

超声波辅助提取大豆总木脂素及其含量分析

陈 韵¹, 石展望², 黄晓敏¹

(1. 韶关学院 生物科学系, 广东 韶关 512005; 2. 广西民族大学 化学与生态工程学院, 广西 南宁 530006)

摘 要:以乙醇为浸提溶剂, 超声波辅助提取不同品种大豆中的木脂素, 并用紫外-可见分光光度法对其含量进行分析, 同时对浸提溶剂、料液比、浸提时间及次数等因素进行比较。结果表明:以乙醇为浸提溶剂, 料液比在 1/8 ~ 1/12 范围, 浸提时间 20 min, 浸提 2 次效果比较理想; 标准对照品在 0 ~ 0.18 mg · mL⁻¹ 浓度范围内吸光度与其总木脂素含量呈良好的线性关系, 回归方程 $A = 6.081c + 0.0445$, 相关系数 $r = 0.9998$, 总木脂素检出限 8.3×10^{-5} mg · mL⁻¹, 平均回收率为 94.4%, RSD 为 1.2%。该方法简便、实用、可靠, 可对大豆木脂素的深入研究提供参考。

关键词:大豆; 总木脂素; 超声波辅助提取; 紫外-可见分光光度法

中图分类号:TS214.2

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)01-0168-03

Ultrasonic-assisted Extraction of Total Lignans and Its Content Analysis in Soybeans

CHEN Yun¹, SHI Zhan-wang², HUANG Xiao-min¹

(1. Bioscience Department of Shaoguan University, Shaoguan 512005, Guangdong; 2. Chemical and Ecological Engineering College of Guangxi Ethnic University, Nanning 530006, Guangxi, China)

Abstract: Total lignans in several soybean samples were detected by UV-Vis with the ultrasonic-assisted extraction in this paper. The result showed that by twice extraction it can get ideal effect with ethanol as extracting reagent in the material/reagent ratio of 1/8 ~ 1/12. The relationship between standard substance concentration within 0 ~ 0.18 mg · mL⁻¹ and absorbance remained better linear. The regression equation was $A = 6.081c + 0.0445$, with the correlation coefficient $r = 0.9998$, the detection limit was 8.3×10^{-5} mg · mL⁻¹ with the average recovery of 94.4% and the RSD of 1.2%. Results suggest the method is convenient and practical to detect lignans from soybean.

Key words: Soybean; Total lignans; Ultrasonic-assisted extraction; UV-Vis

木脂素(lignans)广泛分布于植物的各个部位,尤其在亚麻、谷类、水果、蔬菜中含量较高,具有广泛的药理作用,如抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、保肝、免疫激活等^[1-4]。大豆作为重要食品来源,以往研究的重点在异黄酮、低聚糖、球蛋白、多肽、磷脂、皂苷等^[5-8]活性物质方面,而对木脂素的研究却鲜有报道。

木脂素含量主要采用高效液相色谱法测定,该法的优点是可以分别测定总木脂素中主要成分如五味子甲素、乙素、丙素;五味子醇甲、醇乙;五味子酯甲、乙、丙、丁、戊等,但从药理方面来说如此细分没有多大意义,再者仪器昂贵,分析繁杂,对一般基层单位不太适用。因总木脂素中除了五味子酯戊外,其余在 B 环上都有亚甲二氧基结构,可与变色酸反应,其产物在 570nm 处有吸收,因此可以用紫外分

光光度法测定,其结果可以代表总木脂素含量^[9]。现采用超声波辅助法提取不同大豆品种中的木脂素,并用紫外-可见分光光度法分析其含量,为大豆产品的深加工利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 主要仪器 Unicam-300 型紫外-可见分光光度计(美国 Thermo Electron 公司);九阳 JYDZ-29 型全自动豆浆机(九阳股份有限公司);KQ500B 型控温超声波清洗器(上海精密仪器有限公司)。

1.1.2 主要试剂 五味子酯甲对照品(中国药品生物制品检定所),变色酸(天津市新精细化工开发中心),其余试剂纯度都在分析纯以上,相关溶液都

收稿日期:2009-08-24

基金项目:广东省科技计划资助项目(2005B33001004)

第一作者简介:陈韵(1965-),男,硕士,研究方向为生物无机化学。E-mail: yunchen68@163.com。

用二次蒸馏水配制。

1.1.3 大豆材料 广东本地早、晚熟大豆(编号Ⅰ和Ⅱ)和东北早、晚熟大豆(编号为Ⅲ和Ⅳ)。

1.2 试验方法

1.2.1 紫外-可见分光光度计仪器条件 室温条件下,在波长 250 ~ 700 nm 范围自动优化扫描,比色皿宽度为 1 cm,狭缝宽度 2 nm。

1.2.2 样品处理 将大豆烘干、粉碎,过 80 目筛,取豆粉 1 g 于 20 mL 具塞试管中,加 10 mL 75% 乙醇,置超声波清洗器(500W, 40 KHz)中提取 30 min,过滤,滤液在沸水浴中挥去乙醇,加入 10% 变色酸 0.5 mL、浓硫酸 3.0 mL、蒸馏水 1.5 mL,摇匀后在沸水浴中加热 30 min,迅速冷却,用蒸馏水准确定容至 5.0 mL,在 570 nm 处检测其吸光度。另外,取烘干大豆 50 g,用蒸馏水浸泡 24 h,在豆浆机中打磨 20 min,滤去豆浆,豆渣用纯净水洗 2 次,烘干,再按上述方法处理。

1.2.3 标准溶液配制 准确称取五味子酯甲对照品 10 mg,用乙醇溶解并定容至 100 mL,分别吸取此溶液 0、0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 刻度试管中,按 1.2.2 方法处理后用蒸馏水准确定容至 5.0 mL,此为标准溶液,五味子酯甲浓度分别为 0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 标准曲线和回归方程的建立

以纯乙醇管样为空白样品,把标准溶液按 1.2.1 方法测定 570 nm 的波长处测定吸光度(A)值,以 A 为纵坐标,以五味子酯甲浓度为横坐标得标准曲线。回归方程 $A = 6.081c + 0.0445$,相关系数 $r = 0.9998$,五味子酯甲浓度线性范围在 0 ~ 0.18 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 大豆总木脂素提取次数

取 1 g 样品Ⅰ豆粉 2 份于具塞试管中,加 10.0 mL 75% 乙醇,分别用超声波辅助提取和普通浸提法提取 8 次,超声波辅助提取时间每次为 20 min,普通浸提时间为每次 2 h,按 1.2.2 方法处理并测定每次提取物吸光度(图 1)。结果表明,采用超声波辅助提取,提取 2 次,提取量可达到大豆总木脂素的 95% 以上,而用普通乙醇浸提要提取 5 次以上才能达到此效果。

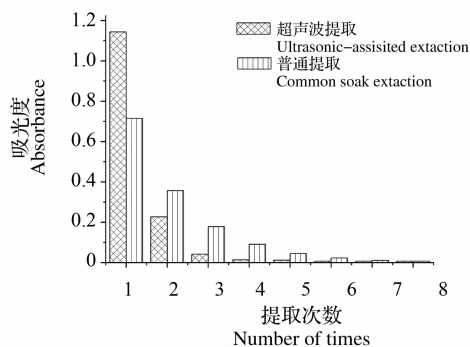


图 1 2 种方法提取总木脂素效果比较

Fig. 1 Comparison between ultrasonic-assisted extraction and common extraction

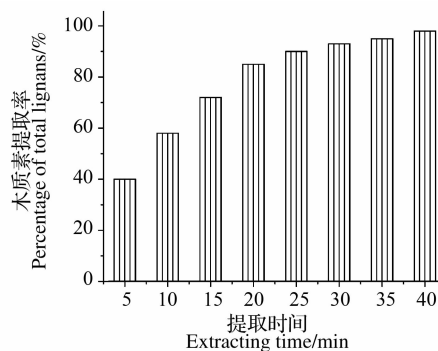


图 2 超声波辅助提取时间与总木脂素提取量关系

Fig. 2 Relation between ultrasonic-assisted extracting time and extraction percentage of total lignans in soybean

2.3 超声波辅助提取时间及温度

按方法 1.2.2,取 1 g 豆粉,以乙醇为提取溶剂,室温下超声波提取时间分别设定为 5、10、15、20、25、30、35、40 min。结果表明,超声波提取时间达到 30 min 时,总木脂素提取率可达到 90% 以上(图 2);分别在 25℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃ 温度下超声波提取 30 min,木脂素浸提率随温度的升高有一定的提高,但温度达到 60℃ 以后,提高效率明显放缓(图 3)。

2.4 提取溶剂的选择及料液比

按方法 1.2.2,取 1 g 豆粉,以乙醇为提取溶剂,料液比($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)在 1:2 ~ 1:20 范围内超声波辅助提取,结果料液比在 1:8 ~ 1:12 较为适宜(图 4);分别用蒸馏水、甲醇、乙醇、丙酮、乙醚、乙酸乙酯、氯仿、环己烷为溶剂提取,料液比为 1/10,提取效果依次为乙醇 > 甲醇 > 乙酸乙酯 > 丙酮 > 二次蒸馏水 > 环己烷 > 乙醚、氯仿(表 1)。

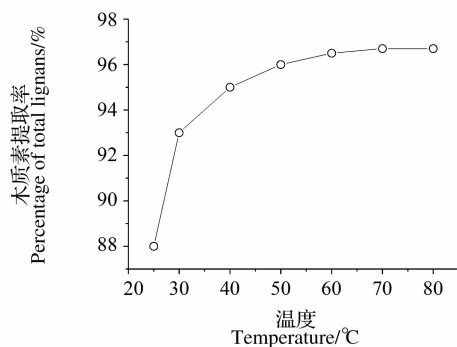


图3 提取温度与总木脂素提取量的关系

Fig. 3 Relation between extracting temperature and extraction percentage of total lignans

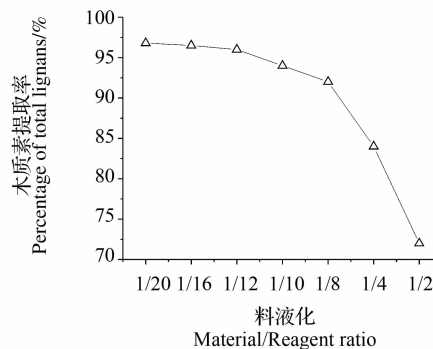


图4 料液比与总木脂素提取量的关系

Fig. 4 Relation between material/reagent ratio and extraction percentage of total lignans

表1 不同溶剂对大豆总木脂素提取效果比较.

Table 1 Comparison of extraction effect of total lignans in soybean with different reagents

溶剂 Reagents	蒸馏水 Distilled water	甲醇 Methanol	乙醇 Ethanol	丙酮 Acetone	乙醚 Ethylether	乙酸乙酯 Ethylacetate	氯仿 Dichloromethane	环己烷 Cyclohexane
总木脂素提取率 Total lignans%	17	86	91	48	<3	55	<3	9

2.5 油脂对吸光度的影响

在1 g 豆粉中加入相当于其质量40% 油酸和亚油酸混合物(质量比为1:2),按方法1.2.2 处理并计算,发现与未加油酸和亚油酸混合物对比误差在 $\pm 5\%$ 范围,表明大豆中油脂不影响木脂素含量测定;由于蛋白质在乙醇中溶解度甚微,乙醇提取液中蛋白质含量很少,故蛋白质对测定影响可不予考虑。

2.6 精密度、检出限和回收率

用 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准溶液按1.2.2 方法处理后平行测定6 次,RSD% 为1.2%;用3 倍标准偏差($n=21$)与标准曲线斜率的比值得出的检出限为 $8.3 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;取I~IV 号样品各1 g,分别加入 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准溶液1.0 mL,按1.3 方法处理后上机检测,计算出回收率分别为90.8%、95.4%、101.6% 和89.6%,平均回收率为94.4%。

2.7 样品分析

从表2 可见,大豆总木脂素含量介于1.32%~

表2 几种大豆样品总木脂素检测结果

Table 2 Analytic results of total lignans in several soybean samples

样品编号 Sample No.	总木脂素含量 Percentage of lignans/%	各成分总木脂素分布 Distribution of lignans in components/%	
		豆渣 Bean dregs	豆浆 Soybean milk
I	1.32	24.6	5.4
II	1.47	26.1	73.9
III	1.36	23.8	76.2
IV	1.56	25.4	74.6

1.56% 之间,同类早、晚熟品种木脂素含量差异不大,但晚熟品种所含木脂素都比早熟品种略高些,这可能与生长周期有关。研究还表明,豆浆中所含总木脂素都占大豆总木脂素的70% 以上,此结论可为大豆的科学饮食提供参考。

3 结论与讨论

超声波辅助提取法检测大豆中的总木脂素简便实用,结果可靠,精密度、检出限和回收率等指标都能满足检测要求。但此法只能检测大豆中总木脂素,木脂素各成分含量及其分布有待进一步研究。我国作为大豆生产大国,大豆产品的深加工和综合利用具有广阔的前景,特别是近年来不断出现木脂素抗艾滋病病毒的报道^[10]。该研究提供了一种方便快捷的木脂素提取和检测方法,可为大豆木脂素的后续研究提供依据。

参考文献

- [1] Masso Hirose. Effects of arctiin on PhI-induced mammary, colonic and pancreatic carcinogenesis in female Sprague rats and MeIQ-induced hepatocarcinogenesis in male F334 rats[J]. Cancer, 2000, 155(1):793-797.
- [2] Chen D F, Zhang SX, Xie L, et al. Anti-AIDS Agents- X X XI, structure-activity correlations of gomisin-G relates anti HIV lignans from Kadsura interior and of relates synthetic analogs[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1997, 5(8):1715-1722.

(下转第173页)

酸雨能力较强的作物^[9],萌发种子糖代谢受酸雨伤害较小;(2)大豆萌发种子4种碳水化合物的用途与用量(利用率)存在差异,如可溶性糖、蔗糖(淀粉是碳源)需求较多,故维持较高水平(与CK差异不显著);(3)催化淀粉水解为单糖的酶系复杂(除上述2种酶外,还有 β -淀粉酶、脱支酶和 α -葡萄糖苷酶),因不同淀粉酶对酸雨敏感性存在差异,也可导致碳水化合物水平出现差异,抑或(2)、(3)因素同时存在,原因尚待进一步研究。

结果表明,大豆萌发种子糖代谢对酸雨胁迫有较强适应;4种碳水化合物含量与2种淀粉酶,在高强度酸雨胁迫下存在共轭关系。

参考文献

- [1] Li W, Gao J X. Acid deposition and integrated zoning control in China[J]. *Environmental Management*, 2002, 30(2): 169-182.
 - [2] 燕惠刚, 陈欣欣, 铁柏清, 等. 模拟酸雨对水稻、玉米和绿豆萌发及生长影响[J]. *农业环境与发展*, 1998, 15(2): 13-16. (Yan H G, Chen X X, Tie B Q, et al. Effects of simulated acid rain on the germination and the growth of rice, maize and mung bean[J]. *Agro-Environment and Development*, 1998, 15(2): 13-16.)
 - [3] 王丽红, 周青, 曾庆玲. 3类抗性种子萌发过程中糖代谢对酸雨胁迫的响应[J]. *环境科学*, 2008, 29(3): 799-803. (Wang L H, Zhou Q, Zeng Q L. Responses of sugar metabolism in seed germination of three various acid-fast plants to acid rain[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(3): 799-803.)
 - [4] 吴遥琪, 彭莹, 唐璐, 等. 酸雨胁迫下La(Ⅲ)对水稻种子萌发及POD活性影响[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(5): 1901-1906. (Wu Y Q, Peng Y, Tang L, et al. Effect of lanthanum on the germination of rice seeds and POD activity under acid rain stress[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(5): 1901-1906.)
 - [5] 邹琪. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 111-113, 151-154. (Zou Q. Direction for plant physiological and biochemical experiments[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000: 111-113, 151-154.)
 - [6] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 128-129. (Zhang Z L, Qu W J. Direction for botany physiological experience[M]. Beijing: Higher Education Press, 2003: 128-129.)
 - [7] 胡晋. 种子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 158. (Hu J. Seed biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2005: 158.)
 - [8] 王丽红, 周青, 黄晓华. 种子萌发过程中淀粉酶对酸雨胁迫的响应[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(6): 1465-1469. (Wang L H, Zhou Q, Huang X H. Response of amylase to acid rain during seed germination[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(6): 1465-1469.)
 - [9] 冯宗炜, 曹洪法, 周修萍, 等. 酸沉降对生态环境的影响及其生态恢复[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1993: 2, 100. (Feng Z W, Cao H F, Zh X P, et al. Acid deposition on the ecological environment and its ecological restoration[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1993: 2, 100.)
-
- (上接第170页)
- [3] Kanae Yamashita, Yoshie Iizuka, Tomoko Imai, et al. Sesame seed and its lignans produce marked enhancement of vitamin E activity in rats fed a low α -tocopherol diet[J]. *Lipids*, 1998, 33(6): 567-571.
 - [4] 张永忠, 李小莉, 郭群. 辛夷木脂素类成分抗血小板活化因子作用的研究[J]. *湖北中药杂志*, 2001, 23(10): 7-10. (Zhang Y Z, Li X L, Guo Q. Study on action of lignans composition of flos magnoliae resisting platelet activating factor[J]. *Hubei Journal of Traditional Chinese Materia Medica*, 2001, 23(10): 7-10.)
 - [5] 刘春龙, 李中秋, 孙海霞, 等. 大豆异黄酮的生理作用及其在医学方面的研究进展[J]. *大豆科学*, 2008, 27(4): 693-695. (Liu C L, Li Z Q, Sun H X, et al. Research progress and physiological function of soybean isoflavone on medicine[J]. *Soybean Science*, 2008, 27(4): 693-695.)
 - [6] 周建芹. 大豆异黄酮提取工艺优化及其活性研究[J]. *大豆科学*, 2007, 26(2): 276-279. (Zhou J Q. Optimization of extraction technology of soybean isoflavones and its physiological activity analysis[J]. *Soybean Science*, 2007, 26(2): 276-279.)
 - [7] 谢莎丽, 石凯, 石元刚. 大豆低聚糖和低聚肽对高脂血症大鼠抗氧化作用及粪胆汁酸代谢的影响[J]. *重庆医学*, 2009, 38(8): 922-924. (Xie S L, Shi K, Shi Y G. Effects of soy oligosaccharides and peptides on vasoactive substances and apolipoprotein levels in hyperlipidemia rats[J]. *Chongqing Medicine*, 2009, 38(8): 922-924.)
 - [8] 吴素萍, 田立强. 大豆皂苷的生理功能及其提取纯化的研究现状[J]. *大豆科学*, 2008, 27(5): 883-887. (Wu S P, Tian L Q. Research status quo of extraction and purification and physiological functions of soybean Saponin[J]. *Soybean Science*, 2008, 27(5): 883-887.)
 - [9] 孙丽华, 王巧懿, 江月仙, 等. 比色法测定还韶胶囊中五味子素的含量[J]. *浙江省医学科学院学报*, 2002, 13(1): 25-26. (Sun L H, Wang Q Y, Jiang Y X, et al. Determination of Schisandrins in Huanshao capsule by colorimetry[J]. *Acta Academiae Medicinae Zhejiang*, 2002, 13(1): 25-26.)
 - [10] 杨毅, 张成路, 王喆, 等. 木脂素抗艾滋病病毒研究[J]. *化学进展*, 2003, 15(4): 327-331. (Yang Y, Zhang C L, Wang Z, et al. Advances in lignans with Anti-HIV properties[J]. *Progress in Chemistry*, 2003, 15(4): 327-331.)