

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2018-0569

袁惠君, 李欣, 贾鸿震, 袁毅君. 响应面法优化黄芪总黄酮提取工艺及初步纯化. 草业科学, 2019, 36(6): 1683-1692.

YUAN H J, LI X, JIA H Z, YUAN Y J. Optimization of extraction technology for total flavonoids from astragali radix by response surface methodology and their preliminary enrichment. Pratacultural Science, 2019, 36(6): 1683-1692.

响应面法优化黄芪总黄酮提取工艺 及初步纯化

袁惠君¹, 李欣¹, 贾鸿震², 袁毅君³

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃省轻工研究院有限责任公司, 甘肃 兰州 730000; 3. 天水师范学院, 甘肃 天水 741000)

摘要: 黄芪总黄酮具有抗氧化、增强机体免疫等功能, 常作为免疫增强剂添加在食品和饲料中。通过单因素试验研究乙醇体积分数、料液比和提取时间对黄芪总黄酮提取量的影响, 进一步用 Box-Behnken 法优化黄芪总黄酮最佳提取工艺, 并利用大孔吸附树脂-聚酰胺联用技术对其进行富集纯化。结果表明: 在乙醇体积分数 70%, 料液比 1:17, 提取时间 70 min 的条件下提取效果最佳, 总黄酮提取量为 $2.78 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 相对标准偏差为 1.41%。经 HPD722 大孔吸附树脂-聚酰胺联用富集纯化后, 黄芪总黄酮提取量为 $310.63 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 增加 112 倍, 其中毛蕊异黄酮含量由 $0.13 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增至 $42.56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 增加 327 倍; 芒柄花素含量由 $0.06 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增至 $7.89 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 增加 132 倍。

关键词: 黄芪; 黄酮; 单因素试验; Box-Behnken 法; 大孔吸附树脂-聚酰胺联用

中图分类号: S567.099

文献标志码: A

文章编号: 1001-0629(2019)06-1683-10

Optimization of extraction technology for total flavonoids from astragali radix by response surface methodology and their preliminary enrichment

YUAN Huijun¹, LI Xin¹, JIA Hongzhen², YUAN Yijun³

(1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, Gansu, China;

2. Gansu Research Institute of Light Industry Co. Ltd, Lanzhou 730000, Gansu, China;

3. Tianshui Normal University, Tianshui 741000, Gansu, China)

Abstract: Flavonoids in astragali radix exert biological health functions actions such as antioxidant and immune-enhancing effects. They are often added to food and feed as immunopotentiators. The effects of ethanol concentration, the solid/liquid ratio, and extraction time on the extraction content of total flavonoids (TFA) from *Astragalus membranaceus* were evaluated using single factor experiments. Furthermore, the optimum beneficiation and depuration technology of TFA was investigated with HPD722 macroporous resin-polyamide combination method. The results showed that the extraction content of TFA and relative standard deviation (RSD) were $2.78 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and 1.41%, respectively, under the conditions of 70% ethanol concentration, solid/liquid ratio of 1:17, and an extraction time of 70 min. When TFA were enriched and purified using HPD722 macroporous resin-polyamide, the extraction content of TFA was $311 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and its purity was increased 112 times. As the main component of TFA, the content of calycosin was increased 327 times from $0.13 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ to $42.56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and formononetin was increased 132 times from $0.06 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ to $7.89 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

收稿日期: 2018-10-17 接受日期: 2019-01-15

基金项目: 国家自然科学基金 (81360619)

第一作者: 袁惠君 (1974-), 女, 甘肃天水人, 副教授, 硕导, 博士, 研究方向为植物逆境生理与分子生物学。E-mail: gsyhj@163.com

通信作者: 袁毅君 (1966-), 女, 甘肃天水人, 教授, 硕导, 博士, 研究方向为中药活性成分提取分离及药理研究。E-mail: tsjoan@163.com

<http://cykx.lzu.edu.cn>

Keywords: *Astragalus membranaceus*; flavonoids; single factor experiments; Box-Behnken method; macroporous resin-polyamide

Corresponding author: YUAN Yijun E-mail: tsjoan@163.com

中药黄芪为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 (*Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*) 或膜荚黄芪 (*A. membranaceus*) 的根^[1], 富含多糖、皂苷和总黄酮等多种生物活性成分, 其中总黄酮主要包括毛蕊异黄酮、芒柄花素及其糖苷成分, 具有抗辐射、清除氧自由基、抑菌、增强机体免疫和抗病毒等功能^[2-3], 常作为保健因子添加到食品中, 也是饲料中常用的生长免疫增强剂成分, 在水产养殖和畜牧业上被广泛应用, 具有增强免疫, 提高动物生产性能、产品品质等功效^[4]。

黄芪总黄酮提取最常规的方法是乙醇回流法^[4], 但由于不同产地药材活性成分性质的差异, 其提取工艺参数不同。单因素法和 Box-Behnken 响应面设计法是优化提取工艺研究常用的方法^[5-6], 其中响应面法是一种采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析寻求最优工艺参数的统计方法, 具有试验周期短, 回归方程精度高, 能分析多种因素交互作用等优点, 已被广泛用于各种工艺参数的优化^[5]。

总黄酮的纯化方法主要有大孔吸附树脂法、硅胶柱层析法、聚酰胺柱层析法和葡聚糖凝胶柱层析法等^[7], 其中大孔吸附树脂法因其吸附量大、解析率高、选择性强和成本低等优点成为黄酮类、生物碱等多种活性成分提取的有效方法之一^[8], 但也存在因部分黄酮不溶于水而难以富集纯化的问题^[9-11]。聚酰胺是一类以酰胺键聚合而成的高分子化合物, 主要通过大量酰胺基与黄酮类化合物的酚羟基形成氢键而进行吸附, 可除去色素和部分脂溶性化合物, 可有效弥补大孔吸附树脂的部分不足^[12-13]。

黄芪药材来源驳杂, 全国不同地方常用同属植物的根都作为黄芪, 甘肃黄芪以宕昌和陇西产的药材在外观性状和有效成分含量方面最优^[14-15], 但其详细的分离纯化工艺研究未见报道。本研究以甘肃宕昌产黄芪为材料, 通过单因素试验和响应面分析对黄芪总黄酮最佳提取工艺进行研究, 并利用 HPD722 大孔吸附树脂-聚酰胺柱层析联用法

进行富集纯化, 以期深入研究黄芪总黄酮产品的开发利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

黄芪产自甘肃省陇南市宕昌县哈达铺。芦丁纯度为 91.7%, 购自中国食品药品检定研究院。毛蕊异黄酮和芒柄花素纯度分别为 99.08% 和 99.03%, 均购自成都曼思特生物科技有限公司。乙醇、氯仿、正丁醇、 H_2O_2 、苯酚、浓硫酸等均为分析纯; 聚酰胺(过孔径 450 μm 样品筛)和 HPD722 大孔吸附树脂购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司。

1.1.2 仪器设备

电热恒温水浴锅 (HH-4 型, 京科伟永兴仪器有限公司), 高效液相色谱仪 (Agilent 1100, 美国安捷伦公司), 紫外分光光度计 (UV-1800, 日本岛津公司), 天平 (AE260, 瑞士梅特勒公司), 超纯水机 (AFX2-0501-P, 颐洋企业发展有限公司), 高速多功能粉碎机 (CXP-100, 上海市晟喜制药机械有限公司), 超声波清洗器 (SK3310LHC, 上海科导超声仪器有限公司), 远红外快速干燥箱 (766-3, 江苏省南通县金余电器配件厂), 旋转蒸发仪 (RE-5299, 巩义市予华仪器有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 黄芪总黄酮提取

黄芪药材粉碎后过孔径 450 μm 样品筛, 准确称取 2 g, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 参考预试验, 按一定料液比加入不同乙醇体积分数, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴回流提取一定时间, 过滤后定容至 25 mL, 即为黄芪总黄酮粗提液。

1.2.2 黄芪总黄酮粗提液含量测定

标准曲线制作: 称取芦丁 10 mg, 用 40% 乙醇溶解并定容至 50 mL, 即为芦丁对照品 ($0.204 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。取 10 mL 具塞比色管 7 只, 分别吸取 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 芦丁对照品, 用 40% 乙醇补至

5 mL, 混匀后加入 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液, 静置 6 min。加入 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液, 混匀后静置 6 min。最后加入 4 mL 4% NaOH 溶液, 用 40% 乙醇定容 10 mL, 混匀后静置 15 min。以 40% 乙醇为空白, 在 510 nm 处测定吸光值^[16]。以浓度 (X , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 吸光值 $A(Y)$ 为纵坐标, 绘制标准曲线, $Y=0.0122X-0.0082$, $r=0.9998$ 。芦丁含量在 5.1~61.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内具有良好的线性关系。黄芪总黄酮粗提液含量的测定同法操作。提取量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) = 粗提液中总黄酮含量/药材质量。

1.3 单因素试验

准确称取 2 g 黄芪药材粉, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 在料液比为 1:15, 提取时间 90 min, 乙醇体积分数分别为 30%、40%、50%、60%、70% 和 80% 条件下, 测定总黄酮提取量, 分析乙醇体积分数对黄芪总黄酮提取量的影响; 在乙醇体积分数为 70%, 提取时间 90 min, 料液比 ($\text{g}:\text{mL}$) 分别为 1:9、1:11、1:13、1:15、1:17、1:19 条件下, 测定总黄酮提取量, 分析料液比对黄芪总黄酮提取量的影响; 在乙醇体积分数为 70%, 料液比为 1:17, 提取时间分别为 20、40、60、80、100 和 120 min 条件下, 测定总黄酮提取量, 分析提取时间对黄芪总黄酮提取量的影响。每试验重复 3 次。

1.4 响应面试验

在单因素试验基础上, 利用 Design-Expert8.0.6.1 软件中的 Box-Behnken 设计进行响应面优化设计, 以乙醇体积分数、料液比和提取时间为响应变量, 黄芪总黄酮提取量为响应值, 设计 3 因素 3 水平, 共 17 个试验点。试验因素水平如表 1 所列。

1.5 大孔吸附树脂富集黄芪总黄酮

大孔吸附树脂预处理: 称取适量 HPD722 树脂, 用 95% 乙醇充分浸泡过夜, 除去树脂中的碎片和

杂物后乙醇湿法装柱, 用乙醇持续冲柱, 随时检查流出液, 冲至与水混合不呈白色浑浊为止, 然后用大量蒸馏水洗掉层析柱内乙醇, 备用。称取 100 g 经过预处理的 HPD722 大孔吸附树脂, 取上述最佳条件下制备的黄芪总黄酮浓缩液, 调整浓度为 0.71 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 3.0, 依据预试验, 上样速度为 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 上样体积为 3 柱床体积 (bed volume, BV), 4 BV 蒸馏水除杂, 6 BV 70% 乙醇解吸附, 收集解析液并旋转蒸发得黄芪总黄酮^[17]。

1.6 聚酰胺树脂富集黄芪总黄酮

聚酰胺预处理: 称取适量聚酰胺树脂, 用 95% 乙醇充分浸泡过夜, 乙醇湿法装柱, 用乙醇持续冲柱, 随时检查流出液, 冲至与水混合不呈白色浑浊为止, 然后用大量蒸馏水洗掉层析柱内乙醇, 备用。称取 30 g 经预处理后过孔径 450 μm 样品筛的聚酰胺, 参考预试验, 上述黄芪总黄酮以 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 上样 1 BV, 30% 乙醇 3 BV 除杂, 90% 乙醇 3 BV 解吸附, 收集解析液 60 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发得黄芪总黄酮^[18]。

1.7 毛蕊异黄酮和芒柄花素含量测定

色谱条件参考文献 [19]: 色谱柱为 Agilent TC-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) 和 0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序为 0–15 min 30% A 和 70% B, 15–35 min 65% A 和 35% B; 流速为 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长为 254 nm; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 20 μL 。

精密称取 3 份 0.1 g 纯化的黄芪总黄酮粉末, 均用流动相 A 溶解定容至 25 mL, 分别进样 20 μL 测定, 利用外标法计算黄芪总黄酮主要成分毛蕊异黄酮和芒柄花素含量。

1.8 数据统计分析

采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析 (one-

表 1 Box-Behnken 因素水平表
Table 1 Factors and levels of Box-Behnken

水平 Levels	因素 Factor		
	A 乙醇体积分数 A ethanol concentration/%	B 料液比 B solid to liquid ratio ($\text{g}:\text{mL}$)	C 提取时间 C extraction time/min
-1	60	1:15	40
0	70	1:17	60
1	80	1:19	80

way ANOVA), Design-Expert 8.0.6.1 软件进行响应面分析并绘制响应曲面图, Origin7.5 软件制图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

随着乙醇体积分数增加, 黄芪总黄酮提取量显著增加 ($P < 0.05$), 并在乙醇体积分数为 70% 时达到最大, 然后随乙醇体积分数增加而降低 (图 1a), 这是因为当乙醇体积分数为 70% 时, 黄芪总黄酮溶出趋于饱和, 随后其他醇溶性或脂溶性物质开始溶出, 从而使黄芪总黄酮提取量下降^[20]。故乙醇体积分数选择 70%。

当料液比 (g : mL) 在 1 : 9 ~ 1 : 17 范围内, 黄芪总黄酮提取量随料液比增加而增加 ($P < 0.05$), 并在料液比 (g : mL) 1 : 17 时达到峰值, 随后继续增加料液比, 因其他醇溶性杂质开始逐渐溶出, 导致黄芪总黄酮提取量反而下降 (图 1b)。因此, 料液比 (g : mL) 以 1 : 17 为最佳。

随提取时间的延长, 黄芪总黄酮提取量显著增加 ($P < 0.05$), 但在 60 min 以后提取量增幅减小 (图 1c), 表明提取时间 60 min 时大部分黄芪总黄酮已溶出, 继续延长提取时间, 可能导致黄芪总黄酮被氧化^[21]。因此, 选择最佳提取时间为 60 min。

2.2 响应面试验结果

基于表 1 响应面设计进行的试验结果如表 2 所列。通过 Design-Expert 8.0.6.1 软件进行响应面分析后得到以黄酮提取量为响应值的回归方程为 $Y = 2.72 + 0.13A + 0.076B + 0.031C - 0.027AB + 0.058AC + 0.13BC - 0.66A^2 - 0.27B^2 - 0.072C^2$ 。如表 3 所列, 二次回归模型 $P < 0.0001$, 失拟项 $P = 0.7687 > 0.05$, 决定系数 $R^2 = 0.9807$, 校正系数 $R_{adj}^2 = 0.9559$, 与决定系数 R^2 接近, 说明该模型回归显著、准确, 与试验结果拟合度良好。 F 值越大表明该变量对黄酮提取量的影响越大^[22], 因此 3 种因子对黄芪总黄酮提取量的影响依次为乙醇体积分数 > 料液比 > 提取时间。BC 交互作用显著影响黄芪总黄酮提取量 ($P < 0.05$), 而 AB、AC 交互作用不影响黄芪总黄酮的提取量 ($P > 0.05$)。

2.3 响应面分析

比较 3 组等高曲线图可知: 乙醇体积分数和料

液比对黄芪总黄酮提取量的影响显著, 表现为曲线陡峭 (图 2a、图 2b), 表明黄芪总黄酮提取量对各参数的变化较敏感; 提取时间影响不显著, 曲线表现较为平缓圆润 (图 2c), 说明黄芪总黄酮提取量对提取时间的变化不敏感^[23], 与方差分析结果相一致。

回归模型预测分析表明, 黄芪总黄酮最佳工艺条件为乙醇体积分数 71.17%, 料液比 (g : mL) 1 : 17.5, 提取时间 69.6 min, 总黄酮提取量最大预测值可达

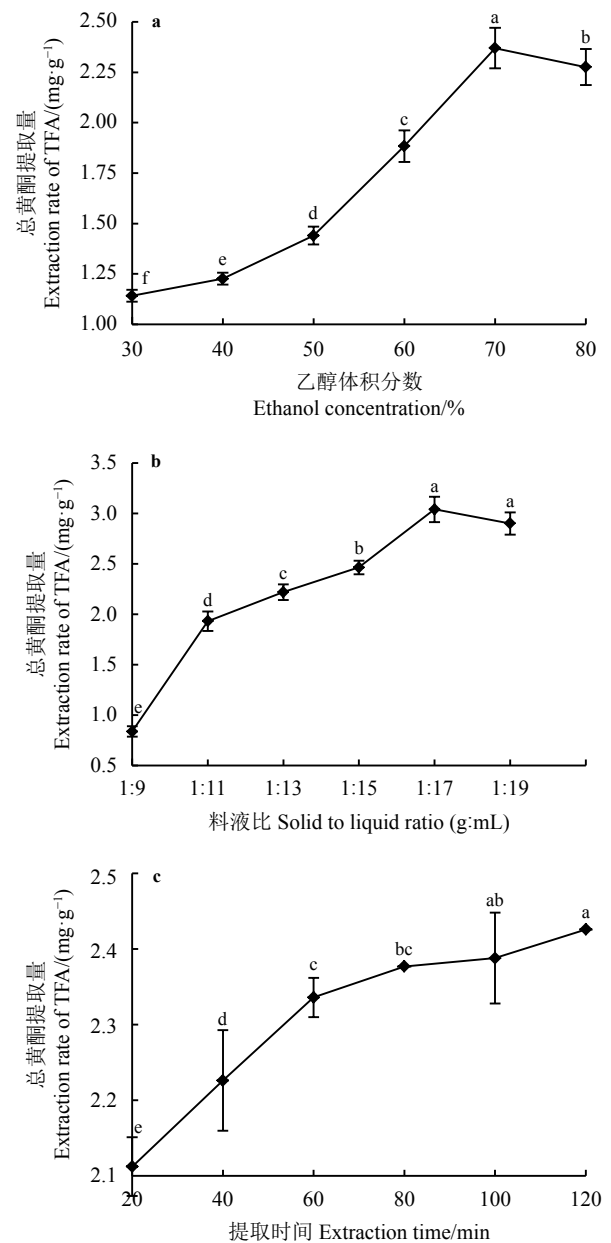


图 1 乙醇体积分数、料液比和提取时间对黄芪总黄酮提取量的影响

Figure 1 Effects of ethanol concentration, solid/liquid ratio, and extraction time on the extraction content of TFA

表 2 Behnken 试验方案及结果
Table 2 Experimental design and results with Box-Behnken

序号 Sequence number	A 乙醇体积分数 A ethanol concentration	B 料液比 B solid to liquid ratio	C 提取时间 C extraction time	总黄酮提取量 Extraction content of TFA/(mg·g ⁻¹)
1	1	0	1	2.26
2	-1	0	-1	1.84
3	-1	0	1	1.86
4	0	0	0	2.72
5	0	0	0	2.71
6	0	0	0	2.82
7	-1	1	0	1.78
8	0	0	0	2.57
9	0	0	0	2.80
10	0	1	-1	2.34
11	1	1	0	1.97
12	0	-1	-1	2.44
13	0	1	1	2.58
14	-1	-1	0	1.57
15	1	0	-1	2.01
16	1	-1	0	1.87
17	0	-1	1	2.18

表 3 回归模型方差分析
Table 3 Analysis of variance of the regression model

方差来源 Sources of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
模型 Model	2.553 8	9	0.283 8	39.531 6	< 0.000 1**
<i>A</i>	0.140 5	1	0.140 5	19.567 1	0.003 1**
<i>B</i>	0.046 5	1	0.046 5	6.475 0	0.038 4*
<i>C</i>	0.007 8	1	0.007 8	1.088 4	0.331 5
<i>AB</i>	0.003 0	1	0.003 0	0.421 4	0.536 9
<i>AC</i>	0.013 2	1	0.013 2	1.842 5	0.216 8
<i>BC</i>	0.062 5	1	0.062 5	8.707 3	0.021 4*
<i>A</i> ²	1.831 3	1	1.831 3	255.135 7	< 0.000 1**
<i>B</i> ²	0.300 2	1	0.300 2	41.818 1	0.000 3**
<i>C</i> ²	0.021 8	1	0.021 9	3.040 9	0.124 7
残差 Residual	0.050 2	7	0.007 2		
失拟项 Lack of fit	0.011 3	3	0.003 8	0.388 0	0.768 7
纯误差 Pure Error	0.038 9	4	0.009 7		
总离差 The total deviation	2.604 0	16			

$$R^2 = 0.980 7, R_{adj}^2 = 0.955 9$$

**和*分别表示差异达极显著水平($P < 0.01$)和显著水平($P < 0.05$)。

** and * indicate significant differences among different treatments at 0.01 and 0.05 level.

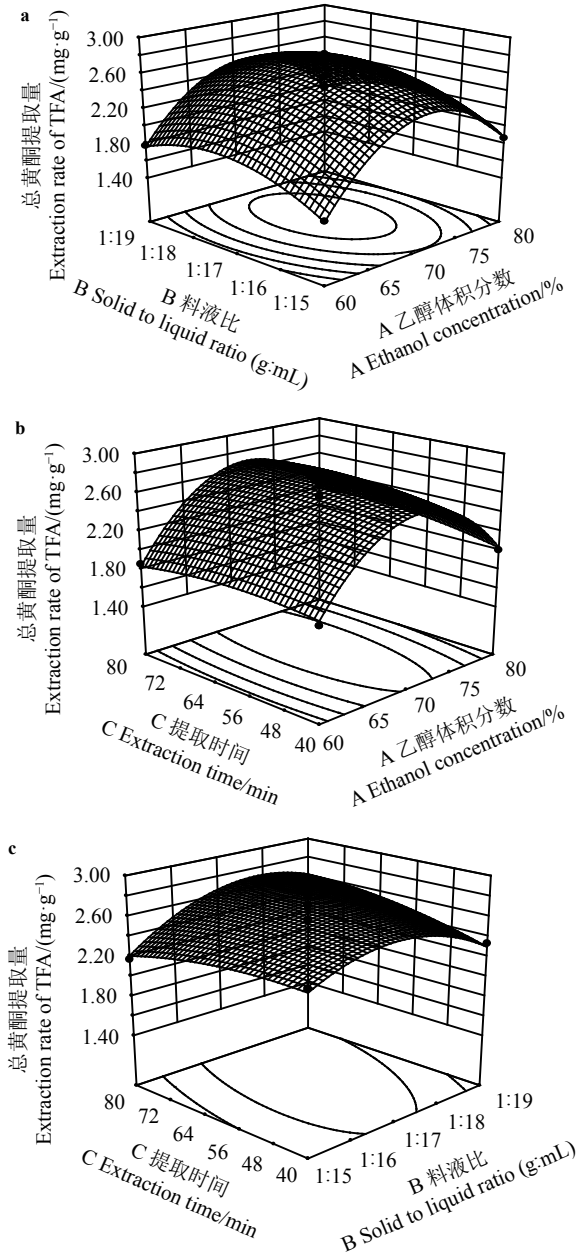


图 2 两因素交互作用的响应面分析

Figure 2 Response surface of three interacting factors

到 $2.75 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。为方便实际操作，将最优条件简化为乙醇体积分数 70%，料液比 (g : mL) 1 : 17，提取时间 70 min，该条件下进行 3 次平行验证试验，黄芪

总黄酮提取量达到 $2.78 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (表 4)，RSD 为 1.41%，与模型预测值误差为 1.09%。说明该模型可较好地预测黄芪总黄酮提取量，优化结果可靠，可用于指导黄芪总黄酮的提取工艺。

2.4 黄芪总黄酮主要组分的含量

经过 HPD722 大孔吸附树脂和聚酰胺联用富集后，黄芪总黄酮提取量可达 $310.63 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，富集 112 倍，回收率分别为 94.11% 和 80.19%；其主要组分毛蕊异黄酮和芒柄花素含量分别为 42.56 和 $7.89 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，分别富集 327 倍和 132 倍。

3 讨论与结论

由于黄芪黄酮已在保健品、饲料方面被广泛应用，其提取工艺研究已有文献报道。肖卫华等^[24]最先用响应面法研究了黄芪总黄酮提取工艺，在提取温度 $75 \text{ }^\circ\text{C}$ ，提取时间 2.5 h，乙醇体积分数 88.3%，液固比 $25 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 条件下，提取量为 $0.98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。最近，刘少静等^[4]用单因素和正交试验的研究表明，在乙醇体积分数 85%，料液比 (g : mL) 1 : 20，温度 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 回流提取 2.5 h 条件下，黄芪总黄酮提取量可达 $2.39 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。但上述工艺的提取量均低于本研究的 $2.78 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，可见该工艺具有一定的推广应用价值。

正交设计和均匀设计是在天然产物分离纯化工工艺研究方面应用较多的传统设计方法。正交设计能在尽量减少试验次数的情况下在多因素多水平组合中找出最佳因素水平组合，但不能给出因素和响应值之间明确的函数表达式，也不能全面地反映各因素之间的交互作用^[25]。均匀设计最大化地追求均匀性达到减少试验次数为目的，但是当试验次数少于因素个数时，采用多重回归的方法来研究响应变量随自变量的变化的回归方程就不是唯一的，而且其在试验设计时不考虑全部交互作用，只有通过回归分析时引入因素之间的交叉乘积项等

表 4 黄芪总黄酮主要组分的含量

Table 4 Content of the main components in TFA of *Astragalus membranaceus*

材料 Material	总黄酮提取量 Extraction content of TFA/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	毛蕊异黄酮含量 Extraction content of calycosin/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	芒柄花素含量 Extraction content of formononetin/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
原药材 Raw material	2.78 ± 0.04	0.13 ± 0.09	0.06 ± 0.21
制备品 Preparation	310.63 ± 6.52	42.56 ± 9.46	7.89 ± 3.52

来进行探索, 因此, 其结果不够稳定^[5,25]。本研究采用 Box-Behnken 设计, 共重复 5 个中心点, 充分考虑了各因素间及各因素与响应值间的相互作用, 提高了试验精度, 验证试验结果与模型预测值误差仅为 1.09%。本研究中乙醇体积比对提取结果的影响大于料液比, 与刘少静等^[4]的研究结果一致。

大孔吸附树脂和聚酰胺均是分离纯化总黄酮类物质的常用材料, 但其吸附机理不同, 各有优缺点^[26]。严柳叶等^[27]和丁艳霞等^[28]的研究表明, 单纯利用上述任何一种材料分离纯化, 总黄酮富集纯化效果均不及大孔吸附树脂和聚酰胺柱层析联用。本研究选用 HPD722 弱极性大孔吸附树脂和聚酰胺进行联用富集, 充分发挥了 HPD722 的弱极性与黄酮分子内疏水部分有较强吸附作用的特点, 以及聚酰胺可截留黄芪色素和部分脂溶性成分, 且经

过水洗可除去部分水溶性杂质等特点, 较好地结合了两者的优势, 得到良好的纯化效果。本研究通过单因素试验, 研究了乙醇体积分数、料液比和提取时间对黄芪总黄酮提取量的影响, 并采用响应面分析法对提取工艺进行优化, 建立了回归模型, 表明在乙醇体积分数 70%, 料液比 (g : mL) 1 : 17, 80 °C 提取 70 min 的条件下, 黄芪总黄酮提取量可达 2.78 mg·g⁻¹; 经过 HPD722 大孔吸附树脂和聚酰胺大孔吸附树脂联用富集后, 黄芪总黄酮提取量可达 310.63 mg·g⁻¹, 高于其他文献报道^[29], 富集倍数为 112; 其主要组分毛蕊异黄酮和芒柄花素含量分别为 42.56 mg·g⁻¹ 和 7.89 mg·g⁻¹, 富集倍数分别为 327 倍和 132 倍。上述结果表明, 该提取工艺和富集纯化方法合理, 可为黄芪总黄酮的提取和工业化生产提供参考。

参考文献 References:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一). 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 284.
National Pharmacopoei Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part I). Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010: 284.
- [2] 刘月涛, 贾璐, 秦雪梅. 多效黄芪物质基础的研究进展. 中草药, 2018, 49(6): 1476-1480.
LIU Y T, JIA L, QIN X M. Research advances of material basis of multi-effect *Astragali radix*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(6): 1476-1480.
- [3] 游庭活, 刘凡, 温露, 邹宇晓, 廖森泰. 黄酮类化合物抑菌作用研究进展. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3645-3649.
YOU T H, LIU F, WEN L, ZOU Y X, LIAO S T. Advance in studies on antibacterial effect of flavonoids. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(21): 3645-3649.
- [4] 刘少静, 盛耀光, 马晓娇, 万凤凤, 杨黎彬. 黄芪中总黄酮的提取纯化工艺研究. 化学工程师, 2018(5): 9-12.
LIU S J, SHENG Y G, MA X J, WAN F F, YANG L B. Optimization of the extraction and purification technologies of total flavonoids from *Radix astragali*. Chemical Engineer, 2018(5): 9-12.
- [5] 余小翠, 刘高峰. 响应面分析法在中药提取和制备工艺中的应用. 中药材, 2010, 33(10): 1651-1655.
YU X C, LIU G F. Application of response surface analysis in extraction and preparation of traditional Chinese medicine. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2010, 33(10): 1651-1655.
- [6] 陈况况, 帕塔尔·尼牙孜, 章宏慧, 刘东红, 叶兴乾. 响应面法优化水芹黄酮提取工艺及其成分研究. 中国食品学报, 2014, 14(11): 83-89.
CHEN K K, Pataer-Niyazi, ZHANG H H, LIU D H, YE X Q. Optimization of flavonoids extraction from *Oenanthe javanica* by response surface methodology and the study on chemical compositions. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(11): 83-89.
- [7] 李静, 张朝辉, 段筱杉, 应锐. 聚酰胺-大孔树脂联用纯化大叶藻黄酮. 食品科技, 2016, 41(3): 203-207.
LI J, ZHANG Z H, DUAN X S, YING R. Purification of flavonoids from *Zostera marina* L. with polyamide-macroporous resin. Food Science and Technology, 2016, 41(3): 203-207.
- [8] 王冬, 关宏峰, 刘晓秋. 中药中重金属和残留农药去除方法研究进展. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(2): 152-155.

- WANG D, GUAN H F, LIU X Q. Research progress on techniques of removing heavy metals and pesticides from traditional Chinese medicine. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2009, 26(2): 152-155.
- [9] 张蕾, 廖琼峰, 谢智勇, 冯志强, 曾元儿. 聚酰胺-大孔树脂联用富集苦参总黄酮. *中草药*, 2011, 42(10): 1968-1972.
- ZHANG L, LIAO Q F, XIE Z Y, FENG Z Q, ZENG Y E. Enrichment of total flavonoids from *Sophora flavescens* with polyamidemacroporous resin. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2011, 42(10): 1968-1972.
- [10] 刘鄂湖, 鄢丹, 蔡光明, 肖小河, 夏新华. 大孔吸附树脂技术在中药中应用现存问题分析与探讨. *中草药*, 2007, 38(5): I0003-I0005.
- LIU E H, YAN D, CAI G M, XIAO X H, XIA X H. Issues analysis and discussion on application of macroporous adsorbing resins in traditional Chinese medicine. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2007, 38(5): I0003-I0005.
- [11] 张俊, 李进, 吕海英, 马雪. 响应面法优化扁桃果皮熊果酸的纯化工艺. *食品与发酵工业*, 2017, 43(10): 170-176.
- ZHANG J, LI J, LYU H Y, MA X. Optimization of purification process for ursolic acid from *Amygdalus communis* L. peel by response surface methodology. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(10): 170-176.
- [12] ZHANG J, HAYAT K, ZHANG X M, ZHANG X M, TONG J M, XIA S Q. Separation and purification of flavonoid from ginkgo extract by polyamide resin. *Separation Science and Technology*, 2010, 45(16): 2413-2419.
- [13] 金慧鸣, 郭红英, 谭兴和, 刘梦浩, 王锋, 蔡文, 张喻, 邓洁红. 大孔吸附树脂-聚酰胺联用纯化茅莓总黄酮工艺优化. *食品科学*, 2016, 37(12): 13-18.
- JIN H M, GUO H Y, TAN X H, LIU M H, WANG F, CAI W, ZHANG Y, DENG J H. Purification of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* by combined use of macroporous adsorption resin and polyamide. *Food Science*, 2016, 37(12): 13-18.
- [14] 林丽, 杨扶德, 李硕, 张毅. 甘肃7个不同产地蒙古黄芪质量的比较研究. *湖南中医药大学学报*, 2009, 29(4): 24-26.
- LIN L, YANG F D, LI S, ZHANG Y. Quality comparison of *Radix astragali* from seven regions of Gansu. *Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan*, 2009, 29(4): 24-26.
- [15] 包强, 刘丽梅, 王瑞海, 叶迎, 柏冬, 刘卫东, 田生华. 甘肃不同产地黄芪和红芪药材中总黄酮含量对比研究. *中药材*, 2016(10): 2281-2284.
- BAO Q, LIU L M, WANG R H, YE Y, BAI D, LIU W D, TIAN S H. Comparative study on total flavonoid content between *Radix astragali* and *Radix hedysari* from different regions of Gansu. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2016(10): 2281-2284.
- [16] 白生文, 汤超, 田京, 闫宏斐, 许晓莎, 范惠玲. 沙棘果渣总黄酮提取工艺及抗氧化活性分析. *食品科学*, 2015, 36(10): 59-64.
- BAI S W, TANG C, TIAN J, YAN H F, XU X S, FAN H L. Extraction and antioxidant activity of total flavonoids from sea buckthorn pomace. *Food Science*, 2015, 36(10): 59-64.
- [17] 吴博, 刘春梅, 刘冰, 赵旭, 毕开顺, 贾英. 益智总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺研究. *中草药*, 2015, 46(9): 1321-1325.
- WU B, LIU C M, LIU B, ZHAO X, BI K S, JIA Y. Purification technology for flavone from *Alpiniae oxyphyllae* Fructus with macroporous resins. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2015, 46(9): 1321-1325.
- [18] 林春梅. 聚酰胺层析法分离纯化牛蒡叶中的总黄酮. *食品与发酵工业*, 2014, 40(2): 236-238.
- LIN C M. Separation and purification of total flavones in burdock leaves by polyamide column. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(2): 236-238.
- [19] 李涛, 刘晓璠, 杨小兰. 啤酒花总黄酮测定方法的比较研究. *食品科学*, 2014, 35(18): 89-92.
- LI T, LIU X F, YANG X L. Comparative study on assays for determination of flavonoids in hops (*Humulus lupulus* L.). *Food Science*, 2014, 35(18): 89-92.
- [20] 陈红梅, 谢翎. 响应面法优化半枝莲黄酮提取工艺及体外抗氧化性分析. *食品科学*, 2016, 37(2): 45-50.
- CHEN H M, XIE L. Optimization of extraction process for flavonoid from *Soutellaria barbata* by response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity. *Food Science*, 2016, 37(2): 45-50.
- [21] 刘玉芬, 夏海涛. 响应面法优化碱蒿黄酮提取工艺及其体外抗氧化作用. *食品科学*, 2012, 33(12): 63-68.
- LIU Y F, XIA H T. Optimization of extraction process for flavonoids from *Artemisia anethifolia* Web. ex Stechm by response

- surface methodology and evaluation of their antioxidant activity. *Food Science*, 2012, 33(12): 63-68.
- [22] 宋思圆, 苏平, 王丽娟, 邹明明, 孙昕. 响应面法优化超声提取黄秋葵花果胶多糖工艺及其体外抗氧化活性. *食品科学*, 2017, 38(2): 283-289.
- SONG S Y, SU P, WANG L J, ZOU M M, SUN X. Optimization of ultrasonic-assisted extraction by response surface methodology and antioxidant activities of pectic polysaccharide from okra flowers. *Food Science*, 2017, 38(2): 283-289.
- [23] 张丙云, 孙莉, 黄艳, 郭涛, 王雅. 响应面法优化竹叶椒总木脂素的超声提取工艺. *食品工业科技*, 2014, 35(7): 198-201.
- ZHANG B Y, SUN L, HUANG Y, GUO T, WANG Y. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total lignans from *Zanthoxylum armature* DC. by response surface methodology. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(7): 198-201.
- [24] 肖卫华, 韩鲁佳, 杨增玲, 刘贤. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究. *中国农业大学学报*, 2007, 12(5): 52-56.
- XIAO W H, HAN L J, YANG Z L, LIU X. Optimization of alcohol extraction techniques of flavonoids from *Radix astragali* using response surface methodology. *Journal of China Agricultural University*, 2007, 12(5): 52-56.
- [25] 田彦芳, 万海同, 朱紫焯, 郑平平, 虞立, 何昱. 基于熵权法的多目标筛选甘草黄酮类成分纯化工艺. *中草药*, 2016, 47(7): 1118-1125.
- TIAN Y F, WAN H T, ZHU Z Y, ZHENG P P, YU L, HE Y. Multi-objective optimization of purification technology for licorice flavonoids based on entropy-weight method. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2016, 47(7): 1118-1125.
- [26] 杨超, 刘冬恋, 谭林, 杨春梅, 牟倩云. 聚酰胺-大孔树脂联用富集桑叶总黄酮工艺研究. *食品研究与开发*, 2016, 37(8): 45-48.
- YANG C, LIU D L, TAN L, YANG C M, MOU Q Y. Enrichment of total flavonoids of mulberry leaves with polyamide-macroporous resin. *Food Research and Development*, 2016, 37(8): 45-48.
- [27] 严柳叶, 罗锡平, 阮晓, 杨性民, 王强. 红豆杉叶氯仿萃余相中黄酮类化合物的分离纯化. *中国食品学报*, 2014, 14(1): 145-150.
- YAN L Y, LUO X P, RAN X, YANG X M, WANG Q. Separation and purification of flavonoids from remainder extracts of *Taxus chinensis* leaves. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(1): 145-150.
- [28] 丁艳霞, 郭洋静, 曾令莲, 李钦. 聚酰胺-大孔树脂联用富集杜仲雄花总黄酮. *河南大学学报(医学版)*, 2013, 32(4): 242-246.
- DING Y X, GUO Y J, ZENG L L, LI Q. Enrichment of total flavonoids from male flowers of *eucommialmoides-oliv* with polyamide-macroporous resin. *Journal of Henan University (Medical Science)*, 2013, 32(4): 242-246.
- [29] 王治平, 高英, 李卫民, 刘杰. 大孔吸附树脂纯化黄芪总黄酮和总皂苷的研究. *中药材*, 2010, 33(7): 1163-1166.
- WANG Z P, GAO Y, LI W M, LIU J. Study on purification of total flavonoids and saponin of *Astragalus* with macroporous resin. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2010, 33(7): 1163-1166.

(责任编辑 武艳培)