

# 黄芪黄酮乙醇回流提取工艺的研究

肖卫华, 韩鲁佳\*

(中国农业大学工学院, 北京 100083)

**摘要:** 采用高效液相色谱法对黄芪黄酮进行测定, 对乙醇回流提取法从蒙古黄芪中提取黄酮类物质的工艺进行了研究, 在单因素实验的基础上对黄芪黄酮提取工艺参数进行了优化, 得出其较佳的工艺条件为: 提取温度 75℃, 提取时间 2.5h, 提取液乙醇浓度 90% (v/v), 液料比 20mL/g, 在此工艺条件下进行实验, 黄芪黄酮的提取得率为 0.934mg/g。  
**关键词:** 黄芪, 黄酮, 提取工艺

## Study on extraction technology of flavonoids from *Astragalus mongholicus* by alcohol reflux

XIAO Wei-hua, HAN Lu-jia\*

(College of Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** HPLC was used to evaluate the yield of flavonoid extracted from *Astragalus mongholicus* by alcohol reflux process. Based on the results of single factor experiments, the best extraction processing parameter was ascertained as follows: temperature 75℃, time 2.5h, concentration of ethanol 90% (v/v), ratio of solvent to raw material 20mL/g. Yield of that optimized procedure was 0.934mg/g.

**Key words:** *Astragalus mongholicus*; flavonoids; extraction process

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2008)01-0233-03

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 (*Astragalus membranaceus*) 或膜荚黄芪 (*Astragalus membranaceus*) 的干燥根, 具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效。黄芪中的主要有效成分为多糖、皂苷和黄酮类化合物, 其中黄酮类化合物主要包括毛蕊异黄酮 (calycosin) 及其糖苷芒柄花素 (formononetin) 和芒柄花苷 (ononin) 等<sup>[1]</sup>。研究证实黄芪中的黄酮类成分具有多种药理活性, 具有清除氧自由基, 抑制脂质过氧化, 增强免疫力, 抗病毒以及促进细胞增殖的作用<sup>[2,3]</sup>。目前对黄芪活性物质的提取研究多集中在多糖和皂苷的研究方面<sup>[4-6]</sup>, 对于黄芪黄酮的提取工艺研究较少。现有的研究主要采用甲醇索氏法测定黄酮含量<sup>[7]</sup>, 该法仅限于实验室规模, 不利于工业化提取生产, 同时从安全性角度考虑, 乙醇作为提取溶剂较甲醇有着不可替代的优势。本文以蒙古黄芪为研究对象, 采用高效液相色谱法对黄芪黄酮进行定量分析, 通过单因素实验, 在比较不同提取方法的基础上, 主要考察了黄芪黄酮乙醇提取工艺中各种因素对黄芪黄酮类化合物提取效果的影响, 对黄芪黄酮乙醇提取工艺进行了优化, 并进行进一步实验验证, 以期为进一步生产实践提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黄芪饮片 购自北京同仁堂医药股份有限公司, 为山西产蒙古黄芪; 毛蕊异黄酮 (含量 90.3%) 购自上海中药标准化研究中心; 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷 (含量 98.0%) 购自北京天宝物华生物技术有限公司; 芒柄花素 (含量 96.6%)、芒柄花苷 (含量大于 90.3%) 标准品 购自美国 CHROMADEX 公司; 乙腈 色谱纯, 美国 FISHER 公司。

日立高效液相色谱仪 (包括 MODEL L-7200 自动进样器、L-7420/L-7420S 型紫外可见检测器、MODEL L-7300 柱温箱、MODEL L-7100 泵、L-7610 真空脱气机)、WML-2001 通用型威玛龙色谱数据工作站 南宁市威玛龙色谱科技有限公司; KQ-500DV 台式数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; FW135 型中草药高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; MILLIPORE 超纯水机。

### 1.2 实验方法

1.2.1 黄芪黄酮含量的测定 毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷、芒柄花素和芒柄花苷的测定参考 Tao Wu 等方法<sup>[8]</sup>。色谱条件: 色谱柱: SupelocosiTMLC18 (4.6mm × 250mm, 5μm); 紫外检测波长: 230nm; 柱温: 40℃; 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 水。梯度洗脱程序如表 1。

1.2.2 标准曲线的制作 精密称取毛蕊异黄酮 (C)、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷 (C-G)、芒柄花素

收稿日期: 2007-06-08 \* 通讯联系人

作者简介: 肖卫华 (1977-), 女, 博士研究生, 主要从事生物质资源利用方面的研究。

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划课题 (2001B501A30); 北京市科技计划项目课题 (Y704003040511)。

(F)和芒柄花苷(O)的标准品置于10mL容量瓶中,用甲醇溶解,定容至刻度,摇匀,即得4种黄酮化合物的标准品混合液。用0.45 $\mu$ m微孔滤膜过滤,分别进样5、10、15、20、25、30、35、40 $\mu$ L,按上述色谱条件测定,得到标准曲线、回归方程及线性范围,见表2。

表1 HPLC 梯度洗脱流动相

时间(min)	流速(mL/min)	流动相组成(A%)
0	1.2	0
15	1.0	28
30	1.0	38
60	1.0	100

表2 黄芪黄酮 HPLC 标准曲线

标准品	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围( $\mu$ g/mL)
C-G	$y = 4 \times 10^{-5}x + 0.8198$	0.999	15~120
O	$y = 3 \times 10^{-5}x + 0.6417$	0.998	5.5~44
C	$y = 4 \times 10^{-5}x + 6.8155$	0.999	35~280
F	$y = 3 \times 10^{-5}x + 3.1648$	1.000	28~224

由表2可知,毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、芒柄花素和芒柄花苷分别在上述范围内线性关系良好。将供试液按上述方法测得上述四种黄酮化合物浓度,四种化合物含量的总和记为黄酮的得率。

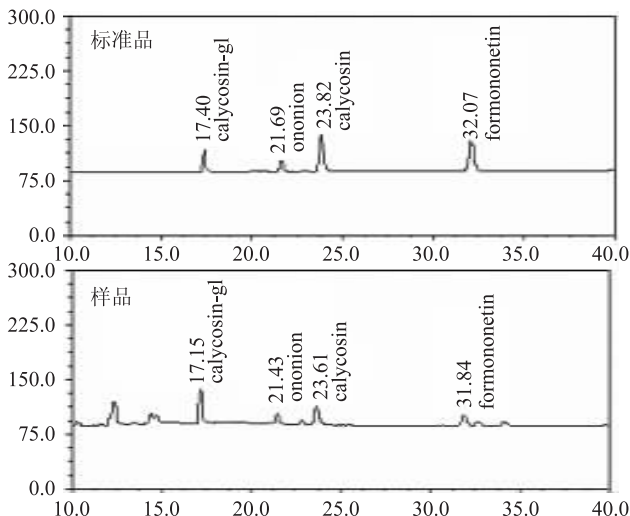


图1 黄芪黄酮标准品和样品的液相色谱图

### 1.2.3 提取方法的选择

**1.2.3.1 索氏提取法** 将黄芪饮片在60 $^{\circ}$ C下干燥、粉碎后,过10目筛。称取4.0g黄芪粉,用滤纸包好,放入索氏提取器中,然后向圆底烧瓶中按比例加入100mL甲醇,回流提取4h,趁热过滤,收集滤液,4000r/min离心20min,取上清液,浓缩,蒸干,加甲醇定容,测定。

**1.2.3.2 煎煮法** 称取20.0g黄芪粉,加入10倍量蒸馏水,在100 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中采用电动搅拌煎煮,回流提取2次。

**1.2.3.3 乙醇提取法** 精密称取20.0g黄芪粉,加入10倍量90%乙醇溶液,在75 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中采用电动搅拌,回流提取2次。

**1.2.3.4 超声提取法** 精密称取10.0g黄芪粉,加入10倍量90%乙醇溶液,在75 $^{\circ}$ C水浴中超声提取2

次,每次30min。

### 1.2.4 乙醇回流提取单因素实验方法

**1.2.4.1 提取次数的确定** 取20.0g黄芪粉,加入10倍量90%(v/v)乙醇溶液,在75 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中回流提取3次,分别收集各次提取液,测定黄酮得率。

**1.2.4.2 浸提时间、浸提温度、浸提液乙醇浓度以及液料比对黄芪黄酮提取得率的影响** 在原料粉碎粒度以及提取次数一定的条件下,分别研究了不同浸提时间、浸提温度、浸提液乙醇浓度以及液固比对黄芪黄酮提取的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取方法的选择

不同提取方法对黄芪黄酮提取得率的影响见图2。由图可知索氏提取法的黄酮得率最高,为1.292mg/g,其次是乙醇回流提取法,提取得率为0.837mg/g,超声法和煎煮法的得率较低,仅为0.5~0.6mg/g。由于索氏提取法仅适用于实验室规模实验研究,无法放大生产,且考虑到甲醇的毒性,因此,选择乙醇回流提取法较为经济可行。

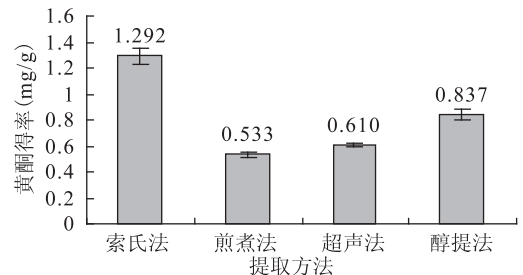


图2 不同提取方法对黄酮提取得率的影响

### 2.2 提取次数的影响

提取次数对黄芪黄酮得率的影响见图3。随着提取次数的增加,提取得率显著减小,第2次提取得率为第1次的26.6%,第3次提取的得率仅为第1次提取得率的6.5%,可见经过2次提取后,黄酮得率增加不明显,因此重复提取2次即可。

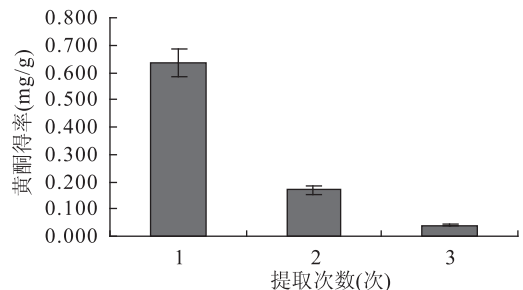


图3 提取次数对黄酮得率的影响

### 2.3 提取时间对黄酮得率的影响

在浸提温度为75 $^{\circ}$ C、乙醇浓度为90%、液固比为10mL/g的条件下,反复提取2次,考察浸提时间(0.5~3.0h)对黄芪黄酮得率的影响。

提取的传质过程,需要一定时间才能达到平衡,时间太短,还未达到平衡,其得率就偏低;当传质过程达到基本平衡后,得率就不会明显上升。由图4可知,黄芪黄酮提取得率随提取时间的延长而升高,当时间超过2.5h后,得率上升的趋势已趋于平缓,说明提取2.5h已接近平衡,因此选择提取时间为2.5h。

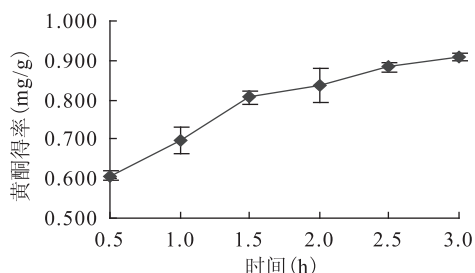


图4 时间对黄酮得率的影响

### 2.4 提取温度对黄酮得率的影响

在浸提时间为2.0h、乙醇浓度为90%、液固比为10mL/g条件下,反复提取2次,考察浸提温度对黄芪黄酮含量的影响。

温度的升高,有助于传质过程,使分子扩散运动激烈,加快溶质的扩散和溶剂的渗透,有利于黄芪黄酮类物质的溶出。从图5可以看出,黄酮提取得率在低温段(35~55℃)增加缓慢,而在高温段(55~75℃)增加显著,且在75℃达到最高。由于乙醇溶液的沸点介于75~80℃之间,当提取温度高于提取溶剂沸点时会沸腾,造成溶剂大量损失,因此,选择在75℃下提取较为合理可行。

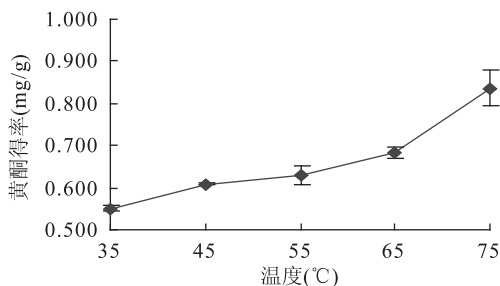


图5 温度对黄酮得率的影响

### 2.5 乙醇浓度对黄酮得率的影响

在浸提时间为2h、温度为75℃、液固比为10mL/g条件下,反复提取2次,考察乙醇浓度对黄芪黄酮得率的影响。

毛蕊异黄酮和芒柄花素及其苷类均属于异黄酮类物质,母核上仅有1~2个羟基,亲水性较差。从图6可以看出,随着乙醇浓度增大,黄酮得率显著增加,方差分析结果表明,当 $\alpha = 0.05$ 时,60%、70%、80%、90%的乙醇提取得率差异显著,而60%与100%乙醇提取得率无显著性差异。因此90%乙醇溶液提取得率最高,且无大量水溶性杂质溶出,由此可以推断黄芪异黄酮类物质在90%乙醇中溶解性较好。

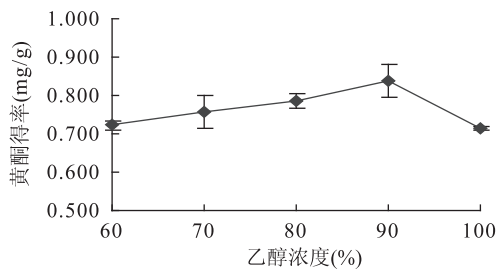


图6 乙醇浓度对黄酮得率的影响

### 2.6 液固比对黄酮得率的影响

在浸提时间为2.0h、温度为75℃、乙醇浓度为

90%条件下,反复提取2次,考察液固比对黄芪黄酮含量的影响。

由图7可知,液固比太小,难以保证原料中的黄酮全部转移到液相中,提取得率较低;随着液固比的增加,黄酮得率逐渐增大。方差分析表明,当 $\alpha = 0.05$ 时,液固比为20、25mL/g时的黄酮得率与5、10mL/g时的黄酮得率有显著性差异,而10、15mL/g以及15、20、25mL/g组内均无显著差异。考虑到液固比过大不仅消耗大量溶剂,而且后续浓缩费时费能,因此选择液固比为20mL/g即可。

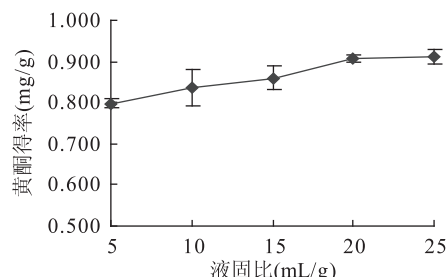


图7 液固比对黄酮得率的影响

## 3 结论

本文采用高效液相色谱法对黄芪黄酮进行定量分析,通过比较研究发现,乙醇回流提取法是较煎煮法和超声提取法更高效的方法,同时从安全性和实用性考虑,乙醇回流提取较索氏提取法更易于实现大规模应用,因此,对乙醇回流提取黄芪黄酮的各影响因素进行了研究。通过单因素实验考察了影响黄芪黄酮乙醇提取得率的几个主要因素:提取次数、提取时间、提取温度、乙醇浓度以及液固比,明确了各参数对黄酮得率影响的变化规律,从而对黄酮醇提工艺参数进行初步优化。结果表明,采用黄芪粗粉为原料,用乙醇溶液反复提取2次,较适宜的操作条件为:提取温度75℃,提取时间2.5h,乙醇浓度90%,液固比20mL/g,在此工艺条件下,黄酮的提取得率为0.934mg/g。

### 参考文献:

- [1] 姚美村,齐莹,毕开顺,等. 黄芪药效物质基础研究[J]. 中国野生植物资源,2000,19(2):33~36.
- [2] 汪德清,田亚平,宋淑珍,等. 黄芪总黄酮抗突变作用实验研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(12):1164~1167.
- [3] 汪德清,田亚平,等. 黄芪总黄酮生物学活性作用的化学成分基础研究[J]. 军医进修学院学报,2006(1):13~15.
- [4] 阎巧娟,韩鲁佳,江正强,等. 黄芪皂甙的提取方法[J]. 中国农业大学学报,2000,5(6):61~65.
- [5] 闫巧娟,韩鲁佳,江正强,等. 黄芪多糖的分子量分布[J]. 食品科学,2004,25(8):27~30.
- [6] 韩鲁佳,阎巧娟,江正强,等. 黄芪多糖及皂甙提取工艺研究[J]. 农业工程学报,2000,5(9):118~121.
- [7] 纪松岗. 正交设计法确定黄芪中黄酮类成分的超声提取条件[J]. 第二军医大学学报,2005(10):1168~1170.
- [8] Tao Wu, A C, S W Annie Blighb, Li - hua Gu, et al. Simultaneous determination of six isoflavonoids in commercial Radix Astragali by HPLC - UV [ J ]. Fitoterapia Elsevier Amsterdam Netherlands,2005,76(2):157~165.