



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113662983 A

(43) 申请公布日 2021.11.19

(21) 申请号 202110959848.7

(22) 申请日 2021.08.20

(71) 申请人 傅美静

地址 350002 福建省福州市仓山区西江林  
语花园27号楼704室

(72) 发明人 傅美静

(51) Int. Cl.

A61K 36/488 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61K 125/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种葛根异黄酮提取方法

(57) 摘要

本发明提供一种葛根异黄酮提取方法。该提取方法包含如下步骤：氯化胆碱/尿素的制备：将139.6g的氯化胆碱与120.1-240.2g的尿素混合，直到形成透明溶液，然后在60℃真空干燥箱中干燥36h，即得深度共熔溶剂氯化胆碱/尿素，在恒温水浴锅中提取后得到葛根异黄酮粗提液，然后分离纯化得到葛根异黄酮。本发明的目的在于提供一种葛根异黄酮提取方法，利用深度共熔溶剂氯化胆碱/尿素对植物细胞壁具有溶解破坏作用，以及与黄酮类化合物形成氢键促进其溶解等特性，同时添加乙醇提高葛根异黄酮的提取效率；称量葛根异黄酮粉末重量，最终提取率为21.48-27.23mg/g（按葛根原料计算），并测定葛根异黄酮的羟基自由基清除率、DPPH清除率、ABTS清除率，结果表明与VC活性吻合。

1. 一种葛根异黄酮提取方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:

(1) 氯化胆碱/尿素的制备:将139.6g的氯化胆碱与120.1-240.2g的尿素混合(即摩尔比控制在1:2-4),在80℃的水浴锅中磁力搅拌2-3h,直到形成透明溶液,然后在60℃真空干燥箱中干燥36h,即得深度共熔溶剂氯化胆碱/尿素,保藏在干燥器中,待用。

(2) 用蒸馏水配置提取溶液,包含20-40%氯化胆碱/尿素和20-40%乙醇,然后添加至60目的葛根粉中并搅拌均匀,在恒温水浴锅中提取后得到葛根异黄酮粗提液,然后分离纯化得到葛根异黄酮。

2. 根据权利要求1所述的一种葛根异黄酮提取方法,其特征在于:将139.6g的氯化胆碱与120.1-240.2g的尿素混合(即摩尔比控制在1:2-4)。

3. 根据权利要求1所述的一种葛根异黄酮提取方法,其特征在于:用蒸馏水配置提取溶液,包含20-40%氯化胆碱/尿素和20-40%乙醇。

4. 根据权利要求1所述的一种葛根异黄酮提取方法,其特征在于:所述的葛根粉与提取液的料液比在1:10-25。

5. 根据权利要求1所述的一种葛根异黄酮提取方法,其特征在于:提取过程中,温度在40-60℃,提取时间在30-60min。混合物使用台式高速离心机12000g下离心10min分离固体颗粒,得到葛根异黄酮提取液。然后使用旋转蒸发器,在真空和加热温度为50℃条件下,将葛根异黄酮提取液中的乙醇蒸发去除,然后添加蒸馏水将浓缩后的体积调整至原体积,得到粗提液。

6. 根据权利要求1所述的一种葛根异黄酮提取方法,其特征在于:将15mL粗取液缓慢加入至层析柱中,接着用600mL去离子水洗脱其他杂质,再用70%的乙醇溶液洗脱,并收集乙醇洗脱液。然后,用旋转蒸发器将洗脱液浓缩至10mL,用稀盐酸调pH至3.0。将浓缩液放置在4℃环境中,静置24h,葛根异黄酮晶体析出,过滤并冷水洗涤后得粗品葛根异黄酮。粗品葛根异黄酮以石灰水加热溶解,0.22um膜过滤,滤液用盐水调至pH 3.0,冷却静置,使其重新结晶析出沉淀,过滤,冷水洗涤,冻干,得到精制葛根异黄酮。

## 一种葛根异黄酮提取方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及技术领域,具体为一种葛根异黄酮提取方法,属于食品加工领域。

### 背景技术

[0002] 葛根为豆科植物野葛 (*Pueraria lobata* (Willd)) 的干燥根,属药食同源类植物,含有丰富的功能性异黄酮类化合物,其具有改善血液循环、降血压、降血糖、预防癌症、增强机体免疫力等功效,在食品工业、日用、保健、医药等领域具有广阔的前景,因此探究葛根异黄酮的提取工艺具有重要意义。

[0003] 目前最常用的提取方法是有机溶剂提取法,操作简便,对仪器设备要求不高,但往往存在提取时间长,效率低、有机溶剂消耗大的缺点。

[0004] 本发明内容

[0005] 本发明方法中,利用深度共熔溶剂氯化胆碱/尿素对植物细胞壁具有溶解破坏作用,以及与黄酮类化合物形成氢键促进其溶解等特性,同时添加乙醇提高葛根异黄酮的提取效率。

[0006] 本发明可通过以下方案实现目的,包括如下步聚,但不仅限于:

[0007] (1) 氯化胆碱/尿素的制备:将139.6g的氯化胆碱与120.1-240.2g的尿素混合(即摩尔比控制在1:2-4),在80℃的水浴锅中磁力搅拌2-3h,直到形成透明溶液,然后在60℃真空干燥箱中干燥36h,即得深度共熔溶剂氯化胆碱/尿素,保藏在干燥器中,待用。

[0008] (2) 用蒸馏水配置提取溶液,包含20-40%氯化胆碱/尿素和20-40%乙醇,然后添加至60目的葛根粉中并搅拌均匀,在恒温水浴锅中提取后得到葛根异黄酮粗提液,然后分离纯化得到葛根异黄酮。

[0009] (3) 所述的葛根粉与提取液的料液比在1:10-25。

[0010] (4) 提取过程中,温度在40-60℃,提取时间在30-60min。

[0011] (5) 提取结束后,通过高速离心的方式去除葛根残渣,得粗提液,粗提液中的葛根异黄酮含量在1.19-1.54mg/mL,提取率为3.58-4.62%。

[0012] (6) 所述的分离纯化是以AB-8型号的大孔树脂为填料,通过层析柱分离纯化,实现提纯。分离纯化过程步骤包括:湿法装柱,粗提液上样,乙醇溶液洗脱,收集洗脱液,旋转蒸发浓缩洗脱液,调节pH,冷却析出沉淀,过滤获得粗品葛根异黄酮沉淀,石灰水溶解沉淀,调节pH,冷却析出沉淀,过滤,冷冻干燥得到精制葛根异黄酮。

[0013] (7) 通过湿法装柱,将AB-8树脂装入层析柱(15mm\*500mm)中,柱体积为50mL。

[0014] (8) 粗提液上样体积为15mL。

[0015] (9) 收集70%乙醇浓度的洗脱液。

[0016] (10) 浓缩洗脱液和重新溶解液的pH用盐水调至pH 3.0。

[0017] (11) 称量葛根异黄酮粉末重量,提取率为21.48-27.23mg/g(按葛根原料计算)。

[0018] (12) 测定葛根异黄酮的羟基自由基清除率、DPPH清除率、ABTS清除率。

[0019] 有益效果:

[0020] 本发明的特点是采用具有低挥发性,不易燃易爆,热稳定性好,粘度、密度、电导率可调控等优良特性的深度共熔溶剂替代传统溶剂,利用深度共熔溶剂氯化胆碱/尿素对植物细胞壁具有溶解破坏作用,以及与黄酮类化合物形成氢键促进其溶解等特性并借助碱提取酸沉淀的重结晶方法制备高品质类黄酮;称量葛根异黄酮粉末重量,最终提取率为21.48-27.23mg/g(按葛根原料计算),并测定葛根异黄酮的羟基自由基清除率、DPPH清除率、ABTS清除率,结果表明与VC活性吻合。

[0021] 实施例一:

[0022] (1) 深度共熔溶液制备。将纯度为99%的氯化胆碱和尿素在60℃真空干燥箱内干燥24h后,按照1:2,1:3,1:4的摩尔比混合,装于50mL圆底烧瓶中,塞上塞子,在100℃水浴锅内,300rpm转速下搅拌加热约2~3h,直至形成均一、透明的溶液。冷却至室温,在60℃的真空干燥箱内干燥36h后转移至干燥器内密封保存。用前将氯化胆碱/尿素,乙醇和蒸馏水按一定比例混合,得到氯化胆碱/尿素浓度为20%,乙醇浓度为40%的提取液。

[0023] (2) 葛根预处理。将所购葛根晾晒后再烘干12h,然后切片,再用中药粉碎机磨碎打粉,过60目筛,细粉装袋室温干燥器内保存。

[0024] (3) 葛根异黄酮提取。称量细粉,按料液比1g:20mL加入提取液,搅拌均匀。然后在60℃恒温水浴锅提取1h。混合物使用台式高速离心机12000g下离心10min分离固体颗粒,得到葛根异黄酮提取液。然后使用旋转蒸发仪,在真空和加热温度为50℃条件下,将葛根异黄酮提取液中的乙醇蒸发去除,然后添加蒸馏水将浓缩后的体积调整至原体积,即为粗提液。

[0025] (4) 芦丁的分离提纯。将15mL粗取液缓慢加入至层析柱中,接着用600mL去离子水洗脱其他杂质,再用70%的乙醇溶液洗脱,并收集乙醇洗脱液。然后,用旋转蒸发仪将洗脱液浓缩至10mL,用稀盐酸调pH至3.0。将浓缩液放置在4℃环境中,静置24h,葛根异黄酮晶体析出,过滤并冷水洗涤后得粗品葛根异黄酮。粗品葛根异黄酮以石灰水加热溶解,0.22um膜过滤,滤液用盐水调至pH 3.0,冷却静置,使其重新结晶析出沉淀,过滤,冷水洗涤,冻干,得到精制葛根异黄酮。

[0026]	摩尔比	1:2	1:3	1:4
	粗提液中的葛根异黄酮含量(mg/mL)	1.27	1.35	1.19
	粗提液中异黄酮提取率(%)	3.82	4.06	3.58
	精制芦丁提取率(mg/g)	22.95	24.27	21.48

[0027] 注意:粗提液中的葛根异黄酮含量与粗提液中异黄酮提取率的比值应固定。实施例二:

[0028] (1) 深度共熔溶液制备。将纯度为99%的氯化胆碱和尿素在60℃真空干燥箱内干燥24h后,按照1:2的摩尔比与乙二醇混合,装于50mL圆底烧瓶中,塞上塞子,在100℃水浴锅内,300rpm转速下搅拌加热约2~3h,直至形成均一、透明的溶液。冷却至室温,在60℃的真空干燥箱内干燥36h后转移至干燥器内密封保存。用前将氯化胆碱/尿素,乙醇和蒸馏水按一定比例混合,得到的提取液:1)氯化胆碱/尿素浓度为30%和乙醇浓度为30%;2)氯化胆碱/尿素浓度为40%和乙醇浓度为20%。

[0029] (2) 葛根预处理。将所购葛根晾晒后再烘干12h,然后切片,再用中药粉碎机磨碎打粉,过60目筛,细粉装袋室温干燥器内保存。

[0030] (3) 葛根异黄酮提取。称量细粉,按料液比1g:20mL加入提取液,搅拌均匀。然后在

60℃恒温水浴锅提取1h。混合物使用台式高速离心机12000g下离心10min分离固体颗粒，得到葛根异黄酮提取液。然后使用旋转蒸发仪，在真空和加热温度为50℃条件下，将葛根异黄酮提取液中的乙醇蒸发去除，然后添加蒸馏水将浓缩后的体积调整至原体积，即为粗提液。

[0031] (4) 芦丁的分离提纯。将15mL粗取液缓慢加入至层析柱中，接着用600mL去离子水洗脱其他杂质，再用70%的乙醇溶液洗脱，并收集乙醇洗脱液。然后，用旋转蒸发仪将洗脱液浓缩至10mL，用稀盐酸调pH至3.0。将浓缩液放置在4℃环境中，静置24h，葛根异黄酮晶体析出，过滤并冷水洗涤后得粗品葛根异黄酮。粗品葛根异黄酮以石灰水加热溶解，0.22um膜过滤，滤液用盐水调至pH 3.0，冷却静置，使其重新结晶析出沉淀，过滤，冷水洗涤，冻干，得到精制葛根异黄酮。

[0032]	DES浓度%	10	20	30	40
	粗提液中的葛根异黄酮含量(mg/mL)	1.21	1.35	1.31	1.21
	粗提液中异黄酮提取率(%)	3.64	4.06	3.94	3.62
	精制芦丁提取率(mg/g)	21.85	24.47	23.24	21.72

[0033] 注意：粗提液中的葛根异黄酮含量与粗提液中异黄酮提取率的比值应固定。实施例三：

[0034] (1) 深度共熔溶液制备。将纯度为99%的氯化胆碱和尿素在60℃真空干燥箱内干燥24h后，按照1:2的摩尔比与乙二醇混合，装于50mL圆底烧瓶中，塞上塞子，在100℃水浴锅内，300rpm转速下搅拌加热约2~3h，直至形成均一、透明的溶液。冷却至室温，在60℃的真空干燥箱内干燥36h后转移至干燥器内密封保存。用前将氯化胆碱/尿素，乙醇和蒸馏水按一定比例混合，得到氯化胆碱/尿素浓度为30%和乙醇浓度为30%的提取液。

[0035] (2) 葛根预处理。将所购葛根晾晒后再烘干12h，然后切片，再用中药粉碎机磨碎打粉，过60目筛，细粉装袋室温干燥器内保存。

[0036] (3) 葛根异黄酮提取。称量细粉，按料液比1g:10, 20, 25mL加入提取液，搅拌均匀。然后在60℃恒温水浴锅提取1h。混合物使用台式高速离心机12000g下离心10min分离固体颗粒，得到葛根异黄酮提取液。然后使用旋转蒸发仪，在真空和加热温度为50℃条件下，将葛根异黄酮提取液中的乙醇蒸发去除，然后添加蒸馏水将浓缩后的体积调整至原体积，即为粗提液。

[0037] (4) 芦丁的分离提纯。将15mL粗取液缓慢加入至层析柱中，接着用600mL去离子水洗脱其他杂质，再用70%的乙醇溶液洗脱，并收集乙醇洗脱液。然后，用旋转蒸发仪将洗脱液浓缩至10mL，用稀盐酸调pH至3.0。将浓缩液放置在4℃环境中，静置24h，葛根异黄酮晶体析出，过滤并冷水洗涤后得粗品葛根异黄酮。粗品葛根异黄酮以石灰水加热溶解，0.22um膜过滤，滤液用盐水调至pH 3.0，冷却静置，使其重新结晶析出沉淀，过滤，冷水洗涤，冻干，得到精制葛根异黄酮。

[0038]	料液比	10	20	25
	粗提液中的葛根异黄酮含量(mg/mL)	1.22	1.35	1.44
	粗提液中异黄酮提取率(%)	3.67	4.06	4.32
	精制芦丁提取率(mg/g)	22.01	24.47	25.81

[0039] 实施例四：

[0040] (1) 深度共熔溶液制备。将纯度为99%的氯化胆碱和尿素在60℃真空干燥箱内干

燥24h后,按照1:2的摩尔比与乙二醇混合,装于50mL圆底烧瓶中,塞上塞子,在100℃水浴锅内,300rpm转速下搅拌加热约2~3h,直至形成均一、透明的溶液。冷却至室温,在60℃的真空干燥箱内干燥36h后转移至干燥器内密封保存。用前将氯化胆碱/尿素,乙醇和蒸馏水按一定比例混合,得到氯化胆碱/尿素浓度为30%和乙醇浓度为30%的提取液。

[0041] (2) 葛根预处理。将所购葛根晾晒后再烘干12h,然后切片,再用中药粉碎机磨碎打粉,过60目筛,细粉装袋室温干燥器内保存。

[0042] (3) 葛根异黄酮提取。称量细粉,按料液比1g:10,20,25mL加入提取液,搅拌均匀。然后在40,50,60℃恒温水浴锅提取1h。混合物使用台式高速离心机12000g下离心10min分离固体颗粒,得到葛根异黄酮提取液。然后使用旋转蒸发仪,在真空和加热温度为50℃条件下,将葛根异黄酮提取液中的乙醇蒸发去除,然后添加蒸馏水将浓缩后的体积调整至原体积,即为粗提液。

[0043] (4) 芦丁的分离提纯。将15mL粗取液缓慢加入至层析柱中,接着用600mL去离子水洗脱其他杂质,再用70%的乙醇溶液洗脱,并收集乙醇洗脱液。然后,用旋转蒸发仪将洗脱液浓缩至10mL,用稀盐酸调pH至3.0。将浓缩液放置在4℃环境中,静置24h,葛根异黄酮晶体析出,过滤并冷水洗涤后得粗品葛根异黄酮。粗品葛根异黄酮以石灰水加热溶解,0.22um膜过滤,滤液用盐水调至pH 3.0,冷却静置,使其重新结晶析出沉淀,过滤,冷水洗涤,冻干,得到精制葛根异黄酮。

温度(℃)	60	70	80
粗提液中的葛根异黄酮含量(mg/mL)	1.51	1.54	1.36
粗提液中异黄酮提取率(%)	4.53	4.62	4.09
精制芦丁提取率(mg/g)	26.72	27.22	23.72

[0045] 注意:粗提液中的葛根异黄酮含量与粗提液中异黄酮提取率的比值应固定。实施例五:

[0046] (1) 深度共熔溶液制备。将纯度为99%的氯化胆碱和尿素在60℃真空干燥箱内干燥24h后,按照1:2的摩尔比与乙二醇混合,装于50mL圆底烧瓶中,塞上塞子,在100℃水浴锅内,300rpm转速下搅拌加热约2~3h,直至形成均一、透明的溶液。冷却至室温,在60℃的真空干燥箱内干燥36h后转移至干燥器内密封保存。用前将氯化胆碱/尿素,乙醇和蒸馏水按一定比例混合,得到氯化胆碱/尿素浓度为30%和乙醇浓度为30%的提取液。

[0047] (2) 葛根预处理。将所购葛根晾晒后再烘干12h,然后切片,再用中药粉碎机磨碎打粉,过60目筛,细粉装袋室温干燥器内保存。

[0048] (3) 葛根异黄酮提取。称量细粉,按料液比1g:10,20,25mL加入提取液,搅拌均匀。然后在50℃恒温水浴锅提取30,60min。混合物使用台式高速离心机12000g下离心10min分离固体颗粒,得到葛根异黄酮提取液。然后使用旋转蒸发仪,在真空和加热温度为50℃条件下,将葛根异黄酮提取液中的乙醇蒸发去除,然后添加蒸馏水将浓缩后的体积调整至原体积,即为粗提液。

[0049] (4) 芦丁的分离提纯。将15mL粗取液缓慢加入至层析柱中,接着用600mL去离子水洗脱其他杂质,再用70%的乙醇溶液洗脱,并收集乙醇洗脱液。然后,用旋转蒸发仪将洗脱液浓缩至10mL,用稀盐酸调pH至3.0。将浓缩液放置在4℃环境中,静置24h,葛根异黄酮晶体析出,过滤并冷水洗涤后得粗品葛根异黄酮。粗品葛根异黄酮以石灰水加热溶解,0.22um膜

过滤,滤液用盐水调至pH 3.0,冷却静置,使其重新结晶析出沉淀,过滤,冷水洗涤,冻干,得到精制葛根异黄酮。

[0050]	提取时间 (min)	30	60
	粗提液中的葛根异黄酮含量 (mg/mL)	1.40	1.54
	粗提液中异黄酮提取率 (%)	4.20	4.62
	精制芦丁提取率 (mg/g)	24.54	27.23

[0051] 注意:粗提液中的葛根异黄酮含量与粗提液中异黄酮提取率的比值应固定。测定葛根异黄酮的羟基自由基清除率、DPPH清除率、ABTS清除率。

[0052]		羟基自由基清除率 (%)	DPPH清除率 (%)	ABTS清除率 (%)
	精制芦丁	25.3	60.1	62.7

[0053] 羟基自由基清除率 (%) 测定方法修改如下:配制8mmol/L的 $\text{FeSO}_4$ 溶液、20mmol/L的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和3mmol/L水杨酸。取0.335mL发酵液与0.1mL  $\text{FeSO}_4$ 、0.335mL水杨酸及0.08mL  $\text{H}_2\text{O}_2$ 混匀,37℃水浴30min。冷却后补足至体积为1mL,8000rpm离心10min后于510nm波长处测定上清液吸光值,分别以蒸馏水代替样品和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液作为空白组和对照组。以抗坏血酸(Vc)作为阳性对照组,0.5mmol/L Vc的羟基自由基清除率为27.3%。

[0054] DPPH清除率 (%) 测定方法修改如下:2mL不同浓度芦丁溶液加入2mL新配制的0.2mmol/L DPPH溶液,混匀后在37℃避光水浴30min,后在波长517nm处测定吸光值。用无水乙醇代替样品做为空白对照组。以抗坏血酸(Vc)作为阳性对照组。0.5mmol/L Vc的DPPH自由基清除率为61.8%。

[0055] ABTS清除率 (%) 测定方法修改如下:将1mL ABTS溶液(7.4mmol/L)和等体积2.6mmol/L  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 混合,避光静置16h,形成ABTS+储备液;使用前使用无水乙醇溶液对ABTS+,溶液进行适当的稀释,使该混合液在734nm处的吸光度范围为 $0.7 \pm 0.02$ ,得到ABTS+工作液;将1.980mL ABTS+与20 $\mu\text{L}$ 样品混匀,30℃下反应10min,测定734nm处吸光值;以蒸馏水与乙醇混匀的吸光值为样品对照;蒸馏水代替样品的吸光值为空白对照;以抗坏血酸(Vc)作为阳性对照组。0.5mmol/L Vc的ABTS清除率为59.7%。