

正交试验法优选鹰嘴豆种子中鹰嘴豆芽素 A 的提取工艺

田春元

(孝感学院生命科学技术学院, 湖北 孝感 432000)

摘 要：目的：优选鹰嘴豆种子中鹰嘴豆芽素 A 的提取工艺。方法：采用正交试验法，以鹰嘴豆种子中鹰嘴豆芽素 A 的含量为指标进行试验。结果：优选出从鹰嘴豆种子中提取鹰嘴豆芽素 A 的最佳工艺：10 倍于生药量的 95% 乙醇溶液热回流提取两次，每次 1.5h。结论：该工艺可提高鹰嘴豆种子中鹰嘴豆芽素 A 的提取率和纯度，而且方便、安全、无毒、成本低、效率高，可在大规模生产鹰嘴豆芽素 A 时推广应用。另外，本研究还建立了一种新的快速、准确检测鹰嘴豆种子中鹰嘴豆芽素 A 的 RP-HPLC 方法。

关键词：鹰嘴豆种子；鹰嘴豆芽素 A；正交试验；RP-HPLC

Orthogonal Array Design for Optimization of Extraction of Biochanin A from Chickpea Seed

TIAN Chun-yuan

(School of Life Science and Technology, Xiaogan University, Xiaogan 432000, China)

Abstract : Orthogonal array design was used to optimize hot ethanol reflux extraction of biochanin A from chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed in this study. Results showed that an optimal compromise between biochanin A yield and purity was achieved by two-time extraction at a material/liquid ratio of 1:10 for 1.5 h each time. This extraction method, thanks to its convenience, safety, low cost and high efficiency, can be popularized for the large-scale production. Moreover, based on optimized hot ethanol reflux extraction, a RP-HPLC method was developed for rapid and accurate determination of biochanin A from chickpea seed.

Key words : chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed ; biochanin A ; orthogonal array design ; RP-HPLC

中图分类号：R284.2；R286.02

文献标识码：A

文章编号：1002-6630(2010)06-0127-04

鹰嘴豆中有多种具有生物活性的成分，如亚油酸有抗肿瘤、抗氧化、降低动物和人体胆固醇以及甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇、抗动脉粥样硬化、提高免疫力、提高骨骼密度、防治糖尿病等多种重要生理功能^[1]；在鹰嘴豆发芽种子的胚芽部分含有异黄酮类成分：鹰嘴豆芽素 A(biochanin A)、鹰嘴豆芽素 B(biochanin B 或 formononetin)、鹰嘴豆芽素 C(biochanin C)以及高丽槐素等多种异黄酮成分^[1-4](图 1)。特别是鹰嘴豆芽素 A，是鹰嘴豆中的一种主要的异黄酮成分，有多方面重要的生物活性，如抗癌，尤其是与性腺相关的癌症，如乳腺癌^[5-10]、前列腺癌^[11-15]等，抗骨质疏松^[16]，抗氧化^[17-18]，降血脂^[16-19]以及雌激素样活性^[20-23]等。而且，在肠道微生物的作用下，鹰嘴豆芽素 A 可

转化为具有更强生物活性的金雀异黄素(genistein)^[24-25]。所以，弄清楚鹰嘴豆芽素 A 在鹰嘴豆体内的分布及其含量，并找到一种适合的提取方法，对于鹰嘴豆药材的深度开发无疑具有重要的意义。

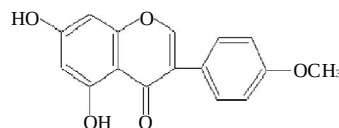


图 1 鹰嘴豆芽素 A 的化学结构

Fig.1 Chemical structure of biochanin A

本研究采用正交试验法对鹰嘴豆中鹰嘴豆芽素 A 的提

收稿日期：2009-03-02

作者简介：田春元(1966—)，男，副教授，博士，主要从事药用植物及中药资源与质量研究。

E-mail: hbtcy@yahoo.com.cn

取工艺进行考察,以期找到一种能在生产中大规模提取鹰嘴豆芽素 A 时安全、无毒、低耗、简便有效的生产方法,为鹰嘴豆芽素 A 的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

鹰嘴豆种子购自黑龙江泰来县,经上海中医药大学中药学院生药教研室周秀佳教授鉴定。

鹰嘴豆芽素 A 对照品 美国 Sigma 公司;甲醇(色谱纯);95% 乙醇溶液(分析纯)。

1100 高效液相色谱仪 美国安捷伦公司;FA2004N 型电子天平(精确到 0.1g) 上海精密科学仪器有限公司;AG135 型电子天平(精确到 0.01g) Mettler Toledo 公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS 柱(250mm × 4.6mm, 5μm);流动相:甲醇-水(72:28, V/V);流速:1mL/min;柱温:35℃;检测波长:254nm。

1.2.2 对照品溶液的配制

精密称取鹰嘴豆芽素 A 对照品 2.20mg,用 95% 乙醇溶液定容至 10mL 容量瓶中,配制成 0.22mg/mL 的标准溶液。

1.2.3 检测波长的选择

因鹰嘴豆芽素 A 为异黄酮,而一般情况下多数异黄酮类植物成分只在 250~270nm 波长间有一个强吸收峰^[26]。因此,本实验选择较常用的 254nm 波长作为鹰嘴豆芽素 A 的检测波长。

1.2.4 检测方法建立

1.2.4.1 标准曲线绘制

取上述对照品标准溶液分别稀释 100 倍和 10 倍,然后分别以稀释 100 倍的标准溶液 5.0μL 和稀释 10 倍的标准溶液 5.0μL 以及原标准溶液 1.0、2.0、5.0、10.0μL 进样,按上述色谱条件,测定吸收峰面积。以吸收峰面积为纵坐标,以对照品进样量(μg)为横坐标作图,绘制标准曲线。

1.2.4.2 精密度实验

精密吸取同一供试品溶液 2.0μL,重复进样 5 次,按上述色谱条件分别测定吸收峰面积。

1.2.4.3 重现性实验

平行取同一样品 6 份,用 95% 乙醇溶液回流 1h,过滤,浓缩并定容至 2mL,用 0.45μm 微孔滤膜过滤,精密吸取各份样品续滤液 20.0μL 进样,用上述色谱条件测定吸收峰面积。

1.2.4.4 回收率实验

取同一已知含量的脱脂鹰嘴豆种子粉末,精密称取 6 份,分别准确加入一定量的不同质量浓度的鹰嘴豆芽素 A 对照品溶液。按 1.2.4.3 节方法制备样品,用上述色谱条件测定吸收峰面积,并按下式计算平均回收率。

$$\text{回收率}/\% = \frac{\text{加标测得值} - \text{样品测得值}}{\text{加标量}} \times 100$$

1.2.5 鹰嘴豆芽素 A 提取工艺优选

1.2.5.1 提取方法的选择

取鹰嘴豆种子 30g 磨成细粉,全部过 40 目筛,在索氏提取器中用石油醚(60~90℃)脱脂;脱脂后置 105℃ 电热恒温干燥箱中干燥。精确称取 0.5g 和 1.0g 干燥至质量恒定的脱脂鹰嘴豆粉各两份,分别按表 3 所列方法制备样品,提取液过滤浓缩。最后,用 95% 乙醇溶液定容于 10mL 容量瓶中。用上述色谱条件测定各样品的吸收峰面积,并计算鹰嘴豆芽素 A 的含量。

1.2.5.2 提取工艺的优选

精确称取 2.0g 上述干燥至质量恒定的脱脂鹰嘴豆粉 9 份,以乙醇溶液体积分数、乙醇溶液用量、回流提取时间和次数为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交试验表(表 1)进行试验,测定鹰嘴豆芽素 A 的含量。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in orthogonal array design for optimizing compromise between biochanin A yield and purity under different extraction conditions

水平	因素			
	A 乙醇溶液体积分数/%	B 乙醇溶液用量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数
1	75	10	0.5	1
2	85	20	1.0	2
3	95	30	1.5	3

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

表 2 标准品的进样量与相应的峰面积

Table 2 Data of injection amount and peak area for preparation of RP-HPLC standard curve of biochanin A

项目	进样量/μg					
	0.011	0.11	0.22	0.44	1.1	2.2
保留时间/min	7.124	7.142	6.970	6.985	7.014	7.719
峰面积/mAU	153.98	1004.6	2188.14	4366.61	10336.4	21042.5

标准品进样量及相应峰面积测定结果见表 2。回归方程为 $y=9519.5x+40.52$, $R=0.9999$ 。表明鹰嘴豆芽素 A 进样量在 0.011~2.20μg 范围内线性关系良好(图 2)。在

此基础上,每批样品都采用检测当天通过两点法校正的标准曲线计算样品中鹰嘴豆芽素 A 的含量。

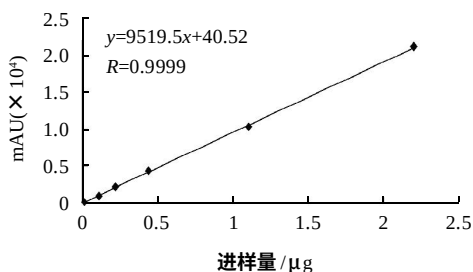


图2 检测鹰嘴豆芽素 A 的 RP-HPLC 标准曲线

Fig.2 Calibration curve of biochanin A for RP-HPLC determination

2.2 精密度实验结果

按色谱条件分别测定 5 次进样的吸收峰面积为 16851.60、16536.20、16159.40、16723.50、16637.90, 计算得 RSD 为 1.59%, 说明该方法的精密度较好。

2.3 重现性实验结果

用上述色谱条件测定的吸收峰面积分别为 4588.87、4446.83、4165.68、4318.47、4422.73、4620.23, RSD 为 3.83%。表明该方法的重现性较好。

2.4 加样回收率实验

用上述色谱条件测定吸收峰面积分别为 1454.78、1448.08、4412.28、4422.90、4636.61、1474.34, 计算得平均回收率为 92.06%, RSD 为 2.46%。平均加样回收率和 RSD 值均在允许范围之内。

2.5 提取方法的选择

表3 鹰嘴豆芽素 A 提取方法比较

Table 3 Comparison of extraction of biochanin A from chickpea seed by different methods

样品	质量/g	提取方法	含量/(μg/g)
1	0.4995	25mL 95% 乙醇溶液超声 1h	7.7768
2	1.0025	50mL 95% 乙醇溶液热回流 4h	2.7572
3	1.0022	100mL 95% 乙醇溶液热回流 4h	4.1866
4	0.5031	25mL 甲醇冷浸 48h	5.0807

由表 3 可知, 超声提取效果最好, 其次是甲醇冷浸和用高倍量乙醇热回流, 但考虑到生产上大规模提取时工艺上的可行性以及安全、无毒和成本等因素, 选择用乙醇热回流作为从鹰嘴豆种子中提取鹰嘴豆芽素 A 的提取方法。

2.6 提取工艺的优选

由表 4 可知, 影响鹰嘴豆芽素 A 提取的因素主次顺序为乙醇溶液体积分数>提取时间>乙醇溶液用量>提取次数。其中, 乙醇体积分数和提取时间对鹰嘴豆芽素 A 的提取有显著影响, 而乙醇溶液用量和提取次数对

鹰嘴豆芽素 A 无显著影响。最佳提取条件为 $A_3B_1C_3D_3$, 但由于 D_3 与 D_2 相差甚微, 故可取 $A_3B_1C_3D_2$ 作为从鹰嘴豆粉中提取鹰嘴豆芽素 A 的最佳条件, 即用 10 倍于生药量的 95% 乙醇溶液提取两次, 每次 1.5h。这样既可以节省时间, 减少溶媒用量, 降低成本提高效率, 又可以基本提尽鹰嘴豆芽素 A。

表4 鹰嘴豆芽素 A 提取正交试验结果

Table 4 Arrangement and experimental results of orthogonal array design for optimizing compromise between biochanin A yield and purity under different extraction conditions

试验号	A	B	C	D	鹰嘴豆芽素 A 含量/(μg/g)
1	1	1	1	1	1.3457
2	1	2	2	2	0.8926
3	1	3	3	3	2.1102
4	2	1	2	3	1.8218
5	2	2	3	1	2.6115
6	2	3	1	2	1.9227
7	3	1	3	2	4.1068
8	3	2	1	3	3.0062
9	3	3	2	1	2.5718
K_1	4.3484	7.2743	6.2746	6.5290	
K_2	6.3560	6.5102	5.2862	6.9221	
K_3	9.6848	6.6047	8.8285	6.9382	
R	5.3364	0.7641	3.5422	0.4091	

3 讨论

3.1 从安全、无毒、成本和效率角度考虑, 超声法从鹰嘴豆粉中提取鹰嘴豆芽素 A 的效果最好, 效率最高。但大规模生产时, 恐有工艺上的困难, 而要在实验室小规模制备鹰嘴豆芽素 A 时, 超声无疑是最佳方法。

3.2 通过正交试验, 对从鹰嘴豆种子粉末中提取鹰嘴豆芽素 A 的提取工艺进行了筛选, 结果显示用 10 倍于生药量的 95% 乙醇溶液热回流提取两次, 每次 1.5h, 提取效果最好。

3.3 在参考前人^[27-31]检测鹰嘴豆芽素 A、金雀异黄酮等异黄酮方法的基础上, 本实验建立了一种新的快速、准确检测鹰嘴豆芽素 A 的 RP-HPLC 方法, 即选择 Hypersil ODS 柱 (250mm × 4.6mm, 5 μm) 作为检测鹰嘴豆芽素 A 的色谱柱, 用甲醇-水 (72:28, V/V) 作为流动相, 流速 1 mL/min, 柱温 35℃, 检测波长 254nm。该方法精密度高, 重现性和线性关系好, 而且保留时间短, 流动相仅为甲醇和水, 便宜易得, 是一种值得推广的检测鹰嘴豆芽素 A 的好方法。

参考文献:

- [1] 孙文基, 绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998.

- [2] 中国科学院上海药物研究所植物化学研究室. 黄酮体化合物鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- [3] 江苏新医学院. 中药大词典: 上册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 887.
- [4] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草: 第四册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 417-418.
- [5] YING C, HSU J T, HUNG H C, et al. Growth and cell cycle regulation by isoflavones in human breast carcinoma cells[J]. Reprod Nutr Dev, 2002, 42(1): 55-64.
- [6] ZHANG S, MORRIS M E. Effects of the flavonoids biochanin a, morin, phloretin, and silymarin on p-glycoprotein-mediated transport[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304(3): 1258-1267.
- [7] PETERSON G, BARNES S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi drug resistance gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 179(1): 661-667.
- [8] AN J, TZAGARAKIS-FOSTER C, SCHARSCHMIDT T C, et al. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens[J]. J Bio Chem, 2001, 276(21): 17808-17814.
- [9] PETERSON T G, COWARD L, KIRK M, et al. The role of metabolism in mammary epithelial cell growth inhibition by the isoflavones genistein and biochanin A[J]. Carcinogenesis, 1996, 17(9): 1861-1869.
- [10] ZHANG S, YANG X, MORRIS M E. Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport[J]. Mol Pharmacol, 2004, 65(5): 1208-1216.
- [11] RICE L, SAMEDI V G, MEDRANO T A, et al. Mechanisms of the growth inhibitory effects of the isoflavonoid biochanin a on LNCaP cells and xenografts[J]. Prostate, 2002, 52(3): 201-212.
- [12] HIIPAKKA R A, ZHANG H Z, DAI W, et al. Structure-activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(6): 1165-1176.
- [13] SUN X Y, PLOUZEK C A, HENRY J P, et al. Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin a in prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 1998, 58(11): 2379-2384.
- [14] PETERSON G, BARNES S. Genistein and biochanin a inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation[J]. Prostate, 1993, 22(4): 335-345.
- [15] JARRED R A, KEIKHA M, DOWLING C, et al. Induction of apoptosis in low to moderate-grade human prostate carcinoma by red clover-derived dietary isoflavones[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002, 11(12): 1689-1696.
- [16] CLIFTON-BLIGH P B, BABER R J, FULCHER G R, et al. The effect of isoflavones extracted from red clover (rimostil) on lipid and bone metabolism[J]. Menopause, 2001, 8(4): 259-265.
- [17] RUIZ-LARREA M B, MOHAN A R, PAGANGA G, et al. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones[J]. Free Radic Res, 1997, 26(1): 63-70.
- [18] KAMEOKA S, LEAVITT P, CHANG C, et al. Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids[J]. Cancer Letters, 1999, 146(2): 161-167.
- [19] GOPALAN R, GRACIAS D, MADHAVAN M. Serum lipid and lipoprotein fractions in bengal gram and biochanin a induced alterations in atherosclerosis[J]. Indian Heart J, 1991, 43(3): 185-189.
- [20] BECK V, UNTERRIEDER E, KRENN L. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 84(2/3): 259-268.
- [21] SALONIEMI H, WAHALA K, NYKANEN-KURKI P, et al. Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1995, 208(1): 13-17.
- [22] SCHULTZ G, ELGHAMRY M I. Isolation of biochanin a from *Lupinus termis* and estimation of its estrogenic activity[J]. Naturwissenschaften, 1971, 58(2): 98.
- [23] LINDNER H R. Occurrence of anabolic agents in plants and their importance[J]. Environ Qual Saf Suppl, 1976(5): 151-158.
- [24] MIZUNUMA H, KANAZAWA K, OGURA S, et al. Anticarcinogenic effects of isoflavones may be mediated by genistein in mouse mammary tumor virus-induced breast cancer[J]. Oncology, 2002, 62(1): 78-84.
- [25] SFAKIANOS J, COWARD L, KIRK M, et al. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats[J]. J Nutr, 1997, 127(7): 1260-1268.
- [26] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [27] KRENN L, UNTERRIEDER I, RUPRECHTER R. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B, 2002, 777(1/2): 123-128.
- [28] HSU Y T, WU C J, CHEN J M, et al. The presence of three isoflavonoid compounds in *Psoralea corylifolia*[J]. J Chromatogr Sci, 2001, 39(10): 441-444.
- [29] FRANKE A A, CUSTER L J, TANAKA Y. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids[J]. Am J Clin Nutr, 1998, 68(Suppl 6): 1466-1473.
- [30] FRANKE A A, CUSTER L J, WANG W, et al. HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 217(3): 263-273.
- [31] 曾建国, 张胜, 侯团章, 等. 红车轴草提取物中总鹰嘴豆芽素类成分 HPLC 测定方法的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 13(1): 35-38.