

超临界 CO₂ 抗溶剂法纯化大豆异黄酮的研究^{*}

袁其朋¹ 张 怀¹ 钱忠明²

(1. 北京化工大学化学工程学院, 北京 100029; 2. 香港理工大学应用生物及化学科技学系, 香港)

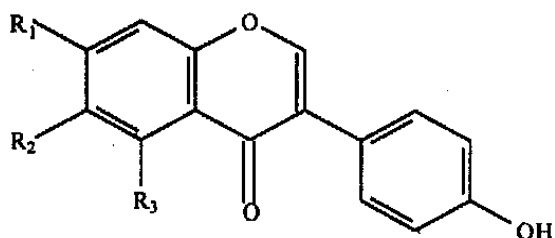
摘要 测定了大豆异黄酮中两种主要成分染料木甙和大豆黄甙的露点压力, 采用有机溶剂提取和超临界 CO₂ 抗溶剂技术通过两次膨胀进行大豆异黄酮的精制, 得到的产品中大豆异黄酮含量高于 90%, 异黄酮收率大于 78%。该研究为超临界 CO₂ 抗溶剂技术在天然极性物质分离纯化中的应用提供了新的思路。

关键词 超临界流体; 抗溶剂; 大豆异黄酮

中图分类号 S565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2002)03-0177-06

0 前言

大豆异黄酮 (soybean isoflavone) 存在于大豆的子粒中, 是具有 α -苯基色原酮结构的化合物群, 根据侧链结构不同, 共有 12 种组分, 其中两种主要成分染料木甙 (genistin) 和大豆黄甙 (daidzin) 占总异黄酮的 80% 以上, 结构如下^[1]:



R₁ = O-glucosyl, R₂ = H, R₃ = OH 为染料木甙

R₁ = O-glucosyl, R₂ = H, R₃ = H 为大豆黄甙

近年来研究表明, 大豆异黄酮具有许多重要的生理功能, 如预防乳腺癌、前列腺癌, 降低血清胆固醇, 预防心血管疾病, 治疗妇女更年期综合症, 预防老年人的骨质疏松症等^[2,3]。美国 ADM 公司于 1996 年建立了年产 20 吨 40% 大豆异黄酮的生产线, 并开发了一系列系终端产品, 年销售额数亿美元。国内华北制药厂利用北京化工大学技术建立了大豆异黄酮生产线, 但规模小, 成本相对较高。

现有的大豆异黄酮纯化工艺包括溶剂萃取法、树脂吸附法及柱层析法等^[4-7], 其主要缺点是工艺

复杂、收率低并用多种溶剂, 导致大豆异黄酮价格高居不下。开发新的、高收率的大豆异黄酮生产工艺是目前国内外研究的热点。

超临界流体抗溶剂技术是利用超临界流体在有机溶剂中有较大的溶解度, 能引起溶剂体积膨胀, 以降低其溶剂化能力, 从而使溶剂中溶解的物质析出这一原理而开发的新兴分离技术。许多物质可溶于有机溶剂但不溶于超临界流体, 同时超临界流体在许多有机溶剂中溶解度很大, 能引起溶剂体积膨胀, 降低其溶化能力。因此, 在适当条件下通入超临界流体可使溶剂中溶解的溶质析出, 这一过程称为超临界流体抗溶剂过程。Gallagher 等^[8]于 1989 年最早提出超临界流体抗溶剂的概念, 此后, 这方面的研究与应用得到迅速发展, 在物质重结晶、天然产物的分离及微粒制备等方面得到广泛的应用。

异黄酮是强极性物质, 溶于多种极性溶剂, 但不溶于超临界 CO₂ 流体。根据这一性质, 可用超临界流体抗溶剂法进行异黄酮的分离和纯化。本文测定了异黄酮-丙酮体系的相平衡数据, 并进行了利用超临界流体抗溶剂技术分离纯化大豆异黄酮的实验研究。

1 材料与方法

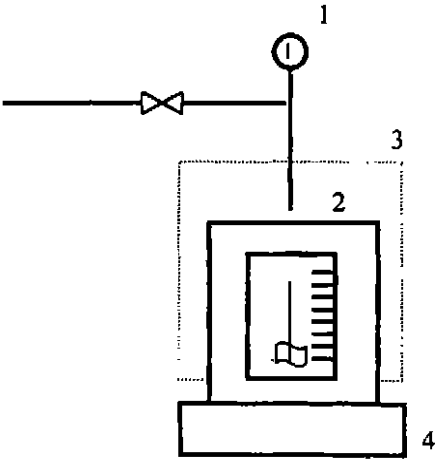
1.1 实验装置及流程

* 收稿日期: 2001-12-28

作者简介: 袁其朋 (1969-), 男, 博士, 研究方向制药工程。

1.1.1 相平衡测定装置

图1为相平衡测定装置,主要部分为带视窗和刻度的高压釜,容积为50mL,内置带长柄的磁子。将预先制备好的异黄酮-丙酮溶液置于高压釜内,以一定的流速通入CO₂,同时开动釜底的磁力搅



1—压力表 2—高压釜 3—恒温水浴 4—磁力搅拌器

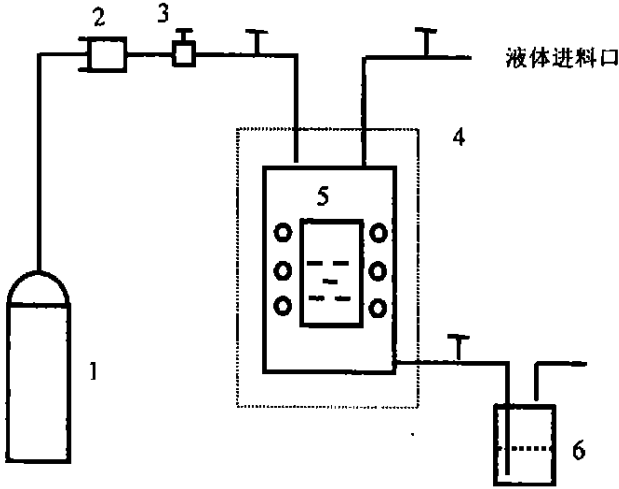
图1 相平衡测定装置图

Fig. 1 Measured of balance

拌,通过视窗观察釜内固体物质从溶液中析出的情况。异黄酮在溶剂中达到饱和时 CO₂ 的压力即为露点压力。

1.1.2 超临界 CO₂ 抗溶剂分离纯化装置

图2为 CO₂ 抗溶剂分离纯化实验装置图,其主体部分为一个体积约为100mL的带视窗和刻度的高压釜,可观察到釜内溶液的变化情况,底部为一100目的筛网,可过滤沉淀下来的固体物质。将预先制备好的异黄酮-丙酮浸提液置于高压釜内,以240mL/h的流速通入CO₂,同时开动釜底的磁力搅拌,通过视窗可观察到釜内液体体积膨胀,并伴有固体物质从溶液中析出,当压力升至略低于纯异黄酮的露点压力时,停止加压,关闭搅拌,静置20min,使此压力下溶液中的固体完全沉淀。打开釜底阀门,将溶液缓慢过滤放出,同时不断通入CO₂,以保持体系压力基本恒定。将溶剂蒸发掉,残留物干燥,分析其中染料木甙和大豆黄甙的含量。用与浸提液相同的溶剂将沉淀釜内的固体洗出,同样方法分析含量。



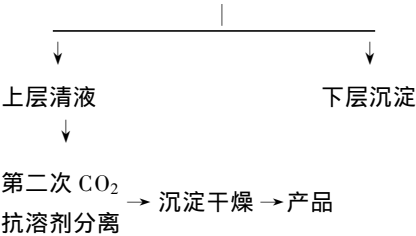
1—CO₂ 储罐 2—高压注射泵 3—三通阀门 4—恒温水浴 5—高压沉淀釜 6—样品接收器

图2 CO₂ 抗溶剂分离纯化实验装置图

Fig. 2 Expaniment of CO₂ antisolvent process

1.1.3 实验流程

异黄酮样品→丙酮浸提→第一次CO₂抗溶剂分离



1.2 实验材料

大豆异黄酮样品含量10.57%(其中染料木甙为4.81%,大豆黄甙为3.70%,其他大豆异黄酮成分为2.06%),由华北制药厂107车间提供。

CO₂纯度为99.9%,购于北京环新气体公司。

1.3 分析方法

大豆异黄酮用HPLC进行分析(北京农科院分析中心)。

色谱条件:柱温,45℃;流动相,30%甲醇+70%乙酸水溶液(乙酸浓度5%),流速,1ml/min;检测

器, SPD-6AV, 检测波长 254nm。

柱型: C18 反相柱, 长 250 mm, 内径 4.6mm。

染料木甙(genistin)和大豆黄甙(daidzin)的标准品由美国 Sigma 公司提供。

2 结果与讨论

2.1 异黄酮在丙酮中的雾点压力

在利用超临界流体抗溶剂法分离活性有效成分的过程中涉及到一个基本的问题是在什么样的条件下溶质可以析出, 也就是体系的相平衡性质。为此, 利用图 1 所示的装置我们分别测定了 308.15K 和 318.15K 两个温度下不同浓度的染料木甙和大豆黄甙在丙酮中的雾点压力。染料木甙-丙酮体系的相平衡数据如图 3 所示。

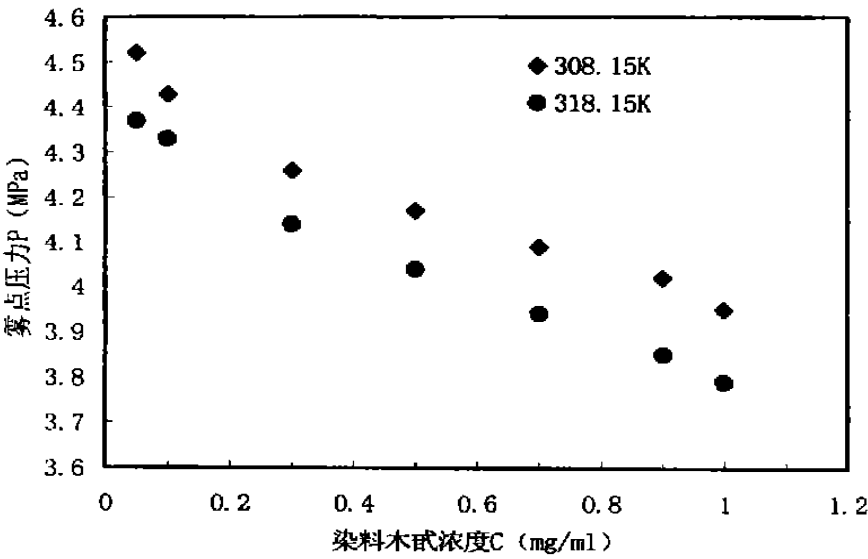


图 3 染料木甙在丙酮中的雾点压力

Fig. 3 The data of phase equilibrium of genistin in acetone

从图中可以看出, 随浓度的升高, 雾点压力降低。对异黄酮分离纯化而言, 另一个重要的数据就是何种条件下异黄酮可以完全沉淀, 也就是丙酮中异黄酮浓度接近零时的雾点压力。将图 3 得到的曲

线外推至染料木甙浓度为 0 时即可得到此压力, 对染料木甙, 其在 308.15K 和 318.15K 时的压力分别为 4.91 和 4.83MPa。

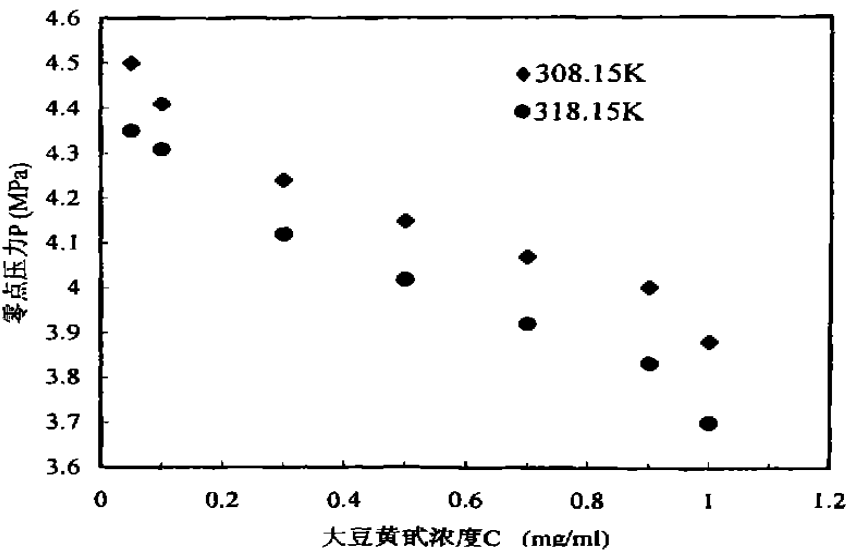


图 4 大豆黄甙在丙酮中的雾点压力

Fig. 4 The data of phase equilibrium of daidzin in acetone

同样可得到大豆黄甙在浓度接近零时 308.15K 和 318.15K 下的露点压力分别为 4.89 和 4.81Mpa (图 4)。该值略低于染料木甙, 这与大豆黄甙的极性较强有关。

据此我们可以知道分离纯化大豆异黄酮大豆黄甙 D 和染料木甙 G 两种物质的大概压力范围。即对于一定浓度和温度的异黄酮-丙酮溶液, 沉淀杂质的压力应略低于或接近该浓度下的露点压力, 使杂质沉淀而异黄酮不析出, 而沉淀异黄酮的最高压力是异黄酮浓度接近零时的露点压力, 这种操作可保证最大程度地回收异黄酮, 但有时为提高纯度, 压力范围会适当缩小。

2.2 抗溶剂法分离纯化大豆异黄酮的研究

2.2.1 丙酮浸提

采用丙酮-水溶液浸提法, 可将样品中异黄酮转移到溶液中。丙酮的浓度不同, 会导致浸提成分有一定的差异, 对后面的 CO₂ 抗溶剂分离有一定的影响。本实验采用 85% 和 95% 两种不同浓度的丙酮水溶液进行研究, HPLC 分析表明, 浓度为 85% 的丙酮溶液可将样品中的异黄酮全部转移到溶液中。溶液中染料木甙浓度约为 1.3mg/mL, 大豆黄甙的浓度约为 1 mg/mL。

2.2.2 CO₂ 抗溶剂分离纯化

10% 大豆异黄酮样品是复杂的混合物, 含皂甙、蛋白、糖、脂肪、甾醇等一系列物质。若以染料木甙为参照物, 可将样品中所含组分根据其极性大小分为三部分, 如图 4 所示。

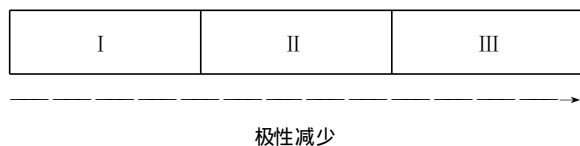


图 5 大豆异黄酮样品组成分布示意图

Fig 5 Sample of soybean isoflavone

其中 II 为染料木甙, I 和 III 分别为极性大于染料木甙和小于染料木甙的组分。本实验分离纯化的目的在于选择合适的参数条件, 使得随着 CO₂ 的通入, 在抗溶剂中溶解度最小的物质, 即在混合物中极性最强的 I 物质最先析出, 此时被 CO₂ 膨胀的溶液中异黄酮刚好达到饱和, 但并未沉淀析出(即略低于露点压力), 从而减少异黄酮的损失。在实验中选择了溶液膨胀压力为控制参数, 分别于 308.15K 和 318.15K 两个温度条件下进行了定量实验, 结果如表 1 所示。其中沉淀率和膨胀倍数分别按下式计算:

沉淀率(%) = (沉淀质量/样品质量) × 100%

膨胀倍数 = (V - V₀) / V₀

式中 V₀ 和 V 分别为膨胀前后的溶液体积。

异黄酮收率计算:

第一次分离纯化目的是沉淀杂质, 产品是上层清液干燥物, 因此收率按下式计算:

第一次异黄酮收率 = (1 - 沉淀率) × 上层清液干燥物中异黄酮含量 / 体系中异黄酮总量 × 100%

第二次分离纯化的目的是沉淀异黄酮, 而将杂质留于上清液中, 收率按下式计算:

第二次异黄酮收率 = 沉淀率 × 下层沉淀干燥物中异黄酮含量 / 体系中异黄酮总量 × 100%

总异黄酮收率 = 第一次异黄酮收率 × 第二次异黄酮收率

其中体系中总异黄酮含量计算方法如下:

体系中异黄酮总量 = 沉淀率 × 下层沉淀干燥物中异黄酮含量 + (1 - 沉淀率) × 上层清液干燥中异黄酮含量。

从表 1 可以看出, 上层清液中大豆异黄酮的含量经历了一个由低到高再降低的过程, 即存在最大值, 而后随着 CO₂ 的继续通入大豆异黄酮含量急剧降低。对应着上清液异黄酮含量最大值时的膨胀倍数为 2.48, 此时 CO₂ 压力为 3.73MPa, 略低于该条件下染料木甙和大豆黄甙的露点压力。溶液中沉淀析出的多为物质 I, 仅有少量的异黄酮, 当压力升至露点压力时大豆异黄酮在溶液中已经达到饱和, 物质 I 几乎全部析出, 异黄酮含量存在最大值, 随后 CO₂ 压力超过露点压力, 大豆异黄酮开始逐渐沉淀析出, 沉淀中大豆异黄酮含量急剧增加。

另外, 比较 308.15K 和 318.15K 两种温度下的纯化效果, 在膨胀倍数接近的情况下, 308.15K 可得到较高的异黄酮含量, 因此温度以 308.15K 较好, 温度再低, 则需要降温, 过程不好控制且增加能耗。

从表 1 还可以看出, 用 CO₂ 超抗溶剂法进行产品的纯化, 异黄酮含量从 10% 提高至 40% (308.15K, 膨胀倍数 2.48, 85% 丙酮), 异黄酮收率约为 89.6%, 而用溶剂萃取或树脂吸附法(通过洗脱条件的改变)达到同样的纯化效果, 异黄酮收率分别为 67% (华药 107 车间数据) 和 58% (本实验室用聚酰胺树脂、大孔吸附树脂研究结果)。

根据表 1 的结果, CO₂ 抗溶剂过程第一次膨胀除去了提取物中的物质 I 使产品纯度有一定程度的提高, 如需进一步纯化, 还需要进行第二次抗溶剂膨胀过程, 旨在沉淀提取物中的大豆异黄酮, 从而实现

与物质 II 的分离。此时, 二次膨胀的膨胀倍数应以高于 2.5 为宜, 实验温度选用 308.15K, 溶剂选用 85%丙酮。实验过程与第一次膨胀过程相同, 区别

在于所加入的溶液为第一次膨胀后得到的上次清液。表 2 给出了二次膨胀得到产品的分析结果。

表 1 CO₂ 抗溶剂法第一次分离纯化异黄酮提取物的实验数据(85%丙酮)

Table 1 CO₂ antisolvent process for primary purification soy isoflavone

	膨胀 倍数	上层清液干燥物				下层沉淀干燥物		
		G(%)	D(%)	总异黄酮 (%)	沉淀率 (%)	G(%)	D(%)	总异黄酮 (%)
308. 15 K	1. 30	8. 33	6. 29	18. 03	43. 39	0. 22	0. 32	0. 71
	1. 72	10. 18	7. 62	21. 96	54. 36	0. 29	0. 41	0. 89
	2. 08	11. 59	8. 53	24. 72	60. 24	0. 33	0. 52	1. 13
	2. 48	19. 62	14. 19	40. 89	76. 97	0. 38	0. 56	1. 42
	3. 52	15. 94	7. 62	26. 44	84. 06	2. 76	2. 96	8. 12
	3. 95	4. 41	3. 19	8. 33	86. 49	4. 87	3. 78	10. 92
318. 15 K	1. 48	7. 91	6. 01	17. 21	40. 55	0. 26	0. 31	0. 68
	1. 69	9. 34	7. 20	20. 63	51. 21	0. 30	0. 36	0. 87
	2. 19	12. 20	9. 11	25. 91	62. 38	0. 36	0. 42	1. 22
	2. 34	16. 53	12. 84	35. 36	73. 33	0. 39	0. 45	1. 47
	3. 06	9. 64	6. 17	23. 68	80. 31	3. 67	3. 12	7. 28
	3. 87	8. 42	6. 01	15. 90	82. 80	4. 05	3. 22	9. 39

表 2 CO₂ 抗溶剂法第二次分离纯化异黄酮提取物的实验数据(85%丙酮)

Table 2 CO₂ antisolvent process for second purification soy isoflavone

膨胀 倍数	下层沉淀干燥物			上层清液干燥物沉淀率(%)			
	G(%)	D(%)	总异黄酮 (%)	G(%)	D(%)	总异黄酮 (%)	
308.15 K							
2.58	1.97	32.16	50.34	98.53	19.37	13.43	39.73
3.01	14.7	36.72	37.69	96.78	16.45	10.11	31.34
3.46	33.06	48.69	37.88	94.54	7.26	3.96	14.62
4.01	39.59	43.52	32.02	90.23	3.96	2.46	8.56

从表 2 可以看出, 当溶剂膨胀倍数达到 4.01 时, 下层沉淀物中异黄酮含量已达到 90%, 上清液干燥物中的异黄酮已降至 10%以下, 说明异黄酮已基本沉淀下来。异黄酮从 40%纯化至 90%, 收率为 87.3%。

10%的大豆异黄酮样品经过两次 CO₂ 抗溶剂纯化, 纯度已达到 90.23%, 总收率为 78.2%。而利用树脂吸附或溶剂萃取生产 90%以上异黄酮的研究尚未见有报导。

3 结论

CO₂ 抗溶剂法纯化大豆异黄酮经两次膨胀, 可将异黄酮含量从 10%纯化至 90%以上, 总收率达 74%以上, 远高于传统的溶剂萃取法和树脂吸附法,

且具有操作简单, 不污染环境等优点, 展现了较好的工业应用前景, 并为天然产物中有价值极性物质的分离提供了新的研究思路。

CO₂ 抗溶剂法通过 CO₂ 压力的连续变化以连续改变溶剂的极性, 从而达到对混合物进行分离纯化的目的, 在分离机理上具有明显的先进性。但由于该技术从诞生到现在仅有十年的时间, 尚有大量工作要做。对分离大豆异黄酮而言, 基础相平衡数据的完善、设备的放大及连续化将是今后研究的重点。

参 考 文 献

1 Naokazu Ohta, Goro Kuwata, et al. Isoflavonoid Constituents of Soybeans and Isolation of a New Acetyl Daidzin[J]. Agric. Biol. Chem., 1979, 43(7): 1415—1419.

- 2 Kelly, Graham, Edmund. Health Supplements Containing Phyto-estrogens[P] . Analogues or Metabolites Thereof. WO 93/ 23069, Nov. 25, 1993.
- 3 Greg Peterson, Stephen Barnes. Genistein Inhibition of the Growth of Human Breast Cancer Cells; Independence from Estrogen Receptors and the Multi-drug Resistance Gene[J] . Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991, 179(1): 661—667.
- 4 Naokazu Ohta, Goro Kuwata, et al. Isoflavonoid Constituents of Soybeans and Isolation of a New Acetyl Daidzin[J] . Agric. Biol. Chem. 1979, 43(7):1415—1419.
- 5 Yukio Ohshima, Toru Okuyama, et al. Isolation and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of Isoflavonoids from the Pueraria Root[J] . Planta medica. 1988; 250—254.
- 6 BoLin Zheng, Superior, John A. Yegge, Longmon, et al. Process for the Isolation and Purification of Isoflavones[P] . US 5, 679, 806, Oct. 21, 1997.
- 7 Eric T. Gugger, Daniel G. Dueppen. Production of Isoflavone Enriched Fractions from Soy Protein Extracts[P] . US5, 702, 752, Dec. 30, 1997.
- 8 Gallagher P. M., Coffey M. P., Krukonis V. J., et al. Gas anti-solvent recrystallization: new process to recrystallize compounds insoluble in supercritical fluids[P] . ACS Symp. Series, 406, 1989, 334.

STUDY ON THE PURIFICATION OF SOY ISOFLAVONE BY SUPERCRITICAL CO₂ ANTISOLVENT PROCESS

Yuan Qipeng¹ Zhang Huai¹ Qian Zhongming²

(1. College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Department of Applied Biology & Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University)

Abstract The data of phase equilibrium of genistin and daidzin in acetone was measured. The super critical CO₂ anti-solvent process and extraction by organic solvent was combined to purify soy isoflavone. The content of isoflavone in the product is higher than 90% and the yield is 78%. This study provides a new idea for purifying natural product by means of super critical CO₂ anti-solvent process.

Key words Super critical fluid; Anti-solvent; Soy isoflavone

2003 年《玉米科学》征订启事

《玉米科学》是 1992 年经国家新闻出版署和国家科委批准出版的全国性科技期刊。

《玉米科学》是理论与实践相结合, 普及与提高相结合的刊物。主要报道: 遗传育种、新品种信息、品种资源、耕作栽培、生理生化、生物工程、土壤肥料、植物保护、种子繁育、加工利用国内外玉米科研动态、市场信息等方面的内容。适合科研、教学生产及管理方面人员参考。国内外公开发行人。季刊, 每季末月 25 日出版。国际大开本(210mm×297mm)。标准刊号 CN22—1201/S, 国内定价: 每本 7.00 元, 全年 28.00 元。邮发代号: 12—137。全国各地邮局(所)均可订阅。漏订者可直接向吉林省公主岭市西兴华街 6 号, 吉林省农业科学院《玉米科学》编辑部补订, 邮编 136100。

《玉米科学》愿为科研、教学、生产及广大农民种业界朋友竭诚服务。从 2001 年开始承办广告业务。广告经营许可证: 四广字 050104 号。

电话: 0434—6257334, E-mail: ymkx@cjaas.com