

微波辅助提取红车轴草异黄酮的工艺研究

金汝城¹, 赵国磊², 李贵文², 逢艳³

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050;

2. 兰州理工大学石油化工学院, 甘肃 兰州 730050; 3. 深圳大学应用化学化工学院, 广东 深圳 518060)

摘要: 采用密闭微波提取装置对红车轴草异黄酮成分进行提取工艺的研究。通过单因素和正交试验对红车轴草异黄酮提取工艺中乙醇浓度、微波功率、料液比、提取时间和提取次数等影响异黄酮提取率的因素进行探讨。红车轴草异黄酮的最佳提取工艺参数为: 乙醇浓度70%, 微波功率高火(750W), 料液比1:15, 提取时间1min, 提取三次, 异黄酮提取率可达到98.91%。与超声波提取、乙醇回流提取和索氏提取相比, 微波提取具有提取速度快, 选择性好及操作方便等特点。

关键词: 微波提取; 红车轴草; 异黄酮; 正交试验

Study on Microwave-assisted Extraction of Isoflavones in *Trifolium pratense*

JIN Ru-cheng¹, ZHAO Guo-lei², LI Gui-wen², PANG Yan³

(1. College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;

2. College of Petrochemical Technology, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;

3. College of Chemical and Technology, University of Shenzhen, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Extraction technology of isoflavones in *Trifolium pratense* was developed by using an obturated microwave-assisted extraction (MAE) equipment. Effects of ethanol-water solvent, microwave power, ratio of liquid to material, extraction time and extraction times on extraction rate of isoflavones were investigated by single factor and orthogonal test. The optimum extraction conditions for *Trifolium pratense* isoflavones were established as follows: 70% ethanol (V/V) as solvent, ratio of liquid to material 15:1 (V/W), microwave power high fire (750W), extraction for 3 times and 1 min for each time. The extraction rate of isoflavones in *Trifolium pratense* was as high as 98.91%. Compared with ultrasonic extraction, reflux extraction and Soxhlet extraction, microwave extraction is a rapid method with a good selectivity and handle expediently.

Key words: microwave extraction; *Trifolium pratense*; isoflavone; orthogonal test

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)09-0165-04

红车轴草(*Trifolium pratense*)为豆科蝶形花亚科车轴草属植物,又名红三叶、红花苜蓿、红菽草、红荷兰翘摇、金花菜、三叶草等。其被发现的早期常被用来治疗皮肤病及呼吸系统的疾病。因其全草含有染料木素(genistein)、芒柄花素(formononetin)、大豆苷元(daidzein)和鹰嘴豆芽素A(biochanin A)及相应的苷等8种主要异黄酮成分,是少数几种含“植物雌激素”的植物之一,使之成为一种极具前途的天然保健食品^[1]原料。至今,大量的药理学研究表明,红车轴草异黄酮及其活性成分具有植物雌激素样作用和改善更年期妇女的骨质疏松症、预防乳腺癌、心血管系统疾病的作用,且逐步应用于临床^[2-4]。

微波提取是利用微波能来进行物质萃取的一种新发

展起来的技术。与常规提取方法相比较,具有高效率、易控制、穿透力强、选择性高、提取成本低等特点。本实验对红车轴草中异黄酮成分的微波提取与常规方法提取进行了比较,结果表明,密闭微波提取法所需时间短,方法简便易行,具有潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红车轴草 甘肃岷县;芒柄花素(批号:111703-200501) 中国药品生物制品检定所;UV-9200紫外可见分光光度计;KQ-250DE型数控超声波清洗器;Galanz WP750 机械型微波炉。

1.2 方法

收稿日期:2007-06-08

作者简介:金汝城(1949-),男,教授,博士后,研究方向为天然产物与生物药物,非处方药物(包括健康食品)。

1.2.1 红车轴草异黄酮的含量测定

采用三波长紫外分光光度法测定异黄酮的含量^[5], 精确称取干燥至恒重的刺芒柄花素 5.1mg, 用甲醇溶解并定容至 25ml。准确吸取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6ml 此溶液于 10ml 容量瓶中, 分别加入甲醇使成 0.6ml, 再用 80% 乙醇定容至 10ml, 用 UV-9200 分光光度计在 242、262、282nm 三个波长处测其吸光度, 计算 $A(A=A_{262} - (A_{242}+A_{282})/2)$ 。异黄酮浓度与吸光度的关系为: $A=0.0736C$, 其中 C 为异黄酮浓度, 单位 $\mu\text{g/ml}$, $r=0.9997$ 。

1.2.2 提取率的计算

准确称取 5g 红车轴草粉于 250ml 圆底烧瓶中, 加入 60ml 80% 的乙醇, 80℃ 水浴回流提取, 重复提取多次至提取液无色, 且经紫外分光光度计检测异黄酮浓度接近于零, 合并提取液, 计算出红车轴草中异黄酮总含量为 2.83mg/g (占全草), 与文献[6]报道的结果相近。以此异黄酮含量为基准(100% 提取), 计算不同方法的提取率。

$$\text{提取率}(\%) = \frac{\text{不同方法提取的异黄酮含量}}{\text{红车轴草异黄酮总含量}} \times 100$$

1.2.3 单因素及正交试验设计

试验采用密闭微波提取装置, 将原料加入到置于高压釜内的聚四氟乙烯材料制成的内杯中, 加入溶剂后, 密闭体系, 将高压釜放入微波炉中进行提取, 通过对提取工艺中的乙醇浓度、料液比、微波功率、提取时间和次数等影响红车轴草异黄酮提取率的因素进行单因素及正交试验, 确定最佳的工艺参数。

表 1 正交试验因素水平表 $L_{18}(3^5)$
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素				
	A 乙醇浓度(%)	B 功率	C 料液比	D 时间(min)	E 次数
1	60	中火	1:10	1	1
2	70	中高火	1:15	2	2
3	80	高火	1:20	3	3

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 乙醇浓度的影响

将原料与溶剂按 1:15(g/ml) 的比例装入高压釜中, 分别加入 40%、50%、60%、70%、80% 和 95% 的乙醇溶液, 微波功率设为中火, 提取 3min, 提取液离心 (3500r/min) 10min, 过滤, 用相应浓度的乙醇溶液定容至 100ml, 测定异黄酮含量, 计算提取率, 结果见图 1。

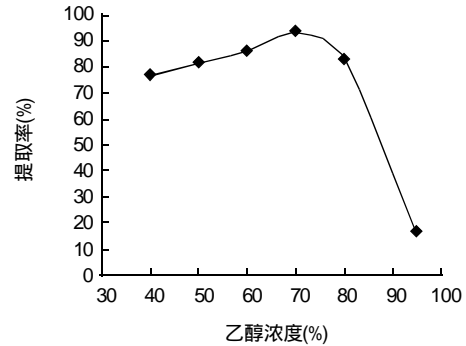


图 1 乙醇浓度对异黄酮提取率的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on extraction rate of isoflavone

采用微波提取时所选用的溶剂必须对微波透明或半透明, 便于有效地吸收所需要的微波能。医用乙醇是较好的提取剂, 可避免有毒、有害物质的残留, 后处理相对简单。由图 1 可知, 随着乙醇浓度的增加, 提取率亦随之增大, 当乙醇浓度达到 70% 时, 异黄酮的提取率最高; 乙醇浓度再增加, 提取率开始降低, 原因是随着乙醇浓度的增加, 一些醇溶性的杂质、色素、亲脂性强的成分溶出量增加, 导致异黄酮的提取率下降。

2.1.2 料液比的影响

选用 70% 的乙醇作为提取剂, 分别采用 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 和 1:30 的料液比进行装釜, 微波功率设为中火, 提取 3min, 提取液离心 (3500r/min) 10min, 过滤, 用 70% 的乙醇溶液定容至 100ml, 测定异黄酮含量, 计算提取率, 结果见图 2。

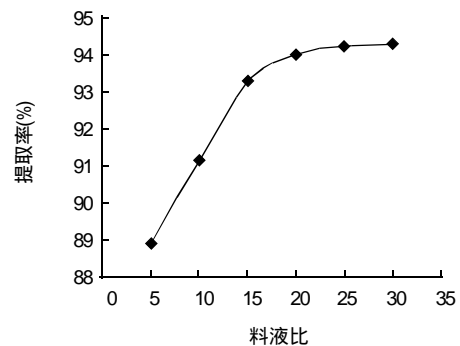


图 2 料液比对异黄酮提取率的影响

Fig.2 Effects of ratio of liquid to material on extraction rate of isoflavone

料液比实际上是溶剂的用量大小, 在提取过程中, 当溶剂用量达到一定程度, 有效成分的提取率便趋于平衡, 过大的料液比会造成溶剂和能源的浪费, 并给后续的浓缩带来困难。由图 2 可知, 当料液比达到 1:20 时, 再增大溶剂用量, 异黄酮的提取率变化趋于平缓, 表明已经达到溶解平衡。

2.1.3 微波功率的影响

选用70%的乙醇作为提取剂，料液比为1:20，在不同的微波功率下，提取3min，提取液离心(3500r/min)10min，过滤，用70%的乙醇溶液定容至100ml，测定异黄酮含量，计算提取率，结果见图3。

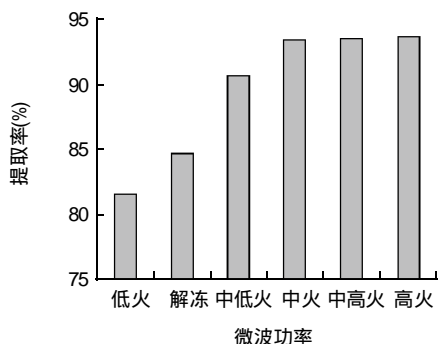


图3 微波功率对异黄酮提取率的影响

Fig.3 Effects of power of microwave on extraction rate of isoflavone

微波功率对提取率具有明显的影响。功率越高，提取的效率越高，但同时体系的升温速度也越快，温度过高可能会引起某些成分的结构被破坏。由图3可知，微波功率为中火时，异黄酮的提取率趋于平衡。综合考虑提取率、能源损耗和提取效率等因素，选用中火、中高火、高火为进一步优化范围。

2.1.4 提取时间的影响

选用70%的乙醇作为提取剂，料液比为1:20，微波功率设为中火，提取时间分别为1、2、3、4、5、6min，提取液离心(3500r/min)10min，过滤，用70%的乙醇溶液定容至100ml，测定异黄酮含量，计算提取率，结果见图4。

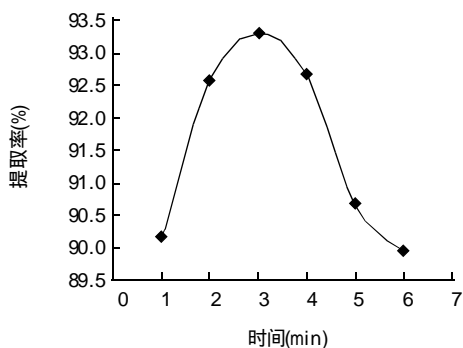


图4 提取时间对异黄酮提取率的影响

Fig.4 Effects of extraction time on extraction rate of isoflavone

由图4可知，随着时间的增加，提取率逐渐升高，当时间达到3min时，提取率最高。再延长时间，提取率反而开始下降，原因可能是因为时间过长，体系温

度过高，萃取釜内的压强会越来越大，进而引起异黄酮结构被氧化破坏导致提取率降低。

2.1.5 提取次数的影响

选用70%的乙醇作为提取剂，料液比为1:20，微波功率设为中火，分别提取1、2、3、4次，每次3min，提取液离心(3500r/min)10min，过滤，用70%的乙醇溶液定容至100ml，测定异黄酮含量，计算提取率，结果见图5。

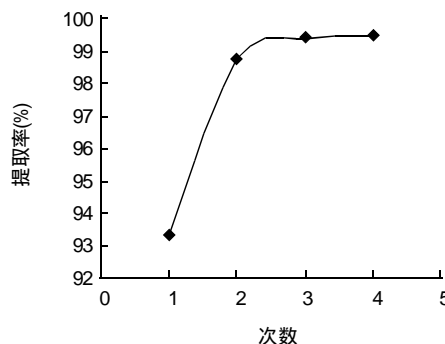


图5 提取次数对异黄酮提取率的影响

Fig.5 Effects of extraction times on extraction rate of isoflavone

由图5可知，微波提取三次时，异黄酮成分可基本上提取完全，再继续增加提取次数不但增加溶剂消耗，而且造成能源浪费，给后续浓缩带来困难。

2.2 正交试验结果与分析

在以上单因素试验的基础上，对影响红车轴草异黄

表2 正交试验设计及结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	E	提取率(%)
1	1	1	1	1	1	81.52
2	1	2	2	2	2	82.72
3	1	3	3	3	3	84.41
4	2	1	1	2	2	92.58
5	2	2	2	3	3	93.54
6	2	3	3	1	1	96.91
7	3	1	2	1	3	92.34
8	3	2	3	2	1	85.38
9	3	3	1	3	2	91.14
10	1	1	3	3	2	82.48
11	1	2	1	1	3	86.81
12	1	3	2	2	1	87.77
13	2	1	2	3	1	92.82
14	2	2	3	1	2	90.66
15	2	3	1	2	3	91.38
16	3	1	3	2	3	94.99
17	3	2	1	3	1	91.62
18	3	3	2	1	2	92.82
K ₁	84.29	89.46	89.18	90.18	89.34	
K ₂	92.98	88.46	90.34	89.14	88.73	
K ₃	91.38	90.74	89.14	89.34	90.58	
R	8.70	2.28	1.20	1.04	1.85	

黄酮提取率的因素进行 $L_{18}(3^7)$ 正交试验,并对试验结果进行统计分析,结果如表2、3所示。

表3 异黄酮提取率的方差分析

Table 3 Analysis of variance of extraction rate of isoflavone

方差来源	平方和	自由度	平均平方和	F 显著性
A	257.109	2	128.555	16.681**
B	15.721	2	7.861	1.020
C	5.558	2	2.779	0.361
D	3.659	2	1.830	0.237
E	10.620	2	5.310	0.689
误差	30.830	4	7.708	

注: $F_{0.05}(2, 4) = 6.94$ 。

由直观分析和方差分析可知,乙醇浓度对红车轴草异黄酮提取率有显著性影响($\alpha=0.05$),各因素影响大小依次为: $A > B > E > C > D$,据测定结果优化出的最佳工艺为 $A_2B_3C_2D_1E_3$,即用70%的乙醇溶液,料液比1:15,微波功率高火,提取三次,每次1min,因最佳组合不在实验设计中,需做验证实验。

2.3 验证实验

按正交实验优选工艺 $A_2B_3C_2D_1E_3$,平行提取三次,得平均提取率98.91%,表明实验所确定的最佳工艺为较优工艺。

2.4 微波提取同其它方法的比较

使用同一批原料,在各自最佳实验条件下分别进行三次实验,对比微波辅助法、超声波法、乙醇回流法和索氏提取对红车轴草异黄酮成分的提取效果,结果见表4。

由表4可知,微波辅助提取同其它几种方法比较,提取时间缩短,乙醇浓度水平更低,异黄酮提取率高,充分体现了微波提取速度快,提取效率和选

表4 不同提取方法结果的比较

Table 4 Comparison of results of different extraction methods

方法	乙醇浓度(%)	时间	次数	提取率(%)
微波辅助	70	1min	3	98.91
超声波法	80	5min	3	96.83
回流提取	80	1h	3	94.62
索氏提取	80	10h	1	98.11

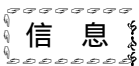
择性好的优点。

3 结论

通过单因素试验和正交试验,确定红车轴草异黄酮最佳提取工艺为:乙醇浓度70%,微波功率高火,料液比1:15,提取时间1min,提取三次,红车轴草异黄酮提取率可达98.91%。

参考文献:

- [1] 曾虹燕,周朴华,侯团章.红车轴草有效成分的研究进展[J].中草药,2001,32(2):189-190.
- [2] VAN DE WEIJER P H, BARENTSEN R. Isoflavones from red clover (*Prunensil*) significantly reduce menopausal hot flash symptoms compared with placebo[J]. *Maturitas*, 2002, 42(3): 187-193.
- [3] LIU J, BURDETTE J E, XU H, et al. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(5): 2472-2479.
- [4] HAN K K, SOARES J M, HAIDAR M A, et al. Benefits of soy isoflavone, therapeutic regimen on menopausal symptoms[J]. *Am College Obstet Gynecol*, 2002, 99(3): 389-394.
- [5] 陈寒青,金征宇.三波长紫外分光光度法测定红车轴草异黄酮含量的研究[J].食品科学,2005,26(5):194-197.
- [6] LEI X, ASHWANI K, KAREN L, et al. Recovery of isoflavones from red clover flowers by an membrane-based process[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2006, 70: 558-562.



澳专家揭开Shiraz 的辛辣之谜

位于阿德雷德的澳大利亚葡萄酒研究组织(AWRI),帮助发现了Shiraz 中的神秘成分,而使Shiraz 葡萄酒拥有更加辛辣的气息和味道。

这种辛辣来自于一种化合物,它有着非常强劲的力量,仅一滴可以使一个奥运会标准的游泳池都散发出胡椒粉味。一个全球性的,包括AWRI 在内的长达八年的合作小组,使这种化合物分离出来。

研究组的科学家Alan Polnitz博士说,“Shiraz 葡萄的种植在澳洲超过了所有葡萄品种的1/5,这项研究的成功在葡萄酒酿造业是一个重要的突破。这表明了,目前我们可以准确的测量出葡萄中这种化合物的含量,我们可以尝试并计算出在葡萄生长过程中,在哪个阶段产生该种物质,是什么因素影响这种物质的大量产生。”

如果酿酒师希望他的Shiraz 葡萄酒能含有较多的这种化合物,或者他们希望产品在每个年份能拥有等量的辛辣化合物,他们便可以测量并按照自己的需要控制这种物质的量。Polnitz 博士还说,大约20%的人是闻不到这种物质的气味的。