

李漪锦,肖力,徐梦玮,等. 葛根淀粉提取工艺优化与同时富集回收总异黄酮的方法[J]. 江苏农业科学,2020,48(12):192-196.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.041

# 葛根淀粉提取工艺优化与同时富集回收总异黄酮的方法

李漪锦<sup>1</sup>,肖力<sup>1</sup>,徐梦玮<sup>1</sup>,刘德明<sup>2</sup>,董新荣<sup>1</sup>,朱池明<sup>3</sup>

(1. 湖南农业大学理学院,湖南长沙 410128; 2. 湖南农业大学分析测试中心,湖南长沙 410128;

3. 张家界越天然农产品开发有限公司,湖南张家界 427200)

**摘要:**旨在采用匀浆法优化葛根淀粉提取工艺并同时利用大孔吸附树脂富集回收其水提液中的总异黄酮。通过单因素及正交试验设计优化葛根淀粉的提取条件,同时考察葛根总异黄酮的溶出效果,最后用大孔树脂吸附法富集回收匀浆提取液中的总异黄酮。结果表明,用匀浆法提取葛根淀粉的最佳工艺条件为液料比 8 mL:1 g、匀浆时间 30 s,洗涤时的液料比为 6 mL:1 g,在此条件下淀粉的收率为 $(18.58 \pm 0.26)\%$  ( $n=3$ ,相对标准偏差=1.38%),总异黄酮在水中的溶出率为 $(1.49 \pm 0.05)\%$  ( $n=3$ ,相对标准偏差=3.37%)。D101 大孔树脂对葛根总异黄酮的动态饱和吸附容量可以达到 30.12 mg/mL,70% 乙醇的洗脱率达到 86.89%,样品中的总异黄酮含量(紫外比色法)可以达到 50.91%,其中葛根素的含量(高效液相色谱法)为 28.77%。该研究方法操作简单易行,提取溶剂价格低廉且环保,淀粉、总异黄酮的收率都较高,回收的总异黄酮纯度也较高,减轻了葛根淀粉提取加工过程中排放水对环境的污染,高效合理利用了葛根资源,能够为中小型葛根加工企业对于葛根淀粉的提取加工及资源化综合利用提供科学依据。

**关键词:**葛根;淀粉;总异黄酮;葛根素;匀浆法

**中图分类号:** TS234<sup>+</sup>.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2020)12-0192-05

葛根(Radix Puerariae)是豆科植物野葛[*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi]或甘葛藤[*Pueraria thomsonii* Benth.]的干燥根,为常用的传统中药,其性味甘、辛、凉,归脾、胃经,具有解肌退热、生津止渴、升阳止泻的功效<sup>[1]</sup>。葛根药用始载于《神农本草经》<sup>[2]</sup>,被列为中品。我国葛属植物资源丰富,目前发现 9 个品种和 2 个变种,应用最多的是野葛和粉葛,其中粉葛淀粉含量丰富(含粉率一般为 20%~25%),但是异黄酮含量相对于野葛而言并不高,多用于提取淀粉。野葛异黄酮含量较高而淀粉含量较低,因此对其活性成分异黄酮的研究较多<sup>[3-4]</sup>。目前,从葛根中分离鉴定的异黄酮类化合物多达几十种,主要为葛根素,还有大豆素、大豆苷、染料木素、芒柄花素等。葛根异黄酮具有植物雌激素样作

用及扩张冠脉血管等心血管相关作用,还具有抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗氧化等活性<sup>[5-10]</sup>,因而受到人们的广泛关注。葛根素为葛根中特有的异黄酮,在临床上已被广泛应用于心脑血管系统疾病、糖尿病、眼底疾病、急性乙醇中毒及肿瘤的治疗<sup>[11-13]</sup>。

葛根是国家卫生健康委员会批准的药食两用植物,野葛淀粉在我国民间的食用历史悠久。但是长期以来我国葛根资源的开发呈现顾此失彼的状况,仅限于对淀粉或者黄酮类化合物中单一成分的利用,造成了资源的浪费。随着经济的发展,近年来我国开始出现部分中小型葛根淀粉生产加工企业,但一般采用传统工艺<sup>[14-15]</sup>。为了获得色泽洁白的葛根淀粉,常需要多次漂洗与沉降,存在用水量大、仅利用了其中的淀粉而对生产过程中的匀浆提取液并未加以回收利用便直接外排,这样不仅会对环境造成较大污染,而且会造成异黄酮资源的巨大浪费。近年来,人们认识到在生产葛根淀粉的同时回收利用异黄酮成分的重要性,提出了醇提工艺<sup>[16-17]</sup>,但是以乙醇替代水作为溶剂提取和生产葛根淀粉,必然导致生产工艺复杂、设备投入大、生产成本偏高等问题,不适合中小型加工企业的生产要求。本研究旨在优化大部分中小型葛根生产企业在葛根淀粉提取加工中采用的匀浆法这一传统加

收稿日期:2019-06-26

基金项目:湖南农业大学国家新农村发展研究院特色产业基地慈利葛根项目(编号:2018xny-tc007)。

作者简介:李漪锦(1998—),女,湖南岳阳人,研究方向为天然产物化学。E-mail:923295910@qq.com。

通信作者:刘德明,硕士,实验师,主要从事中药材品质分析与提取技术研究,E-mail:14050868@qq.com;董新荣,博士,教授,主要从事天然产物化学的教学与研究工作,E-mail:xinrong108@126.com。

工工艺,以期减少生产中的用水量,同时考察葛根异黄酮的溶出情况,并以大孔树脂吸附法富集回收加工葛根淀粉所产生的排放水中的总异黄酮,从而为葛根资源的综合利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂 葛根材料为粉葛,种植时间为2年,购自张家界越天然农产品开发有限公司;葛根素标准样品(编号:110752-201615),购自中国食品药品鉴定研究院;D101 大孔树脂,购自天津市光复精细化工研究所;试验用水为纯净水;其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备 UV-2450 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;LC-20AT 高效液相色谱(HPLC)仪,日本岛津公司;ATY124 万分之一电子天平,日本岛津公司;TP-520A 千分之一电子天平,湘仪天平仪器设备有限公司;搅拌机,广东美的生活电器制造有限公司;TG16-WS 高速离心机,长沙湘智离心机仪器有限公司;RE-52C 旋转蒸发器,巩义市予华仪器有限责任公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 葛根淀粉的生产工艺及方法 葛根淀粉的生产工艺流程如下:鲜葛根→清洗→去皮→切片→匀浆→过滤→洗涤→沉降→干燥。具体方法:将鲜葛根用自来水洗净、去皮,切成0.2 mm左右的薄片;称取50 g薄片放入搅拌机中,加入适量纯净水,启动电源匀浆一定时间;用3层纱布过滤匀浆,残渣用适量纯净水分次洗涤,收集滤液,即为匀浆法制备得到的提取液(目前此提取液在实际生产中被大部分中小型葛根加工厂当作废水向外直接排放);将滤液静置沉降24 h后倾出上清液,收集上清液(用于总异黄酮的富集与回收);沉淀用100 mL纯净水清洗1次,进行二次沉淀,倾去上清液,将淀粉在70℃烘干至恒质量,取出淀粉,在千分之一电子天平上称质量。按公式(1)计算淀粉收率:

$$\text{淀粉收率} = m_1 / m_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: $m_1$ 为葛根淀粉的质量,g; $m_0$ 为鲜葛根的质量,g。

1.2.2 单因素试验条件 考察匀浆过程中的液料比(2 mL:1 g、4 mL:1 g、6 mL:1 g、8 mL:1 g、10 mL:1 g、12 mL:1 g)、匀浆时间(30、60、90、120、150 s)、洗涤过程中的液料比(0 mL:1 g、1 mL:1 g、2 mL:1 g、3 mL:1 g、4 mL:1 g、

5 mL:1 g、6 mL:1 g、7 mL:1 g、8 mL:1 g)对葛根淀粉收率及总异黄酮收率的影响。

1.2.3 正交试验设计 以淀粉、总异黄酮的收率为考察指标,对匀浆过程中的液料比、匀浆时间及洗涤过程中的液料比进行3因素3水平的正交试验 $L_9(3^3)$ ,因素与水平设置见表1。

表1 正交因素水设置

水平	因素		
	A:匀浆用液料比 (mL:g)	B:洗涤用液料比 (mL:g)	C:匀浆时间 (s)
1	4	5:1	30
2	6	6:1	60
3	8	7:1	90

1.2.4 验证试验 按照正交试验的优选条件进行3个平行试验。

1.2.5 匀浆提取液中总异黄酮的回收 按照上述优选条件提取淀粉,沉降24 h。倾出上清液并将上清液于9 000 r/min离心处理5 min,收集离心液。离心液用D101大孔树脂以1 BV/h的流速上柱动态吸附,吸附总异黄酮的树脂先用2 BV的纯净水洗去残留液,再用6 BV的70%乙醇以1 BV/h的流速洗脱。收集洗脱液,回收乙醇至干,即可得到总异黄酮样品。

### 1.2.6 总异黄酮与葛根素含量的测定

1.2.6.1 紫外(UV)比色法测定总异黄酮含量 由于葛根异黄酮在250 nm处的紫外吸收特征峰与葛根素相似,因此在用UV比色法测定葛根中总异黄酮含量的过程中可以采用葛根素作为对照品,具体操作步骤如下:

(1)标准曲线的绘制。准确称取6.0 mg葛根素标样于100 mL烧杯中,加适量甲醇溶解,将其定量转移至25 mL容量瓶中,定容、摇匀。分别移取0.10、0.20、0.40、0.60、0.80 mL储备液于10 mL容量瓶中,用甲醇定容、摇匀。用紫外-可见分光光度计在250 nm波长下测定吸光度,绘制总异黄酮标准曲线。

(2)样品的分析。将液体样品作适当稀释后直接采用UV比色法测定,依据标准曲线可以计算出待测液中的总异黄酮浓度 $C_1$ ,同时可以按照以下公式计算出样品中的总异黄酮含量:

$$\text{总异黄酮含量} = \frac{C_1 \times f \times V \times 10^{-6}}{m_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $C_1$ 为待测液中总异黄酮的质量浓度,mg/L; $f$

为稀释倍数;  $V$  为待测液体积, mL;  $m_0$  为鲜葛根的质量, g。

**1.2.6.2 HPLC 法分析总异黄酮样品中的葛根素含量** HPLC 条件: InertSustain - C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为纯净水, 流动相 B 为甲醇。梯度洗脱条件如下: 00.00 ~ 25.00 min, 30% ~ 70% B; 25.00 ~ 25.10 min, 70% ~ 100% B; 25.10 ~ 27.00 min, 100% B; 27.00 ~ 34.00 min, 30% B。流速为 0.80 mL/min, 柱温为 35 ℃, 检测波长为 250 nm, 进样量为 10 μL。

标准曲线的绘制: 配制葛根素质量浓度为 1.747 ~ 57.576 mg/L 的系列标准品溶液, 按照上述色谱条件检测后绘制标准曲线。样品浓度的测定: 准确称取 10 mg 分离样品于 100 mL 烧杯中, 加适量甲醇溶解后定量转移至 25 mL 容量瓶中, 定容摇匀。按照上述色谱条件进行测定, 依据标准曲线计算出样品溶液中葛根素的浓度。按公式 (3) 计算葛根素含量:

$$\text{葛根素含量} = \frac{C_2 \times f \times V \times 10^{-6}}{m_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:  $C_2$  为待测液中葛根素的质量浓度, mg/L;  $f$  为稀释倍数;  $V$  为待测液体积, mL;  $m_0$  为鲜葛根的质量, g。

## 2 结果与分析

### 2.1 UV 比色法分析样品中的总异黄酮含量

通过紫外-可见分光光度法, 在 250 nm 处依次测定系列标准溶液的吸光度。结果表明, 总异黄酮的质量浓度在 2.4 ~ 19.2 mg/L 范围内时, 其质量浓度 ( $x$ ) 与吸光度 ( $y$ ) 具有很好的线性关系, 线性方程为  $y = 0.0162 + 59.04896x$  ( $r = 0.9998, n = 5$ )。

### 2.2 单因素试验结果

**2.2.1 匀浆时间对淀粉、总异黄酮收率的影响** 固定匀浆过程中的液料比及洗涤过程中的液料比, 研究匀浆时间对淀粉及总异黄酮收率的影响。从图 1 可看出, 匀浆时间为 60 s 时, 淀粉及总异黄酮收率均已达到较高水平。由于匀浆时间过长时, 匀浆时会产生大量泡沫, 给后续的过滤水洗淀粉工作带来困难, 因此, 本研究选择的匀浆时间为 60 s。

**2.2.2 匀浆过程中液料比对淀粉、总异黄酮收率的影响** 在匀浆时间一定、固定洗涤过程中液料比的条件下, 研究匀浆过程中液料比对淀粉、总异黄酮收率的影响。从图 2 可以看出, 随着液料比的增大,

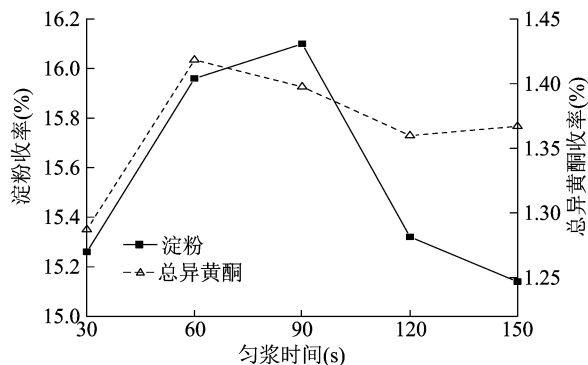


图1 匀浆时间对淀粉和总异黄酮收率的影响

淀粉与总异黄酮的收率均呈现先升高后略有降低的趋势; 当液料比为 6 mL : 1 g 时, 淀粉收率最高; 当液料比为 8 mL : 1 g 时, 总异黄酮收率最高。综合考虑实际生产中的用水成本, 最后选择匀浆过程中的液料比为 6 mL : 1 g。

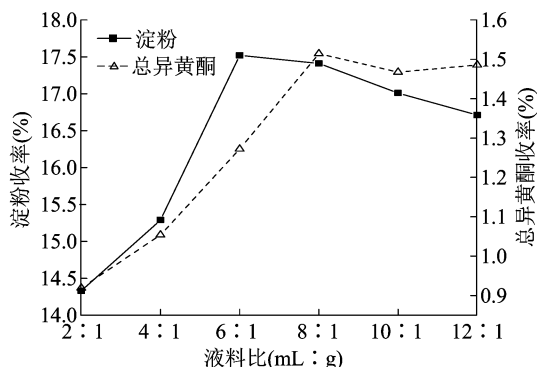


图2 匀浆过程中水-料比对淀粉和总异黄酮收率的影响

**2.2.3 冲洗过程中液料比对淀粉和总异黄酮收率的影响** 在匀浆时间及匀浆过程中液料比一定的条件下, 研究洗涤过程中液料比对淀粉、总异黄酮收率的影响。从图 3 可以看出, 在冲洗过程中, 随着液料比增大, 淀粉收率也提高, 当液料比大于 6 mL : 1 g 时, 淀粉收率的变化不明显, 即吸附在残渣上的淀粉已经被水冲洗干净; 在洗涤过程中, 当液料比 ≥ 3 mL : 1 g 时, 总异黄酮收率基本保持不变。由于水量增加时, 会导致企业的生产成本增加和排放水处理工作量增大, 因此, 综合考虑后选择的液料比为 6 mL : 1 g。

### 2.3 正交试验

为了进一步优化匀浆法提取淀粉、总异黄酮的条件, 对匀浆过程中的液料比、洗涤过程中液料比及匀浆时间进行 3 因素 3 水平的 L<sub>9</sub> (3<sup>3</sup>) 正交试验。从表 2 可见, 3 个因素对淀粉收率影响的排序为 B (洗涤液料比) > C (匀浆时间) > A (匀浆用液料比)。对于总异黄酮的收率而言, 匀浆液料比的影

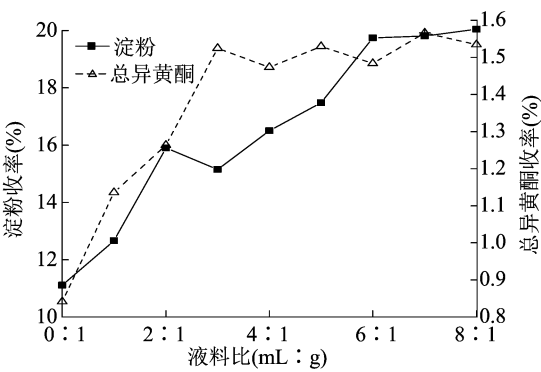


图3 洗涤过程中液料比对淀粉和总异黄酮收率的影响

表 2 正交试验结果

编号	各因素的水平			收率(%)	
	A	B	C	淀粉	总异黄酮
1	1	1	1	16.78	1.37
2	1	2	2	17.50	1.33
3	1	3	3	13.85	1.28
4	2	1	3	16.39	1.17
5	2	2	1	18.32	0.86
6	2	3	2	13.93	1.40
7	3	1	2	17.66	0.87
8	3	2	3	16.38	0.94
9	3	3	1	14.98	0.82
$k_{\text{淀粉}1}$	16.04	16.94	16.69		
$k_{\text{淀粉}2}$	16.21	17.40	16.36		
$k_{\text{淀粉}3}$	16.34	14.25	15.54		
$R_{\text{淀粉}}$	0.30	3.15	1.15		
$k_{\text{总异黄酮}1}$	1.33	1.14	1.02		
$k_{\text{总异黄酮}2}$	1.14	1.04	1.20		
$k_{\text{总异黄酮}3}$	0.88	1.17	1.13		
$R_{\text{总异黄酮}}$	0.45	0.13	0.18		

响最大。正交试验结果表明,以 2 年生栽培粉葛为原料,用匀浆法提取淀粉的最佳工艺条件为  $A_3B_2C_1$ ,即匀浆用液料比为 8 mL : 1 g,洗涤液料比为 6 mL : 1 g,匀浆时间为 30 s;用匀浆法以水为溶剂提取总异黄酮的最佳工艺条件为  $A_1B_3C_2$ ,即匀浆用液料比为 5 mL : 1 g,洗涤过程中的液料比为 7 mL : 1 g,匀浆时间为 60 s。

2.4 验证试验

由于葛根淀粉生产中的总异黄酮仅为回收利用,故按上述淀粉提取的优选条件进行 3 个平行验证试验。结果表明,3 次平行试验中,淀粉收率分别为 18.29%、18.77%、17.69%,平均值为  $(18.58 \pm 0.26)\%$  ( $n = 3, RSD = 1.38\%$ ),此时总异黄酮在水中的溶出率分别为 1.54%、1.44%、1.50%,平均值

为  $(1.49 \pm 0.05)\%$  ( $n = 3, RSD = 3.37\%$ )。说明用优选条件提取葛根淀粉是可行的,同时对总异黄酮的溶出效果也是稳定的。

2.5 匀浆提取液中总异黄酮的回收

沉降分离淀粉后,水中含有较高含量的葛根素及其他异黄酮,其中葛根异黄酮具有重要的生物活性,用途广泛,而葛根素已被广泛应用于生物制药中。因此,将工业生产过程中沉降淀粉后的水直接排放,不仅会污染环境,而且会造成异黄酮资源的巨大浪费。本研究用 D101 大孔树脂吸附排放水中的异黄酮,再用 6 BV 的 70% 乙醇以 1.0 BV/h 的流速洗脱吸附在树脂上的异黄酮,然后用旋转蒸发仪回收洗脱液中的乙醇至干,得到葛根总异黄酮样品。用 UV 比色法分析样品中的总异黄酮含量,结果表明,D101 大孔树脂对葛根总异黄酮的动态饱和和吸附容量可达到 30.12 mg/mL,70% 乙醇的洗脱率达到 86.89%,样品中的总异黄酮含量可达 50.91%。

采用 HPLC 法检测并分析用大孔树脂富集回收所得总异黄酮样品中的葛根素含量,用 HPLC 法对葛根素标准对照样品(保留时间为 11.63 min)及总异黄酮样品进行分析检测。如图 4 所示,葛根素质量浓度( $x$ )在 1.747 ~ 57.576 mg/L 范围内时,与积分面积( $y$ )具有良好线性关系: $y = 29\,348.4x - 841.565, r^2 = 0.999\,6 (n = 7)$ 。按标准曲线计算,用 D101 大孔树脂富集回收得到的总异黄酮样品中葛根素的含量为 28.77%。

3 讨论

通过单因素及正交试验设计,对匀浆法提取葛根淀粉及其总异黄酮的条件进行了优化,并用大孔树脂吸附树脂富集了匀浆提取液中的总异黄酮。结果表明,在匀浆液料比为 8 mL : 1 g、洗涤液料比为 6 mL : 1 g、匀浆时间为 30 s 的条件下提取淀粉,淀粉收率为  $(18.58 \pm 0.26)\%$  ( $n = 3, RSD = 1.38\%$ ),此时总异黄酮的溶出率为  $(1.49 \pm 0.05)\%$  ( $n = 3, RSD = 3.37\%$ )。D101 大孔树脂对葛根总异黄酮的动态饱和和吸附容量可达到 30.12 mg/mL,70% 乙醇的洗脱率达到 86.89%。用旋转蒸发仪回收洗脱液中的乙醇至干,所得样品中的总异黄酮含量可达到 50.91% (UV 比色法),葛根素含量为 28.77% (HPLC 法)。

葛根为常用中药材,葛根素在临床上用于治疗

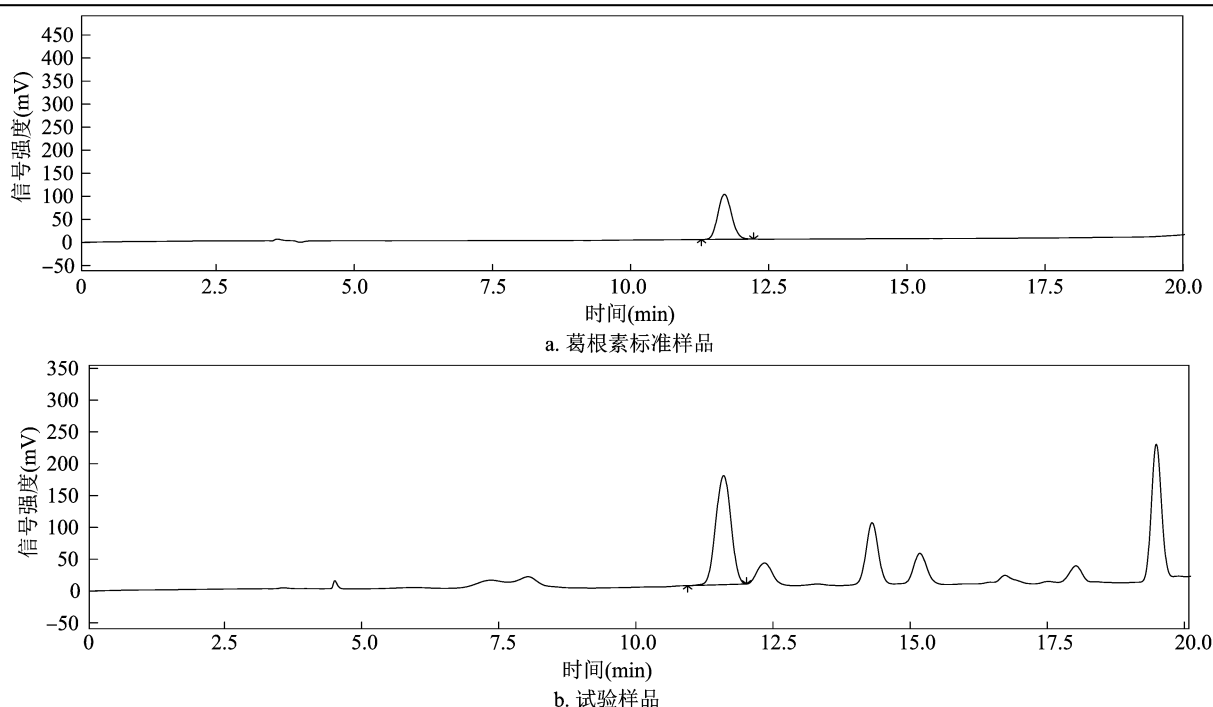


图4 HPLC 分析图谱

心脑血管等疾病,主要药用成分为葛根素等异黄酮类化合物,此外葛根中还有高含量的淀粉。葛根对生长的环境要求不高,耐贫瘠,耐干旱,适合在山区种植。近年来,葛根种植与淀粉加工已经成为山区农民脱贫致富的一条重要途径。一些地区小型淀粉加工厂多,在技术上仅利用了葛根淀粉,这不仅造成葛根素等异黄酮资源的巨大浪费,而且在葛根淀粉加工过程中排放的水也对环境造成了较为严重的污染。因此,中小型葛根加工企业可以在生产实际中大力推广采用匀浆法优化后的葛根淀粉提取工艺,同时利用大孔吸附树脂富集回收其水提液中总异黄酮的方法。这一生产工艺既符合国家的绿色发展战略,又可以高效合理利用葛根资源,不仅能够从生产源头防止企业对环境造成污染,而且可以为企业增加经济收益。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:312.
- [2] 马继兴. 神农本草经辑注[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:194.
- [3] 石勇,吴正奇. 葛根和葛根保健品的国内外研究进展[J]. 湖北工学院学报,2000,15(1):52-55.
- [4] 张雁,张孝祺,吴伟琪,等. 葛根资源的开发利用[J]. 中国野生植物资源,2000,19(6):26-29.
- [5] 李天星,李新民. 中药葛根的研究进展[J]. 湖南中医杂志,2013,29(8):151-153.
- [6] 陈荔烜,陈树和,刘焱文. 葛根资源、化学成分和药理作用研究概况[J]. 时珍国医国药,2006,17(11):2305-2306.
- [7] 裴月湖,姜红祥. 天然药物化学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社,2016:183.
- [8] Boue S M, Wiese T E, Nehls S, et al. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2003,51(8):2193-2199.
- [9] 郑高利,张信岳,郑经纬,等. 葛根素和葛根总异黄酮的雌激素样活性[J]. 中药材,2002,25(8):566-568.
- [10] 刘葵,张恩娟. 大豆异黄酮的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药房,2006,17(1):67-69.
- [11] 刘新,林於,徐传福. 愈风宁心片体外溶出度比较[J]. 中国中药杂志,2001,26(2):132-133.
- [12] 赵晓莉,崔小兵,狄留庆. HPLC法测定葛根素葡萄糖注射液中葛根素及3'-甲氧基葛根素含量[J]. 中国中药杂志,2000,25(7):413-415.
- [13] 王靖,吉民,华维一,等. 葛根素研究进展[J]. 药学进展,2003,27(2):70-73.
- [14] 常虹,周家华,兰彦平,等. 葛根淀粉提取工艺研究[J]. 现代食品科技,2009,25(5):523-526.
- [15] 孙庆杰,杨明毅. 葛根淀粉连续化生产工艺的研究[J]. 食品科学,2002,23(4):93-94.
- [16] 何美军,王华,张宇,等. 高黄酮含量野葛淀粉提取工艺优化[J]. 湖北农业科学,2016,55(24):6537-6540.
- [17] 张雁,池建伟,张名位,等. 新鲜葛根中总黄酮和淀粉的提取工艺研究[J]. 中国食品学报,2008,8(3):73-77.