

催化与分离提纯技术

酸碱法纯化红三叶草中总异黄酮的工艺

史高峰 蒲凌云 陈学福 王国英 祝娟娟

(兰州理工大学 石油化工学院,甘肃 兰州 730050)

摘要:采用酸碱法及醇溶水沉法对红三叶草中总异黄酮进行了纯化工艺的研究,分别考察碱溶 pH、酸沉 pH、水沉加水量对异黄酮含量及浸膏得率的影响。再通过正交实验得到最佳纯化工艺条件为:碱溶 pH = 8.5,酸沉 pH = 2.5,加水量为异黄酮醇溶液的 6 倍量时,异黄酮质量分数可达 50% 以上。

关键词:红三叶草; 异黄酮; 酸碱法; 纯化

中图分类号:R284.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5214(2011)12-1191-04

A Study on the Acid-base Purification of Isoflavones in Red Clover

SHI Gao-feng, PU Ling-yun, CHEN Xue-fu, WANG Guo-ying, ZHU Juan-juan

(College of Petrochemical Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, Gansu, China)

Abstract: The purification technology with a method of acid-base and water-precipitation in purifying the total isoflavones from red clover was studied. The effect of alkaline solution, acid settling and the amount of water on the content of isoflavones and the yield of extractive was investigated. By the orthogonal test $L_9(3^3)$, the optimal purification conditions were ascertained as follows: pH 8.5 of alkaline solution, pH 2.5 of acid settling, and six times of the amount of water. Under the optimum conditions the content of the total isoflavones from red clover could reach 50%.

Key words: red clover; isoflavones; acid-base method; purification

红三叶草(*Trifolium pratense* L.) 是豆科多年生的草本植物,又名红车轴、红花苜蓿、红苜蓿、金雀菜、三叶草^[1]。研究发现,红三叶是少数几种含有芒柄花素(*formononetin*)、鹰嘴豆芽素(*biochanin*)、染料木素(*genistein*)、大豆素(*daidzein*) 4 种雌激素样异黄酮的植物之一,具有大多数异黄酮 6 倍以上的雌激素样的活性,且具有双向调节作用。目前,红三叶异黄酮的提取物是国际上公认的治疗妇女更年期综合征疗效确切的植物药,其销量在美国多年来一直名列植物药前十位,我国每年均有大量出口。

目前,红三叶草中总异黄酮一般采用乙醇提取、大孔树脂分离的制备方法^[7],但该方法存在分离设备投入高、产量低、有机溶剂耗量大、分离纯化效率低等问题。同时,根据卫生部颁发的卫法监发[2002]135 号文件,由于大孔吸附树脂分离纯化工艺的安全性尚在研究中,为保障食品的食用安全,卫

生部将不再受理以此工艺生产的保健食品,从而严重限制了采用该工艺制备的异黄酮产品的应用范围^[8]。为此,本文采用碱溶酸沉法和醇溶水沉法联合对红三叶异黄酮进行纯化,并对其纯化工艺进行了优化实验,得到了最佳的纯化工艺条件。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

红三叶草,由甘肃岷县方正草业有限公司提供,经中国科学院西北高原生物研究所黄荣福研究员鉴定为豆科植物红三叶草(*Trifolium pratense* L.)的干燥带花枝叶;鹰嘴豆芽素标准品(质量分数大于 98%)购自 Sigma 公司;甲醇为色谱纯;无水乙醇、氢氧化钠、硫酸均为 AR。

U-2001 紫外分光光度计(日本 Hitachi 公司) ZK-82 电热真空干燥箱(上海市实验仪器总厂),AL204

收稿日期:2011-08-19; 定用日期:2011-10-28

作者简介:史高峰(1963-),男,教授,博士,电话:13109391608, E-mail: shigaofeng@lut.cn.

电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)RE-3000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)KQ5200DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 供试液的制备

取 100 g 红三叶全草,将其粉碎,置于 1 000 mL 的圆底烧瓶中,采用 V (体积分数为 90% 乙醇): V (乙酸乙酯)=4:1 的混合溶剂进行热回流提取,其中提取的料液质量比为 1:8,提取温度为 75 °C,提取时间为 1.5 h,共提取 3 次,合并滤液进行减压浓缩,回收溶剂,收集浓缩液,进行真空干燥,得浸膏量为 7.81 g,然后将浸膏用石油醚进行热回流脱脂,得到浸膏粉 5.2 g,采用紫外分光光度法测得其异黄酮质量分数为 10%。然后向此浸膏中加入 100 mL 的蒸馏水,配制成异黄酮浸膏的水溶液,备用。

1.2.2 红三叶草异黄酮的含量测定

标准曲线的制作:精确称取鹰嘴豆芽素 A 标准品 9.8 mg,用甲醇溶解并定容至 10 mL,再从此溶液中准确吸取 0.5 mL 于 10 mL 容量瓶,用甲醇定容至刻度。精密吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 此溶液,分别置于 10 mL 容量瓶中,各自加入甲醇定容至 10 mL,在波长 260 nm 处测定吸收值。得回归标准曲线为:

$$Y = 140.6X + 0.1254 \quad r = 0.9999$$

其中: X 是红三叶草异黄酮的浓度。

1.2.3 红三叶总异黄酮纯化

1.2.3.1 碱溶 pH 的考察

取如 1.2.1 节方法制备红三叶异黄酮的备用液 10 mL 各 5 份,分别缓缓加入 2 mol/L 的 NaOH 水溶液调节 pH 至 7、7.5、8、8.5、9。然后进行过滤,取滤液,缓缓向滤液中加入 2 mol/L 的硫酸溶液,调节 pH 至 2.0,在室温下静置 1 h,可观察到有黄褐色沉淀析出,3 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,进行真空干燥,得黄褐色粉末浸膏。取少量浸膏粉末,用甲醇溶解且用 10 mL 容量瓶定容,用紫外分光光度法测其总异黄酮含量。

1.2.3.2 酸沉 pH 的考察

取如 1.2.1 节方法制备红三叶异黄酮的备用液 50 mL,分别缓缓加入 2 mol/L 的 NaOH 水溶液调节 pH 至 8。然后进行过滤,取滤液将其分成 5 等份,然后缓缓向滤液中加入 2 mol/L 的硫酸溶液,分别调节 pH 至 2、2.5、3、3.5、4,在室温下静置 1 h,可观察到有黄褐色沉淀析出,后处理同 1.2.3.1 节。

1.2.3.3 水沉加水量的考察

取上述酸沉浸膏粉末 2 g 于小烧杯中,向其中缓缓加入无水乙醇至浸膏完全溶解,过滤后,将其分

成 5 等份,然后向滤液中缓缓加入滤液量的 2 倍、4 倍、6 倍、8 倍、10 倍的蒸馏水,滤液中出现了灰绿色絮状沉淀,静置 12 h 后,后处理同 1.2.3.1 节。

2 结果与分析

红三叶异黄酮属于黄酮类化合物,其结构中具有酚羟基,显酸性,易溶于碱水中,而难溶于酸水,根据红三叶异黄酮的理化性质,以红三叶总异黄酮含量为指标,分别对碱溶 pH、酸沉 pH、水沉加水量分别进行了考察,其考察结果分析如下。

2.1 碱溶 pH 的考察

不同碱溶 pH 对异黄酮质量分数的影响见图 1。

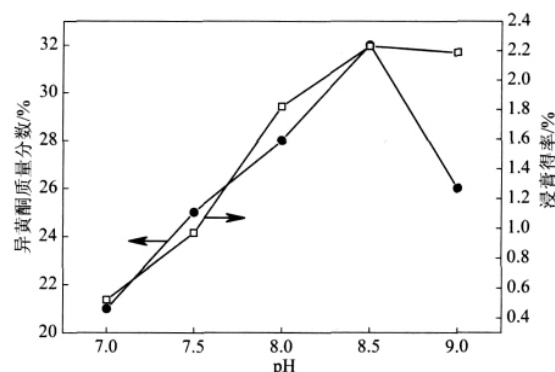


图 1 不同碱液浓度对异黄酮质量分数的影响

Fig. 1 Effect of base concentration on the mass fraction of isoflavone

由图 1 可知,碱的 pH = 8.5 时,异黄酮质量分数最高,可达 32%。这是由于异黄酮类化合物结构中具有酚羟基,显酸性,易溶于碱水中,随着碱浓度的增加,异黄酮溶解度逐渐增大,但碱性过大会破坏黄酮的母核,从而导致异黄酮含量下降。

2.2 酸沉 pH 的考察

不同酸沉 pH 对异黄酮质量分数的影响见图 2。

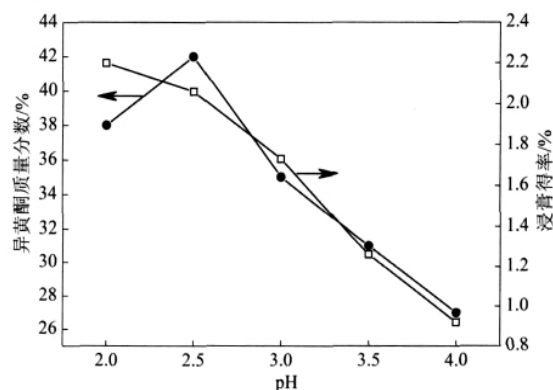


图 2 不同酸浓度对异黄酮质量分数的影响

Fig. 2 Effect of acid concentration on the mass fraction of isoflavone

由图 2 可知 酸的 $\text{pH} = 2.5$ 时,异黄酮质量分数最高,可达 42%。根据异黄酮类物质的结构性性质可知 异黄酮类化合物显酸性 不溶于酸性溶液中,所以 pH 减小有利于异黄酮类物质析出,可与其他易溶于酸性溶液的杂质进行分离 达到分离纯化的目的。

2.3 水沉加水量的考察

异黄酮乙醇溶液加水量倍数对异黄酮质量分数的影响如图 3 所示。

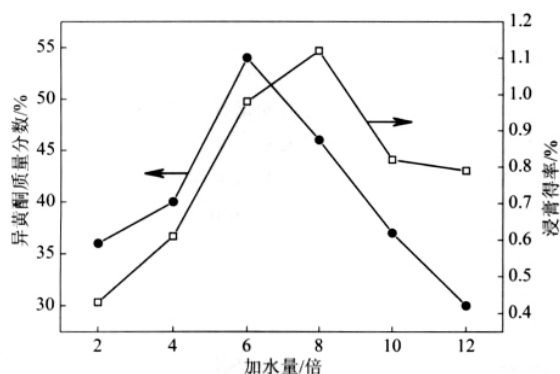


图 3 不同加水量倍数对异黄酮质量分数的影响

Fig. 3 Effect of water volume on the mass fraction of isoflavone

由图 3 可知,加水量为样品醇溶液的 6 倍量时,异黄酮质量分数最高,可达 54%。这是由于异黄酮类物质易溶于乙醇,而难溶于水。随着异黄酮乙醇溶液加水量的增加,异黄酮类物质析出,而随着加水量的继续增加,一些中小极性的物质也被析出,导致异黄酮含量下降。

2.4 最佳工艺选择

在单因素实验的基础上,选取碱溶 pH 、酸沉 pH 、加水量倍数为参考因素,以红三叶草中总异黄酮含量和浸膏含量为指标,综合评分 $= 0.7 \times$ 异黄酮质量分数(%) $+ 0.3 \times$ 浸膏得率(%),设计 $L_9(3^3)$ 正交实验,确定红三叶草中总异黄酮的最佳纯化工艺。因素实验表见表 1,正交实验结果见表 2。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	A 碱溶 pH	B 酸沉 pH	C 加水量/倍
1	8	2	6
2	8.5	2.5	8
3	9	3	10

由表 1 可知,异黄酮含量及得率的因素影响程度按照从小到大的顺序排列为 $R_A > R_B > R_C$,并得到最佳纯化工艺条件为 $A_2B_2C_1$,即碱溶 $\text{pH} = 8.5$,酸沉 $\text{pH} = 2.5$,加水量为异黄酮醇溶液的 6 倍量。

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

实验号	A 碱溶 pH	B 酸沉 pH	C 加水量/倍	总异黄酮 质量分数/%	浸膏得率 /%	综合 评分
1	1	1	1	49.31	0.91	34.79
2	1	2	2	50.23	0.96	35.45
3	1	3	3	48.70	1.02	34.40
4	2	1	2	52.85	1.05	37.31
5	2	2	3	54.12	0.99	38.18
6	2	3	1	50.64	1.10	35.78
7	3	1	3	48.22	1.01	34.06
8	3	2	1	51.48	0.94	36.32
9	3	3	2	47.11	0.98	33.27
K1	34.88	35.38	35.63			
K2	37.09	36.65	35.34			
K3	34.55	34.48	35.55			
R	2.54	2.17	0.29			

2.5 红三叶异黄酮酸碱纯化法重复性验证实验

如 1.2.1 节方法制备红三叶异黄酮的备用液,向其中加入 2 mol/L 的 NaOH 水溶液调节 $\text{pH} = 8.5$,过滤后,再向滤液中缓缓加入 2 mol/L 的硫酸溶液,调节 $\text{pH} = 2.5$,离心后,将沉淀进行真空干燥,再用无水乙醇进行溶解,加入乙醇溶解液 6 倍的蒸馏水,待其完全沉淀后,离心,得异黄酮粗粉。用紫外分光光度法测其异黄酮含量,其结果如表 3 所示。

表 3 红三叶异黄酮酸碱纯化法重复性验证实验结果

Table 3 Result of verifying test in the acid-base purification of isoflavones

实验次数	浸膏量/g	浸膏得率/%	异黄酮质量分数/%
1	1.0512	1.05	50.60
2	0.9134	0.91	52.10
3	0.9485	0.95	54.40

3 结论

采用酸碱法及醇溶水沉法对红三叶草中异黄酮进行纯化,最佳工艺条件为:碱溶 $\text{pH} = 8.5$,酸沉 $\text{pH} = 2.5$,加水量为异黄酮醇溶液的 6 倍量时,红三叶异黄酮质量分数最高,可达 50% 以上。

此技术工艺简单,且制备过程中仅采用食用级乙醇为溶剂,具有安全、污染少、成本低的优点,为开发以异黄酮为有效成分的保健食品和医药品提供了参考。

参考文献:

- [1] 陈学福,史高峰.红三叶异黄酮研究进展[J].中草药,2006,32(2):309-311.
- [2] 沈玥,张永忠.红三叶草异黄酮抗氧化活性的研究[J].食品与发酵工业,2009,35(11):122-124. (下转第 1202 页)

本文对适用的氧化剂进行了筛选,结果见表 4。以新制的 Ag_2O 作氧化剂,成本最高,收率最低,且氧化银的还原产物银附着在瓶壁上,难以处理。 NaClO_2 和 Jone's 试剂只需室温反应,但亚氯酸钠氧化反应时间短,反应物定量转化,收率非常高,且后处理简单,而 Jone's 试剂氧化反应时间长,且现用现配,操作繁琐。故 NaClO_2 是本反应较优的氧化剂。

表 4 氧化剂对氧化反应收率的影响

Table 4 Effect of oxidant on the yield of oxidation

	氧化剂		
	新制的 Ag_2O ^①	NaClO_2	新制的 Jone's 试剂 ^②
反应时间/h	3	1	10
反应温度/°C	90	20~25	20~25
收率/%	46	99	87

①新制的 Ag_2O : $n(\text{硝酸银}):n(\text{NaOH}(1\text{ mol/L}))=1:2$, 室温, 搅拌约 30 min; ②三氧化铬的硫酸溶液。

3 结论

以邻香兰素为原料,在氯化钠作用下,与烯丙基溴发生烯丙基化反应,所得到的中间体经亚氯酸钠和氨基磺酸氧化得到 3-甲氧基-2-(2-丙烯氧基)苯甲酸,然后,与甲醇作用成酯,再经过克莱森重排、氨解反应得到目标产品——阿利苯多,反应总收率为 71.9%。本文探索了一条合成阿利苯多的工艺路线,此工艺具有原料易得,操作简便,条件温和,产品收率高,易于纯化等特点。

参考文献:

[1] Clemence F, Le Martret O. 2-Hydroxy-3-methoxy-5-allyl

benzamides [P]. US: 3668238, 1972-06-06.

- [2] Kim E, Kim J Y, Rhee H. A synthesis of alibendol 2-hydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-3-methoxy-5-(2-propenyl) benzamide via m-CPBA oxidation of o-vanillin [J]. Bull Korean Chem Soc 2004, 25(11): 1720-1722.
- [3] Amala K, Raman K V, Adibhatla Kali Satya Bhujanga Rao *et al.* An improved process for the preparation of 2-hydroxy-3-methoxy-5-allylbenzamides [P]. IN: 199099, 2006-07-07.
- [4] Yamaguchi S, Tsuchida N, Miyazawa M *et al.* Synthesis of two naturally occurring 3-methyl-2,5-dihydro-1-benzoxepin carboxylic acids [J]. J Org Chem 2005, 70(19): 7505-7511.
- [5] Gao Y, Voigt J, Zhao H *et al.* Utilization of a peptide lead for the discovery of a novel PTP1B-binding motif [J]. J Med Chem 2001, 44(18): 2869-2878.
- [6] Nagamani S A, Norikane Y, Tamaoki N. Photoinduced hinge-like molecular motion: Studies on xanthene-based cyclic azobenzene dimmers [J]. J Org Chem 2005, 70: 9304-9313.
- [7] Yoshida M, Nakatani K, Shishido K. Total synthesis of radulanin H and proposed structure of radulanin E [J]. Tetrahedron 2009, 65: 5702-5708.
- [8] Belinda A, Philip T. Synthetic studies of the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 and related analogues [J]. Australian Journal of Chemistry 2003, 56(11): 1099-1106.
- [9] 李桂花, 李增喜, 陈玉焕, 等. 甲基丙烯酰氧化酯化制甲基丙烯酸甲酯 [J]. 精细化工 2004, 21(10): 775-777.
- [10] 费学宁, 张宝莲, 石博杰, 等. 烯丙基酚类衍生物的简便合成 [J]. 应用化学 2006, 23(2): 221-223.
- [11] Pincock A L, Pincock J A, Stefanova R. Substituent effects on the rate constants for the photo-claisen rearrangement of allyl aryl ethers [J]. J Am Chem Soc 2002, 124: 9768-9778.
- [12] Kumar D S, Chandrasekhar A, Narasimha K V L *et al.* Design, synthesis and evaluation of peroxisome proliferator-activated receptor/dual agonists for the treatment of type 2 diabetes [J]. Letters in Drug Design & Discovery 2007, 4(1): 27-32.

(上接第 1193 页)

- [3] Antoinette H W, Toebes Vincent de Boer, Jos A C Verkleij *et al.* Extraction of isoflavone malonylglucosides from *Trifolium pratense* L. [J]. Food Chem 2005, 53(12): 4660-4666.
- [4] Rong Tsao, Yousef Papadopoulos, Raymond Yang *et al.* Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006, 54(16): 5797-5805.
- [5] 张念, 华茉莉, 姜仁吉, 等. 红车轴草醇提物的化学成分研究

[J]. 中成药 2010(10): 103-106.

- [6] 苏振宏, 马红樱, 喻格书, 等. 红车轴草的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 黄石理工学院学报 2008, 24(5): 20-23.
- [7] 李崇明, 向阳, 翟莉, 等. 红车轴草中总异黄酮提取精制工艺研究 [J]. 中草药 2004, 35(10): 61-62.
- [8] 汪海波. 红车轴草异黄酮的分离纯化工艺研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(9): 266-270.

欢迎订阅 2012 年《精细化工》月刊

《精细化工》月刊(每月 15 日出版、每期正文 104 版)是中国化工学会精细化工专业委员会和中国精细化工协会(筹)会刊。国内统一刊号: CN 21-1203/TQ; 国际标准刊号: ISSN 1003-5214。

《精细化工》定价 15 元/期, 全年订价 180 元, 国内邮发代号: 8-55, 全国各地邮政局(所)均可订阅; 国外总发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱), 国外发行代号: 4624 M。本刊编辑部随时办理补订业务。欢迎您订阅、投稿、刊登广告。

邮局汇款地址: 大连高新园区黄浦路 201 号(邮编 116023); 收款人: 《精细化工》编辑部; 电话: 0411-84699773-4; 传真: 0411-84685669-4; E-mail: finechem@mail.dlptt.ln.cn; 网址: http://www.finechemicals.com.cn; 联系人: 曲蕾。

银行汇款请汇至开户行: 交通银行星海支行; 账号: 212060050010149003596; 收款单位: 大连化工研究设计院(汇款请务必注明汇款目的)。