

大豆异黄酮纯化工艺研究

刘少静¹, 王多宁², 刁颖博¹, 肖秋茹¹, 张玉琪¹, 杨黎彬¹

(1. 西安医学院 药学院, 陕西 西安 710021; 2. 西安医学院 科研中心, 陕西 西安 710021)

摘要: 以大豆异黄酮纯度为考察指标, 将醇沉结合乙酸乙酯萃取法与其他纯化方法进行对比, 并进一步对醇沉法中工艺参数通过单因素试验及正交试验进行优化。结果表明: 醇沉最佳工艺为浓缩液质量分数 25%, 乙醇浓度 80%, 搅拌时间 13 min, 静置时间 5 h; 经等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 异黄酮基本萃取完全。醇沉结合乙酸乙酯萃取法可得到含量高达 16.83% 的大豆异黄酮产品, 比单纯醇沉法提高约 4 倍。

关键词: 豆粕; 大豆异黄酮; 纯化; 醇沉法; 萃取

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)04-0535-04

Optimization on the Purification Technologies of Soybean Isoflavone

LIU Shao-jing¹, WANG Duo-ning², DIAO Ying-bo¹, XIAO Qiu-ru¹, ZHANG Yu-qi¹, YANG Li-bin¹

(1. College of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Scientific Research Center, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Abstract: With the purity of soybean isoflavone as investigation index, the isoflavone purification method of alcohol precipitation combined with ethyl acetate extraction was compared with other methods. And then the alcohol precipitation parameters for the purification of isoflavones were optimized by single-factor and orthogonal experiment. The optimized conditions of ethanol precipitation were, mixing 25% mass fraction of isoflavone extract with 80% ethanol for 13 min, and then standing for 5 h; After 3 times extraction with ethyl acetate, isoflavones could be extracted completely. Under the new technology of alcohol precipitation and ethyl acetate extraction, the purification of isoflavones in final product was 16.83%, increased nearly 4 times than separate ethanol precipitation.

Key words: Soybean meal; Soybean isoflavone; Purification; Ethanol precipitation; Extraction

大豆异黄酮是存在于大豆中的生物活性成分, 是一种具有多种重要生理活性的天然营养因子。近年来的研究表明, 大豆异黄酮具有防治癌症、心血管疾病; 预防骨质疏松症、老年痴呆症; 改善妇女更年期综合征及美容、延缓衰老等多方面的生理作用^[1-2]。但自然界中异黄酮资源十分有限, 即使在含量较高的大豆荚中也仅含 0.1%~0.5%, 在实际生产中, 大豆制油后所残留的豆粕中含有大量的异黄酮^[3-4]。在大豆异黄酮生产过程中多采用 70% 乙醇溶液提取, 提取液中含有糖类、皂苷、少量的蛋白质等水溶性杂质, 大豆异黄酮纯度较低^[5]。因此, 现采用醇沉—乙酸乙酯萃取法, 通过单因素和正交试验对从豆粕中提取纯化大豆异黄酮的工艺条件进行优化, 以期提高大豆异黄酮纯度。

1 材料与方法

1.1 试验材料

脱脂豆粕(榆林市三丰油脂有限公司); 染料木素对照品(中国药品生物制品检定所提供, 纯度:

98%); 甲醇、乙醇及乙酸乙酯均为分析纯。

1.2 试验仪器

UV-160A 紫外分光光度计(日本岛津公司)、SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)、RE-2000A 旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司)、FA1004B 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司)、KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、L-550 台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)和 DZF6020 真空干燥箱(上海琅轩实验设备有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的建立 染料木素标准品在 200~800 nm 波长范围内进行扫描得最大吸收波长在 254 nm 处。精密称取染料木素标准品适量, 用乙醇溶解, 转入 50 mL 容量瓶中, 用乙醇定容, 摇匀, 得质量浓度为 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的染料木素标准母液。取 5 支 10 mL 量瓶, 分别精密加入 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 2.5 mL 染料木素标准母液, 用乙醇定容, 摇匀, 得 5 个不同浓度的标准品溶液。以乙醇为空白对照, 在

收稿日期: 2012-12-10

基金项目: 2011 年榆林科技局产学研项目。

第一作者简介: 刘少静(1984-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事天然产物研究工作。E-mail: liushaojingbmgw@163.com。

通讯作者: 杨黎彬(1973-), 男, 博士, 副教授, 主要从事天然产物研究工作。E-mail: yangoyang@sina.com。

254 nm 波长处测定其吸光度(A),以吸光度(A)对进样浓度(C)进行线性回归分析。标准曲线方程为 $A = 0.1259C + 0.0272$ ($r = 0.9994$),线性范围为 $1.25 \sim 6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3.2 提取纯化工艺流程及结果计算 采用 70% 乙醇回流提取豆粕粗粉 2 h,过滤,离心滤液,所得上清液减压浓缩。浓缩液进一步用醇沉法纯化,搅拌、静置一定时间后离心,所得上清液回收乙醇后,采用 1 倍量乙酸乙酯萃取 3 次,合并乙酸乙酯层,干燥,即得高纯度大豆异黄酮(产品)。

精密称取产品适量,用无水乙醇溶解,于 254 nm 波长处测定其吸光度,代入“1.3.1”项下的标准曲线方程,计算产品中大豆异黄酮浓度,换算出产品纯度。公式: $x = [c \times v] / m \times 100\%$

式中: x 为产品中大豆异黄酮含量,%; c 为试样溶液浓度, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; v 为试样定容体积, mL ; m 为产品质量, mg 。

1.3.3 纯化方法的初步筛选 醇沉过程只是一个初步提纯过程,试验初期比较了甲醇、乙醇两种试

剂进行沉淀除杂及乙酸乙酯萃取等方法对产品纯度的提高。为了进一步纯化,在此基础上将醇沉法与萃取法相结合处理浓缩液,达到提高大豆异黄酮纯度的目的。

1.3.4 醇沉及乙酸乙酯萃取工艺的优化 在大量预实验的基础上,依次考察了不同的浓缩液质量分数、乙醇浓度、搅拌时间及静置时间对异黄酮纯度的影响。在此基础上,设计 4 因素 3 水平的正交试验,确定豆粕中异黄酮的最佳醇沉纯化工艺。

为了进一步纯化大豆异黄酮产品,对醇沉后样品采用乙酸乙酯萃取,并考察了萃取次数对异黄酮含量的影响。

2 结果与分析

2.1 纯化方法的比较

分别量取适量提取浓缩液,采用甲醇沉淀、乙醇沉淀、乙酸乙酯萃取及乙醇沉淀结合乙酸乙酯萃取进行处理,比较纯化效果,结果见表 1。

表 1 不同纯化方法试验结果

Table 1 The experimental results of several purification methods

纯化方法 Purification method	母液体积 Mother liquor volume/mL	产品质量 Product quality/mg	异黄酮质量 Isoflavones quality/mg	异黄酮纯度 Isoflavones purity/%
甲醇沉淀 Methanol precipitation	50	549.05	11.64	2.12
乙醇沉淀 Ethanol precipitation	50	546.85	22.64	4.14
乙酸乙酯萃取 Ethyl acetate extraction	50	232.69	7.33	3.15
乙醇沉淀-乙酸乙酯萃取 Ethanol precipitation-Ethyl acetate extraction	50	314.13	50.14	15.84

结果显示,提取浓缩液采用乙醇沉淀比用甲醇沉淀所得产品纯度高,且采用乙醇沉淀结合乙酸乙酯萃取较单独采用乙醇沉淀所得产品纯度提高近 4 倍。同时该法易操作,制备的大豆异黄酮纯度较高,颜色浅黄。

2.2 醇沉法单因素试验

2.2.1 浓缩液质量分数 取质量分数为 20%、25%、30%、35% 和 40% 的浓缩液各 50 mL,分别加入一定量无水乙醇调节至乙醇浓度为 80%,搅拌 10 min,静置 4 h,离心,所得上清液按照“1.3.2”项下后续操作进行处理。由图 1A 可见,浓缩液的质量分数对结果影响不大。考虑到浓缩液质量分数过大,导致有效成分易包裹于沉淀中而造成损失,并且浓度过大时粘度增加,不利于后续处理工艺,因此选择质量分数为 20% ~ 30%。

2.2.2 乙醇浓度 取质量分数为 25% 的浓缩液

50 mL 5 份,加入不同体积的无水乙醇调节至乙醇浓度分别为 50%、60%、70%、80%、90%,后续操作同“2.2.1”。由图 1B 可见,随着乙醇浓度增加,产品纯度升高,当乙醇浓度增至 80%,产品纯度达最大值,继续增加乙醇浓度,产品纯度几乎不变。因此,选择乙醇浓度约 80%。

2.2.3 搅拌时间 取质量分数为 25% 的浓缩液 50 mL 5 份,加入无水乙醇调节至乙醇浓度均为 80%,分别搅拌 5,10,15,20,25 min 进行醇沉,后续操作同“2.2.1”。由图 1C 可见,随着醇沉搅拌时间延长,产品纯度开始有所升高,当时间超过 10 min 反而使异黄酮纯度降低,从节能和省时间方面考虑,选择搅拌时间约 10 min 为宜。

2.2.4 静置时间 取质量分数为 25% 的浓缩液 50 mL 5 份,加入无水乙醇调节至乙醇浓度均为 80%,搅拌 10 min,分别静置 3,4,5,6,7 h。其他条

件同“2.2.1”。由图 1D 可见,随着静置时间延长,产品纯度升高,静置 5 h,纯度达最大值,继续延长时

间,纯度无明显变化。因此,选择静置时间为 5 h。

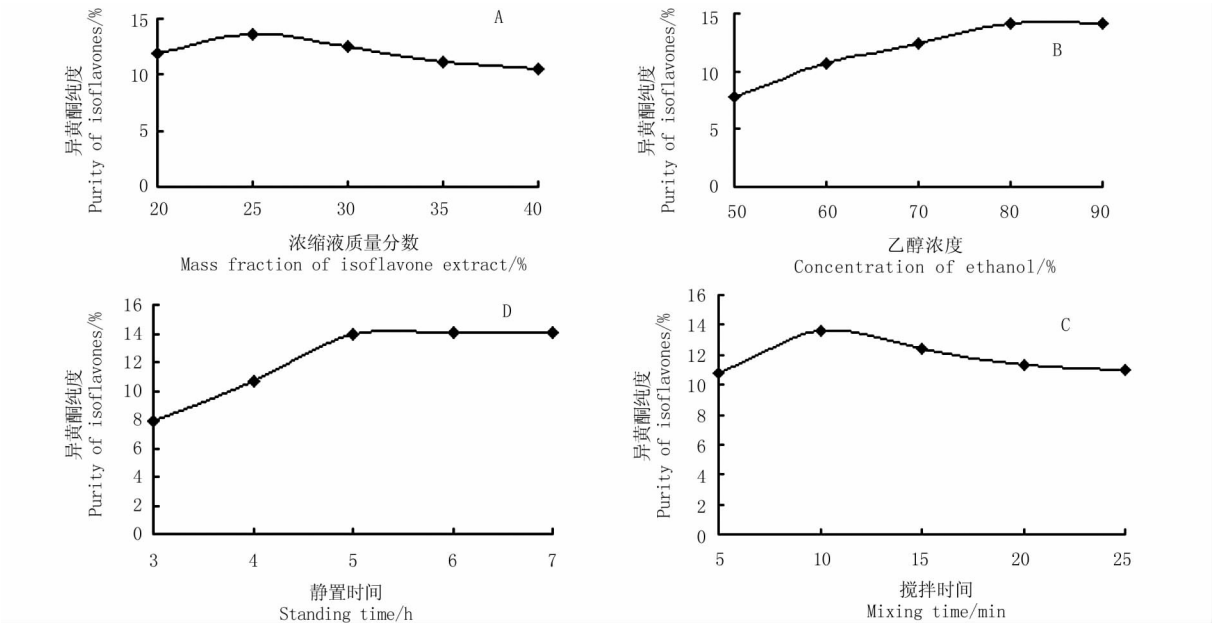


图 1 浓缩液质量分数(A)、乙醇浓度(B)、搅拌时间(C)和静置时间(D)对异黄酮纯度的影响

Fig. 1 Effect of mass fraction of isoflavone extract (A) ,ethanol,concentration(B) , mixing time (C) and standing time (D) on purity of isoflavones

2.3 醇沉法正交试验

在单因素试验基础上,选取浓缩液质量分数、乙醇浓度、搅拌时间及静置时间 4 个因素,设计 4 因

素 3 水平的正交试验(表 2),以确定醇沉法纯化大豆异黄酮的最佳条件。

表 2 正交试验的水平及因素

Table 2 Levels and factors of orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors			
	A 浓缩液质量分数 Mass fraction of concentrated liquid/%	B 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	C 搅拌时间 Mixing time/min	D 静置时间 Standing time/h
1	20	75	7	5
2	25	80	10	6
3	30	85	13	7

表 3 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test

序号 No.	浓缩液质量分数 Mass fraction of concentrated liquid/%	乙醇浓度 Ethanol concentration/%	搅拌时间 Mixing time/min	静置时间 Standing time/h	纯度 Purity/%
1	1	1	1	1	11.34
2	1	2	2	2	14.16
3	1	3	3	3	12.86
4	2	1	2	3	13.23
5	2	2	3	1	16.32
6	2	3	1	2	13.58
7	3	1	3	2	12.68
8	3	2	1	3	13.98
9	3	3	2	1	14.08
均值 1 Average 1	12.787	12.417	12.967	13.913	
均值 2 Average 2	14.377	14.820	13.823	13.473	
均值 3 Average 3	13.580	13.507	13.953	13.357	
极差 Range	1.590	2.403	0.986	0.556	

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variances

方差来源 Variance sources	偏差平方和 Sum of square of deviations	自由度 Degree of freedom	F 比 F ratio	F 临界值 Critical value of F
浓缩液质量分数 Mass fraction of concentrated liquid	3.792	2	7.335	19.000
乙醇浓度 Ethanol concentration	8.689	2	16.807	19.000
搅拌时间 Mixing time	1.724	2	3.335	19.000
静置时间 Standing time	0.517	2	1.000	19.000
误差 Error	0.520	2		

$F_{0.05(2,2)} = 19.000$; $F_{0.01(2,2)} = 99.000$.

由表 3 及表 4 可以看出,4 个因素对异黄酮纯度的影响程度大小顺序为乙醇浓度 > 浓缩液质量分数 > 搅拌时间 > 静置时间。乙醇浓度对异黄酮纯度影响最显著,确定醇沉的最佳工艺条件为 $A_2B_2C_3D_1$,即浓缩液质量分数 25%,乙醇浓度 80%,搅拌时间 13 min,静置时间 5 h。

2.4 萃取次数对异黄酮产品纯度的影响

将醇沉、离心后所得上清液回收乙醇,按照 1:1 的体积比加入乙酸乙酯进行液液萃取,比较萃取次数对异黄酮产品纯度的影响。从图 2 可以看出,当萃取到第 3 次时,继续增加萃取次数,异黄酮纯度基本无明显增加。同时从溶剂用量、成本、工艺操作等方面综合考虑,选择萃取 3 次,不宜再增加萃取次数。

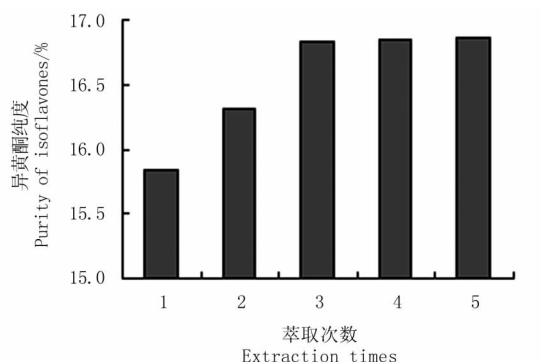


图 2 萃取次数对异黄酮纯度的影响

Fig.2 Effect of extraction times on purity

2.5 重复性试验

为了考察最佳纯化工艺的重复性,平行量取浓缩液 3 份,采用最佳醇沉工艺结合乙酸乙酯萃取处理样品,测定吸光度,计算产品纯度。结果异黄酮产品纯度可达 16.83%,RSD(相对标准偏差)为 0.18%,表明该工艺合理可行。

3 结 论

考察了从脱脂豆粕中提取纯化大豆异黄酮的工艺。结果显示醇沉结合乙酸乙酯萃取法可得到含量高达 16.83% 的大豆异黄酮产品,比单纯醇沉法提高约 4 倍。醇沉最佳工艺为浓缩液质量分数 25%,乙醇浓度 80%,搅拌时间 13 min,静置时间 5 h;向醇沉、离心后回收乙醇液中加入等体积乙酸乙酯萃取 3 次,异黄酮基本萃取完全。

参考文献

- [1] 王莹,翟登攀,马冬云,等.超声波及微波提取豆粕中总黄酮的工艺优化[J].佳木斯大学学报(自然科学版),2009,27(3):468-470. (Wang Y,Zhai D P, Ma D Y, et al. Optimization of the extraction of isoflavones from soybean meal by ultrasonic wave and microwave[J]. Journal of Jiamusi University (Natural Science), 2009,27(3):468-470.)
- [2] 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.)
- [3] 李年龙,刘洁珠,陈锦峰,等.豆粕中大豆异黄酮提取工艺研究[J].安徽农业科学,2011,39(27):17017-17018,17021. (Li N L,Liu J Z,Chen J F, et al. Study on the extraction technology of isoflavones from soybean meal[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2011,39(27):17017-17018,17021.)
- [4] 杨阳,蒋和体.豆粕中大豆异黄酮的提取工艺研究[J].中国食物与营养,2006(9):40-42. (Yang Y, Jiang H T. Extraction of soybean isoflavones from soybean meal[J]. Food and Nutrition in China,2006(9):40-42.)
- [5] 许芙蓉.醇沉法纯化大豆异黄酮[J].中国油脂,2008,33(9):58-60. (Xu F P. Purification of soybean isoflavone by ethanol precipitation[J]. China Oils and Fats,2008,33(9):58-60.)