

盐酸催化水解槐角异黄酮的研究

张晓松, 张博雅, 金花*, 张永忠

东北农业大学应用化学系, 哈尔滨 150030

摘要: 利用盐酸甲醇溶液对槐角总异黄酮进行水解制备染料木黄酮。采用高效液相色谱法检测槐角异黄酮水解率。探讨水解时间、盐酸浓度和水解温度对异黄酮水解率的影响, 并通过响应面法确定最佳水解条件。实验结果表明最佳水解条件为: 水解时间 3.8 h、盐酸浓度 2.59 mol/L、水解温度 78.5 °C。在此工艺下, 槐角异黄酮水解率达 93.38%。

关键词: 槐角异黄酮; 酸水解; 高效液相色谱

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.019

Hydrolysis of Fructus Sophorae Isoflavones by Hydrochloric Acid Catalysis

ZHANG Xiao-song, ZHANG Bo-ya, JIN Hua*, ZHANG Yong-zhong

Application Chemistry Department of Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China

Abstract: Fructus Sophorae isoflavones were hydrolyzed to genistein in hydrochloric acid-methanol solution. The hydrolysis rate of Fructus Sophorae isoflavones was detected by high performance liquid chromatography. The effects of hydrolysis time, hydrolysis temperature and hydrochloric acid concentration on hydrolysis rate of Fructus Sophorae isoflavones were investigated. The optimal hydrolysis conditions were determined as follows: hydrolysis time 3.8 h, hydrochloric acid concentration 2.59 mol/L, hydrolysis temperature 78.5 °C. Under these conditions, the hydrolysis rate of total isoflavones reached 93.38%.

Key words: Fructus Sophorae isoflavones; acid hydrolysis; high performance liquid chromatography

槐角具有清热泻火、凉血止血的保健和药理活性, 是我国著名的传统中草药, 可用于治疗缓解头痛、止血和治疗血管性高血压等疾病。近些年来, 人们对槐角的天然活性物质进行了提取和研究发现, 槐角中含有大量的异黄酮类物质, 包括染料木苷 (genistin)、槐角苷 (Sopho-ricoside)、槐角双苷 (Sophorabioside)、染料木黄酮-7-双葡萄糖苷 (genistein-7-diglucoside) 和染料木黄酮-7, 4-双葡萄糖苷 (genistein-7, 4-diglucoside) 等^[1-4]。槐角中总异黄酮的含量高达 200 g/kg^[5] 以上, 远大于传统异黄酮提取物大豆的 525 ~ 986 mg/kg^[6]。同时, 槐角异黄酮的提取和纯化成本都较大豆要低, 因此对于槐角异黄酮的研究吸引了许多科学工作者的目光^[7,8]。

槐角中异黄酮主要包含糖苷型和苷元型两种存在形式, 其中苷元型的染料木黄酮功能活性最高, 也是国际公认的抗氧化、抗癌化合物, 能够有效地起到

预防和抑制中老年骨质疏松、乳腺癌、前列腺癌以及妇女更年期综合症等疾病的作用^[9-11], 但其在槐角中的含量较少。在大豆异黄酮的研究中, 高活性的苷元型异黄酮经常通过糖苷型异黄酮水解制备, 其中最常用的就是酸水解法, 如: 高荣海等利用盐酸水解大豆异黄酮制备苷元型产物^[12], 水解率可达 81.31%; 蒋磊等则采用超声波辅助酸法水解糖苷型大豆异黄酮, 且确定了最佳水解条件^[13]。因此本实验以提高槐角异黄酮中染料木黄酮含量为目的, 利用酸解法水解槐角苷、槐属双苷等糖苷型化合物, 使其糖苷键断裂最终获得苷元型染料木黄酮, 并通过单因素实验和响应面法对水解工艺进行优化, 以期通过该研究对药用植物槐角的开发和应用起到积极推动作用。

1 仪器与材料

HZS-H 水浴振荡器, 哈尔滨东明医疗仪器厂; Agilent-1100 高效液相色谱仪 (HPLC), 配 Agilent-G1314A 泵, Agilent-G1314A 紫外检测器, 色谱柱 C₁₈ 柱 (4.6 × 150 mm, 5 μm); 梅特勒-电子天平 AL104

型,上海梅特勒-托利多仪器有限公司。

槐角异黄酮粉,参考文献^[14]自制(总异黄酮含量46.5%);染料木黄酮标准品(货号G6649,98%),Sigma公司;甲醇(色谱纯)和水(超纯水);其余所用试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 HPLC 测定方法

2.1.1 色谱条件

流动相体积比:甲醇:水=55:45;流速:1.00 mL/min;进样量:5 μL;柱温:室温;检测波长:260 nm;检测时间:15 min。

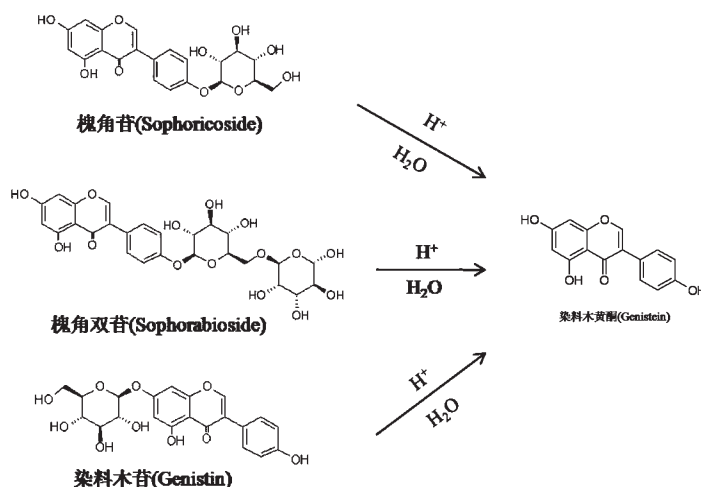


图1 槐角异黄酮水解化学反应方程式

Fig. 1 Hydrolysis routes of Fructus Sophorae isoflavones

利用水和正丁醇混合溶液(体积比为:水:正丁醇=1:2),萃取槐角异黄酮粉3次。萃取后的正丁醇相经减压脱溶、离心干燥后,得到异黄酮萃取物。精密称取此萃取物0.0100 g,以色谱纯甲醇溶液溶解,稀释并定容至50.00 mL。另取一份萃取物0.0100 g,然后与20 mL一定浓度的盐酸甲醇溶液混合,将此溶液转移至水浴振荡器内,于一定温度下水解一定时间,反应冷却后用NaOH溶液(1.0 mol/L)调pH至7,然后将水解液用甲醇定容至50.00 mL。应用高效液相色谱测定水解前后染料木黄酮的含量。槐角异黄酮水解率计算公式如下:

$$\text{水解率}(\%) = \frac{(g)(g)}{(g) - (g)} \times 100\%$$

式中,以完全水解确定水解后产物中染料木黄酮含量。依据上述实验方法,调节盐酸浓度为2.5 mol/L,水解3.5 h。不断增加水解温度,直至染料木

2.1.2 标准曲线的绘制

精密称取染料木黄酮标准品0.0250 g,用甲醇(色谱纯)定容至100.0 mL容量瓶中,制成染料木黄酮标准储备液。精密吸取储备液,甲醇定容为25.00 mL,配制系列梯度浓度(0.01、0.03、0.05、0.07、0.09、0.11、0.13、0.15、0.17 mg/mL)的标准溶液待测。利用HPLC进行测定,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

2.2 盐酸水解反应

本实验应用盐酸对槐角中的糖苷型异黄酮进行水解,制备苷元型产物染料木黄酮,其化学反应方程式及实验操作如下:

黄酮含量不再升高为止。

2.3 盐酸水解单因素试验

以槐角异黄酮水解率为评价指标,对水解时间、盐酸浓度和水解温度3个因素进行单因素试验。实验平行三次,取平均值。单因素试验条件范围如下:设定水解温度为60℃,盐酸浓度为2 mol/L,分别使水解时间为1.5、2.5、3.5、4.5、5.5 h进行水解;设定水解温度为60℃,水解时间3.5 h,配制浓度为1、1.5、2、2.5、3、3.5 mol/L的盐酸溶液进行水解;设定盐酸浓度为2 mol/L,水解时间3.5 h,分别在温度为40、50、60、70、80、90℃条件下进行水解。根据单因素所确定的水解实验条件,通过测定槐角异黄酮水解率来确定最佳水解时间,盐酸浓度及最佳水解温度。

2.4 响应面优化实验及试验数据统计分析

由单因素分析后,选择水解时间,盐酸浓度和水

解温度 3 个因素,使用 Box-Behnken 中心组合进行 3 因素 3 水平响应面正交试验设计^[15],因素水平见表 1。

并通过 Design-Expert V8.0.6 软件对试验数据进行处理分析。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken Design

因素 Factors	代码 Code	水平 Level		
		-1	0	1
水解时间 Hydrolysis time (h)	X_1	2.5	3.5	4.5
盐酸浓度 Hydrochloric acid concentration (mol/L)	X_2	2	2.5	3
水解温度 Hydrolysis temperature (°C)	X_3	70	80	90

3 结果与分析

3.1 HPLC 法测定染料木黄酮的标准曲线

测定系列浓度的染料木黄酮标准溶液,以峰面

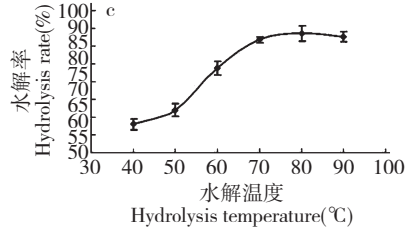
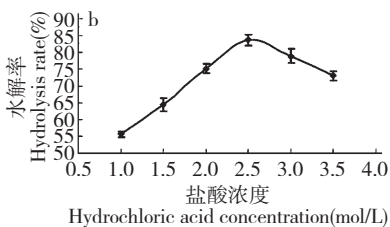
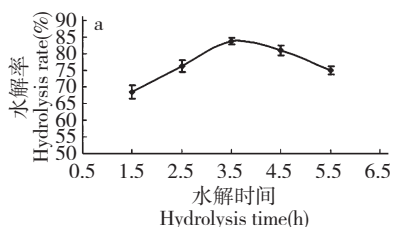


图 2 水解时间 (a)、盐酸浓度 (b) 及水解温度 (c) 对槐角异黄酮水解率的影响

Fig. 2 Effects of hydrolysis time (a), hydrochloric acid concentration (b) and hydrolysis temperature (c) on the hydrolysis rate of isoflavones

3.2.1 水解时间对异黄酮水解率的影响

如图 2a 可知,在水解时间为 3.5 h 之前,水解率随着水解时间的增加而快速提升。当水解时间为 3.5 h 时,水解率最高。但是,继续延长水解时间却发现异黄酮的水解率呈下降趋势。分析造成这种现象的原因,可能是随着反应的进行,水解产物的含量虽然提高,却越来越不稳定,易被氧化而导致水解率下降。

3.2.2 盐酸浓度对异黄酮水解率的影响

由图 2b 可以看出,在盐酸浓度 2.5 mol/L 以前,水解率随盐酸浓度的升高而快速提高。当盐酸浓度为 2.5 mol/L 时,水解率最高。而后继续增加盐酸浓度却发现异黄酮水解率呈下降趋势。这因为在盐酸浓度较低时,增加盐酸浓度可以促进水解,而当水解达到顶峰时,过大的盐酸浓度可能会破坏染料木黄酮。

3.2.3 水解温度对异黄酮水解率的影响

由图 2c 所示,70 °C 之前随着水解温度的升高,水解率上升明显。当水解温度为 80 °C 时,槐角异黄

酮的水解率最大。这是由于温度越高,分子运动速度越快,水解率上升越明显。当水解温度高于 80 °C 时,水解率变化不明显。因此,选择水解温度 80 °C 为最佳反应温度,既能获得较高水解率,也避免了能源的浪费。

3.2 单因素试验

酮的水解率最大。这是由于温度越高,分子运动速度越快,水解率上升越明显。当水解温度高于 80 °C 时,水解率变化不明显。因此,选择水解温度 80 °C 为最佳反应温度,既能获得较高水解率,也避免了能源的浪费。

3.3 响应面正交试验设计与结果

3.3.1 多元二次模型方程的建立与检验

采用 Design-Expert 软件进行试验设计及优化的 17 组试验设计,以水解时间,盐酸浓度和水解温度为自变量,以槐角异黄酮水解率为响应值 Y 进行实验,结果见表 2。

使用 Design-Expert 软件对表 2 进行二次多元回归拟合,得到多元二次响应面回归模型,回归方程为:

$$Y = 93.25 + 1.64X_1 + 2.46X_2 - 1.34X_3 + 1.12X_1X_2 - 0.77X_1X_3 + 0.86X_2X_3 - 3.22X_1^2 - 7.44X_2^2 - 4.68X_3^2$$

对回归模型进行方差分析,结果见表 3。

表2 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

实验号 No.	X_1 (h)	X_2 (mol/L)	X_3 (°C)	水解率 Hydrolysis rate, Y (%)
1	1	0	-1	88.61
2	0	0	0	93.74
3	0	0	0	93.79
4	1	-1	0	81.62
5	0	0	0	93.78
6	-1	0	-1	84.85
7	0	0	0	92.45
8	-1	1	0	81.32
9	1	1	0	87.91
10	0	-1	1	76.07
11	-1	0	1	83.63
12	0	-1	-1	80.40
13	0	1	1	83.59
14	0	0	0	92.51
15	1	0	1	84.33
16	-1	-1	0	79.52
17	0	1	-1	84.48

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

方差来源 Variance source	平方和 Sum of Squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean Square	F 值 F Value	$Prob > F$ P-value	显著性 Significance
模型 Model	500.64	9	55.63	67.29	< 0.0001	* *
X_1	21.62	1	21.62	26.15	0.0014	* *
X_2	48.46	1	48.46	58.62	0.0001	* *
X_3	14.36	1	14.36	17.38	0.0042	* *
$X_1 X_2$	5.04	1	5.04	6.10	0.0429	*
$X_1 X_3$	2.34	1	2.34	2.83	0.1363	
$X_2 X_3$	2.96	1	2.96	3.58	0.1004	
X_1^2	43.68	1	43.68	52.84	0.0002	* *
X_2^2	233.11	1	233.11	282.00	< 0.0001	* *
X_3^2	92.15	1	92.15	111.48	< 0.0001	* *
Residual	5.79	7	0.83			
Lack of Fit	3.79	3	1.26	2.52	0.1962	
Pure Error	2.00	4	0.50			
Cor Total	506.43	16		$R^2 = 0.9886$	$R^2_{Adj} = 0.9739$	

注: * 差异显著 ($P < 0.05$); ** 差异高度显著 ($P < 0.01$); *** 差异极显著 ($P < 0.001$)。

Note: * means significant difference ($P < 0.05$); ** means highly significant difference ($P < 0.01$); *** means extremely significant difference ($P < 0.001$).

从表3可以看出,回归模型达到极显著水平 ($P < 0.0001$),失拟误差 ($P = 0.1962 > 0.05$)不显著,说明该回归方程的建立与实际情况互相吻合,同时决定系数与矫正决定系数可以解释响应值的变化,因此可以利用该回归方程确定水解的最佳工艺条

件。方差分析中一次项 X_1 (水解时间)、 X_2 (盐酸浓度)、 X_3 (水解温度)对模型影响极其显著,交互项 $X_1 X_2$ 影响显著;二次项 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 对模型影响极显著。该模型的确定系数 R^2_{Adj} 值为 0.9739,说明响应面变化有 97.39% 来自水解时间,盐酸浓度及

水解温度。因此,根据方差分析结果,可知各因素影响顺序: X_2 (盐酸浓度) > X_1 (水解时间) > X_3 (水解温度)。

3.3.2 响应面图和等高线图分析

利用 Design-Expert 软件对表 2 数据进行二次多

项回归拟合,做出二次回归方程响应面图及等高线图,从立体图 3 可知,盐酸浓度与水解时间,水解温度与水解时间,盐酸浓度与水解温度之间的交互作用对异黄酮水解率的影响。利用该组图,可分析任何两因素对异黄酮水解率的交互影响,并确定最优工艺。

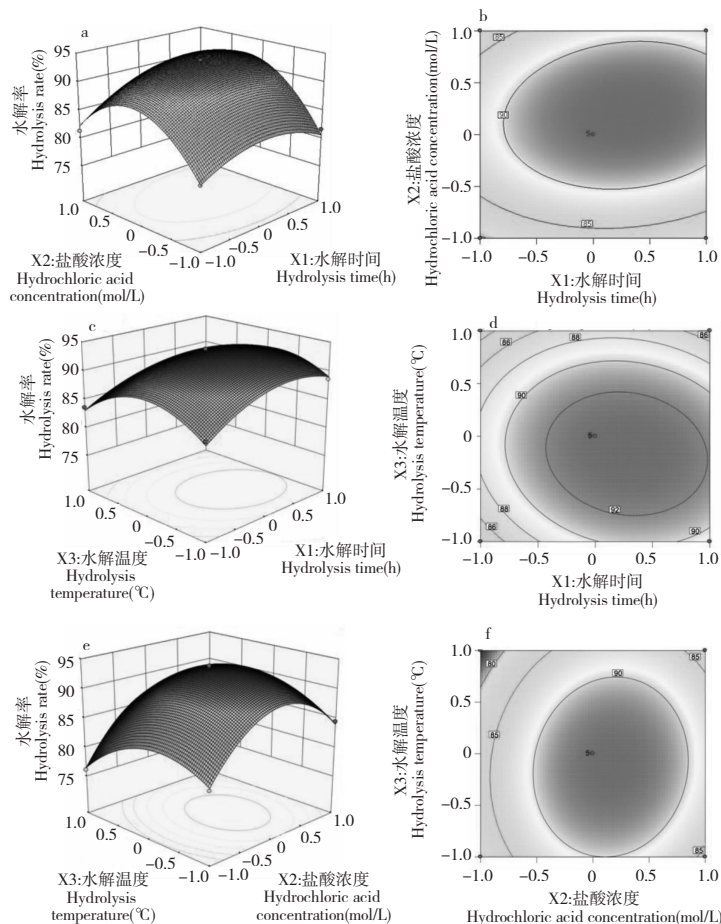


图 3 水解时间和盐酸浓度(a-b)、水解时间和水解温度(c-d)及水解温度和盐酸浓度(e-f)交互作用对异黄酮水解率的影响和等高线图

Fig. 3 Response surface plots and contour plots showing the interactive effects of hydrolysis time and hydrochloric acid concentration (a-b), hydrolysis time and hydrolysis temperature (c-d) and hydrolysis temperature and hydrochloric acid concentration (e-f) on the hydrolysis rate of isoflavones

由组图 3 可以看出,等高线图越趋近圆形,模型中各因素交互作用越弱,因此水解时间与盐酸浓度的交互作用对异黄酮水解率的影响最大,与方差分析结果一致。根据回归方程,考察拟合响应曲面的形状,当响应值最大时,获得最优工艺参数为:水解时间 3.8 h、盐酸浓度 2.59 mol/L、水解温度 78.5 °C。预测最佳水解率为 93.83%。

3.3.3 最佳条件验证试验

将水解时间设定为 3.8 h、盐酸浓度 2.59 mol/

L、水解温度 78.5 °C 时,重复实验三次,实际测得异黄酮水解率平均值为 93.38%。实测值与预测值相互吻合,说明该方程与实际情况拟合良好,验证了所建模型的正确性。说明响应面法适用于对槐角异黄酮的水解条件进行回归分析和工艺优化。

4 结论

应用盐酸催化可对槐角总异黄酮进行水解,得到染料木黄酮。在单因素试验结果的基础上,根据

中心组合实验设计原理,设计三因素三水平实验,利用 Design-Expert 软件进行响应面分析,建立了槐角异黄酮水解率的回归方程。试验结果表明,盐酸浓度,水解时间和水解温度对异黄酮水解率影响极显著。最佳工艺条件为:水解时间 3.8 h、盐酸浓度 2.59 mol/L、水解温度 78.5 °C。在此条件下测得槐角总异黄酮的水解率为 93.38%,与预测值吻合。本文首次对槐角中糖苷型异黄酮进行盐酸催化转化,产生生物利用度更高的染料木黄酮。染料木黄酮可以和中药的有效成分发生配合,达到提高药效和预防保健功能的目的。

参考文献

- 1 Do TH, Trinh NT, Tran TP, *et al.* The selected flavonol glycoside derived from Sophorae Flos improves glucose uptake and inhibits adipocyte differentiation via activation AMPK in 3T3-L1 cells. *Bioorgan Med Chem Lett*, 2010, 20: 6076-6081.
- 2 Chang L, Ren YP, Cao L, *et al.* Simultaneous determination and pharmacokinetic study of six flavonoids from Fructus Sophorae extract in rat plasma by LC-MS/MS. *J Chromatogr B*, 2012, 904:59-64.
- 3 Li YM, Zhong H, Lu YQ. Comparative study on rare earth elements from Flos Sophorae and Fructus Sophorae. *J Rare Earths*, 2012, 30:397-400.
- 4 Xu Q, Shen YY, Wang HF, *et al.* Application of response surface methodology to optimise extraction of flavonoids from fructus sophorae. *Food Chem*, 2013, 138:2122-2129.
- 5 Cong YB(丛艳波), Zhang YZ(张永忠), Liu X(刘潇). Study on total isoflavones from Fructus Sophorae by subcritical water extraction. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2010, 41:717-720.
- 6 Akitha Devi MK, Gondi M, Sakthivelu GP, *et al.* Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chem*, 2009, 114:771-776.
- 7 Wang JB(王剑波), Guo P(郭萍), Zhao XB(赵小兵), *et al.* Determination of genistein in Fructus Sophorae extract by RP-HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2004, 35:402-403.
- 8 Du PP(都盼盼), Shi YB(石延榜), Zhang ZL(张振凌), *et al.* Effects of different processing methods on content of flavonoids from *Sophorae Fructus*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2014, 45:3271-3274.
- 9 Wang JH(王建华), Li E(李恩), Kong DJ(孔德娟), *et al.* Effects of isoflavones on bone mineral density and bone metabolism in ovariectomized rats. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2003, 15:43-45.
- 10 Tsao R, Papadopoulos Y, Yang R, *et al.* Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages. *J Agric Food Chem*, 2006, 54:5797-5805.
- 11 Corinna ER, Sabine EK. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. *J Agric Food Chem*, 2006, 54:2926-2931.
- 12 Gao RH(高荣海), Li CB(李长彪), Meng XW(孟宪文), *et al.* Hydrolysis of soybean isoflavone glycoside. *China Oil*(中国油脂), 2007, 32(5):52-55.
- 13 Jiang L(蒋磊), Yu GP(于国萍), Dai W(代微). Ultrasonic assisted acid hydrolysis of soy isoflavones. *Food Ind Technol*(食品工业科技), 2007, 28(9):165-168.
- 14 Zhang BY(张博雅), Zhou L(周丽), Wang FR(王凤荣), *et al.* Study on extraction of total isoflavones from *Sophorae Fructus* by pressurized solvent. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2012, 43:1108-1111.
- 15 Jin HL, Myoung GC. Determination of optimal acid hydrolysis time of soybean isoflavones using drying oven and microwave assisted methods. *Food Chem*, 2011, 129:577-582.