

文章编号:1674-2869(2014)03-0001-07

# 葛根总黄酮在乙醇-无机盐双水相体系中的萃取

池汝安<sup>1,2</sup>, 詹斯维<sup>1,2</sup>, 张越非<sup>1,2</sup>, 陈 哲<sup>1,2</sup>, 刘 哲<sup>1,2</sup>, 李娅丽<sup>1,2</sup>

[1. 武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430074 ;

2. 绿色化工过程教育部重点实验室(武汉工程大学), 湖北 武汉 430074]

**摘 要:**根据乙醇/无机盐双水相体系的分相能力差异与葛根总黄酮在其中的分配差异,用双水相对葛根总黄酮进行萃取纯化.先在室温 25℃下用浊点法分别绘制研究乙醇与氯化钠、碳酸钠、磷酸氢二钾、碳酸钾、硫酸铵 5 种盐所组成的双水相体系的相图,并计算萃取后葛根总黄酮在各体系中的分配系数和萃取率,筛选出乙醇/磷酸氢二钾体系为最佳体系.然后考察改变该体系中水与乙醇体积比和盐的量对体系相比以及葛根总黄酮的分配系数和萃取率的影响,确定最佳组成.最后考察了葛根粗提取液中葛根总黄酮浓度变化对其分配系数和萃取率的影响.结果表明乙醇质量分数为 50.14%、磷酸氢二钾质量分数为 22.67% 的双水相体系是分离纯化葛根总黄酮的最佳条件;在一定质量浓度范围内,葛根总黄酮质量浓度越高,葛根总黄酮在双水相体系中的分配系数越大,当葛根粗提物质量浓度超过 0.014 g/mL 后,分配系数减小;质量浓度的改变对萃取率影响不大;在最佳萃取条件下,葛根总黄酮在体系中的分配系数为 35.99,萃取率高达 99.23%.该双水相萃取技术操作简单、环保无害,并对葛根粗提取液中葛根总黄酮的分离纯化有较好的效果.

**关键词:**双水相体系;乙醇/磷酸氢二钾体系;葛根总黄酮;萃取

**中图分类号:**TQ028.4;R284.2

**文献标识码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.1674-2869.2014.03.001

## 0 引 言

葛根是多年生缠绕藤本植物,为豆科植物野葛(*Pueraria lobata*(wild.)Ohwi)或甘葛藤(*Pueraria thomsonii* Benth)干燥的根,具有很多功效,可作为药物应用于多种病症<sup>[1]</sup>.葛根总黄酮是葛根的主要有效成分,约占总质量的 10%.葛根总黄酮包括葛根素、大豆(黄豆)甙、大豆甙元等 10 余种.其中,葛根素在葛根总黄酮中的质量含量最高,具有较高的药用价值.传统的葛根分离纯化方法有水提醇沉法、醇提水沉法和铅盐法等,其污染大、收率较低<sup>[2]</sup>,造成了葛根资源的浪费,产品成本的提高.因此,探索出操作简便、成本低,易实现工业化分离纯化的工艺,对提高葛根总黄酮药用价值具有重要意义<sup>[3]</sup>.

双水相萃取技术是指亲水性有机物水溶液在一定条件下可形成双水相,利用被分离物在两相中分配不同,便可实现分离.常见的能形成双水相体系的高聚物有:聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、甲基聚乙二醇、聚乙烯醇聚乙炔吡咯烷酮、甲基纤维素、乙基羟乙基纤维素、葡聚糖、聚丙基葡聚糖、羟丙基葡聚糖、聚蔗糖等,低分子有机物有:乙醇、丙

醇、异丙醇等,无机盐有:硫酸钾、硫酸铵、草酸钠、磷酸钾等<sup>[4]</sup>.

霍清<sup>[5-6]</sup>对葛根素在双水相体系中的分配特性进行了研究.其实验表明,采用聚乙二醇(PEG)/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 双水相体系时,最大分配系数可达 148.2,最大收率为 99.90%;采用丙酮/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相体系时,最大分配系数可达 36.71,最大收率为 99.55%.王志辉等<sup>[7]</sup>研究了葛根素在乙醇/硫酸铵双水相体系中的分配特性以及影响因素.其实验表明,在其最佳萃取条件下,最大分配系数可达 16.30,回收率为 94.33%,葛根素分配在上相. Xu Huaneng 等<sup>[8]</sup>研究了一个使用正丁醇/水双水相体系萃取,氧化铝柱纯化和重结晶获取大豆黄酮和葛根异黄酮的新方法,并考察提取溶剂类型对产量的影响;其实验表明,等体积比的正丁醇/水双水相体系实现了固液萃取和液液净化的双重效果,相对于普通的单一溶剂提取,具有更高的大豆黄酮和葛根异黄酮产率.

新型的亲水有机溶剂/无机盐双水相体系可以为部分生物物质提供良好的生物环境,并保持其生物活性,但是传统的聚合物/聚合物双水相体系和聚合物/无机盐双水相体系存在着原材料成

收稿日期:2013-10-17

基金项目:国家自然科学基金项目(21006075);武汉市青年科技晨光计划项目(201271031400)

作者简介:池汝安(1959-),男,福建三明人,教授,博士,博士研究生导师.研究方向:分离与富集.

本偏高以及不易回收等问题,因此制约了双水相萃取体系在工业上的应用.乙醇/无机盐双水相体系采用的是无毒无害、又易挥发回收的小分子有机溶剂乙醇,且乙醇同时又可作为中药有效成分的提取剂.因此该双水相萃取体系有望克服传统双水相萃取技术原料成本偏高、不易回收等缺点,充分发挥双水相萃取的技术优势和成本优势,从而实现双水相萃取技术提取分离生物物质和天然产物中有效成分的大规模工业化生产.

本实验选用乙醇/无机盐双水相体进行研究.着重考察乙醇/无机盐双水相体系的相平衡以及葛根总黄酮在该双水相体系中的分配特性.根据不同种类无机盐与无水乙醇形成的双水相体系的分相能力和葛根总黄酮在该双水相体系中的分配特性,选择出适合萃取葛根总黄酮的双水相体系,并考察目标萃取物在该体系中的分配系数和目标萃取物的萃取率.

## 1 实验部分

### 1.1 主要试剂与仪器

葛根,购于三九大药房,经鉴定为柴葛;对照品葛根素(南京替斯艾么中药研究所提供,UV含量测定用);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司提供);所用药品和试剂均为分析纯;水为去离子水.

电子分析天平(AL104)[梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司];XH-100A微波催化合成/萃取仪(北京祥鸽科技发展有限公司);旋转蒸发仪(上海嘉鹏科技有限公司);Anke-1000高速离心机(上海安亭科学仪器厂);KQ-250DB型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UV2450分光光度计(日本岛津公司);电热鼓风干燥箱(上海嘉鹏科技有限公司).

### 1.2 供试液(葛根醇提浓缩液)的制备

称取粒径 0.250 mm 的葛根粉末 20 g,用 400 mL 80% 的乙醇溶液于 80 °C、800 W 下,微波辅助回流提取 30 min,过滤,滤渣用相同方法再次提取、过滤,合并提取液,用旋转蒸发仪浓缩提取液,得到葛根醇提浓缩液,低温干燥保存备用.

### 1.3 葛根总黄酮的分析方法

取对照品葛根素标准溶液和双水相体系萃取供试液后的上下相,用紫外分光光度计在 200~400 nm 波长范围内做光谱扫描,最大吸收峰在 $\lambda=248$  nm 处,与文献[9]相符,本实验选取这一波长进行葛根总黄酮的分析波长.

葛根总黄酮测定的标准曲线方程为: $A=$

$0.0514C+0.0037$  ( $A$  为吸光度; $C$  为质量浓度,  $10^{-6}$  g/mL),相关系数  $R^2=0.9992$ .

### 1.4 双水相体系分相能力的研究

在常温常压下,用 NaCl、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 五种盐作为实验用无机盐,无水乙醇为实验用亲水有机相.采用浊点滴定法绘制双水相体系相图:精确称取一定质量( $m_s$ )无机盐于干燥的锥形瓶中,加入一定量的去离子水( $m_w$ ),用酸式滴定管缓慢滴加无水乙醇,并不断振荡使其充分混合,观察溶液的澄清状况,直至锥形瓶内液体出现浑浊为止,记录所滴加无水乙醇的体积,换算为质量( $m_{ei}$ ),此时体系的总质量为  $m_i$ ;然后继续加入一定量去离子水( $m_{wj}$ ),溶液变为澄清,此时体系的总质量为  $m_j$ ;继续向锥形瓶中缓慢滴加无水乙醇并不断摇匀,直至再次出现浑浊,如此反复操作,每次浑浊时,计算一次无水乙醇和盐在系统总量中的质量分数,以盐的质量分数为横坐标,无水乙醇的质量分数为纵坐标作图,即得各种双水相体系的相图<sup>[10]</sup>.计算公式如下:

无水乙醇质量浓度:

$$w_{ei} = \frac{\sum m_{ei}}{m_i} \quad (\text{其中 } i = 1, 2, 3, \dots, n)$$

盐的质量浓度:

$$w_s = \frac{m_s}{m_i} \quad (\text{其中 } i = 1, 2, 3, \dots, n)$$

### 1.5 双水相体系萃取能力测定

考察乙醇/无机盐双水相体系对一定浓度目标萃取物溶液的萃取能力.配置乙醇和无机盐质量分数确定的某双水相体系,加入目标萃取物溶液后,充分振荡,使体系充分完全混合,离心后取样用紫外分光光度计测定上、下相的吸光度,根据标准曲线计算上、下相葛根总黄酮的浓度,考察体系的相比( $R$ )、目标萃取物在体系中的分配系数( $K$ )以及目标萃取物的萃取率( $Y$ ).

双水相体系相比计算公式为:

$$R = \frac{V_t}{V_b}$$

其中, $V_t$ 、 $V_b$  分别是上、下相体积(mL).

目标萃取物在体系中分配系数计算公式为:

$$K = \frac{C_t}{C_b}$$

其中, $C_t$ 、 $C_b$  分别是上、下相目标萃取物的质量浓度( $10^{-6}$  g/mL).

目标萃取物的萃取率,即收率的计算公式为<sup>[10]</sup>:

$$Y = \frac{RK}{1 + RK}$$

2 结果与讨论

2.1 乙醇与不同种类无机盐相图的绘制及分相能力考察

实验显示,NaCl 无法与无水乙醇形成双水相,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 因溶解度随温度影响比较大,容易析出晶体而不能与乙醇形成稳定的双水相体系,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 都能与乙醇形成稳定的双水相体系.室温 298 K 下,通过改变盐的加入量,采用浊点法绘制各双水相体系相图.结果如下图所示:

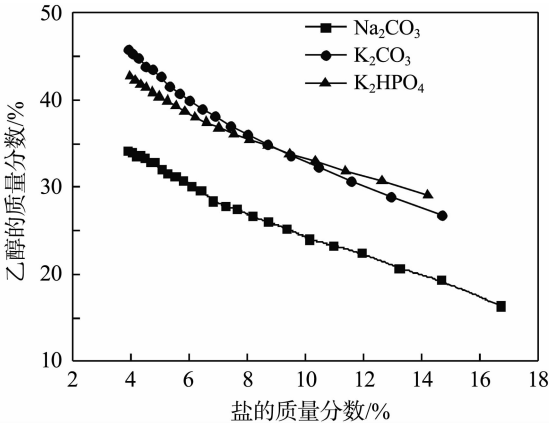


图 1 三种不同盐的双水相体系的相图  
Fig.1 The aqueous two-phase diagram of three different salt

结合实验现象,分析图 1 可知,乙醇/碳酸钠、乙醇/磷酸氢二钾、乙醇/碳酸钾三种双水相体系中:碳酸钠分相能力较强,即在较少的盐、醇的用量时,就能形成稳定的双水相体系,但碳酸钠在水中溶解度较低,含盐量较低时该双水相体系的分配系数较小,又无法考察含盐量较高时该双水相体系对目标萃取物的萃取效果,故不适合作萃取体系;碳酸钾能够稳定分相且持续时间长但萃取能力不太明显,上下相葛根总黄酮浓度相差不大,故不适合作萃取体系;磷酸氢二钾不仅能够稳定分相、持续时间长、分相范围广,而且萃取能力强,葛根总黄酮几乎只分布在其上相,故选用此体系为萃取葛根总黄酮的双水相体系,并对其进一步研究.

2.2 EtOH/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相体系萃取葛根总黄酮最佳体系的确定

2.2.1 EtOH/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 体系中水与乙醇体积比的考察 在 EtOH/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 体系中,改变水与乙醇的体积比,考察体系上下相体积的变化.由图 1 可知:当水和乙醇的量一定时,盐的量越多下相体积越大,达一定程度部分盐不溶;当盐和乙醇的

量一定时,水的量过多体系不成双水相,水的量过少盐不能完全溶解;当盐和水的量一定时,乙醇过多部分盐析出,乙醇过少体系不成双水相.双水相体系的分相过程是有机溶剂与无机盐竞争夺取水分子的过程,故水与乙醇的体积比要适当.本实验将针对水与乙醇的体积比(V/V)分别为 3:7、4:6、5:5 来作进一步研究.

2.2.2 EtOH/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 体系中磷酸盐加入量的确定 对稀释一定倍数的供试液,在水与无水乙醇体积比分别为 3:7、4:6、5:5 条件下,改变 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的加入量,用紫外可见分光光度计测定双水相萃取后上下相溶液的吸光度,考察相比 R、分配系数 K 及萃取率 Y 的变化情况.重复实验两次,计算其误差,实验结果分别如图 2、3、4 所示.

当水与乙醇体积比为 3:7(见图 2),K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 加入量为 2.5 g 时,分配系数 K 近达 30,萃取率 Y 为 99.06%;当水与乙醇体积比为 4:6(见图 3),

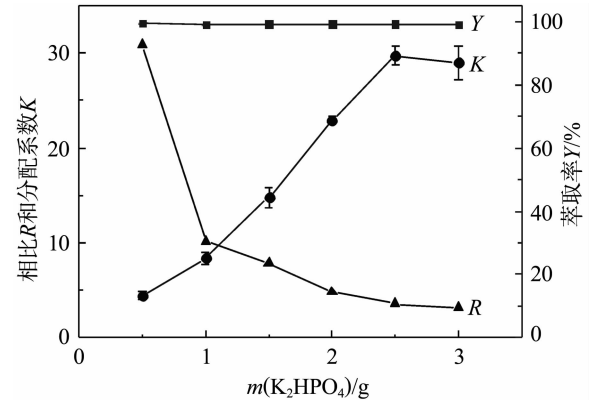


图 2 水与乙醇体积比为 3:7 时 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的量对相比 R、分配系数 K 及萃取率 Y 的影响  
Fig.2 Ethanol/water(V/V)=3:7,the effects of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> amount on R,K and Y

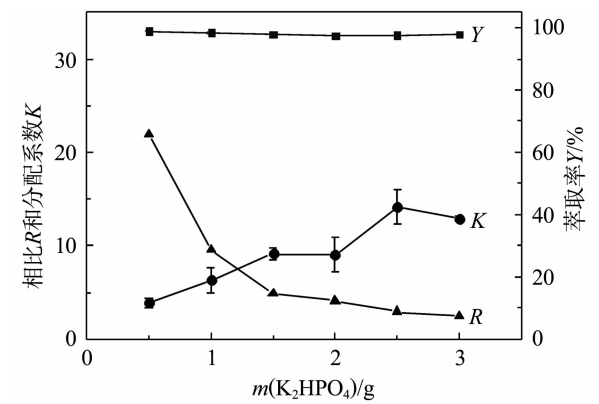


图 3 水与乙醇体积比为 4:6 时 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的量对相比 R、分配系数 K 及萃取率 Y 的影响  
Fig.3 Ethanol/water(V/V)=4:6,the effects of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> amount on R,K and Y

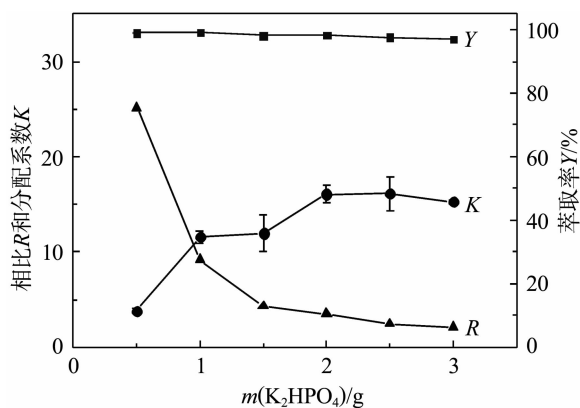


图 4 水与乙醇体积比为 5 : 5 时  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  的量对相比  $R$ 、分配系数  $K$  及萃取率  $Y$  的影响

Fig. 4 Ethanol/water(V/V)=5 : 5, the effects of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  amount on  $R$ ,  $K$  and  $Y$

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  加入量为 2.5 g 时,分配系数  $K$  为 14.18,萃取率  $Y$  为 97.64%;当水与乙醇体积比为 5 : 5(如图 4), $\text{K}_2\text{HPO}_4$  加入量为 2.5 g 时,分配系数  $K$  为 16.13,萃取率  $Y$  为 97.54%。

综合分析图 2、3、4 可知,EtOH/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  双水相体系上相中葛根总黄酮的含量随磷酸氢二钾或乙醇质量分数的增大而减小,这是由于黄酮易溶于碱性水溶液中。当双水相体系中乙醇的质量分数一定时,随着  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  质量分数的增大, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  争夺水分子的能力越强,体系上相中的水减少,导致上相体积减小,上相中乙醇的质量浓度增大,其中的黄酮质量浓度也增大;当双水相体系中  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  的质量分数一定时,随着乙醇质量分数的升高,乙醇争夺水分子的能力越强,体系上相中的水增多,相对的导致体系下相的体积减小,使得体系下相中  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  的质量浓度增大,pH 值也随着增大,增大了黄酮在下相的溶解度。水与乙醇体积比为 3 : 7 时,体系分配系数相较 4 : 6、5 : 5 略大,且萃取率基本平衡处于较高水平;随磷酸氢二钾的质量增加,虽然相比有所减小、分配系数有所增加,但萃取率基本不变;另外磷酸氢二钾的量越多,不利于后续回收。故拟取水与乙醇体积比为 3 : 7, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  为 2.5 g 时为最佳双水相萃取体系。

因此萃取葛根总黄酮最佳的体系条件为:乙醇质量分数为 50.14%、磷酸氢二钾质量分数为 22.67% 的 EtOH/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  双水相体系,此时相比  $R$  为 3.56,且分配系数  $K$  为 29.75,葛根总黄酮的萃取率  $Y$  达到 99.06%。

### 2.3 待萃取物浓度对萃取效果的影响

精确称取不同质量制备的供试液(葛根醇提

浓缩液),用水与乙醇体积比为 3 : 7 的溶液定容,精密量取上述配制好的溶液各 3.00 mL 加入到水与乙醇体积比为 3 : 7、 $m(\text{K}_2\text{HPO}_4)=2.5$  g 的双水相体系中,充分振荡混合摇匀,离心分相。用紫外可见分光光度计测定双水相萃取后上下相溶液的吸光度,考察分配系数  $K$  及萃取率  $Y$  的变化情况,实验结果如图 5 所示。

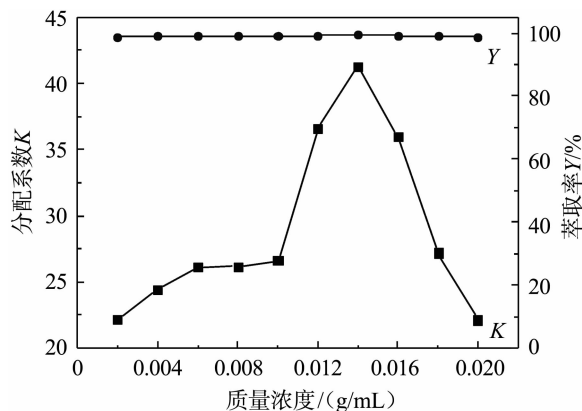


图 5 浓度对分配系数  $K$  和萃取率  $Y$  的影响

Fig. 5 The effect of concentration on  $K$  and  $Y$

由图 5 可知,在一定样品质量浓度范围内,随着葛根总黄酮浓度的增加,其分配系数  $K$  也增加;当供试液浓度超过 0.014 g/mL 后,分配系数  $K$  下降;浓度的改变对萃取率影响不大。对该固定总量的双水相体系,其对葛根总黄酮的萃取能力有一定限制。当葛根总黄酮浓度超过该双水相萃取能力时,上相所能容纳葛根总黄酮达到饱和,多余的葛根总黄酮转移至下相,导致萃取率降低。

### 2.4 利用双水相 EtOH/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 体系萃取葛根总黄酮

取水与乙醇体积比为 3 : 7, $m(\text{K}_2\text{HPO}_4)=2.5$  g,即乙醇的质量分数为 50.14%,盐  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  的质量分数为 22.67% 配制的双水相体系。精确称取制备的供试液(葛根总黄酮醇提浓缩液),用水与乙醇体积比为 3 : 7 的溶液稀释一定倍数后,精密量取一定量加入到已配置的双水相体系中,充分振荡混合摇匀,离心分相。然后用 UV 可见分光光度计测定经双水相萃取后上、下相溶液的吸光度,以及经稀释同等倍数后的未进行双水相萃取的供试液吸光度,实验结果如图 6 所示。同时将未进行双水相萃取和萃取后上、下相的各样品溶液分别用高效液相色谱进行检测,其结果如图 7 所示。色谱条件为:色谱柱,InertsilODSC18 色谱柱(250 nm×4.6 nm,5  $\mu\text{m}$ );流动相,甲醇-水(体积比 20 : 80);检测波长,250 nm;柱温,常温;流速,1 mL/min;进样量,5  $\mu\text{L}$ 。

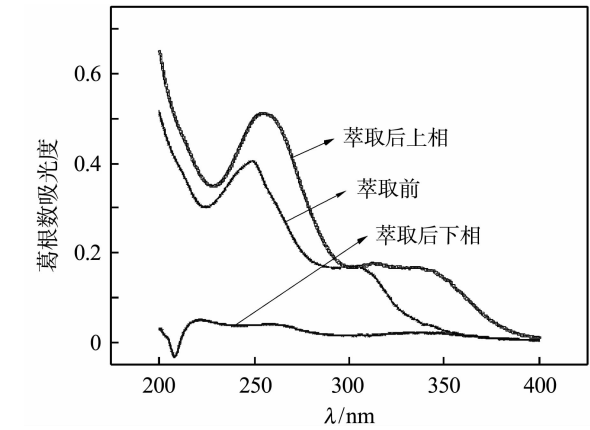


图 6 萃取前后葛根总黄酮紫外吸光度比较  
Fig. 6 The comparison of total flavonids UV absorbance before and after extraction

萃取前经稀释同等倍数的葛根总黄酮浓缩液中葛根总黄酮的质量浓度为  $7.77 \times 10^{-6}$  g/mL, 体积为 10.85 mL; 萃取后上相质量浓度为  $9.46 \times 10^{-6}$  g/mL, 体积为 8.64 mL; 下相的质量浓度为  $6.67 \times 10^{-7}$  g/mL, 体积为 1.79 mL. 由此可知, 粗醇提液经 EtOH/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相体系萃取分离后, 目标萃取物葛根总黄酮在体系上相中浓缩富集, 纯度得到提高.

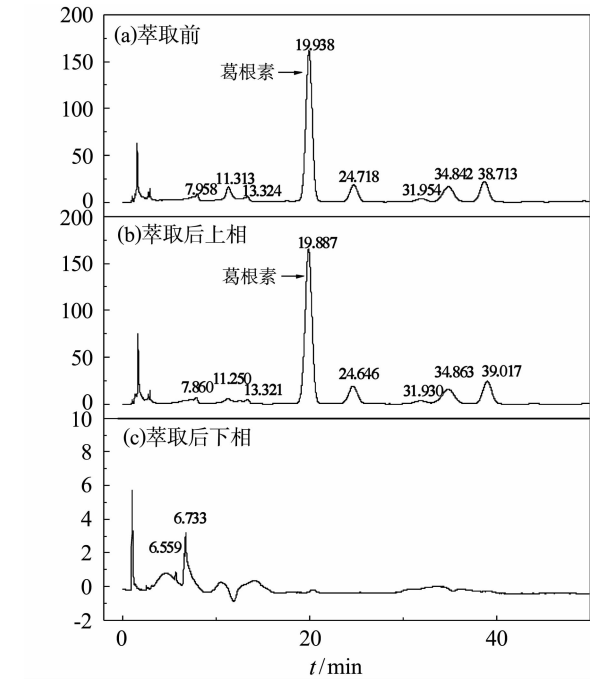


图 7 萃取前后葛根总黄酮高效液相色谱比较  
Fig. 7 The comparison of total flavonids HPLC chromatogram before and after extraction

比较图 7(a) 和 (b): 7~14 min 峰面积减小, 表明经双水相萃取后, 除去了清水性杂质; 葛根素的峰面积增大, 表明萃取后葛根素浓度增大; 后面的 4 个峰是葛根总黄酮的其他异黄酮苷和苷元, 质量浓度都有所提高. 由图 (c) 可看出萃取后下相

几乎没有葛根总黄酮. 故经双水相萃取后, 葛根总黄酮富集在上相, 下相含量非常少, 葛根总黄酮得到纯化.

### 3 结 语

a. 实验中考察的有机小分子溶剂乙醇价廉、低毒、较易挥发、易溶于水, 且具有较大的水化能, 能与其生成双水相的盐较少, 且相比  $R$  难趋近于 1.

b. 因为各种盐的溶解度均受温度的影响, 所以形成的双水相体系也受温度的影响. 本实验在室温 25 °C 下浊点法绘制相图, 在此过程中硫酸盐和碳酸盐的溶解度受温度影响尤为显著, 表现为滴定过程中极易析出晶体. 因此本实验最后选用 EtOH/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 体系作为萃取葛根总黄酮的最佳双水相体系.

c. 在 EtOH/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相体系中, 乙醇易挥发而无需反萃取, 使得分离操作较简单; 磷酸氢二钾具有较宽的分相范围, 并且有较高的分配系数和回收率. 萃取葛根总黄酮最佳的体系条件为: 乙醇质量分数为 50.14%、磷酸氢二钾质量分数为 22.67% 的 EtOH/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相体系, 相比  $R$  为 3.56.

d. 在一定浓度范围内, 葛根总黄酮浓度越高, 葛根总黄酮在双水相体系中的分配系数越大; 当黄酮粗提物质量浓度超过 0.014 g/mL 后, 分配系数减小; 浓度的改变对萃取率影响不大. 在最佳萃取条件下, 葛根总黄酮在体系中的分配系数  $K$  为 35.99, 萃取率  $Y$  高达 99.23%.

e. 经双水相萃取后, 葛根总黄酮富集在双水相的上相, 下相主要富集亲水性杂质, 从而葛根黄酮粗提物得到纯化.

f. EtOH/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相体系萃取技术操作简单, 易于放大, 环保无污染, 实现了葛根总黄酮的初步分离, 有效提高了葛根总黄酮的纯度和得率, 在葛根有效成分的提取分离领域展现了良好的应用前景.

### 致 谢

本研究工作得到了国家自然科学基金项目和武汉市青年科技晨光计划项目的资助, 在此表示诚挚的感谢!

### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. I 部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 233.  
The State Pharmacopoeia Commission. Chinese phar-

- macopoeia[S]. I Department. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 233. (in Chinese)
- [2] 北京中医药大学. 中药化学[M]. 贵州: 贵州人民出版社, 1990: 500 - 506.  
Beijing University of Chinese Medicine. Chinese medicine chemical[M]. Guizhou: Guizhou People Press, 1990: 500 - 506. (in Chinese)
- [3] 郭延生. 葛根有效成分葛根素的提取、分离及结构改造[D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2004.  
GUO Yan-sheng. Extraction, isolation, structural modification of puerarin from *Pueraria lobata*[D]. Gansu: Gansu University of Agricultural, 2004. (in Chinese)
- [4] 陈丛瑾, 屈丽娟, 陈东. 双水相萃取法分离纯化黄酮类化合物的研究进展[J]. 应用化工, 2010, 39(10): 1587 - 1589.  
CHEN Cong-jin, QU Li-juan, CHEN Dong. Research progress on separation and purification of flavonoids by aqueous two-phase systems extraction[J]. Applied Chemical Industry, 2010, 39(10): 1587 - 1589. (in Chinese)
- [5] 霍清. 葛根素双水相体系中的分配特性及分配系数的关联[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(3): 139 - 144.  
HUO Qing. Measurement and correlation of partition coefficient of puerarin in aqueous two-phase system[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2006, 23(3): 139 - 144. (in Chinese)
- [6] 霍清. 葛根素在双水相体系中分配特性的研究[J]. 北京中医药大学报, 2004, 27(4): 51 - 53.  
HUO Qing. Investigation into the characteristics of partition coefficients of puerarin in the aqueous two-phase systems[J]. Journal of Beijing University of TCM, 2004, 27(4): 51 - 53. (in Chinese)
- [7] 王志辉, 朱建航, 郑楠, 等. 葛根素在乙醇/硫酸铵两水相体系中的分配特性[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 13 - 15.  
WANG Zhi-hui, ZHU Jian-hang, ZHENG Nan, et al. The partition properties of puerarin in aqueous two-phase system of ethanol/ammonium Sulfate[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008, 19(1): 13 - 15. (in Chinese)
- [8] XU Hua-neng, HE Chao-hong. Extraction of isoflavones from stem of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi using n-butanol/water two-phase solvent system and separation of daidzein[J]. Separation and Purification Technology, 2007, 56(1): 85 - 89.
- [9] 钟玲, 张越非, 李小菊, 等. 乙醇/无机盐双水相体系分离纯化黄芪总黄酮的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3395 - 3399.  
ZHONG Ling, ZHANG Yue-fei, LI Xiao-ju, et al. Separation and purification of total flavonoids of astragalus membranaceus with ethanol/phosphate aqueous two-phase system[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(22): 3395 - 3399. (in Chinese)
- [10] 刘国兴, 江波, 王元好, 等. 乙醇/碳酸钾双水相萃取盾叶薯蓣发酵液中的 2, 3-丁二醇[J]. 化工学报, 2009, 60(11): 2798 - 2804.  
LIU Guo-xing, JIANG Bo, WANG Yuan-hao, et al. Aqueous two-phase extraction 2, 3-butanediol by ethanol/potassium carbonate system from dioscorea zingiberensis fermentative borths [J]. Journal of Chemical Industry and Engineering (China), 2009, 60(11): 2798 - 2804. (in Chinese)

# Extraction of flavonids from *Pueraria lobata* using ethanol/inorganic salts aqueous two-phase system

CHI Ru-an<sup>1,2</sup>, ZHAN Si-wei<sup>1,2</sup>, ZHANG Yue-fei<sup>1,2</sup>, CHEN Zhe<sup>1,2</sup>, LIU Zhe, LI Ya-li<sup>1,2</sup>

[1. School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China;  
2. Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education(Wuhan Institute of Technology), Wuhan 430074, China]

**Abstract:** According to the diversity of phase separation ability and the distribution of target products in the ethanol/inorganic salts aqueous two-phase system (ATPS), ATPS was used to extract and purify total flavonids of *Pueraria lobata*. The phase diagrams of ethanol/sodium chloride, ethanol/sodium carbonate, ethanol/dipotassium hydrogen phosphate, ethanol/potassium carbonate and ethanol/ammonium sulfate ATPS were drawn and investigated at room temperature of 25 °C by the cloud point method, respectively. The ethanol/dipotassium hydrogen phosphate system was selected as the optimum system for the extraction of total flavonids after the distribution coefficient and the extraction yield was calculated. Then the distribution coefficients and the extraction yield of puerariae flavonids were studied under the different proportion of ethanol to dipotassium hydrogen phosphate of ATPS, and the optimal composition was determined. Finally the effect of the concentration of total flavonids on the distribution coefficient and the extraction yield was investigated. The results show that the optimal extraction condition of total flavonids is got as the ATPS with ethanol 50.14% (w/w) and dipotassium hydrogen phosphate 22.67% (w/w); meanwhile the distribution coefficient increases with the total flavonids concentration increase; however the distribution coefficient begins to decrease when the concentration of crude extract of *Pueraria lobata* is over 0.014 g/mL; finally, the distribution coefficient is 35.99 and the extraction yield of puerariae flavonids reaches 99.23%, respectively. The aqueous two-phase extraction (ATPE) has a good effect on the separation and purification of total flavonids of *Pueraria lobata*.

**Key words:** aqueous two-phase system; ethanol/dipotassium hydrogen phosphate system; total flavonids of *Pueraria lobata*; extraction

本文编辑:张 瑞