



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150192

微波辅助双水相萃取黄芪茎总皂苷及其抗氧化活性

钟方丽¹, 王文姣^{1,2}, 王晓林¹, 曹野¹

(1. 吉林化工学院化学与制药工程学院, 吉林 132022; 2. 吉林大学化学学院, 长春 130012)

摘要: 采用微波辅助双水相萃取法研究了黄芪茎总皂苷的萃取工艺条件及其体外抗氧化活性. 采用单因素和正交实验对黄芪茎总皂苷的萃取工艺进行优化; 通过对超氧阴离子自由基的清除率和还原力对其抗氧化活性进行评价. 得到微波辅助双水相萃取黄芪茎总皂苷的最佳工艺条件: 料液比(g:mL)为 1:30, 微波功率为 500 W, 醇水体积比(mL:mL)为 0.77, 萃取时间为 10 min, 硫酸铵质量浓度为 0.24 g/mL; 双水相萃取工艺对黄芪茎总皂苷的富集倍数为 2.39; 黄芪茎总皂苷提取液的抗氧化活性随提取液质量浓度的增加而逐渐提高, 但其抗氧化活性低于 VC. 优化后的微波辅助双水相萃取黄芪茎总皂苷的工艺比较稳定, 黄芪茎总皂苷提取液具有一定的抗氧化活性.

关键词: 黄芪茎; 总皂苷; 双水相萃取; 抗氧化活性

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2016)05-0025-05

Microwave Assisted Aqueous Two-phase Extraction of Total Saponins from Astragalus Stem and the Antioxidant Activity of the Extracts

ZHONG Fangli¹, WANG Wenjiao^{1,2}, WANG Xiaolin¹, CAO Ye¹

(1. School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China;
2. School of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract: Microwave assisted aqueous two-phase extraction was applied to extract the total saponins in *Astragalus* stems and the antioxidant ability of the extracts in vitro was also investigated. Both single factor and orthogonal tests were employed to optimize the extraction technology. The antioxidant ability of the extraction solution was evaluated according to its scavenging activity and reducing power for superoxide anion free radical. The optimal feed liquid ratio, the microwave power, the ratio between ethanol and water, extraction time and mass concentration of ammonium sulfate were 1:30(g:mL), 500 W, 0.77(mL:mL), 10 min and 0.24 g/mL, respectively. The concentration of the total saponins in *Astragalus* stems was enriched 2.39 times with aqueous two-phase extraction. The antioxidant activity was gradually enhanced with the increase of mass concentration of extract solution, but it was inferior to that of VC solution. This new technology is stable and the extraction solution has certain antioxidant activity.

Key words: *Astragalus* stems; total saponins; aqueous two-phase; antioxidant activity

黄芪为多年生草本植物, 株高 1 m 左右, 主要产自我国东北、华北及西北等地区, 生于林缘、灌丛或疏林下, 性喜凉爽, 耐寒耐旱, 我国各地多有栽培, 为常用中药材之一. 黄芪传统应用部位是黄芪的根, 广泛应用于药品、保健食品、功能饮料等工业中, 具有补气升阳、生津养血、益胃固表之功效^[1]. 目前, 对于黄芪化学成分、药理作用的研究越来越多^[2-3], 而黄芪茎一直作为废物被弃掉, 其产量远高于黄芪根^[4].

近年来, 有关于黄芪茎的化学成分、药理作用的研究工作日渐深入^[5-7], 其在医药、食品、农业等领域已开始应用^[8], 对黄芪茎展开持续、深入的研究可以使其得到更为广泛的利用.

双水相体系是一种具有工艺条件温和、生物亲和性好等优点的新型分离技术, 已应用于天然产物中活性物质的分离^[9]. 聚乙二醇-无机盐体系为传统的双水相萃取体系, 但聚乙二醇回收利用较困难. 而乙醇

收稿日期: 2015-11-05; 修回日期: 2016-01-07

作者简介: 钟方丽(1970—), 女, 山东安丘人, 教授; 通信作者: 王晓林, 副教授, wangxiaolin69@eyou.com.

与无机盐和水以适当浓度混合时,亦能形成双水相体系^[10],该双水相水体系能够克服传统双水相体系相分离时间长的缺点,而且价格低廉,溶剂易于回收利用^[11-12].其中,乙醇-硫酸铵双水相提取体系已广泛应用于天然植物中活性成分的提取^[13].而微波辐射能使植物细胞结构松散,对中药材的细胞产生膨爆作用,可以缩短提取时间、利于目标成分的溶出^[14].本实验将微波与双水相体系相结合^[15]用于萃取黄芪茎总皂苷,并考察黄芪茎总皂苷提取液的体外抗氧化活性,旨在为黄芪茎的合理开发提供依据.

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

黄芪茎,吉林省均林中草药种植有限公司;黄芪甲苷对照品,中国食品药品检定研究院;三羟甲基氨基甲烷,天津市科密欧化学试剂有限公司;香草醛,天津市光复精细化工研究所;水为重蒸馏水;石油醚、冰醋酸、高氯酸、硫酸铵、铁氰化钾、无水乙醇等均为国产分析纯试剂.

1.2 仪器与设备

TU-1810 型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;MAS-II 型常压微波辐射萃取仪,上海新仪微波化学科技有限公司;FA2004N 型电子天平,上海精密科学仪器有限公司;KQ118 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;DHG-9076A 型电热鼓风干燥器,上海精密实验设备有限公司.

1.3 线性关系考察及样品中总皂苷含量的测定

精密称取经 70 °C 减压干燥至质量恒定的黄芪甲苷对照品 2.5 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用无水乙醇溶解并定容至刻度.精密吸取 0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 黄芪甲苷对照品溶液,分别置于具塞试管中,蒸干,各加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液(现用现配)0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,65 °C 水浴中加热 15 min 后取出,冷却至室温,各加冰醋酸至 5 mL,摇匀,30 min 内以不加黄芪甲苷对照品溶液的试剂作为空白对照,按照分光光度法,在 560 nm 处测定吸光度^[16].吸取黄芪茎提取液适量,按上述方法进行显色,测定其吸光度,计算提取液中总皂苷的含量.

1.4 单因素实验

1.4.1 醇水体积比对萃取率的影响

设定双水相总体积为 50 mL,加入硫酸铵 13.5 g,分别设定醇水体积比为 0.47、0.57、0.67、

0.77、0.87,形成稳定的双水相体系,加入脱脂的黄芪茎粉 2 g,于微波功率 500 W 提取 5 min,过滤,滤液于分液漏斗中静置分层,上层乙醇相以相应浓度的乙醇溶液定容,下相用无水乙醇析盐,过滤后以无水乙醇定容至 50 mL,吸取上、下相溶液各适量^[17],按 1.3 方法测定总皂苷含量,计算总皂苷萃取率.

$$\text{总皂苷萃取率} = \frac{m_1}{m_1 + m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_1 为上层乙醇相中总皂苷质量, g; m_2 为下层水相中总皂苷质量, g.

1.4.2 硫酸铵质量浓度对萃取率的影响

双水相总体积为 50 mL,选择醇水体积比为 0.77,分别加入硫酸铵 7.5、10.5、13.5、16.5、19.5 g,硫酸铵质量浓度分别为 0.15、0.21、0.27、0.33、0.39 g/mL,形成稳定的双水相体系,然后按 1.4.1 方法计算总皂苷萃取率.

1.4.3 微波萃取时间对萃取率的影响

双水相总体积为 50 mL,选择醇水体积比为 0.77,硫酸铵质量浓度为 0.21 g/mL,形成稳定的双水相体系,微波萃取时间分别为 1、5、10、15、20、25 min,然后按 1.4.1 方法计算总皂苷萃取率.

1.4.4 料液比(g : mL)对萃取率的影响

醇水体积比为 0.77,料液比分别设定为 1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 40,硫酸铵质量浓度为 0.21 g/mL,微波功率为 500 W,微波萃取 10 min,然后按 1.4.1 方法计算总皂苷萃取率.

1.4.5 微波功率对萃取率的影响

醇水体积比为 0.77,料液比为 1 : 30,硫酸铵质量浓度为 0.21 g/mL,形成稳定的双水相体系,设定微波功率分别为 300、400、500、600、700、800 W,微波萃取 10 min,按 1.4.1 方法计算总皂苷萃取率.

1.5 正交实验

在单因素实验基础上选取萃取时间、料液比、硫酸铵质量浓度、微波功率 4 个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交设计,进一步考察各因素对黄芪茎总皂苷萃取率的影响.

1.6 工艺验证性实验

为了考察上述优选的微波辅助双水相萃取工艺的稳定性,按优化的萃取工艺条件,即醇水体积比为 0.77、微波萃取时间 10 min、料液比 1 : 30,硫酸铵质量浓度为 0.24 g/mL,微波功率为 500 W,重复实验 3 次,计算总皂苷萃取率.同时将上层乙醇相制成干浸膏,测定干浸膏中总皂苷的含量.

1.7 对比实验

称取脱脂处理后的黄芪茎粉 2 g,以醇水体积比 0.77 加入乙醇水溶液 60 mL,设定微波功率为 500 W,微波辅助提取 10 min,过滤,滤液制成干浸膏,测定干浸膏中总皂苷的含量。

1.8 体外抗氧化性实验

1.8.1 清除超氧阴离子自由基测定

将黄芪茎总皂苷提取液分别配制成质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL 的供试品溶液,待用。吸取 4.0 mL Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.2)分别置于 10 mL 试管中,于 25 °C 水浴中预热 20 min,分别加入 2.0 mL 不同质量浓度的黄芪茎总皂苷提取液和 30 mmol/L 邻苯三酚溶液 2.0 mL,混匀后于 25 °C 水浴中反应 5 min,加入 10 mmol/L HCl 溶液 1.0 mL 终止反应,以 Tris-HCl 缓冲液为空白,于波长 320 nm 处测其吸光度 A_1 ;其他条件不变,用同体积蒸馏水替代测定 A_1 实验中的邻苯三酚溶液,于 320 nm 波长处测其吸光度 A_2 ;其他条件不变,用同体积蒸馏水替代测定 A_1 实验中的黄芪茎总皂苷提取液,于 320 nm 波长处测其吸光度 A_3 。

将 VC 配制成质量浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL 的对照液,同上操作。按照式(2)计算黄芪茎总皂苷提取液、VC 溶液对超氧阴离子自由基的清除率^[18]。

$$\text{清除率} = \frac{A_3 - A_1 + A_2}{A_3} \times 100\% \quad (2)$$

1.8.2 还原力测定

分别吸取 1.8.1 节不同质量浓度的黄芪茎总皂苷提取液 1.0 mL,置于 10 mL 具塞试管中,加入磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 6.6) 2.5 mL 和 1% 铁氰化钾溶液 2.5 mL,混合均匀后将该体系置于 50 °C 恒温水浴中恒温 20 min,迅速冷却,加入 10% 的三氯乙酸溶液 1.0 mL,5 000 r/min 离心 10 min,移取 2.5 mL 上清液于另一试管中,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 三氯化铁溶液,混匀,静置 10 min,以 80% 的乙醇溶液为空白,在 700 nm 波长处测定吸光度 A ^[19]。其他条件不变,用蒸馏水替代上步测定吸光度 A 实验中的黄芪茎总皂苷提取液,在 700 nm 波长处测定吸光度 A_0 , A 与 A_0 的差值越大表示供试品溶液的还原能力越强。

将 VC 配制成质量浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 mg/mL 的对照溶液,同上操作。按照式(3)计算黄芪茎总皂苷提取液、VC 溶液的还原力。

$$\text{还原力} = A - A_0 \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 黄芪甲苷的标准曲线

以黄芪甲苷对照品溶液的吸光度为纵坐标,质量浓度(mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $y = 3.366x - 0.0055$, $R^2 = 0.9991$ 。结果表明黄芪甲苷在 0.05 ~ 0.175 mg/mL 范围内呈良好线性关系。

2.2 单因素实验

2.2.1 醇水体积比对萃取率的影响

醇水体积比对萃取率的影响结果如图 1 所示。当醇水体积比在 0.47 ~ 0.87 范围内,总皂苷萃取率先随着醇水体积比的增大而逐渐提高,但萃取率的提高幅度较小;当醇水体积比为 0.77 时,萃取率达到最高值 84.58%,继续增加醇水体积比,萃取率开始下降。整体而言,在 0.47 ~ 0.87 范围内醇水体积比对总皂苷萃取率的影响不是很显著。

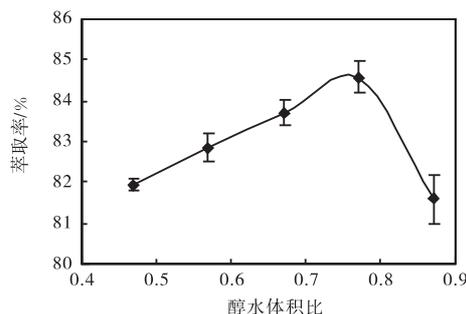


图 1 醇水体积比对萃取率的影响

Fig. 1 Influence of ratio between ethanol and water on extraction efficiency

2.2.2 硫酸铵质量浓度对萃取率的影响

硫酸铵质量浓度对萃取率的影响如图 2 所示。硫酸铵质量浓度在 0.15 ~ 0.39 g/mL 范围内,总皂苷萃取率先增大后开始逐渐降低。当硫酸铵质量浓度为 0.21 g/mL 时,总皂苷萃取率达到最高值 85.64%;当硫酸铵质量浓度超过 0.21 g/mL 后,可能是水相产生了一定的盐析效应而使萃取率开始下降。

2.2.3 微波萃取时间对萃取率的影响

微波萃取时间对萃取率的影响结果如图 3 所示,随萃取时间的延长,总皂苷的萃取率先逐渐增大后开始降低,当萃取时间达到 10 min 时萃取率达到最高值 86.76%。这可能是因为萃取时间短,萃取不完全,从而导致萃取率低;而如果萃取时间过长,某些皂苷类化合物受热结构被破坏,从而导致萃取率下降。

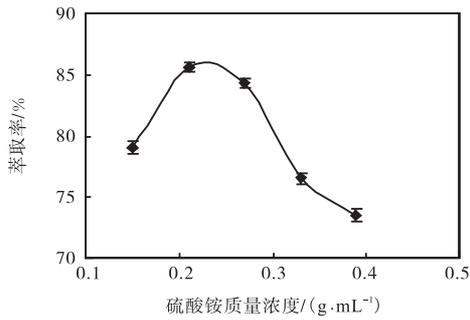


图2 硫酸铵质量浓度对萃取率的影响

Fig. 2 Influence of mass concentration of ammonium sulfate on extraction efficiency

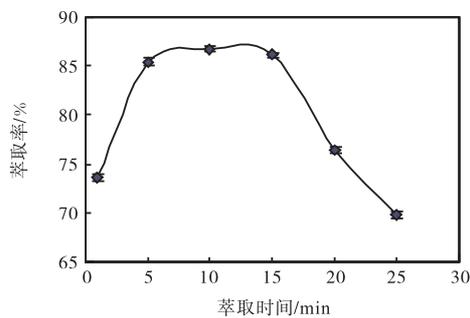


图3 萃取时间对萃取率的影响

Fig. 3 Influence of extraction time on extraction efficiency

2.2.4 料液比(g : mL)对萃取率的影响

料液比对萃取率的影响结果如图 4 所示. 当料液比在 1 : 10 ~ 1 : 30 范围内, 总皂苷的萃取率开始随着料液比的提高而增大, 当料液比达到 1 : 20 时, 萃取率达到 86.07%; 继续提高料液比, 总皂苷的萃取率缓慢增加, 当料液比达到 1 : 30 时, 萃取率达到最大值 88.60%; 再继续增大料液比, 黄芪茎总皂苷的萃取率变化不明显, 且略有下降. 这可能是因为随着料液比的增大, 提取溶剂用量增大, 溶剂与黄芪茎粉末之间接触面积增大, 利于黄芪茎总皂苷的溶出, 导致黄芪茎总皂苷的萃取率逐渐提高. 如果继续增大料液比, 会使提取溶剂用量进一步增大, 对总皂苷产生了稀释作用^[20], 从而使黄芪茎总皂苷的萃取率略有下降.

2.2.5 微波功率对萃取率的影响

微波功率对萃取率的影响结果如图 5 所示. 开始时黄芪茎总皂苷的萃取率随着微波功率的增加而逐渐提高, 当微波功率为 500 W 时, 萃取率达到最高值 88.28%, 而后随着微波功率的增高而逐渐下降. 这可能是因为微波功率超过一定值以后, 短时间内会引起部分皂苷结构被破坏所造成的.

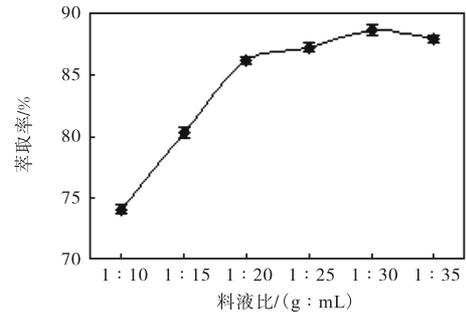


图4 料液比对萃取率的影响

Fig. 4 Influence of feed to liquid ratio on extraction efficiency

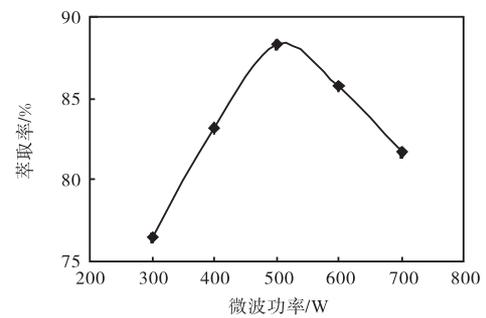


图5 微波功率对萃取率的影响

Fig. 5 Influence of microwave power on extraction efficiency

2.3 正交实验

通过单因素实验结果可知, 醇水体积比在 0.47 ~ 0.87 范围内, 总皂苷萃取率在 81.59% ~ 84.58% 范围内变化, 对萃取率影响较小, 所以在正交实验中选取微波功率(A)、硫酸铵质量浓度(B)、料液比(C)、萃取时间(D)进行 L₉(3⁴) 正交实验, 结果见表 1.

表1 正交实验结果

Tab. 1 Experimental results of orthogonal test

实验号	A/W	B/(g·mL ⁻¹)	C	D/min	萃取率/%
1	400	0.18	1 : 25	7	82.92
2	400	0.21	1 : 30	10	88.09
3	400	0.24	1 : 35	13	85.93
4	500	0.18	1 : 30	13	84.37
5	500	0.21	1 : 35	7	89.52
6	500	0.24	1 : 25	10	87.17
7	600	0.18	1 : 35	10	86.86
8	600	0.21	1 : 25	13	87.13
9	600	0.24	1 : 30	7	83.34
k ₁	85.65	85.74	84.78	85.26	
k ₂	87.09	85.33	88.25	87.37	
k ₃	85.78	87.64	85.48	85.88	
最大值	87.09	87.64	88.25	87.37	
极差 R	1.44	2.31	3.47	2.11	
优水平	A ₂	B ₃	C ₂	D ₂	

由表1可知,4种因素对黄芪茎总皂苷萃取率的影响为料液比>硫酸铵质量浓度>萃取时间>微波功率.黄芪茎总皂苷的最佳萃取工艺条件是 $A_2B_3C_2D_2$,即醇水体积比为0.77、微波萃取时间10 min、料液比1:30,硫酸铵质量浓度为0.24 g/mL,微波功率为500 W.

2.4 工艺验证实验

3次工艺验证实验黄芪茎总皂苷的萃取率分别为90.34%、89.73%、90.56%,平均为90.21%,相对标准偏差(RSD)为0.48%,干浸膏中的总皂苷的含量分别为12.80%、12.73%、12.86%,平均为12.80%.实验结果表明经过单因素及正交实验优选的萃取工艺条件稳定,适合规模化生产.

2.5 对比实验

在不加入分相盐硫酸铵的条件下,按照1.7节提取工艺进行微波提取3次,同法制成干浸膏.经含量测定可知干浸膏中的总皂苷的含量分别为5.37%、5.33%、5.34%,平均含量为5.35%.而微波辅助双水相法制得的干浸膏中的总皂苷的含量平均为12.80%.由实验结果可知,由于分相盐硫酸铵的加入,使干浸膏中的总皂苷的含量提高了7.45%,对黄芪茎中的皂苷类成分起到了一定的富集作用,对总皂苷的富集倍数为2.39.

2.6 体外抗氧化性实验

2.6.1 清除超氧阴离子自由基实验

黄芪茎总皂苷提取液和VC溶液清除超氧阴离子自由基的能力结果如图6所示.

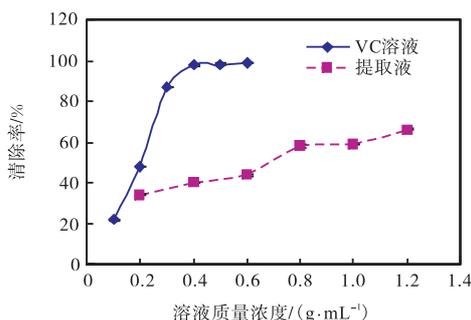


图6 黄芪茎总皂苷提取液、VC溶液清除超氧阴离子自由基的能力

Fig. 6 Scavenging activities of *Astragalus* stem extraction and VC solution for superoxide anion free radical

黄芪茎总皂苷提取液和VC溶液对超氧阴离子自由基的清除率随着其质量浓度的增加而逐渐增大,当质量浓度为0.6 mg/mL时,黄芪茎总皂苷提取液和VC溶液对超氧阴离子自由基的清除率分别为43.76%、98.85%.

研究表明,黄芪茎总皂苷提取液对超氧阴离子自由基具有一定的清除能力,但其清除能力低于VC溶液.

2.6.2 还原力实验

黄芪茎总皂苷提取液和VC溶液的还原力实验结果如图7所示.黄芪茎总皂苷提取液和VC溶液的还原力随着其质量浓度的增加而越来越强,但黄芪茎总皂苷提取液的还原力低于VC溶液的.研究表明,黄芪茎总皂苷提取液具有一定的还原作用,但还原能力较弱.

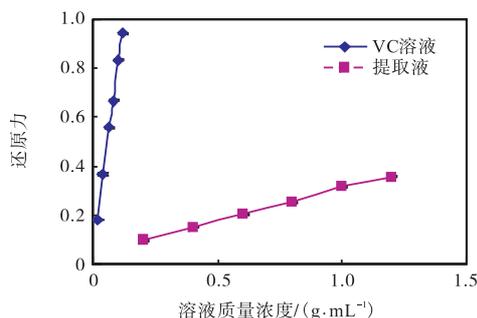


图7 黄芪茎总皂苷提取液、VC溶液的还原力

Fig. 7 The reducing power of *Astragalus* stem extraction and VC solution

3 结论

(1)通过单因素和正交实验对黄芪茎总皂苷的微波辅助双水相萃取工艺进行优化,结果表明黄芪茎总皂苷的最佳萃取工艺条件是:醇水体积比0.77,料液比1:30(g:mL),微波萃取时间10 min,硫酸铵质量浓度0.24 g/mL,微波功率500 W.

(2)在微波辅助双水相最佳提取工艺下得到的黄芪茎总皂苷提取溶液,制成干浸膏的总皂苷纯度为12.80%;而在不加入分相盐硫酸铵的微波提取条件下得到的黄芪茎总皂苷提取溶液,制成干浸膏的总皂苷纯度为5.35%,由于分相盐的加入,干浸膏的总皂苷纯度提高了7.45%,对总皂苷的富集倍数为2.39.

(3)黄芪茎总皂苷提取液的还原力和对超氧自由基的清除率随着质量浓度的增加而提高.结果说明黄芪茎总皂苷提取液具有一定的抗氧化能力,但其抗氧化能力明显弱于VC.

参考文献:

- [1] 张蕾,高文远,满淑丽.黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(21):3023-3025.

(下转第68页)