

葛根总黄酮与葛根素提取工艺优化及增强 结肠炎大鼠抗氧化能力

吴轶¹, 刘文惠¹, 黄芳¹, 鄢雅丽¹, 欧阳克氩², 刘建平², 周世成³, 阮征¹

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学食品学院, 江西南昌 330047)

(2. 江西省科学院生物资源研究所, 江西南昌 330096) (3. 江西省葛工程技术研究中心, 江西上饶 334300)

摘要: 在传统乙醇热回流法提取葛根黄酮的基础上, 采用二次正交旋转组合设计优化同步提取葛根总黄酮和葛根素工艺。由葛根总黄酮得率(y_1)和葛根素得率(y_2)与提取温度(x_1)、回流时间(x_2)、乙醇浓度(x_3)、料液比(x_4)等四个试验因子分别建立回归模型。通过回归模型分析发现, 葛根黄酮提取中最显著的影响因素为提取温度(x_1)和乙醇浓度(x_3), 且得到的最佳提取条件为提取温度 85 °C、回流时间 55 min、乙醇浓度 30%、料液比 1:17.5 (g/mL), 在此条件下葛根总黄酮提取率可达 41.07 mg/g, 葛根素提取率可达 16.50 mg/g, 优化所得的提取工艺稳定可行。在结肠炎模型下葛根提取物相较于纯品葛根素而言, 能更好地提高大鼠血清 CAT、SOD、GSH-px 水平, 即能更好地提高机体抗氧化能力。

关键词: 葛根; 总黄酮; 葛根素; 二次正交旋转组合设计; 结肠炎; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2017)10-117-126

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.018

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids and Puerarin in *Radix Puerariae* and their Enhanced Antioxidant Capacity in Colitis Rats

WU Yi¹, LIU Wen-hui¹, HUANG Fang¹, YAN Ya-li¹, OUYANG Ke-xian², LIU Jian-ping², ZHOU Shi-cheng³,
RUAN Zheng¹

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, College of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China) (2.Institute of Biological Resources, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China)

(3.Jiangxi Engineering Research Center for Kudzu, Shangrao 334300, China)

Abstract: Based on the traditional ethanol heat reflux method to extract puerarin and flavone, the quadratic-orthogonal-rotation-combination design was used to optimize the extraction of total flavonoids and puerarin from *Radix Puerariae*. Regression models were established for the yield of total flavonoid (y_1) and the yield of puerarin (y_2) with the other four test factors (including extraction temperature (x_1), reflux time (x_2), ethanol concentration (x_3) and ratio of material to liquid (x_4), respectively). The regression model showed that, the most important two factors that affected the total flavonoids yield and puerarin yield from *Radix Puerariae* were: extraction temperature (x_1) and ethanol concentration (x_3). The optimal technical conditions were: extracting at 85 °C for 55 min, reflux time 55 min, ethanol concentration of 30%, solid-to-liquid ratio of 1:17.5. Under these conditions, the extraction rate of total flavone from *Radix Puerariae* was 41.07 mg/g, the extraction of puerarin rate could be 16.50 mg/g, and the optimized extraction technology of *Radix Puerariae* was stable and feasible. The results showed that the *Radix Puerariae* extractive had a better effective in recovering serum catalase (CAT), Cu/Zn superoxide dismutase (SOD), and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GSH-px) levels as well as antioxidant capacity in colitis rats as compared with pure puerarin.

Key words: *Radix Puerariae*; total flavone; puerarin; quadratic-orthogonal-rotation-combination design; colitis; anti-oxidation

野葛 [*P. lobata* (Willd.) Ohwi] 又称葛藤或葛条, 为

收稿日期: 2017-01-11

基金项目: 江西省青年科学家项目 (20153BCB23026); 食品科学与技术国家重点实验室自由探索项目 (SKLF-ZZB-201515)

作者简介: 吴轶 (1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生学

通讯作者: 阮征 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品

中医常用的祛风解毒药^[1], 且在我国中东部地区, 葛根 (*Radix Puerariae*) 被广泛应用于预防和治疗肥胖^[2]、高血压^[3]、高血脂和糖尿病^[4]等代谢综合征, 改善心血管功能^[5], 并有报道称葛根在抗氧化和抗炎症等方面具有广谱的药理特性^[6,7]。

目前葛根黄酮的提取工艺主要有浸提法、热回流

法、超声波辅助法、微波萃取法和超临界萃取法等。在众多提取工艺中,热回流法具有安全环保、工艺简单、提取率高、溶剂使用量小及提取所需时间较短等特点外,相较于其他方法还可以更广泛地运用到实际工业生产中^[8]。二次正交旋转组合设计(quadratic-orthogonal-rotation-combination design)是近年来国外应用较多的一种实验设计方法,具有将正交、回归和均匀等融为一体的优点,克服了正交和均匀等试验设计的不足,属于更高级的试验设计技术^[9]。本实验提取优化部分研究结果对特异性地提取黄酮糖苷和黄酮苷元具有参考意义。

黄酮类化合物是葛根中含量最高的有效药用成分^[10,11],葛根素作为葛根中最主要的次生代谢产物,得到国内外科学家广泛研究^[5,12,13],如 Zheng G 等^[14]发现膳食中添加 0.4% 的葛根素对改善肝脏脂代谢、降低血清和肝脏的脂肪堆积具有显著作用; Xu 等^[15]发现从葛根中提取的葛根素对于减缓糖尿病造成的氧化应激和提升机体 SOD 与 CAT 水平具有显著作用。此外,黄酮类化合物的主要吸收场所在结肠,经由肠道细菌代谢,将黄酮糖苷转化为苷元和多种酚酸类化合物进而吸收利用^[16],故可通过对比在溃疡性结肠炎模型下葛根提取物与葛根素的体内抗氧化能力,探讨病理条件下葛根中的多种功效成分共同作用相较于单一的葛根素纯品在药用价值上的区别。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试野葛根茎采于江西省上饶市; SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌性,体质量 250~290 g,湖南长沙天勤生物技术有限公司;大鼠普通饲料,湖南长沙天勤生物技术有限公司。

葛根素(批号 MUST-16011207),成都曼思特生物科技有限公司;甲醇(色谱纯)、乙酸(色谱纯),美国 Tedia 公司;过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、总蛋白定量测定试剂盒(BCA 法),南京建成生物工程研究所;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱, UVD 检测器, 美国 Agilent 公司; Shimadzu LC30 超高效液相色谱系统, 日本 Shimadzu 公司; AB Sciex TripleTOF 5600+质谱检测器, 美国 Sciex 公司; ELx800 型酶标仪, 美国

BioTek 公司; Tu-1900 双光束紫外可见光光度计(北京谱析通用仪器有限公司)、SP-722E 型可见光分光光度计(上海光谱仪器有限公司)、AL104 型分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; HH 恒温水浴锅, 江苏金坛市中大仪器厂; SK3300HP 型超声清洗机, 上海科导超声仪器有限公司; AP-01P 型真空泵, 天津奥特赛斯仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 总黄酮的测定

根据王言才等^[17]的方法,以葛根素为参照物,采用外分光光度法,测定 250 nm 处的吸光度值,制作标准曲线,并得到回归方程: $y=0.0737x+0.0357$, $R^2=0.9993$ (y 为葛根素标准品的吸光度, x 为葛根素的质量浓度/ $\mu\text{g/mL}$)。

1.3.2 葛根素的测定

参考保健食品中葛根素测定国家标准(GB/T 22251-2008)^[18]的色谱条件:C18 色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm);流动相为无水甲醇:36%乙酸:超纯水=25:3:72,流速 0.6 mL/min,检测波长 247 nm,进样量 10 μL 。使用无水甲醇分别配制 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/mL 葛根素标准品,制作标准曲线,并得到回归方程: $y=72127x-187.5$, $R^2=0.99986$ (y 为葛根素标准品的峰面积, x 为葛根素的质量浓度, mg/mL)。

1.3.3 单因素试验

研究提取温度^[19](50、60、70、80 和 90 $^{\circ}\text{C}$)、乙醇浓度^[20](20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 和 90%)、回流时间^[21](20、30、40、50 和 60 min)、料液比^[19](1:5、1:10、1:15、1:20 和 1:25 (g:mL))对野葛茎中总黄酮提取的影响,以总黄酮提取率为评价指标,确定各因素较优的水平,为旋转组合试验提供依据。

1.3.4 二次回归旋转组合设计

数学模型的建立与显著性检验以单因素试验结果为依据,选定提取温度(x_1)、乙醇浓度(x_2)、回流时间(x_3)和料液比(x_4)4 个因素,以葛根总黄酮提取量(y_1)和葛根素提取量(y_2)为指标,采用 4 元(全实施)2 次通用旋转组合设计(表 2)优化野葛茎中总黄酮和葛根素提取的工艺。

1.3.5 葛根提取物中主要黄酮类成分的测定

采用二级液相色谱质谱联用技术(LC-MS/MS)测定葛根提取物中主要的黄酮类成分。色谱柱: Shim-pack GIST C18 柱(75 mm×2.1 mm; 2 μm)。流动相:流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为 95% 甲醇乙腈溶液,梯度洗脱(0~25 min, A:10%→80%;

25~25.1 min, A:80%→100%; 25.1~30 min, A 保持 100%; 30~31 min, A:100%→10%; 31~35 min, A 保持 10%); 流速为 0.3 mL/min; 进样量 10 μ L。质谱条件:一级(DP: 80 V, CE: 10 eV, 采集范围: 100~1000); 二级(IDA 模式, DP: 80 V, CE: 30, CES: 15, 采集范围: 50~1000)。

1.3.6 动物分组及样品处理

大鼠分组前饲喂 5 d 作为适应期, 之后按体重随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为空白组、造模组、造模+葛根素组以及造模+葛根提取物组, 除空白组外其余三组均用 TNBS (100 mg/kg 体重) 灌肠造溃疡性结肠炎模型。所有大鼠均使用普通饲料喂养, 造模+葛根素组每日灌胃葛根素标准品溶液 (200 mg/kg 体重)^[22], 造模+葛根提取物组每日灌胃葛根提取物溶液 (200 mg 葛根素/kg 体重), 正常组和造模组灌胃等量生理盐水, 连续灌胃 15 d, 实验期间大鼠自由摄食和饮水, 每日记录摄食量, 每两日记录体重。

实验第 15 d, 大鼠禁食过夜, 称重后断头取血, 血液自然凝固 30 min 后 3500 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 分离血清。大鼠解剖后用消毒的手术剪剪下结肠后用生理盐水小心冲洗、滤纸吸干, 放入液氮中迅速冷却, 取出组织后加入液氮研磨, 取 0.1 g 研磨后的组织加入 0.9 mL 生理盐水充分均质, 4000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 小心收集上清, -80 $^{\circ}$ C 贮存待测。

1.3.7 体内抗氧化指标测定

根据试剂盒操作说明, 分别测定血清和结肠匀浆中的过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-px)、丙二醛 (MDA) 水平, 最后测定结肠匀浆总蛋白含量用于标定。

1.3.8 统计学分析

采用 IBM SPSS Statistics 24.0 软件对结果进行 t 检验和单因素分析, 所有测定结果均用 mean \pm S.E. 表示 (n=5~10), $p<0.05$ 表示组间有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 葛根素的液相色谱法检测

根据 1.3.2 的色谱条件, 得到葛根素标准品的保留时间为 29.356 min (图 1a), 葛根提取物样品进样后在 29.356 min 附近得到一相同峰型的主峰 (图 1b), 占总峰面积 75% 以上, 说明该色谱条件及色谱柱的选择十分适合分离和测定混合样品中的葛根素含量。

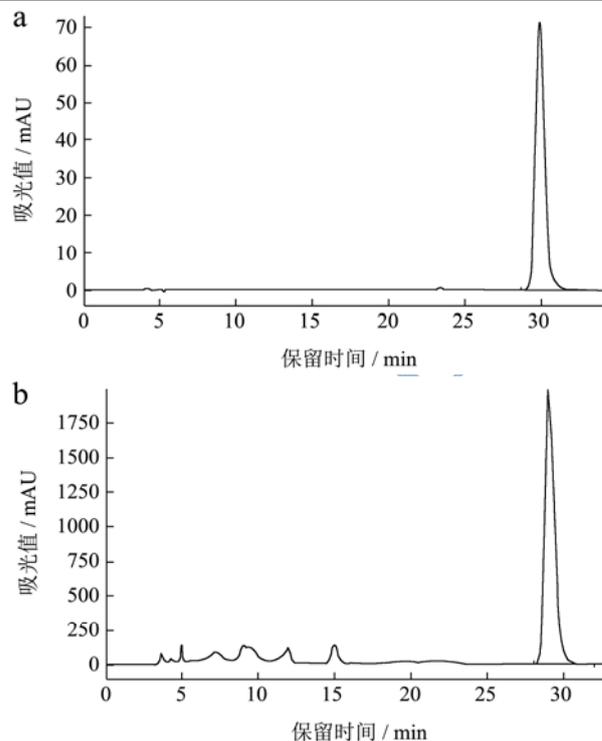


图 1 葛根素及葛根提取物高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of puerarin and *Radix Puerariae* extract

2.2 单因素实验

单因素实验中, 供试条件为: 提取温度为 70 $^{\circ}$ C, 回流时间为 40 min, 乙醇浓度为 50%, 料液比为 1:15, 控制其中三个因素使单一因素的对实验的影响易于观察。参考大量文献选出待测温度范围为 50 $^{\circ}$ C~90 $^{\circ}$ C, 回流时间范围为 20 min~60 min, 乙醇浓度范围为 20%~90%, 料液比范围为 1:5~1:25 (g:mL)。

提取温度在 50 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C 时, 总黄酮得率随温度变化直线上升, 70 $^{\circ}$ C 之后逐渐趋于平缓; 同样的, 随着回流时间的增加葛根总黄酮的得率逐步上升, 但当回流时间大于 40 min 时, 总黄酮的得率曲线亦逐渐趋于平缓; 当乙醇浓度在 30% 以下时, 总黄酮得率随乙醇浓度的增加缓慢上升, 在 30%~60% 之间缓慢下降, 而当乙醇浓度大于 60% 时, 总黄酮得率随乙醇浓度的增加急剧下降; 料液比在 1:5~1:15 (g:mL) 范围内时, 总黄酮得率随料液比增加缓慢上升, 料液比在 1:15 (g:mL) 之后时几近平缓。综上所述, 同时考虑能耗和生产成本, 最终确定旋转组合实验的各个因素优化范围为提取温度 70 $^{\circ}$ C~90 $^{\circ}$ C, 回流时间 40 min~60 min, 乙醇浓度 20%~40%, 料液比 1:10~1:20 (g:mL)。

2.3 正交旋转回归法确定葛根总黄酮和葛根

素提取工艺

针对传统单因素试验设计具有的明显不足,在此采用二次回归旋转组合设计对葛根总黄酮和葛根素提取的主要影响因素进行优化试验,取提取温度(x_1)、乙醇浓度(x_2)、回流时间(x_3)和料液比(x_4)作为四个考察因素,每个因素选取五个显著水平见表1。

表1 因素水平表

Table 1 Factors and levels of the tests

因素	水平				
	-2	-1	0	1	2
提取温度(x_1)/°C	70	75	80	85	90
回流时间(x_2)/min	40	45	50	55	60
乙醇浓度(x_3)/%	20	25	30	35	40
料液比(x_4)/g:mL	1:10	1:12.5	1:15	1:17.5	1:20

2.3.1 数学模型

表2 二次回归旋转组合设计及试验结果

Table 2 Quadratic rotary combination design and test results

试验编号	提取温度(x_1)	回流时间(x_2)	乙醇浓度(x_3)	料液比(x_4)	总黄酮提取量(y_1)/(mg/g)	葛根素提取量(y_2)/(mg/g)
1	-1	1	-1	-1	35.4579	15.0397
2	0	-2	0	0	36.5658	14.9744
3	-2	0	0	0	34.7748	13.6273
4	-1	-1	-1	1	35.6316	14.1752
5	-1	-1	-1	-1	34.7626	13.5738
6	0	0	0	0	37.8820	16.8813
7	0	0	0	0	37.8820	16.8813
8	0	0	0	0	37.8820	16.8813
9	-1	1	1	1	35.3467	16.9662
10	0	0	0	0	37.8820	16.8813
11	-1	-1	1	1	34.7056	16.0186
12	1	1	-1	-1	39.6811	14.8443
13	1	-1	-1	-1	38.4939	14.5688
14	1	1	1	1	39.2883	17.1935
15	0	0	0	0	37.8820	16.8813
16	1	-1	1	-1	37.3745	15.7708
17	-1	1	-1	1	36.1540	15.4074
18	-1	-1	1	-1	33.2191	15.6336
19	1	1	-1	1	40.6893	16.2084
20	1	-1	1	1	38.4810	16.3407
21	0	0	0	0	37.8820	16.8813
22	1	1	1	-1	38.5787	16.6096
23	0	0	2	0	35.0190	16.4425
24	2	0	0	0	41.3284	15.9311
25	0	0	0	-2	35.7612	15.2690
26	-1	1	1	-1	34.1011	16.2226
27	0	0	0	2	38.9037	14.9662
28	1	-1	-1	1	39.6208	14.9253
29	0	2	0	0	38.2754	15.1455
30	0	0	0	0	37.8820	16.8813
31	0	0	-2	0	36.7083	13.1061

根据表 2 试验结果计算出拟合方程的各项系数，从而得到 y_1 和 y_2 的回归方程：

$$y_1 = 37.18103 + 1.97943x_1 + 0.47607x_2 - 0.54982x_3 + 0.46682x_4 + 0.22868x_1^2 + 0.04224x_2^2 - 0.39761x_3^2 + 0.18372x_4^2 + 0.29225x_1x_2 - 0.11820x_1x_3 + 0.09300x_1x_4 - 0.04189x_2x_3 + 0.12097x_2x_4 - 0.07493x_3x_4;$$

$$y_2 = 17.21186 + 0.40797x_1 + 0.35217x_2 + 0.64593x_3 - 0.16299x_4 - 0.51123x_1^2 - 0.37329x_2^2 - 0.60145x_3^2 - 0.42933x_4^2 - 0.03954x_1x_2 + 0.02343x_1x_3 - 0.08857x_1x_4 - 0.08626x_2x_3 - 0.05100x_2x_4 + 0.06110x_3x_4。$$

2.3.2 模型显著性检验及方差分析

由表 3 结果可知， y_1 回归方程的失拟性检验

$F_1 = 0.14735 < F_{0.05}(5,3) = 9.01$ 不显著，说明未知因素对实验结果干扰很小；显著性检验 $F_2 = 10.60134 > F_{0.01}(11,8) = 5.74$ 极显著，说明模型的预测值与实测值拟合很好。 y_2 回归方程的失拟性检验 $F_1 = 1.99375 < F_{0.05}(5,3) = 9.01$ 不显著，说明未知因素对实验结果干扰很小；显著性检验 $F_2 = 8.69715 > F_{0.01}(11,8) = 5.74$ 极显著，说明模型的预测值与实测值拟合很好。根据 $P = 0.1$ 显著水平去除不显著项，可将回归方程分别简化为：

$$y_1 = 37.18103 + 1.97943x_1 + 0.47607x_2 - 0.54982x_3 + 0.46682x_4 - 0.39761x_3^2;$$

$$y_2 = 17.21186 + 0.40797x_1 + 0.35217x_2 + 0.64593x_3 - 0.51123x_1^2 - 0.37329x_2^2 - 0.60145x_3^2 - 0.42933x_4^2。$$

表 3 y_1 和 y_2 方差分析表

Table 3 Variance analysis of y_1 and y_2

差异源	y_1					
	平方和	自由度	均方	偏相关	F 值	显著性
x_1	98.2669	1	101.2760	0.9760	119.6427	0.0000
x_2	5.4612	1	5.6679	0.5676	6.9207	0.0214
x_3	7.7775	1	7.5599	-0.5988	9.1425	0.0090
x_4	5.5333	1	5.6327	0.5597	6.6542	0.0243
x_1^2	1.5822	1	1.5687	0.3353	1.8280	0.2029
x_2^2	0.0532	1	0.0535	0.0667	0.0666	0.8346
x_3^2	4.8463	1	4.6790	-0.5353	5.5262	0.0347
x_4^2	1.0125	1	1.0058	0.2768	1.2245	0.3156
x_1x_2	1.4718	1	1.4458	0.3177	1.7220	0.2260
x_1x_3	0.2408	1	0.2396	-0.1339	0.2855	0.6346
x_1x_4	0.1432	1	0.1464	0.1099	0.1815	0.7158
x_2x_3	0.0297	1	0.0297	-0.0481	0.0354	0.8591
x_2x_4	0.2522	1	0.2456	0.1379	0.2951	0.6470
x_3x_4	0.0942	1	0.0942	-0.0887	0.1132	0.8063
回归	127.0216	15	9.4213		$F_2 = 10.60134$	0.0000
剩余	13.6933	17	0.8616			
失拟	2.7076	10	0.2708		$F_1 = 0.14735$	1.0404
误差	10.5926	6	1.8446			
总和	145.4414	32				

差异源	y_2					
	平方和	自由度	均方	偏相关	F 值	显著性
x_1	4.1263	1	4.2582	0.6984	12.9385	0.0029
x_2	3.1581	1	3.0509	0.6543	9.3518	0.0083
x_3	10.7943	1	10.9646	0.8896	32.4338	0.0000
x_4	0.6586	1	0.6720	-0.3593	2.1890	0.1903
x_1^2	7.8773	1	8.0566	-0.7902	24.2077	0.0002
x_2^2	4.0844	1	4.1999	-0.7138	13.2567	0.0028
x_3^2	10.6857	1	10.6857	-0.8961	34.9658	0.0000

转下页

接上页						
x_4^2	5.4027	1	5.5556	-0.7363	17.8167	0.0010
x_1x_2	0.0256	1	0.0265	-0.0745	0.0832	0.8088
x_1x_3	0.0093	1	0.0090	0.0453	0.0297	0.8720
x_1x_4	0.1375	1	0.1338	-0.1601	0.4310	0.5905
x_2x_3	0.1269	1	0.1303	-0.1650	0.3856	0.5834
x_2x_4	0.0444	1	0.0455	-0.0929	0.1429	0.7913
x_3x_4	0.0653	1	0.0637	0.1103	0.1877	0.7333
回归	41.8605	15	2.9235	F2=8.69715	0.0001	
剩余	5.5773	18	0.3384			
失拟	4.1812	11	0.4134	F1=1.99375	0.2126	
误差	1.1827	7	0.2016			
总和	46.6143	33				

总黄酮得率(y_1)与各因素间的相关系数 R^2 =回归平方和/总平方和=0.8734, 表明该数学模型中四个因素对产量的影响占 87.34%, 而其它因素的影响和误差占 12.66%; 同理葛根素得率(y_2)与各因素间的相关系数 R^2 =0.8980, 表明该数学模型四个因素对产量的影响占 89.80%, 而其它因素的影响和误差占 10.20%。

2.4 效应分析

2.4.1 主要因素效应分析

将任意三个因素固定在零水平, 分别得到 y_1 和 y_2 中另一个因素与得率的效应方程为:

$$y_1=37.18103+1.97943x_1+0.22868x_1^2;$$

$$y_1=37.18103+0.47607x_2+0.04224x_2^2;$$

$$y_1=37.18103-0.54982x_3-0.39761x_3^2;$$

$$y_1=37.18103+0.46682x_4+0.18372x_4^2;$$

$$y_2=17.21186+0.40797x_1-0.51123x_1^2;$$

$$y_2=17.21186+0.35217x_2-0.37329x_2^2;$$

$$y_2=17.21186+0.64593x_3-0.60145x_3^2;$$

$$y_2=17.21186-0.16299x_4+0.42933x_4^2.$$

根据回归系数的绝对值大小可知, 四个因素对总黄酮得率(y_1)的影响顺序为: 提取温度(x_1) \geq 乙醇浓度(x_3) \geq 回流时间(x_2) \geq 料液比(x_4), 对葛根素得率(y_2)的影响顺序为: 乙醇浓度(x_3) \geq 提取温度(x_1) \geq 回流时间(x_2) \geq 料液比(x_4)。并且在一定范围内, 随着提取温度(x_1)、回流时间(x_2)和料液比(x_4)的升高, 总黄酮的提取量会显著提升, 乙醇浓度(x_3)超过 0.5 水平后会使得总黄酮的提取量有降低趋势; 但就葛根素的提取量而言, 料液比(x_4)超过 0.5 水平或其他三个因素超过 0.5 水平后, 对葛根素的提取量都会有一定程度的负面影响。

从上述主要因素效应分析可看出, 温度的提升对葛根总黄酮提取量的增加起着最显著的作用; 但从表 2 和表 4 中, 提取温度在 2 水平 (90 °C) 时的数据来

看, 葛根总黄酮的提取量远高于平均值, 而葛根素的提取量却相对偏低, 可能的原因是高温长时间加热会导致葛根素与配糖间的糖苷键发生一定程度的水解而转化为大豆苷元^[23], 进而导致葛根素的测定值偏低。

2.4.2 交互效应分析

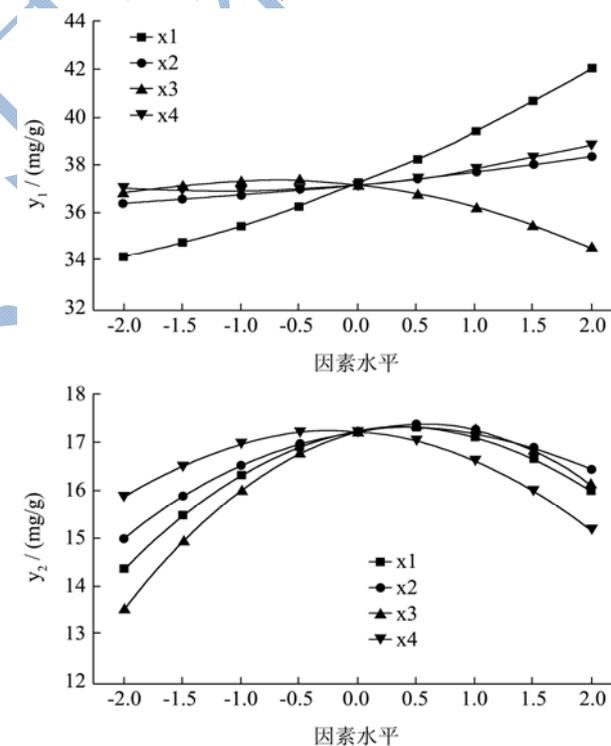


图 2 试验因子的主效应分析

Fig.2 Analysis of the main effects of test factors

由图 2 可知, 提取温度(x_1)和乙醇浓度(x_3)在-2~0 水平区间内接近线性, 说明提取温度(x_1)和乙醇浓度(x_3)在一定范围内对葛根总黄酮和葛根素提取率影响显著。但在 0 至 2 水平区间内, 提取温度(x_1)和乙醇浓度(x_3)对总黄酮的提取存在拮抗作用, 回流时间(x_2)和料液比(x_4)之间存在较强的协同作用, 葛根素提取模型中各因素间无拮抗作用存在。

表 4 总黄酮和葛根素提取相关各变量取值的频率分布

Table 4 Probability distribution of each relative variable of total flavonoids and puerarin

水平	总黄酮							
	x ₁		x ₂		x ₃		x ₄	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率	次数	频率
-2	0	0.0000	43	0.1697	59	0.2298	44	0.1697
-1	1	0.0041	49	0.1913	68	0.2655	46	0.1913
0	36	0.1318	55	0.2098	63	0.2430	55	0.2172
1	102	0.4222	59	0.2309	54	0.2042	59	0.2210
2	127	0.5073	66	0.2552	29	0.1126	67	0.2552
加权平均值	1.3919		0.2294		-0.2857		0.2194	
标准误差	0.0455		0.0909		0.0839		0.0900	
95%置信区间	1.245~1.419		0.042~0.383		-0.427~-0.114		0.042~0.383	

水平	葛根素							
	x ₁		x ₂		x ₃		x ₄	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率	次数	频率
-2	0	0.0000	0	0.0000	0	0.0000	0	0.0000
-1	13	0.1708	13	0.1722	4	0.0569	22	0.2994
0	30	0.4251	25	0.3417	33	0.4738	34	0.4684
1	31	0.4192	25	0.3443	35	0.4591	22	0.2847
2	4	0.0592	13	0.1670	4	0.0557	0	0.0000
加权平均值	0.3590		0.5125		0.3590		0.5125	
标准误差	0.1012		0.0885		0.1012		0.0885	
95%置信区间	0.145~0.522		0.341~0.659		0.145~0.522		0.341~0.659	

2.5 优化验证

因本实验模型同时存在着复杂的主要因素效应和交互效应的影响,无法直接得出最优解,故采用频率分析法分别分析各回归模型(表4),以找到最佳提取条件。

使用 DPS 数据处理系统分析回归方程得到各变量的频率分布表(表4),由表4可知,其他条件均相同时,乙醇浓度在25%~30%范围内,葛根总黄酮的提取量普遍偏高,而葛根素的提取量无显著变化,进一步推知乙醇浓度在这一范围内对黄酮苷元的提取具有较显著的贡献;而当乙醇浓度在30%~35%范围内时,葛根素提取量显著高于其他组,而总黄酮提取量变化不显著,说明乙醇浓度在此范围内较利于黄酮糖苷的提取。总而言之,不同乙醇浓度可能对不同存在形式的黄酮类化合物的提取有着显著影响,这一发现对于特异性地提取和纯化某一类或某一种黄酮类化合物具有重要意义。

再根据表4中各因素的具体频率分布可知,总黄酮的最佳提取条件为提取温度90℃、回流时间60min

乙醇浓度25%、料液比1:20(g:mL),在此条件下葛根总黄酮提取率预计可达到43.35 mg/g;葛根素的最佳提取条件为提取温度80℃、回流时间50 min、乙醇浓度35%、料液比1:15(g:mL),在此条件下葛根素提取率预计可达到18.61 mg/g。综合考虑葛根总黄酮提取率、葛根素提取率和生产成本,得出的人工最佳提取方案为提取温度85℃、回流时间55 min、乙醇浓度30%、料液比1:17.5(g:mL),在此条件下葛根总黄酮提取率预计可达到41.07 mg/g,葛根素提取率预计可达到16.50 mg/g。

按照上述提取工艺对优化结果进行验证,测得在此条件下的葛根总黄酮提取率为40.43 mg/g、葛根素提取率为16.96 mg/g,结果与预测值接近。

2.6 葛根中主要的黄酮类成分

由2.5可知葛根提取物中葛根素的含量约占葛根总黄酮的42%,通过图3质谱图中的峰面积比可知,葛根提取物中的主要黄酮类成分含量从高到低依次为葛根素、大豆苷、3'-甲氧基葛根素、7-木糖葛根素、3-羟基葛根素、大豆苷元、染料木苷和染料木素等。

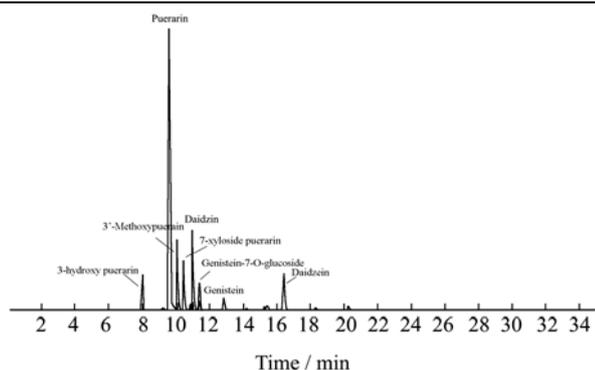


图3 葛根提取物中主要黄酮类成分

Fig.3 The main flavonoids in the extract of *Radix Puerariae*

2.7 大鼠血清和结肠过氧化氢酶 (CAT) 水平

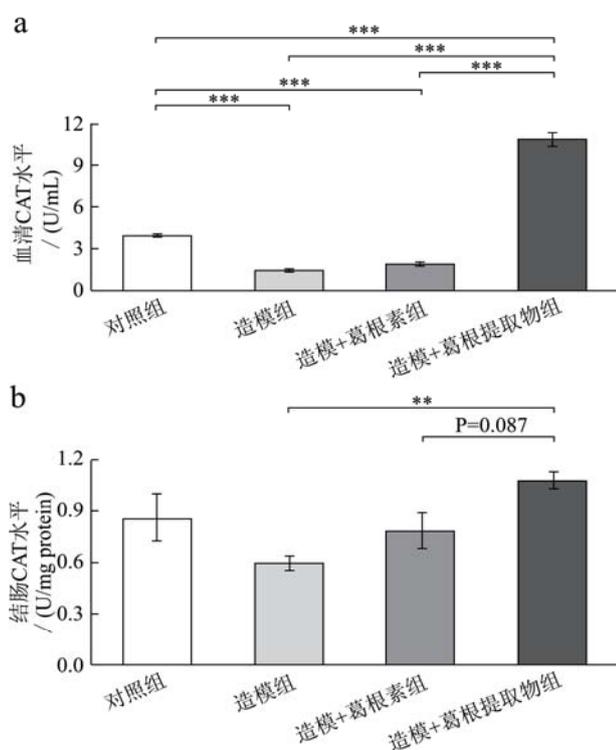


图4 大鼠血清和结肠 CAT 水平

Fig.4 CAT levels of serum and colon in colitis rats

注: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

如图 4a 所示, 血清 CAT 水平呈现出较大组间差异, 相较于正常组而言, 造模组和造模+葛根素组表现出较低血清 CAT 水平, 且造模组与造模+葛根素组之间无显著性差异。造模+葛根提取物组血清 CAT 水平显著高于正常组 (约 2.75 倍) 和其余各组, 表现出极强的抗氧化性。相较血清 CAT 水平而言, 结肠 CAT 水平表现出较大组内差异 (图 4b), 仅在造模组与造模+葛根提取物组间存在显著性差异, 且在造模+葛根素组与造模+葛根提取物组间也存在一定差异性 ($P=0.087$)。说明在溃疡性结肠炎情况下摄入葛根提

取物对血清和结肠 CAT 水平的提升有较显著的促进作用, 而单纯摄入葛根素纯品对提升血清和结肠 CAT 水平无显著作用。

2.8 大鼠血清和结肠超氧化物歧化酶 (SOD) 水平

水平

如图 5a 所示, 葛根素和葛根提取物均对血清 SOD 水平有显著提升作用。值得注意的是, 造模+葛根提取物组血清 SOD 水平显著高于造模+葛根素组 ($p < 0.01$)。但在结肠中, 对照组、造模组和造模+葛根提取物组间的 SOD 水平均无显著差异 (图 5b), 造模+葛根素组的结肠 SOD 水平均显著低于其他三组。

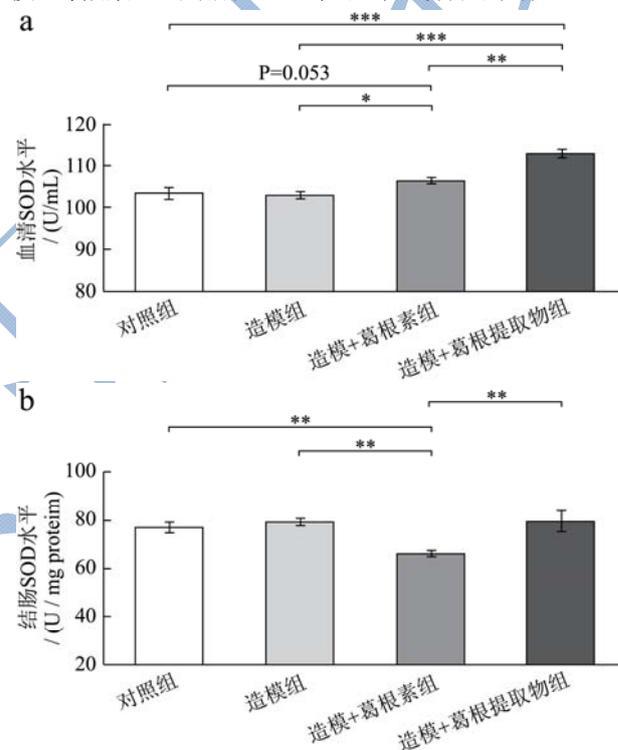


图5 大鼠血清和结肠 SOD 水平

Fig.5 SOD levels of serum and colon in colitis rats

注: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

2.9 大鼠血清和结肠谷胱甘肽过氧化物酶

(GSH-Px) 水平

由图 6a 可知, 造模组相较于正常组血清 GSH-px 水平显著下降, 而造模后连续灌胃葛根提取物使血清 GSH-px 水平恢复到了正常水平。如图 6b 所示, 溃疡性结肠炎对结肠 GSH-px 水平无显著影响, 连续灌胃葛根素后使结肠 GSH-px 水平有所下降, 但造模+葛根提取物组与正常组无显著性差异。

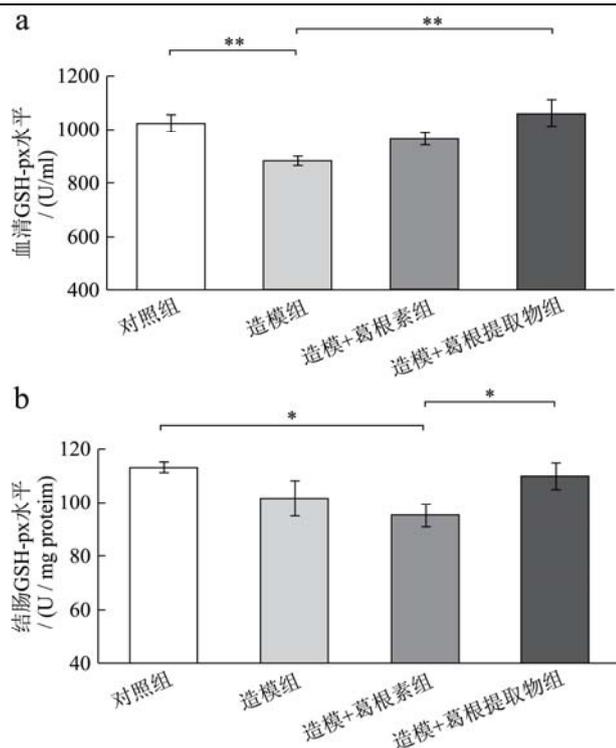


图6 大鼠血清和结肠 GSH-px 水平

Fig.6 GSH-px levels of serum and colon in colitis rats

注: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

2.10 大鼠血清和结肠丙二醛 (MDA) 水平

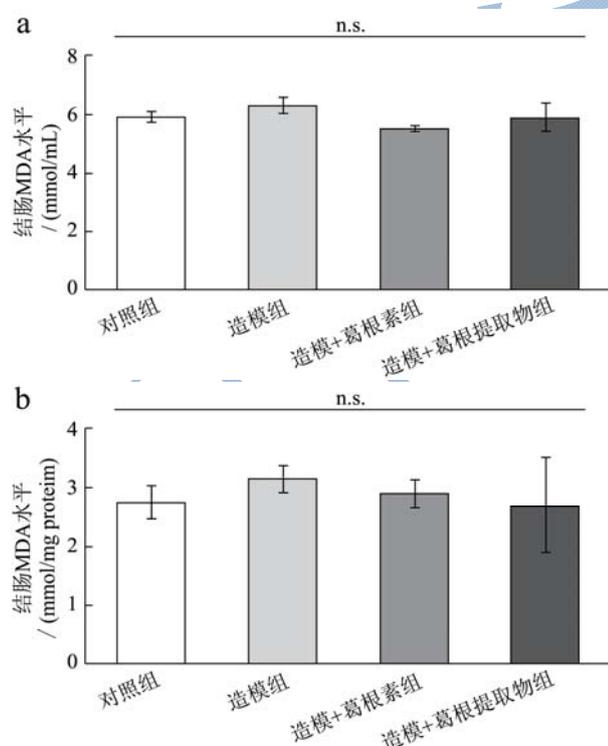


图7 大鼠血清和结肠 MDA 水平

Fig.7 MDA levels of serum and colon in colitis rats

注: n.s., 无显著性差异。

由图7可知, 四组间血清和结肠 MDA 水平均无

显著性差异, 表明溃疡性结肠炎对大鼠体内脂质氧化无显著影响, 而且葛根素和葛根提取物对血清和结肠 MDA 的含量均无显著影响。

3 结论

3.1 本实验优化工艺的实验值与数学模型在相同取值下的计算值基本吻合, 表明所建立的数学模型具有较好的预测性, 优化所得提取工艺稳定可行。

3.2 葛根素和葛根提取物均可使结肠炎大鼠血清 CAT 和 SOD 提高至正常水平或更高水平, 且相同情况下造模+葛根提取物组的提升效果显著高于造模+葛根素组。葛根提取物可使溃疡性结肠炎造成的血清 GSH-px 水平降低恢复正常, 但葛根素纯物质的摄入却造成了结肠 GSH-px 水平进一步降低。四组大鼠血清和结肠 MDA 水平皆无显著性差异, 说明溃疡性结肠炎对大鼠体内脂质氧化物的产生无显著影响, 同时葛根素和葛根提取物对大鼠体内脂质氧化物的产生亦无明显作用。

3.3 总而言之, 葛根素和葛根提取物均提升结肠炎大鼠的抗氧化能力, 而相较于葛根素这一单一物质而言, 葛根提取物在恢复溃疡性结肠炎大鼠血清 CAT、SOD 和 GSH-px 水平上有更好的作用。

参考文献

- [1] 黄仁术, 胡晓梦, 何惠利. 大别山野葛根异黄酮超声辅助提取工艺的响应面优化与还原力测定[J]. 中国药杂志, 2015, 50(1): 51-57
HUANG Ren-shu, HU Xiao-meng, HE Hui-li. Optimization of ultrasonic-assisted extraction techniques of isoflavones from *Pueraria lobate* (wild) ohwi in Dabie mountain by response surface methodology and reducing power measurement [J]. Chin. Pharm. J, 2015, 50(1): 51-57
- [2] 程远渡, 易有金, 易传祝, 等. 植物甾醇酯与葛根素对营养肥胖小鼠的减肥功效[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 223-228
CHENG Yuan-du, YI You-jin, YI Chuan-zhu, et al. Study on the effect of weight reducing of phytosterol ester and puerarin in nutritionally obese mice [J]. Food Science, 2015, 36(13): 223-228
- [3] Han R M, Tian Y X, Becker E M, et al. Puerarin and conjugate bases as radical scavengers and antioxidants: molecular mechanism and synergism with β -carotene [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(6): 2384-2391
- [4] Hsu F L, Liu I M, Kuo D H, et al. Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Journal

- of Natural Products, 2003, 66(6): 788-92
- [5] Zhou Y X, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects [J]. *Phytotherapy Research*, 2014, 28(7): 961-975
- [6] Zhang F, Wang Z, Li M, et al. Puerarin attenuates smoke inhalation injury by regulation of Th1/Th2 expression and inhibition of Th17 cells in rats [J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 28(1): 546-553
- [7] Xiong F L, Sun X H, Gan L, et al. Puerarin protects rat pancreatic islets from damage by hydrogen peroxide [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 529(1-3): 1-7
- [8] 庞捷,周晓霞.超声提取等4种新方法在葛根提取中的优劣性比较[J].*海峡药学*,2012,24(12):79-80
PANG Jie, ZHOU Xiao-xia. Comparison of four kinds of new methods of ultrasonic extraction in the extraction of *Pueraria lobata* [J]. *Straits Pharmacy J*, 2012, 24(12): 79-80
- [9] 彭晓霞,张振巍.二次正交旋转组合设计法优化赤芍醇提工艺[J].*中药材*,2010,33(6):991-994
PENG Xiao-xia, ZHANG Zhen-wei. Quadratic-orthogonal-rotation-combination design for optimization of ethanol extraction craft from *Radix Paeoniae Rubra* [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2010, 33(6): 991-994
- [10] 赵勇.葛根中总黄酮的提取条件优化及含量测定[J].*氨基酸和生物资源*,2015,37(4):57-60
ZHAO Yong. Extraction and determination of total flavonoids from puerarin [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2015, 37(4): 57-60
- [11] 罗秋水,杜华英,熊建华,等.葛根异黄酮类化合物提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J].*中国食品学报*,2015, 15(2):104-110
LUO Qiu-shui, DU Hua-ying, XIONG Jian-hua, et al. Study on extraction process and antioxidant activity of isoflavones from *Pueraria lobata* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(2): 104-110
- [12] Wong K H, Li G Q, Li K M, et al. Kudzu root: Traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 134(3): 584-607
- [13] Zhang Z, Lam T N, Zuo Z. Radix Puerariae: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2013, 53(8): 787-811
- [14] Zheng G D, Lin L Z, Zhong S S, et al. Effects of puerarin on lipid accumulation and metabolism in high-fat diet-fed mice [J]. *Plos One*, 2015, 10(3): e0122925
- [15] Xu X, Ni Z, Chen Z, et al. Puerarin, isolated from *Pueraria lobata* (Willd.), protects against diabetic nephropathy by attenuating oxidative stress [J]. *Gene*, 2016, 591(2): 411-416
- [16] 张蔚.二氢黄酮苷及异黄酮苷与人体肠道细菌的相互作用研究[D].南京:南京中医药大学,2014
ZHANG Wei. Interaction studies between flavanone glycosides and isoflavone glycosides with human intestinal bacteria [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2014
- [17] 王言才,段金彪,华永庆,等.不同品种葛根中葛根素及总黄酮的含量测定[J].*时珍国医国药*,2008,19(1):132-133
WANG Yan-cai, DUAN Jin-ao, HUA Yong-qing, et al. Determination of puerarin and isoflavones in variety of *Pueraria lobate* [J]. *Shi Zhen Medicine and Materia Medica Research*, 2008, 19(1): 132-133
- [18] GB/T 22251-2008,保健食品中葛根素的测定[S]
GB/T 22251-2008, Determination of puerarin in health food [S]
- [19] 陈帅,王慧竹,薛健飞,等.响应面法优化超声提取野葛茎中葛根素的工艺[J].*广东农业科学*,2015,42(4):60-66
CHEN Shuai, WANG Hui-zhu, XUE Jian-fei, et al. Optimization process of ultrasonic-assisted extraction of puerarin from the stem of *Pueraria lobate* by response surface methodology [J]. *Journal of Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(4): 60-66
- [20] 李扬,李梦耀,袁胜,等.葛根中黄酮的提取与纯化研究[J].*应用化工*,2015,44(9):1691-1693
LI Yang, LI Meng-yao, YUAN Sheng, et al. Study on the extraction and purification of total flavones from kudzu root [J]. *Applied Chemical Industry*, 2015, 44(9): 1691-1693
- [21] 孙霞.用水浴提取法从甘葛根中提取葛根素的可行性分析[J].*当代医药论丛*,2015,13(12):159-161
SUN Xia. Feasibility analysis of extraction of puerarin from ginkgo root by water bath extraction [J]. *Contemporary Medicine Forum*, 2015, 44(9): 1691-1693
- [22] Guerra M C, Speroni E, Broccoli M, et al. Comparison between chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism [J]. *Life Sciences*, 2000, 67(24): 2997-3006
- [23] 国海东,蒋艳,上官新晨,等.葛根素的稳定性研究[J].*食品科技*,2014,39(11):229-232
GUO Hai-dong, JIANG Yan, SHANGGUAN Xin-chen, et al. Stability study of puerarin [J]. *Food Science and Technology*, 2014, 39(11): 229-232