

加压溶剂法提取槐角总异黄酮的研究

张博雅¹, 周丽¹, 王凤荣¹, 陈飞³, 刘檀¹, 张永忠^{1,2*}

1. 东北农业大学 应用化学系, 黑龙江 哈尔滨 150030
2. 教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030
3. 中国农业科学院 农产品加工所, 北京 100193

摘要: 目的 优化加压溶剂法提取槐角总异黄酮的最佳工艺参数。方法 采用紫外分光光度法测定总异黄酮, 以总异黄酮得率为指标, 利用正交试验进行优选, 考察提取时间、提取温度、提取压力、乙醇体积分数和固液比对提取效果的影响, 并纯化得到槐角异黄酮和槐角多糖粗提物。结果 最佳工艺条件为提取压力 900 kPa、提取温度 110 °C、提取时间 10 min、乙醇体积分数 50%、固液比 1:12.5。此时槐角总异黄酮得率为 28.4%, 槐角异黄酮粗提物得率为 32.6%、异黄酮质量分数为 48.5%。结论 加压溶剂法是一种省时、节能、高效、环保的中药有效成分提取方法, 具有广阔的应用前景。

关键词: 加压溶剂法; 槐角; 总异黄酮; 正交试验; 槐角多糖

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1108-04

Study on extraction of total isoflavones from *Sophorae Fructus* by pressurized solvent

ZHANG Bo-ya¹, ZHOU Li¹, WANG Feng-rong¹, CHEN Fei³, LIU Tan¹, ZHANG Yong-zhong^{1,2}

1. Department of Applied Chemistry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China
2. Key Laboratory of Soybean Biology, Ministry of Education, Harbin 150030, China
3. Institute of Agro-food Science & Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Key words: pressurized solvent method; *Sophorae Fructus*; total isoflavones; orthogonal test; polysaccharides in *Sophorae Fructus*

槐角 *Sophorae Fructus* 是豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的成熟果实, 是我国的一种传统中药, 有止血明目之功效。异黄酮类化合物是槐角主要活性成分之一, 包括染料木素 (genistein)^[1]、槐属苷 (sophoricoside)^[2]、槐属双苷 (sophorabioside)^[1-2]、染料木素-7, 4'-双葡萄糖苷 (genistein-7, 4'-diglucoside)^[3]等。研究表明该类化合物具有弱雌激素活性, 有消炎^[4]、抗氧化^[5]、预防癌症和骨质疏松^[6-7]以及治疗妇女绝经综合症^[8]等功效。槐角中异黄酮质量分数大于 200 g/kg^[9], 远远高于大豆中异黄酮质量分数 (525~986 mg/kg^[10]), 而大豆异黄酮的提取还受大豆油脂和蛋白的影响, 工艺复杂, 成本偏高, 因此用槐角代替大豆来提取纯化异黄酮更具有研究价值, 且我国槐角资源丰富, 全国各地均产^[11]。因而开发槐角, 提取槐角异黄酮具有很大的医药和 market 前景。

加压溶剂提取法是一种利用高温高压加速有效

成分提取的全新技术, 与国内外已报道的槐角异黄酮提取方法^[9, 12-13]相比, 加压溶剂法更加短时高效, 且自动化程度高, 更符合中药现代化发展的要求。本实验以乙醇溶液为溶剂, 以异黄酮得率为指标, 利用高纯氮气加压以防止异黄酮氧化, 并利用正交试验对提取工艺参数进行优选, 为槐角有效成分的提取与生产提供理论依据。

1 仪器与材料

Mettler Toledo AL-104 型电子天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司); FW100 型高速万能粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司); KCFD05-10 高压磁力搅拌反应釜 (烟台高新区科立自控设备研究所, 容积 0.5 L, 设计压力 <12 000 kPa, 设计温度 <350 °C); UV-2550 紫外可见分光光度计 (日本岛津公司); Allegra-64R 型高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); Eyela N-1100 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); SHB III 循环水式多用真空

收稿日期: 2011-10-28

基金项目: 国家 863 计划资助课题 (2008AA10Z331)

作者简介: 张博雅 (1986—), 女, 河北张家口市人, 在读硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: emmafs1@hotmail.com

*通讯作者 张永忠 Tel: 13359993588 E-mail: zyz1953@sohu.com

网络出版时间: 2012-05-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120511.0852.008.html>

泵(郑州长城科工贸有限公司); DZF—6030 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

槐角购于安国市京兴药业有限责任公司, 经东北农业大学胡宝忠教授鉴定为豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的干燥成熟果实; 槐角苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111695-200501, 质量分数 98.0%); 其余所用试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 槐角总异黄酮的测定

2.1.1 槐角异黄酮最大吸收波长的确定 槐角中的异黄酮主要包括槐角苷及与其化学结构相类似的染料木黄酮和槐属双苷等。经紫外分光光度法测定, 槐角异黄酮提取液的最大吸收波长也与槐角苷相同, 均为 262 nm。因此采用紫外分光光度法, 以槐角苷为对照品, 测定槐角总异黄酮的量。

2.1.2 线性关系考察 准确称取槐角苷对照品 10.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加 95%乙醇 50 mL, 超声溶解, 冷却后加 95%乙醇至刻度, 摇匀, 得槐角苷对照品储备液 (0.1 mg/mL)。分别准确量取对照品储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置 50 mL 量瓶中, 加 95%乙醇至刻度, 摇匀, 放置 15 min 后以 95%乙醇为空白对照, 在 262 nm 测定吸光度 (A) 值。以 A 值对槐角苷对照品的质量浓度绘制标准曲线, 回归方程为 $A=0.0735C+0.0052$, $r=0.9995$, 槐角苷在 2~10 $\mu\text{g/mL}$ 呈线性关系。

2.1.3 供试品溶液的制备和槐角总异黄酮得率的计算 将提取液离心, 收集上清液置 250 mL 量瓶中, 加 95%乙醇至刻度。从中准确移取 1.0 mL 于 100 mL 量瓶中, 加 95%乙醇至刻度; 再次准确移取 1.0 mL 于 50 mL 量瓶, 加 95%乙醇至刻度。以 95%乙醇为参比, 于 262 nm 处测定 A 值, 根据槐角苷标准曲线计算槐角总异黄酮的量, 并计算槐角总异黄酮得率。

总异黄酮得率 = 提取液中总异黄酮质量 / 槐角粉质量

2.2 槐角总异黄酮的提取工艺

将槐角洗净、烘干、粉碎后过 40 目筛, 备用。准确称取槐角粉 8.0 g, 加入乙醇溶液, 搅拌后移入高压反应釜中, 充入高纯度氮气加压, 同时升高温度。设置磁力搅拌速率为 90 r/min。设置不同的提取时间、提取压力、提取温度、乙醇体积分数和固液比等条件进行提取。

2.3 单因素试验结果及分析

2.3.1 提取时间对得率的影响 在提取压力 500 kPa、提取温度 110 $^{\circ}\text{C}$ 、乙醇体积分数 40%、固液

比 1:10 的条件下, 选取了 5 个提取时间 5、15、25、35、45 min 进行试验, 结果各提取时间下的槐角总异黄酮得率分别为 23.2%、25.7%、25.4%、24.2%、23.0%。随提取时间的延长, 槐角总异黄酮得率先上升, 15 min 时得率达到最高。出现该趋势的原因是提取时间的延长有利于槐角颗粒的溶胀和异黄酮的溶出。但 15 min 后槐角总异黄酮得率缓慢下降, 这可能是高温下时间过长会导致部分异黄酮的分解。因此选择 15 min 为最佳提取时间。

2.3.2 提取温度对得率的影响 在提取时间 15 min、提取压力 500 kPa、乙醇体积分数 40%、固液比 1:10 的条件下, 选取了 5 个提取温度 70、90、110、130、150 $^{\circ}\text{C}$ 进行试验, 结果各提取温度下的槐角总异黄酮得率分别为 23.9%、25.7%、27.2%、26.9%、24.8%。随温度升高得率先呈上升趋势, 至 110 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大。提取温度在 110~130 $^{\circ}\text{C}$, 得率变化不大, 130 $^{\circ}\text{C}$ 以后随温度升高得率下降。这是因为起初在升温过程中, 溶剂的极性、黏度和表面张力都减小, 使异黄酮溶解度增大, 溶剂的渗透性增加。升温还能加快分子扩散速度, 从而加速异黄酮的释放和溶解过程。而后期得率下降可能是由于高温使异黄酮发生分解, 或槐角中的部分蛋白质高温变性, 与槐角异黄酮共沉淀从而导致得率降低。还可能是高温下多糖、蛋白质等成分的浸出量增大, 形成泡沫, 包裹在原料表面而影响了异黄酮的充分提取。其反应机制有待于深入研究。根据易操作程度选择 110 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳提取温度。

2.3.3 提取压力对得率的影响 在提取时间 15 min、提取温度 110 $^{\circ}\text{C}$ 、乙醇体积分数 40%、固液比 1:10 的条件下, 选取 5 个提取压力 100、500、900、1300、1700 kPa 进行试验, 结果各提取压力下的槐角总异黄酮得率分别为 23.7%、24.0%、27.6%、26.8%、25.7%。随着提取压力的提高, 得率呈先急剧上升后缓慢下降趋势, 提取压力为 900 kPa 时槐角异黄酮得率最高。起始阶段得率的提高主要是由于槐角粉虽呈粉状, 但其颗粒仍较为致密坚实, 溶剂较难浸润。施加一定压力, 可以破坏药材内部组织, 迫使封闭的微孔张开; 同时能增加溶剂对基质的穿透能力^[14], 从而提高异黄酮的浸出速度和得率。但在 900 kPa 之后, 过高的压力使得槐角粉微粒聚集在一起, 阻碍了溶剂与其充分接触, 或高压造成了槐角异黄酮的分解, 因而导致得率下降。因此选择 900 kPa 为最佳提取压力。

2.3.4 乙醇体积分数对得率的影响 在提取时间 15 min、提取压力 900 kPa、提取温度 110 °C、固液比 1 : 10 的条件下, 选取了 5 个乙醇体积分数 30%、40%、50%、60%、70% 进行试验, 结果各乙醇体积分数下的槐角总异黄酮得率分别为 25.4%、26.3%、27.1%、26.8%、24.1%。随乙醇体积分数的提高, 得率先缓慢上升, 乙醇体积分数为 50% 时槐角异黄酮得率最高, 之后得率逐渐下降。槐角异黄酮包含多种糖苷和苷元, 其极性介于水和乙醇之间, 根据相似相溶原理, 乙醇水溶液的极性与槐角异黄酮极性越接近, 异黄酮溶解度越大。根据试验结果, 50% 乙醇的极性与其最为相似, 此时得率最高, 因此选择 50% 为最佳乙醇体积分数。

2.3.5 固液比对得率的影响 在提取时间 15 min、提取压力 900 kPa、提取温度 110 °C、乙醇体积分数 50% 的条件下, 选取了 5 个固液比 1 : 7.5、1 : 10、1 : 12.5、1 : 15、1 : 17.5 进行试验, 结果各固液比下的槐角总异黄酮得率分别为 24.9%、26.4%、27.9%、27.0%、26.5%。随固液比的提高, 得率呈先急剧上升后缓慢下降趋势, 固液比为 1 : 12.5 时槐角异黄酮得率最高。起初固液比较低时, 溶剂量不足, 会导致对原料的浸润和提取不充分, 甚至会糊化粘底, 造成异黄酮的损失。而固液比高于 1 : 12.5 后, 可能由于槐角中多糖和蛋白质等物质析出增加, 阻碍了异黄酮的析出, 导致得率下降。因此选择 1 : 12.5 为最佳固液比。

2.4 正交试验结果与分析

在单因素试验的基础上, 对提取时间 (A)、提取温度 (B)、提取压力 (C)、乙醇体积分数 (D)、固液比 (E) 5 个因素进行正交试验, 试验设计及结果见表 1。方差分析见表 2。

正交试验直观分析显示, 各因素对槐角异黄酮得率影响的主次顺序为 C > B > A > D > E, 即提取压力 > 提取温度 > 提取时间 > 乙醇体积分数 > 固液比, 最佳组合为 C₂B₂A₁D₃E₂, 即提取压力为 900 kPa、提取温度为 110 °C、提取时间为 10 min、乙醇体积分数为 50%、固液比为 1 : 12.5 时槐角异黄酮提取效果最好。根据方差分析结果, 与因素 E 比较, 因素 C (即提取压力) 具有极显著影响 (P < 0.01), 因素 B 具有显著影响 (P < 0.05)。

2.5 验证试验及槐角异黄酮质量分数测定

准确称取 8.0 g 槐角粉在正交试验确定的最佳条件下进行验证试验, 平行 3 次, 得到槐角异黄酮

表 1 L₁₆(4⁵) 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of L₁₆(4⁵) orthogonal test

试验号	A / min	B / °C	C / kPa	D / %	E	得率 / %
1	10 (1)	100 (1)	700 (1)	40 (1)	1 : 11 (1)	26.0
2	10 (1)	110 (2)	900 (2)	45 (2)	1 : 12.5 (2)	28.3
3	10 (1)	120 (3)	1 100 (3)	50 (3)	1 : 14 (3)	27.5
4	10 (1)	130 (4)	1 300 (4)	55 (4)	1 : 15.5 (4)	27.0
5	15 (2)	100 (1)	900 (2)	50 (3)	1 : 15.5 (4)	27.5
6	15 (2)	110 (2)	700 (1)	55 (4)	1 : 14 (3)	26.3
7	15 (2)	120 (3)	1 300 (4)	40 (1)	1 : 12.5 (2)	26.8
8	15 (2)	130 (4)	1 100 (3)	45 (2)	1 : 11 (1)	26.5
9	20 (3)	100 (1)	1 100 (3)	55 (4)	1 : 12.5 (2)	25.7
10	20 (3)	110 (2)	1 300 (4)	50 (3)	1 : 11 (1)	26.8
11	20 (3)	120 (3)	700 (1)	45 (2)	1 : 15.5 (4)	25.5
12	20 (3)	130 (4)	900 (2)	40 (1)	1 : 14 (3)	28.0
13	25 (4)	100 (1)	1 300 (4)	45 (2)	1 : 14 (3)	25.5
14	25 (4)	110 (2)	1 100 (3)	40 (1)	1 : 15.5 (4)	26.8
15	25 (4)	120 (3)	900 (2)	55 (4)	1 : 11 (1)	27.1
16	25 (4)	130 (4)	700 (1)	50 (3)	1 : 12.5 (2)	26.6
K ₁	108.8	104.7	104.4	107.6	106.4	
K ₂	107.1	108.2	110.9	105.8	107.4	
K ₃	106.0	106.9	106.5	108.4	107.3	
K ₄	106.0	108.1	106.1	106.1	106.8	
R	2.8	3.5	6.5	2.6	1.0	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1.312	3	8.099	
B	1.987	3	12.265	P < 0.05
C	5.757	3	35.537	P < 0.01
D	1.142	3	7.049	
E (误差)	0.162	3		

F_{0.05}(3, 3) = 9.280 F_{0.01}(3, 3) = 29.500

的平均得率为 28.4%, 与预测值基本相符。将提取液进一步纯化, 即将提取液加热浓缩至 10 mL, 加入 250 mL 无水乙醇, 使浓缩液中乙醇体积分数大于 95%, 利用槐角多糖不溶于乙醇的性质, 使多糖和少量蛋白质共沉淀析出, 搅拌 5 min 后静置 2 h, 待沉淀完全后, 减压滤过, 将得到的滤液在 40 °C 下减压旋转蒸发除去乙醇, 真空干燥至恒定质量, 得槐角总异黄酮粗提物。计算得槐角异黄酮粗提物得率为 32.6%, 槐角粗提物中总异黄酮质量分数为 48.5%。

总异黄酮粗提物得率 = 总异黄酮粗提物质量 / 槐角粉质量
 总异黄酮质量分数 = 粗提物中总异黄酮质量 / 总异黄酮粗提物质量

2.6 对比试验

分别准确称取 8.0 g 槐角粉, 参照丛艳波等^[9, 13]和田中民等^[12]的提取条件利用微波辅助法、超声提取法和亚临界水法进行槐角异黄酮的提取, 并与最佳条件下的加压溶剂法对比提取效果, 结果见表 3。与其他方法相比, 加压溶剂法耗时较短, 且得率大幅度提高。与近些年兴起的亚临界水法单独对比发现, 亚临界水法所要求的温度条件较高 (100 °C < T < 374 °C), 相对更耗能; 另外, 异黄酮难溶于普

通水, 在到达亚临界点之前, 异黄酮基本不会析出。而压力溶剂法利用有机溶剂浸提, 在包括升温升压的整个过程中都发生异黄酮的溶析, 因而异黄酮释放快, 同时高压的施加显著增加了异黄酮的浸出量, 得率显著提高。由此可知, 压力溶剂法是一种有效的提取槐角总异黄酮的方法。

3 讨论

本研究发现在采用加压溶剂法提取槐角总异黄酮的过程当中, 压力和温度对提取效果的影响最大,

表 3 对比试验结果

Table 3 Results of comparative tests

提取方法	提取时间 / min	提取温度 / °C	提取压力 / kPa	溶剂	固液比	得率 / %
加压溶剂法	10	110	900	50%乙醇	1 : 12.5	28.4
微波辅助法 (功率 500 W)	7	60	100	60%乙醇	1 : 12.5	20.5
超声提取法 (功率 800 W)	20	25	100	甲醇	1 : 12.5	19.4
亚临界水法	45	130	500	水	1 : 12.5	23.0

其原因可能在于高压使溶剂沸点大幅度提高, 维持了其液体状态, 同时打开了样品颗粒的微孔, 增加了浸润面积; 而高温则增加了溶质的溶解度和扩散速度, 降低了溶剂的黏度和表面张力, 更有利于异黄酮的渗出。

加压溶剂法以水和醇为提取溶剂, 短时高效, 符合中药现代化发展的绿色、节能、环保的理念, 是一种理想的提取中药材有效成分的方法。同时该法对温度和压力条件要求不高, 易实现产业化, 在中药的浸提生产中有着广阔的应用前景。

参考文献

[1] Gevrenova R, Kitanov G, Ilieva D. Ontogenetic and seasonal variation in the flavonoid composition of *Sophora japonica* cultivated in Bulgaria [J]. *Pharm Biol*, 2007, 45(2): 149-155.

[2] Tulaganov A A, Gaibnazarava D T. Isolation and identification of flavonoids from *Sophora japonica* occurring in Uzbekistan [J]. *Pharm Chem J*, 2001, 35(8): 433-434.

[3] 唐于平, 楼凤昌, 马雯, 等. 槐果皮中的异黄酮甙类成分 [J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(3): 187-189.

[4] Yankep E, Njamen D, Fotsing M T, et al. Griffonianone D, an isoflavone with anti-inflammatory activity from the root bark of *Millettia griffoniana* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(9): 1288-1290.

[5] Hensley K, Mou S, Pye Q N, et al. Chemical versus pharmacological actions of nutraceutical phytochemicals:

antioxidant and anti-inflammatory modalities [J]. *Curr Top Nutraceut Res*, 2004, 2(1): 13-25.

[6] McCormick D L, Johnson W D, Bosland M C, et al. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by soy isoflavones and by Bowman-Birk inhibitor [J]. *Nutr Cancer*, 2007, 57(2): 184-193.

[7] Shim J G, Yeom S H, Kim H J, et al. Bone loss preventing effect of *Sophorae Fructus* on ovariectomized rats [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(1): 106-110.

[8] Lee J, Kim K W, Kim H K, et al. The effect of rexflavone (*Sophorae Fructus* extract) on menopausal symptoms in postmenopausal women: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33(4): 523-530.

[9] 丛艳波, 张永忠, 刘潇. 亚临界水提取槐角中总异黄酮的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 717-720.

[10] Devi M K A, Gondi M, Sakthivelu G, et al. Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity [J]. *Food Chem*, 2009, 114(3): 771-776.

[11] 韦华梅, 王剑波. 陕西省道地药材槐角的资源调查 [J]. 西北药学杂志, 2010, 25(6): 419-421.

[12] 田中民, 万明习. 中药槐角中槐角苷超声提取工艺的研究 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(5): 351-353.

[13] 丛艳波, 刘宁, 张永忠. 微波辅助提取槐角总异黄酮的研究 [J]. 精细化工, 2010, 27(11): 1083-1085.

[14] 李鹏, 李绍平, 付超美, 等. 加压溶剂提取技术在中药质量控制中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(8): 723-726.