 1585-1588.
- [9] 诸爱士, 叶金娜, 严飞娜. 均匀设计优化小米多糖提取工艺[J]. 浙江科技学院学报, 2013, 25(1): 27-32.