

加压提取红三叶草总异黄酮的研究

杨薇薇,张永忠*,李成刚,张丽丽

(东北农业大学理学院 应用化学系,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:目的 考察加压技术提取红三叶草总异黄酮的试验条件。方法 通过正交试验,以异黄酮得率为指标,优选红三叶草异黄酮的加压提取工艺参数。结果 当压力为 0.8 MPa,乙醇体积分数为 50%,液固比为 15 mL/g,保压时间为 5 min 时,红三叶草总异黄酮得率和质量分数分别达 57.0 mg/g 和 8.85%。结论 与醇提法相比,加压提取是一种快速高效的新方法,这一方法在中草药有效成分的提取分离中将具有很好的应用前景。

关键词:红三叶草;总异黄酮;加压;提取

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2009)09-1406-02

红三叶草 *Trifolium pratense* L. 又名红车轴草、红苕草、红爪草,为豆科三叶草属多年生牧草,原产小亚细亚与东南欧,广泛分布于温带及亚热带地区^[1]。红三叶草中异黄酮的量比其他豆科植物中异黄酮的量高 10~30 倍^[2]。天然存在的红三叶草异黄酮主要有芒柄花黄素(formononetin)、鸡豆黄素(biochanin A)、染料木黄酮(genistein)、黄豆苷元(daidzein)等,其中芒柄花黄素和鸡豆黄素是大豆中不存在的异黄酮类化合物且量较高^[3]。红三叶草异黄酮具有弱雌激素作用、能有效改善妇女更年期综合症^[4]、预防和治疗动脉硬化^[5]。加压萃取技术是用温度和压力来加速从固体或半固体提取有效成分效率的技术。此项技术在中药提取领域仍是一种全新的方法^[6],在国内研究并不多见。由于传统的回流提取存在提取时间长、溶剂用量多、能耗大、提取效率不高等缺陷,因此本实验尝试将加压技术应用于红三叶草异黄酮的提取上,以期对红三叶草异黄酮的生产提供参考。

1 材料和仪器

红三叶草于东北农业大学园艺站室外种植,采于花期,全株晒干后用高速万能粉碎机粉碎。芒柄花黄素、鸡豆黄素对照品(质量分数为 99%,Fluka 公司);无水乙醇为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

Mettler Toledo AG135 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];FW 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);高压磁力搅拌反应

釜(烟台高新区科立自控设备研究所);高效液相色谱仪:Waters 515 泵、Waters2487 紫外检测器(Waters 公司)。

2 方法和结果

2.1 异黄酮的高效液相色谱法测定^[7]

2.1.1 色谱条件:Novar-Pak C₁₈ 色谱柱(150 mm × 3.9 mm);流动相:60%甲醇;体积流量:1.0 mL/min;柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.1.2 标准曲线的绘制:称取芒柄花素和鸡豆黄素对照品各 1.000 mg,用无水甲醇定容于 10 mL 量瓶。分别从芒柄花黄素、鸡豆黄素各对照品储备液中吸取一定量,用甲醇稀释到 2、4、6、8 μg/mL 测定,记录峰面积。结果芒柄花黄素、鸡豆黄素在 2~8 μg/mL 线性关系良好,所得回归方程分别为 $Y = 47.096X + 1.1634$ ($R^2 = 0.9997$)、 $Y = 60.148X - 9.132$ ($R^2 = 0.9995$)。

2.1.3 供试品溶液的制备:称取 6 g 红三叶草粉末,按正交试验条件提取。提取液减压滤过后转移至量瓶,用 50%乙醇定容至 100 mL。从中精密吸取 1.0 mL,加 50%乙醇定容至 25 mL,再精密吸取 1.0 mL 加 50%乙醇定容至 25 mL,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.4 测定和计算方法:红三叶草异黄酮的得率以芒柄花黄素和鸡豆黄素的总得率计算,即得率 = 提取液中异黄酮的质量/红三叶草的质量。

2.2 加压提取工艺流程:加压提取包括升压、保压、卸压 3 个过程。将红三叶草粉和 50%乙醇放入到

* 收稿日期:2008-11-12

基金项目:黑龙江省“十一五”重大科技攻关项目(GA06B402-4);大豆生物学教育部重点实验室主任基金项目(SB05A04)

作者简介:杨薇薇(1984—),女,吉林人,硕士研究生,主要从事食品化学及天然产物化学的研究。E-mail:weiyang126@163.com

*通讯作者 张永忠 E-mail:zyz1953@sohu.com

高压反应釜内,启动电热加热套通过升温加压,磁力搅拌转速为 240 r/min。当压力上升到所需压力时停止升压,保压一段时间后,通冷凝水降温卸压。然后取出提取液滤过,测定异黄酮的质量浓度。

2.3 正交试验设计:根据单因素预试验结果,每次试验称取 6 g 红三叶草粉,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行优化,因素水平见表 1,测定结果见表 2。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A 压力/ MPa	B 乙醇体积 分数/ %	C 液固比/ (mL · g ⁻¹)	D 保压时间/ min
1	0.4	60	10	3
2	0.6	40	15	5
3	0.8	50	20	7

表 2 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	得率/(mg · g ⁻¹)
1	1	1	1	1	31.45
2	1	2	2	2	41.24
3	1	3	3	3	41.73
4	2	1	2	3	46.43
5	2	2	3	1	43.19
6	2	3	1	2	51.90
7	3	1	3	2	53.47
8	3	2	1	3	44.09
9	3	3	2	1	55.35
K_1	114.42	131.65	127.44	129.99	
K_2	141.52	128.52	143.02	146.61	
K_3	152.91	148.98	138.39	132.45	
k_1	38.14	43.88	42.48	43.33	
k_2	47.17	42.84	47.67	48.87	
k_3	50.97	49.66	46.13	44.15	
R	12.83	6.82	5.19	3.03	

从极差分析结果得出影响红三叶草总异黄酮提取效率的因素主次顺序为 $A > B > C > D$,即压力、乙醇体积分数、液固比,保压时间影响不显著。最佳组合为 $A_3B_3C_2D_2$,即压力为 0.8 MPa,乙醇体积分数为 50%,液固比为 15 mL/g,保压时间为 5 min。

以优化试验所得的条件放大 10 倍进行 3 次验证试验,结果红三叶草异黄酮的平均得率为 57.0 mg/g。

2.4 对比试验:分别取 60 g 红三叶草粉以优化工艺参数进行加压提取和传统回流提取。精密吸取 10.0 mL 提取液于恒重的蒸发皿中,真空干燥至恒重,得其固形物质量,计算其中异黄酮的质量分数(异黄酮的质量分数 = 固形物中异黄酮的质量/固形

物质量 × 100 %),比较结果见表 3。可知与回流浸提法相比,加压法提取红三叶草总异黄酮得率和质量分数都有很大提高,而且乙醇体积分数和液固比都小于溶剂浸提法,另外提取时间大大缩短,说明采用加压提取红三叶草总异黄酮省时节能,高率。

表 3 对比试验结果

Table 3 Results of contrast test

方 法	乙醇体积 分数/ %	液固比/ (mL · g ⁻¹)	提取时间 / min	得率/ (mg · g ⁻¹)	质量分 数/ %
加压法	50	15	5	57.0	8.85
回流浸提 ^[7]	80	20	90	18.3	3.65

3 讨论

实验中发现压力对加压萃取红三叶草异黄酮的影响最大,其原因可能是提高压力可以增加溶质的溶解度及扩散速度,另外也可以减小溶液的黏度以减小阻力,同时有压力下的渗透可能把红三叶草颗粒的某些细胞壁破坏,这些都有利于异黄酮的渗出。由于本实验是通过升温加压,当压力达到 1.2 MPa 时,温度过高,导致红三叶草颗粒部分碳化溶液浑浊。从得率及节能综合考虑,选取压力为 0.8 MPa。

加压提取不同于传统的加热回流提取,加压提取是压力在液体媒介的作用下传递的过程,不论提取对象是液体还是固体,均可受到均匀一致的压力作用。传统的溶剂回流提取由于回流过程要与环境有较大的能量交换;而加压提取在保压时间内几乎没有能耗,其作用效果迅速、均匀且能量消耗较少。将加压提取用于红三叶草异黄酮的提取上,是红三叶草异黄酮提取手段的一种新的探索,可以提高有机溶剂对异黄酮的提取效率,这对红三叶草异黄酮的生产利用具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 陈学颖,张永忠,况 冲. 红三叶草异黄酮及其代谢研究进展[J]. 中草药,2007,38(11):1741-1744.
- [2] Edmund K G. Methods of cholesterol reduction using isoflavones [P]. United States Patent: 20040170713.
- [3] Graham K. Treatment prevention of menopausal symptoms and osteoporosis [P]. United States Patent: 2002003507.
- [4] Peter H M, Weijer S, Barentsen R. Isoflavones from red clover (promensil) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo [J]. Maturitas, 2002, 42: 187-193.
- [5] 于立娜,张永忠,辛 禹. 红三叶草异黄酮在保健食品和医药中的应用的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2005,27(4): 65-68.
- [6] Zhang S Q, Zhu J J, Wang C Z. Novel high pressure extraction technology [J]. Int J Pharm, 2004, 278: 471-474.
- [7] 于丽娜. 红三叶草异黄酮的提取纯化及生物活性的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2006.