

豆粕中大豆异黄酮提取纯化工艺研究

蔡立, 郁建平*, 占建波
(贵州大学生化营养研究所, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 本研究探讨了豆粕中大豆异黄酮提取纯化工艺, 经过单因素和正交试验, 应用大孔树脂技术对提取液进一步纯化。得到大豆异黄酮最佳提取工艺: 提取温度为 80℃, 时间为 2h, 乙醇浓度为 60%, 料液比为 1:20。在此条件下大豆异黄酮的提取率为 0.59%。由大孔树脂静态吸附解吸试验, 得出 D4006 和 H103 型大孔树脂吸附解吸最好。经 D4006 大孔树脂纯化后, 大豆异黄酮的纯度可达到 30.58%。

关键词: 大豆异黄酮; 提取; 纯化; 大孔树脂

Study on Extraction Technology of Isoflavones from Soybean Residue

CAI Li, YU Jian-ping*, ZHAN Jian-bo
(Institute of Biochemistry and Nutrition, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The experiment is designed to study the extraction technology of isoflavones from soybean residue. According to the solo factors and the orthogonal test. It showed that the optimum technological conditions was the best temperature 80℃, the solid-liquid ratio 1:20, the total time 2h, the best proportion of ethanol 60%. The extraction yield could be up to 0.59%. Besides, according to the results of the static adsorption and desorption of macroporous resin, results showed that the best macroporous resin is D4006 or H103. After purified by D4006, the purification of isoflavones could be up to 30.58%.

Key words isoflavones; extraction; purification; macroporous resin

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0185-04

近期的研究表明, 大豆异黄酮与人类的健康密切相关, 具有多种生理功能, 如抗肿瘤作用^[1]、抗氧化作用、对心脑血管的保护作用、治疗骨质疏松症^[2]以及类似女性雌激素作用等。大豆异黄酮因具有如此多的生物学活性而越来越受到社会和学术界的关注, 是近年来研究的热点。但在自然界中大豆异黄酮资源十分有限, 在含量较高的大豆中也仅含 0.1%~0.5%, 因此探讨一条大豆异黄酮高提取率且高纯度的工艺路线具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

豆粕 贵阳花溪动物饲料所; 染料木素黄酮 (genistein) 中国药品生物制品检定所; 大孔树脂 天津南开大学化工厂。

95% 乙醇、丙酮、石油醚、乙酸乙酯、乙醚等, 均为分析纯。

HH. S21-6 型电热恒温水浴锅; JY3002 电子天平; 双光束紫外分光光度计 北京普析通用; 101-2 型干燥

箱; 粉碎机; 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; KS 康氏震荡器; 真空冷冻干燥器; SHB-B 真空抽滤装置。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的绘制

精密称取干燥至恒重的染料木素标准品 2.3mg, 以 95% 的乙醇溶解, 定容至 25ml, 精密吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8ml 标准品溶液置于 10ml 容量瓶中, 加各加入 95% 的乙醇 1.0ml, 再加蒸馏水稀释至刻度。以 1ml 95% 的乙醇加水至 10ml 作空白对照。在 260nm 处测其吸光度, 以标准品的浓度为横作标, 对应的吸光度为纵作标从而得到标准曲线。

1.2.2 大豆异黄酮的提取

豆粕经过粉碎机成细粉, 称取一定量的细粉置于圆底烧瓶中并加入一定量的石油醚回流数小时, 对豆粕进行脱脂。弃去石油醚, 将得到的残渣烘干。称取干粉各 5g, 用乙醇回流提取。

1.2.3 大豆异黄酮测定方法

收稿日期: 2007-11-30

作者简介: 蔡立(1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事天然产物研究。E-mail: cailid@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 郁建平(1956-), 男, 教授, 主要从事应用生物化学研究。E-mail: yujp6@eyou.com

精密吸取 0.2ml 提取液至 10ml 的容量瓶中, 再加入 1ml 的 95% 乙醇, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀。以 1ml 95% 的乙醇加蒸馏水稀释至刻度作空白对照。在 260nm 处测其吸光度, 重复三次。根据标准曲线的线性回归方程, 计算大豆异黄酮的提取率。

大豆异黄酮提取率 = 所测异黄酮量(g)/所用脱脂豆粕量(g) × 100%

1.2.4 单因素试验

分别考查乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比和提取次数对大豆异黄酮提取率的影响, 取脱脂豆粕各 5g 进行试验, 分别采用温度为 30~80℃、乙醇浓度为 30%~90%、料液比为 1:8~1:20 和提取时间为 1~5h 等水平进行单因素试验。

1.2.5 正交试验

采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验, 考查乙醇浓度、提取温度、提取时间和料液比对大豆异黄酮提取率的综合影响。

1.2.6 精密度和加样回收率实验

分别称取脱脂豆粕 3 份(每份 5g), 按照最佳提取条件下提取, 在紫外可见分光光度计下测定其吸光度和含量, 从而计算出 RSD; 取脱脂豆粕 3 份(每份 5g), 分别加入一定量的已知浓度的大豆异黄酮, 在最佳提取条件下提取, 测定其含量计算加样回收率。

1.3 大豆异黄酮的纯化

1.3.1 大孔树脂静态吸附解吸实验

将各类树脂用 95% 的乙醇浸泡 24h 后, 用蒸馏水洗至中性。再用 5% 的 NaOH 浸泡 12h; 用蒸馏水洗至中性, 再用 5% 的 HCl 浸泡 12h, 用蒸馏水洗至中性备用。称取各湿树脂各 2g 放入 150ml 的三角瓶中, 各加入浓度约为 1mg/ml 的大豆异黄酮提取液 50ml, 在振荡器上振荡 12h 达到吸附平衡(此时三角瓶中的溶液浓度不再发生变化)测得此时溶液中大豆异黄酮的含量; 用真空抽滤装置将吸附平衡的各树脂溶液抽干, 弃去滤液。再将各树脂装入三角瓶中并各加入 80% 的乙醇各 50ml。在振荡器上振荡 12h(此时三角瓶中的溶液浓度不再发生变化)并测得此时溶液中的大豆异黄酮含量。通过大孔树脂的静态吸附解吸实验, 从而筛选出吸附好且解吸好的大孔树脂。

吸附量(mg/g)计算公式为: $(C_0 - C_1) \times V / \text{所加入的树脂质量}$; 解吸率计算公式: $C_2 / (C_0 - C_1) \times 100\%$ 。式中, C_0 为初始加入提取液中大豆异黄酮的浓度, C_1 为达到吸附平衡时大豆异黄酮的浓度, C_2 为解吸平衡时大豆异黄酮的浓度。

1.3.2 大孔树脂与有机溶剂纯化大豆异黄酮比较

分别用筛选最好大孔树脂和其它有机试剂如丙酮、乙酸乙酯、乙醚等进行纯化(由于大豆异黄酮易溶于弱极

性的有机溶剂)。采用大豆异黄酮最佳提取工艺, 将提取液分成 4 份(每份 100ml), 经旋转蒸发器减压浓缩挥去乙醇。一份上样于筛选最好的大孔树脂, 用 80% 的乙醇洗脱并收集洗脱液, 将所得到的洗脱液再经减压浓缩挥去乙醇, 再次上柱并用 80% 的乙醇洗脱, 收集洗脱液测定其大豆异黄酮的含量。另外三份提取液经冷冻干燥成粉末, 分别加入丙酮、乙酸乙酯、乙醚各 100ml 经超声波萃取(重复两次)。减压浓缩挥去丙酮、乙酸乙酯、乙醚等有机试剂并干燥, 测得大豆异黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的线性质量

由紫外可见分光光度计直接得到标准曲线的回归方程: $y = 0.12665x + 0.01407$, $R = 0.9996$ 。式中 y 为吸光度, x 为标准品的含量。标准曲线如图 1。

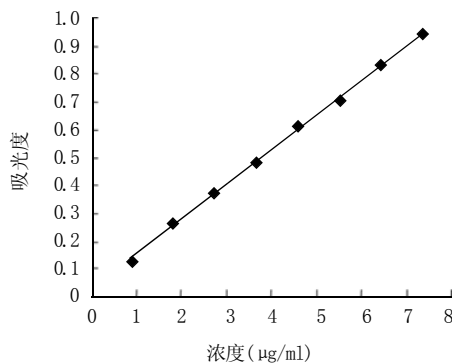


图 1 染料木素标准曲线

Fig.1 Linearity of genistein concentration and peak

2.2 乙醇浓度对大豆异黄酮提取率的影响

乙醇浓度过高或过低都影响大豆异黄酮的提取, 图 2 表明当乙醇浓度在 60% 左右时提取率最大, 由于大豆异黄酮不同的组分其对醇的溶解度有差异。故选择乙醇浓度在 60% 时提取最好。

2.3 温度对大豆异黄酮提取率的影响

随着温度的升高大豆异黄酮的提取率也相应的增加, 图 3 表明温度在 30~60℃ 范围内变化时对提取率的影响不大, 但到达 80℃ 时则显著增大, 在上升温度, 提取率也增加幅度小。考虑到高温可能对大豆异黄酮的裂解且高温时乙醇挥发快影响大豆异黄酮浸提, 故最佳温度应为 80℃。

2.4 提取时间对大豆异黄酮提取率的影响

随着时间的增长大豆异黄酮的提取率也相应的增加, 当时间超过 3h 提取率的增幅不大, 从节约能源和降低成本的角度考虑, 提取时间不应超过 3h。

2.5 料液比对大豆异黄酮提取率的影响

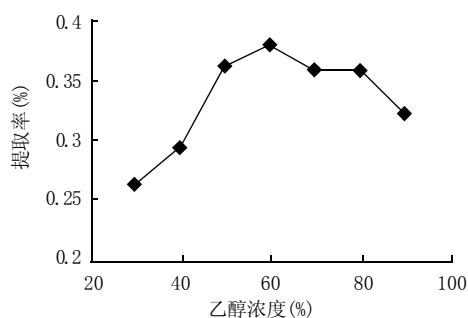


图2 乙醇浓度对提取率的影响

Fig.2 Effects of different proportions of ethanol on extravtion of isoflavones

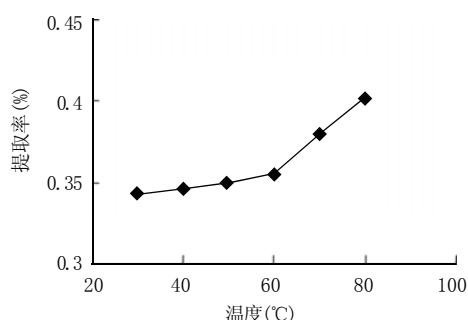


图3 温度对提取率的影响

Fig.3 Effects of different temperatures on extraction of isoflavones

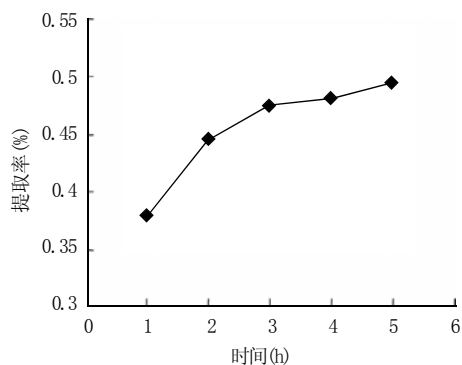


图4 时间对提取率的影响

Fig.4 Effects of time on extraction of isoflavones

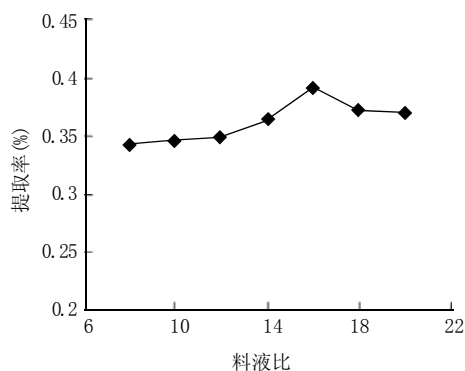


图5 料液比对提取率的影响

Fig.5 Effects of solution and materials on extraction of isoflavones

图5表明料液比过高过低都影响大豆异黄酮的提取。料液比在1:16时提取率最大,所以料液比在1:14~1:20时较合适。

2.6 正交试验结果

根据单因素试验结果,选择温度、乙醇浓度、液料比、提取时间等较优水平,按 $L_9(3^4)$ 设计正交试验(表1),结果如表2。由极差分析可知影响大豆异黄酮提取率的因素的主次顺序是温度(B)>液料比(C)>提取时间(D)>乙醇浓度(A)。最优组合为 $A_2B_3C_3D_2$,即提取工艺参数为乙醇浓度60%、温度80℃、提取时间2h和液料比20:1,在此条件下大豆异黄酮的提取率为0.59%。

表1 四因素三水平正交试验

Table 1 Orthogonal test of four-factor and three-level

| 水平 | 因素 | | | |
|----|-----------|----------|------------|---------|
| | A 乙醇浓度(%) | B 温度(°C) | C 料液比(W/V) | D 时间(h) |
| 1 | 50 | 60 | 12:1 | 1 |
| 2 | 60 | 70 | 16:1 | 2 |
| 3 | 70 | 80 | 20:1 | 3 |

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

| 试验号 | A | B | C | D | 提取率(%) |
|-------|----------------|-------|-------|------|--------|
| 1 | 1(50) | 1(60) | 1(12) | 1(1) | 0.34 |
| 2 | 1(50) | 2(70) | 2(16) | 2(2) | 0.39 |
| 3 | 1(50) | 3(80) | 3(20) | 3(3) | 0.47 |
| 4 | 2(60) | 1(60) | 2(16) | 3(3) | 0.36 |
| 5 | 2(60) | 2(70) | 3(20) | 1(1) | 0.41 |
| 6 | 2(60) | 3(80) | 1(12) | 2(2) | 0.45 |
| 7 | 3(70) | 1(60) | 3(20) | 2(2) | 0.41 |
| 8 | 3(70) | 2(70) | 1(12) | 3(3) | 0.33 |
| 9 | 3(70) | 3(80) | 2(16) | 1(1) | 0.38 |
| K_1 | 1.20 | 1.11 | 1.12 | 1.13 | |
| K_2 | 1.22 | 1.13 | 1.13 | 1.25 | |
| K_3 | 1.12 | 1.30 | 1.29 | 1.16 | |
| R | 0.10 | 0.19 | 0.17 | 0.12 | |
| 最优组合 | $A_2B_3C_3D_2$ | | | | |

2.7 精密度和加样回收率实验

通过表3和表4来看,仪器的精密度为0.87%,平均加样回收率为94.37%。说明仪器的稳定性好且此提取工艺是比较稳定的。

表3 相对标准偏差结果

Table 3 Results of relative standard deviation

| 编号 | 1 | 2 | 3 |
|----------|-------|-------|-------|
| 吸光度 | 0.779 | 0.762 | 0.775 |
| 含量(mg/g) | 6.040 | 5.906 | 6.008 |
| RSD(%) | 0.87 | | |

2.8 大孔树脂静态吸附解吸实验结果

豆粕经石油醚脱脂后,再经乙醇提取后其纯度只有

表5 大孔树脂静态吸附解吸实验结果
Table 5 Results of static adsorption and desorption of macroporous resin

| 树脂 | 粒径(mm) | 比表面积(m ² /g) | 平均孔径(nm) | 外观 | 极性 | 平衡吸附量(mg/g) | 解吸率(%) |
|-------|----------|-------------------------|----------|------|----|-------------|--------|
| D4020 | 0.4~0.6 | 500~600 | 300 | 乳白小球 | 非 | 6.6 | 98.37 |
| D4006 | 0.3~1.0 | 400~440 | 65~75 | 乳白小球 | 非 | 11.1 | 95.59 |
| H103 | 0.3~0.6 | 1000~1100 | 85~95 | 乳白小球 | 非 | 10.6 | 98.24 |
| S-8 | 0.5~0.6 | 600~700 | 280~300 | 乳黄小球 | 是 | 11.2 | 74.74 |
| X-5 | 0.3~1.0 | 540~580 | 100~105 | 乳白小球 | 非 | 11.6 | 82.33 |
| NKA | 0.3~1.2 | 570~590 | 85~90 | 乳白小球 | 弱 | 11.8 | 84.07 |
| D3520 | 0.3~1.25 | 480~520 | 80~90 | 乳白小球 | 非 | 6.81 | 85.32 |

表4 加样回收率实验
Table 4 Results of recovery

| 实验 | 乙醇(%) | 温度(℃) | 时间(h) | 料液比(W/V) | 加入量(mg) | 回收率(%) | 平均回收率(%) |
|----|-------|-------|-------|----------|---------|--------|----------|
| 1 | 60 | 80 | 2 | 20:1 | 1.551 | 94.13 | |
| 2 | 60 | 80 | 2 | 20:1 | 1.551 | 94.39 | 94.37 |
| 3 | 60 | 80 | 2 | 20:1 | 1.551 | 94.58 | |

3%左右,往往达不到要求。所以必须对乙醇提取液进行提纯。由表三可知D4006、H103型大孔树脂吸附量和解吸率较其它大孔树脂理想。D4020大孔树脂虽然解吸率大,但是吸附量较小;S-8、NKA和X-5吸附量大但是解吸率小;D3520吸附量和解吸率则都不理想;故选择D4006、H103型大孔树脂较为合适。

2.9 不同方法纯化大豆异黄酮的比较

分别选用乙醚、乙酸乙酯、丙酮和D4006型大孔树脂对大豆异黄酮进行纯化,结果见表6。

表6 不同有机溶剂和D4006大孔树脂纯化大豆异黄酮结果
Table 6 Results of purification to isoflavones by different organic reagents and D4006

| 方法 | 大豆异黄酮纯度(%) | 大豆异黄酮得率(%) |
|-----------|------------|------------|
| 丙酮 | 11.83 | 39.16 |
| 乙酸乙酯 | 8.14 | 34.56 |
| 乙醚 | 5.38 | 27.45 |
| D4006大孔树脂 | 30.58 | 56.22 |

3 讨论

通过实验得到豆粕中大豆异黄酮的最佳提取条件

为:乙醇浓度60%,提取温度80℃,提取时间2h,料液比1:20,在此条件下提取率为0.59%。通过精密度和加样回收率试验,说明此提取工艺是稳定的。由于豆粕经石油醚脱脂后再经乙醇提取后其纯度只有3%左右,所以必须对乙醇提取进一步的纯化。通过对一系列大孔树脂的静态吸附解吸试验,得出D4006和H103型树脂吸附好且解吸好,优于其它类型的树脂。对D4006大孔树脂动态吸附解吸试验,选择低浓度的乙醇提取液吸附好;高浓度的乙醇解吸好。由于异黄酮在高浓度的乙醇溶液中不易被大孔树脂吸附;低浓度的乙醇不利于异黄酮的解吸。在本实验中将大豆异黄酮乙醇提取液先减压浓缩挥去乙醇进行上样吸附;选用80%乙醇解吸,这样纯化后的大豆异黄酮的纯度可达到30.58%。比较了用溶剂法纯化(如丙酮、乙酸乙酯、乙醚等),不仅纯度低且得率低。大孔树脂使用后还可以回收再利用,所以用大孔树脂纯化大豆异黄酮是一种高效的方法。

参考文献:

- [1] 田玲,王一平,张正.大豆异黄酮抗肿瘤作用研究进展[J].华西医学,2004,19(2):336-337.
- [2] 徐霞,贡沁燕,鲁映青,等.大豆异黄酮对去卵巢大鼠骨密度和雌激素活性的影响[J].中国新药与临床杂志,2002,21(6):321-325.
- [3] 张玉梅,孙学斌,高旭年,等.紫外分光光度法测定大豆异总黄酮的含量[J].中国食品卫生杂志,2000,12(4):7-9.
- [4] 常凤启,秦振顺,韩会新,等.保健品中大豆异黄酮的测定方法[J].中国卫生检验杂志,2004,14(4):430-431.
- [5] 冯建光,谷文英.大孔树脂对大豆异黄酮的吸附与洗脱性能[J].无锡轻工大学学报,2003,22(1):82-85.