

木豆叶中黄酮微波提取工艺研究

金 时^{1,2}, 杨 梅^{1,2*}, 孔 羽^{1,2}, 姚晓慧^{1,2}, 魏作富^{1,2}, 祖元刚^{1,2}, 付玉杰^{1,2*}

1. 东北林业大学 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 东北林业大学 林业生物制剂教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: **目的** 选取适合提取木豆叶中黄酮的方法, 并优化提取工艺参数。**方法** 以木豆叶中荭草苷、木犀草素和总黄酮的提取率及提取物抗氧化活性为指标, 将微波辅助提取与热回流、超声波及浸泡提取方法相比较, 并采用中心组合设计对影响荭草苷和木犀草素提取效果的微波辅助提取工艺参数进行了优化。**结果** 通过比较确定微波辅助提取法较为适合木豆叶中黄酮的提取; 优化得到荭草苷和木犀草素最佳微波提取工艺参数为: 木豆叶粒径为 50 目, 乙醇体积分数为 80%, 料液比 1 : 20, 提取温度 60 ℃, 提取次数 4 次, 提取时间 10 min, 微波功率 500 W; 荭草苷和木犀草素的提取率分别为 (4.42 ± 0.01) 、 (0.10 ± 0.01) mg/g。**结论** 采用微波辅助提取木豆叶中的黄酮具有提取时间短、提取率高、产物抗氧化效果好的特点, 优化的工艺参数具有可行性和实际应用价值。

关键词: 木豆; 黄酮; 荭草苷; 木犀草素; 微波辅助提取; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2235-05

Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Cajanus cajan* leaves

JIN Shi^{1,2}, YANG Mei^{1,2}, KONG Yu^{1,2}, YAO Xiao-hui^{1,2}, WEI Zuo-fu^{1,2}, ZU Yuan-gang^{1,2}, FU Yu-jie^{1,2}

1. Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2. Engineering Research Center of Forest Bio-preparation, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To select the proper method for extracting flavonoids from *Cajanus cajan* leaves and optimize the extraction parameters. **Methods** Taking the extracting rate of orientoside, luteolin, and total flavonoids from *C. cajan* leaves and anti-oxidative activity as indexes, microwave-assisted method was compared with heat reflux extraction, ultrasound-assisted extraction, and maceration extraction. Central composite design was used for optimization of parameters affecting the extraction of orientoside and luteolin using microwave-assisted method. **Results** The results showed that microwave-assisted extraction was the best method and the optimal conditions were: 50 mesh particle size, 80% ethanol aqueous, 1 : 20 material/ethanol aqueous, temperature 60 ℃, 4 times cycle, 10 min extraction time, 500 W extraction power. The extraction yields of orientoside and luteolin were (4.42 ± 0.01) and (0.10 ± 0.01) mg/g from dry *C. cajan* leaves, respectively. **Conclusion** The microwave-assisted method is feasible with less time, higher extraction yield, and better anti-oxidative activity.

Key words: *Cajanus cajan* (L.) Millsp.; flavonoids; orientoside; luteolin; microwave-assisted extraction; anti-oxidative activity

木豆 *Cajanus cajan* (L.) Millsp. 系豆科木豆属植物, 广泛分布于热带和亚热带地区。木豆是一种多用途木豆类作物, 可食用。此外, 木豆在国内外民间药中广泛用于镇痛、肝炎、结石、黄疸、小儿水痘和糖尿病等症^[1-2]。药理学调查显示木豆中有有效活性成分主要是黄酮类和芪类化合物等^[3]。木豆

叶中含有多多种黄酮, 包括木犀草素、芹菜素、球松素、荭草苷、牡荆苷等^[4]。其中, 木犀草素及其八位碳苷(荭草苷)是植物体中重要的黄酮, 具有抗炎、抗氧化、多靶点抗菌、舒张血管平滑肌、降低血浆黏度、抗辐射、调节免疫力等显著药理作用^[5-6]。微波辅助提取技术作为新发展的一种提取方法具有

收稿日期: 2011-03-21

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费项目(201004040); 科技部农业科技成果转化资金项目(2009GB23600514)

作者简介: 金 时(1987—), 女(回族), 黑龙江大庆人, 硕士研究生, 主要从事天然产物研究。Tel: (0451)82190535 E-mail: zorff@163.com

*通讯作者 付玉杰 Tel: (0451)82190535 E-mail: fuyujie1967@yahoo.com.cn

杨 梅 Tel: 13852869337 E-mail: guilingangan@163.com

提取时间短、溶剂消耗少、效率高、无环境污染等优势。本实验将微波辅助提取与传统热回流、超声波及浸泡提取方法相比较,并采用中心组合设计对影响微波辅助提取工艺的参数进行了优化,旨在为从木豆叶中提取黄酮提供经济、高效、绿色的途径。

1 材料与仪器

木豆叶 2009年9月采摘于海南省,当年生,阴干,经东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室聂绍荃教授鉴定为豆科植物木豆 *Cajanus cajan* (L.) Millsp. 的干燥叶。将叶粉碎,过筛分为20、30、40、50、60目。保存于-20℃冰箱中,备用。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)及荭草苷、木犀草素和芦丁对照品(质量分数均大于98%)购于Sigma公司;甲醇为色谱纯,双蒸水自制;其他试剂均为分析纯。

KQ—250DE型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);MAS—II微波反应罐(新仪微波化学科技有限公司);安捷伦1200系列高效液相色谱仪包括:G1322A脱气机、G1311A泵、G1365B多波长检测器。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的测定

参照毕和平等^[7]测定总黄酮的方法。取1mL提取液于10mL量瓶中,加入5%NaNO₂0.3mL,混匀,静置6min;加入10%AlCl₃·6H₂O0.3mL,混匀,静置6min;加入1mol/LNaOH4mL,混匀,静置15min;75%乙醇加至刻度线,混匀,于510nm处测定吸光度(A)值。

精密称取芦丁对照品10.03mg,置于10mL量瓶中,用75%乙醇定容,再取5个10mL量瓶,分别配制成50.15、100.30、200.60、300.90、601.80μg/mL芦丁对照品溶液。按上述方法制作标准曲线,其回归方程为 $A=1.271C-0.0135$, $r^2=0.9996$,表明芦丁在50.15~601.80μg/mL线性关系良好。

2.2 荭草苷和木犀草素的HPLC测定

参考Liu等^[8]的HPLC法测定木豆幼苗中荭草苷和木犀草素的方法。

2.2.1 色谱条件 色谱柱为HIQsil C₁₈W柱(150mm×4.6mm,5μm);柱温30℃;体积流量1mL/min;进样体积10μL;流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸甲醇溶液(B),梯度洗脱:0~15min,33%~33%B;15~40min,33%~75%B;40~45min,75%~33%B。检测波长254nm(木

犀草素)、330nm(荭草苷)。

2.2.2 线性关系考察 分别精确称量木犀草素及荭草苷对照品3.40、2.70mg于10mL量瓶中,加入色谱纯甲醇溶解、混匀,配制成含木犀草素0.340mg/mL、荭草苷0.270mg/mL混合对照品溶液。分别取混合对照品溶液0.25、1.00、1.50、2.50、5.00mL置于5.0mL量瓶中,加甲醇定容,滤过,分别进样10μL,记录峰面积。以峰面积对质量浓度进行线性回归,得回归方程分别为木犀草素 $Y=41363.64X+26.33$, $r^2=0.9991$;荭草苷 $Y=11469.4X-39.6$, $r^2=0.9990$;表明木犀草素在17.00~340.00μg/mL、荭草苷在13.50~270.00μg/mL线性关系良好。

2.3 抗氧化能力的测定

参照Wu等^[3]的方法,对DPPH自由基清除能力进行比较。取4种提取方法所得质量浓度分别为4.00、2.00、1.00、0.50、0.25、0.125mg/mL提取液100μL,分别加入75%乙醇1.4mL,混匀;再加入0.004%DPPH乙醇溶液1mL,混匀,室温避光静置70min,于510nm测定A值。

2.4 数据分析

采用中心组合试验设计,实验均重复3次,数据分析处理使用Stastitica 6.0软件。

2.5 不同方法样品制备及结果比较

2.5.1 样品制备 分别取20、30、40、50、60目的木豆叶粉末5.00g混匀,备用。参照文献[9]以不同方法提取。

(1)热回流提取 取上述木豆叶粉末(5.00g)加入75%乙醇75mL,于80℃条件下热回流提取,分别提取30、60、90、120min各3次,提取液滤过、合并,定容,测定。

(2)超声提取 取上述木豆叶粉末(5.00g)加入75%乙醇75mL,于45℃、功率250W条件下超声提取3次,提取时间分别为30、45、60、90min,提取液滤过、合并,定容,测定。

(3)浸泡提取 取上述木豆叶粉末(5.00g)加入75%乙醇75mL,于室温浸泡6、12、24、36h各3次,提取液滤过、合并,定容,测定。

(4)微波提取 取上述木豆叶粉末(5.00g)加入75%乙醇75mL,于55℃、功率500W条件下微波提取5、10、15、20min各3次,提取液滤过、合并,定容,测定。

2.5.2 不同提取方法提取率的比较 热回流、超声、浸泡和微波提取提取总黄酮、荭草苷及木犀草素的

最佳结果见表 1, 总黄酮最高提取率分别为 36.08、31.58、29.58、33.29 mg/g, 最佳提取时间分别是 60、90 min、12 h、10 min, 其中热回流的效果最佳。而与总黄酮不同, 荭草苷和木犀草素提取率最高是微波 10 min, 分别为 3.85、0.09 mg/g。

表 1 不同方法最高提取率的结果及差异显著性分析

Table 1 Analysis of significant difference between the highest yields from different methods

提取方式	提取率/(mg·g ⁻¹)			提取时间
	总黄酮	荭草苷	木犀草素	
微波提取	33.29 ab	3.85 a	0.090 a	10 min
热回流提取	36.08 a	3.41 b	0.073 b	60 min
超声提取	31.58 bc	3.22 bc	0.077 b	90 min
浸泡提取	29.56 c	3.02 c	0.071 b	12 h

不同的小写字母表示该列数据存在显著差异 ($P<0.05$)

Different lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$)

对不同方法最高提取率的差异显著性分析 (表 1) 可知, 热回流虽然对总黄酮提取率最高, 但与微波相比差异不显著, 而微波提取荭草苷和木犀草素与其他方法比较差异显著 ($P<0.05$)。由此可知, 微波辅助提取在从木豆叶中提取黄酮具有明显的优势, 其主要原因是微波具有由内而外同时加热的特点。微波提取时高频电磁波能穿透萃取介质到达材料内部的维管束和细胞系统引起溶剂加热, 使细胞内部的温度升高、压力超过细胞空间膨胀的能力, 从而导致细胞破裂, 其内的有效成分自由流出被周围的溶剂溶解, 达到提取的目的^[10]。常规方法如热回流, 浸泡的提取机制是溶质分子热运动和溶质在不同浓度溶液之间的扩散, 细胞壁破裂困难, 有效成分释放慢, 故提取率低。超声波提取虽有产生空化破壁的作用, 但破壁效果不及微波, 提取率远远小于微波, 且消耗的时间长。

2.5.3 DPPH 自由基清除能力的比较 不同方法提取物对 DPPH 自由基的清除效果见图 1。微波提取物清除 DPPH 自由基效果最佳, 0.125~4.00 mg/mL 提取物清除率由 $(39.68 \pm 3.88)\%$ 增加至 $(95.18 \pm 2.00)\%$ 。其 IC_{50} 值为 0.26 mg/mL, 明显低于超声、浸泡和热回流提取 (0.45、0.41、0.39 mg/mL), 结果说明微波辅助提取物能够具有较强的抗氧化活性。

综合比较提取物中化合物的得率, 消耗的溶剂和时间及清除 DPPH 自由基效果, 微波辅助提取都具有明显的优势, 适合提取木豆叶中的黄酮荭草苷和木犀草素。因此, 基于提取时间的比较, 以下的

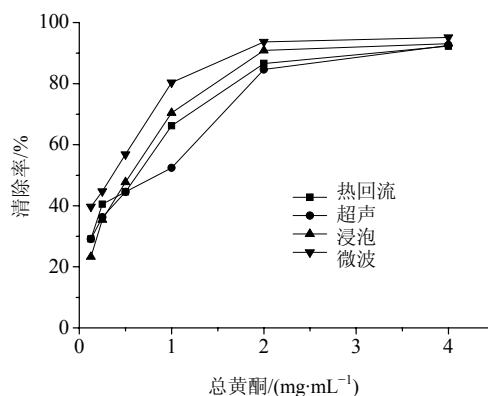


图 1 不同方法提取物的清除 DPPH 自由基的活性

Fig. 1 DPPH free radical-scavenging activity of extracts by different methods

试验选择 10 min 用于的微波提取。通过预试验知微波的功率 (决定加热速率) 对提取率影响不显著, 因为实验使用 MAS—II 微波反应罐 (新仪微波化学科技有限公司) 是采用间歇加热方式, 加热到达提取温度后停止加热, 待降温后再补足, 因此试验选用微波功率固定值 500 W。

2.6 微波工艺参数的优化及结果

2.6.1 中心组合设计 采用 2^5 的中心组合设计优化微波提取木豆叶中荭草苷和木犀草素工艺参数, 包括: X_1 材料粒径 (目)、 X_2 乙醇体积分数 (%)、 X_3 温度 ($^{\circ}C$)、 X_4 料液比和 X_5 提取次数 (次), 因素水平见表 2。

2.6.2 回归方程的建立与分析 不同实验设计条件下, 木犀草素与荭草苷提取率的预测值与实验值见表 3。利用实验数据进行多元拟合分析建立二次方程模型。对方程进行方差分析, 表明两个回归模型在极显著水平 ($P<0.001$); r^2 分别为 0.969 和 0.976, 说明模型拟合程度良好, 实验误差小。对拟合的二次多项式各项的 F 估计值分析可知 X_3^2 即温度平方项对荭草苷提取率影响最显著; 乙醇体积分数平方

表 2 中心组合设计试验因素水平编码表

Table 2 Factors and levels of central composite design

水平	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
-2	20	50	50	5	1
-1	30	60	55	10	2
0	40	70	60	15	3
1	50	80	65	20	4
2	60	90	70	25	5

表 3 中心组合设计方案及试验结果

Table 3 Scheme and results of central composite design

编号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	木犀草素/(mg·g ⁻¹)		荭草苷/(mg·g ⁻¹)	
						实验值	预测值	实验值	预测值
1	1	1	1	1	1	0.105	0.102	2.51	2.68
2	1	1	1	-1	-1	0.408	0.044	1.71	1.75
3	1	1	-1	1	-1	0.054	0.051	1.97	1.93
4	1	1	-1	-1	1	0.066	0.064	3.21	3.16
5	1	-1	1	1	-1	0.053	0.051	2.95	3.01
6	1	-1	1	-1	1	0.051	0.049	2.69	2.73
7	1	-1	-1	1	1	0.063	0.062	2.19	2.15
8	1	-1	-1	-1	-1	0.042	0.041	1.86	1.70
9	-1	1	1	1	-1	0.072	0.070	2.60	2.71
10	-1	1	1	-1	1	0.059	0.058	3.13	3.22
11	-1	1	-1	1	1	0.078	0.078	3.69	3.70
12	-1	1	-1	-1	-1	0.041	0.040	3.39	3.28
13	-1	-1	1	1	1	0.063	0.063	2.86	2.96
14	-1	-1	1	-1	-1	0.039	0.038	2.19	2.18
15	-1	-1	-1	1	-1	0.051	0.052	2.99	2.89
16	-1	-1	-1	-1	1	0.054	0.055	3.69	3.58
17	-2	0	0	0	0	0.062	0.062	3.41	3.27
18	2	0	0	0	0	0.059	0.064	3.02	3.15
19	0	-2	0	0	0	0.046	0.046	3.17	2.87
20	0	2	0	0	0	0.066	0.071	2.86	3.16
21	0	0	-2	0	0	0.058	0.058	2.99	2.88
22	0	0	2	0	0	0.061	0.066	2.47	2.57
23	0	0	0	-2	0	0.042	0.045	2.14	2.13
24	0	0	0	2	0	0.078	0.081	3.48	3.49
25	0	0	0	0	-2	0.044	0.047	2.61	2.71
26	0	0	0	0	2	0.081	0.083	3.99	3.89
27	0	0	0	0	0	0.084	0.083	4.15	4.15
28	0	0	0	0	0	0.085	0.083	4.43	4.15
29	0	0	0	0	0	0.081	0.083	4.17	4.15
30	0	0	0	0	0	0.086	0.083	3.93	4.15
31	0	0	0	0	0	0.082	0.083	4.00	4.15
32	0	0	0	0	0	0.087	0.083	4.23	4.15

项 X_2^2 对木犀草素影响最显著。而 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_3 、 X_1X_4 、 X_2X_5 、 X_3X_4 、 X_3X_5 、 X_4X_5 项对荭草苷提取率方程各项的 F 值小于 $P=0.05$ 的对应值, X_1 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_1X_4 、 X_1X_5 、 X_3X_5 、 X_4X_5 对木犀草素提取率的各项的 F 值小于 $P=0.05$ 的对应值, 即对提取率影响不显著, 在不影响方程模型的基础上忽略对回归方程影响不显著的项, 对荭草苷和木犀草素提取

率的二次多项式简化如下:

$$Y_{\text{荭草苷}} = 4.15 - 0.06 X_1 + 0.14 X_2 - 0.15 X_3 + 0.68$$

$$X_4 + 0.59 X_5 + 0.32 X_1X_2 + 0.35 X_1X_5 - 0.28 X_2X_3 + 0.45 X_2X_4 - 0.47 X_1^2 - 0.57 X_2^2 - 0.71 X_3^2 - 0.67 X_4^2 - 0.43 X_5$$

$$Y_{\text{木犀草素}} = 0.083 + 0.012 3 X_2 + 0.040 8 X_3 + 0.017 7$$

$$X_4 + 0.017 8 X_5 + 0.061 7 X_2X_3 + 0.062 6 X_2X_4 + 0.060 5 X_2X_5 + 0.066 2 X_3X_4 - 0.099 1 X_1^2 - 0.012 2 X_2^2 - 0.010 4 X_3^2 - 0.010 X_4^2 - 0.008 9 X_5^2$$

2.6.3 响应面分析 荭草苷是木犀草素糖苷, 荭草苷分子结构是在木犀草素 8 位 C 上连一个葡萄糖。如图 2、3 所示, 对影响荭草苷和木犀草素提取率各因素响应面分析可知不同因素对两个化合物的影响及因素之间相互作用趋势基本相同。例如, 溶剂是提取过程的基础, 如图 2、3 所示, 荭草苷和木犀草素的提取率都随着乙醇质量分数升高先增加后减少, 但木犀草素是苷元, 极性小, 提取最适乙醇质量分数比荭草苷大, 因此需要通过优化乙醇质量分数提高目标化合物总体提取率。而荭草苷和木犀草素提取率 (图 2、3) 随着温度升高, 先快速增加, 后不变或稍有减少。这一结果说明荭草苷和木犀草素在微波高温辐射时分解。增加温度, 可加快化合物从植物材料的游离和增加目标化合物的溶解度, 但当温度过高时会引起热敏性化合物分解^[11]。因此, 适当的温度可以使目标化合物获得最大的提取率。

2.6.4 优化提取工艺参数 由中心组合设计及响应面分析得到的最佳工艺条件为: 木豆叶粒径 46.97 目, 乙醇体积分数 80.39%, 提取温度 59.60 °C, 料液比 1:20.41, 提取 4.40 次, 荭草苷和木犀草素的提取率为 4.43 mg/g 和 0.10 mg/g。

3 讨论

本实验比较了微波辅助提取技术与传统热回流、超声波及浸泡的方法提取木豆叶中荭草苷、木犀草素和总黄酮提取率及提取物的抗氧化活性, 实验表明微波辅助提取能利用短的时间获取更高的提取率且提取物具有更好的抗氧化能力, 适合用于从木豆叶中提取黄酮类化合物。

利用中心组合设计对微波辅助提取木豆叶中荭草苷和木犀草素的工艺条件进行了优化。回归分析表明模拟二次方程具有较好的拟合性和可靠性。

由中心组合设计优化及响应面分析得到的最佳工艺条件为: 材料粒径 50 目, 乙醇体积分数 80%,

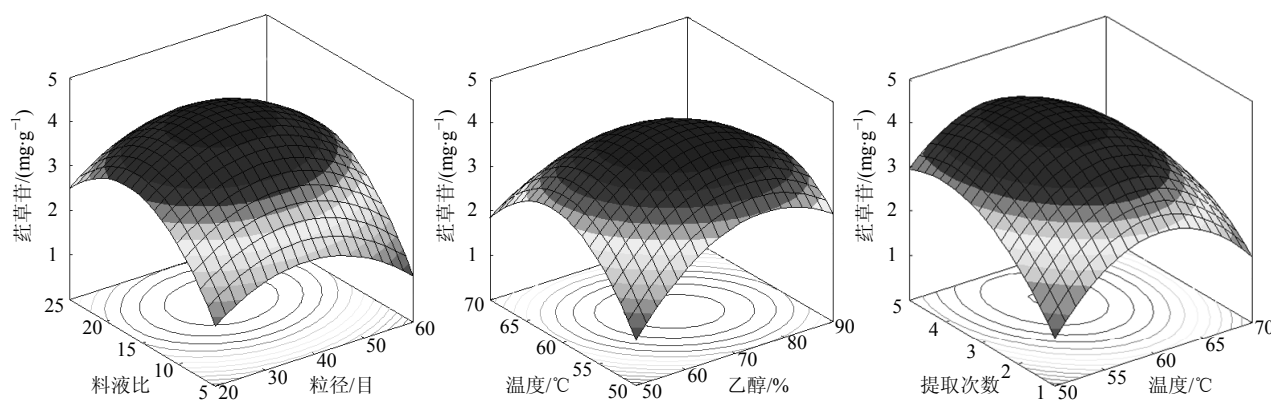


图2 微波提取荭草苷的各因素响应面分析图

Fig. 2 Response surface plots of factors affecting extraction of orientoside by microwave-assisted extraction

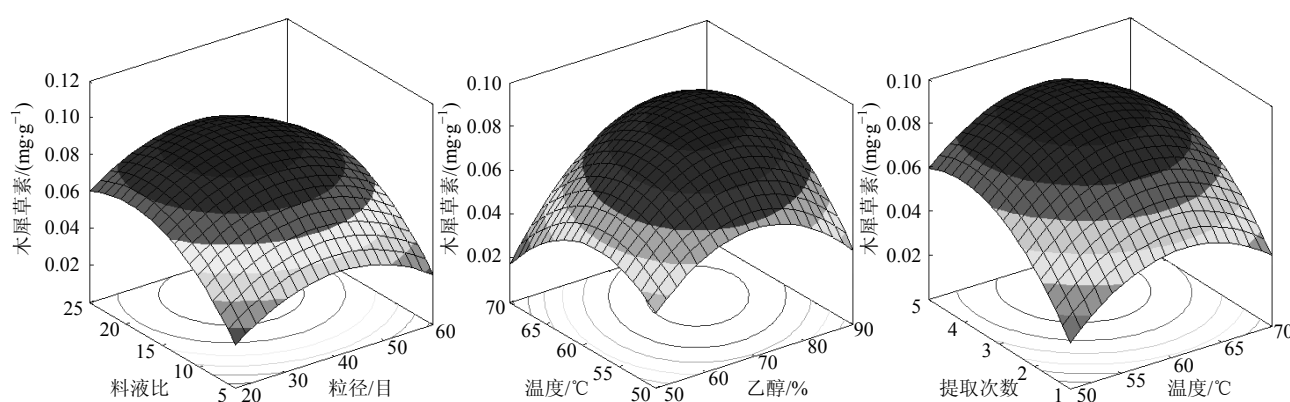


图3 微波提取木犀草素的各因素响应面分析图

Fig. 3 Response surface plots of factors affecting extraction of luteolin by microwave-assisted extraction

料液比 1 : 20, 提取温度 60 °C, 提取次数 4 次, 提取时间 10 min, 功率 500 W。最佳工艺条件下荭草苷和木犀草素的提取率分别为 (4.42 ± 0.01) mg/g 和 (0.10 ± 0.01) mg/g。

参考文献

- [1] 孙绍美, 宋玉梅, 刘 俭, 等. 木豆素制剂药理作用研究 [J]. 中草药, 1995, 26(3): 147-148.
- [2] 张俊清, 李海龙, 谭银丰, 等. 木豆叶的质量评价研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1723-1725.
- [3] Wu N, Fu K, Fu Y J, *et al.* Antioxidant activities of extracts and main components of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves [J]. *Molecules*, 2009, 14(3): 1032-1043.
- [4] 林 励, 谢 宁, 程紫骅. 木豆黄酮类成分的研究 [J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(1): 21-23.
- [5] 付晓春, 杨群华, 汪小根, 等. 荭草苷对大鼠血液流变学及高胆固醇血症小鼠血清胆固醇的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(1): 16-18.
- [6] 张芳芳, 沈汉明, 朱心强. 木犀草素抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2006, 35(5): 573-578.
- [7] 毕和平, 韩长日, 陈明松. 光度法测定杜仲藤中总黄酮 [J]. 理化检验: 化学分册, 2008, 44(5): 345-454.
- [8] Liu W, Zu Y G, Fu Y J, *et al.* Variation in contents of phenolic compounds during growth and post-harvest storage of pigeon pea seedlings [J]. *Food Chem*, 2010, 121(3): 732-739.
- [9] 侯春莲. 木豆叶中牡荆苷与异牡荆苷提取纯化工艺及其抗菌活性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2006.
- [10] 马长雨, 杨悦武, 郭治昕, 等. 微波萃取在中药提取和分析中的应用 [J]. 中草药, 2004, 35(11): 附 7-附 10.
- [11] Shin Y, Liu R H, Nockc J F, *et al.* Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations and antioxidant activity of strawberry [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2007, 45(3): 349-357.