

应用大孔树脂纯化大豆异黄酮的工艺研究

方建¹, 楚楚¹, 程冬萍¹, 黄六仔², 颜继忠¹

(1. 浙江工业大学 药学院, 浙江 杭州 310014; 2. 浙江惠松制药有限公司, 浙江 杭州 310018)

摘要:先用聚醚砜有机膜对豆粕乙醇提取液进行超滤, 然后用 D101 大孔树脂纯化, 研究大豆异黄酮的精制工艺。结果表明: 用孔径 5 000 D 的有机膜超滤处理豆粕乙醇提取液, 能够去除其中 56.1% 的杂质。用 D101 大孔树脂纯化, 采用上样液浓度为 $0.750 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大豆异黄酮溶液, 流速为 $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 依次用去离子水、1.0 BV 10% 乙醇、2.0 BV 80% 乙醇淋洗大孔树脂, 得到纯度为 41.2% 的大豆异黄酮产品, 大豆异黄酮的总收率为 65.7%。

关键词: 大豆异黄酮; 超滤; 大孔树脂

中图分类号: TQ914.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)03-0474-04

Purification of Soybean Isoflavones by Macroporous Resin

FANG Jian¹, CHU Chu¹, CHENG Dong-ping¹, HUANG Liu-zai², YAN Ji-zhong¹

(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang; 2. Zhejiang Huisong Pharmaceutical Co., Ltd, Hangzhou 310018, Zhejiang, China)

Abstract: This paper studied the soybean isoflavones refining process by ultrafiltrating soybean meal extract with polyether sulphone organic membrane and then purified with D101 macroporous resin. The detailed soybean isoflavones refining process was studied and optimized conditions were obtained. The results showed that removal rate of the impurities was up to 56.1% by ultrafiltrating soybean ethanol extract with organic membrane of pore diameter 5 000 D. Purified by D101 macroporous resin, with $0.750 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ sample concentration and $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ fluid samples rate, then successively rinsed with 1.0 BV deionized water, 1.0 BV 10% ethanol and 2.0 BV 80% ethanol, purify of 41.2% soybean isoflavone products was obtained and the overall yield was 65.7%.

Key words: Soybean isoflavones; Ultrafiltration; Macroporous resin

大豆异黄酮是大豆中一类重要的生理活性物质, 主要包含大豆苷、染料木苷、黄豆黄苷、大豆苷元、染料木素、黄豆黄素等成分^[1-2]。它可作为雌性激素的替代品, 对女性的更年期综合征的治疗和预防有很好的效果^[3-4]。

近年来, 利用大孔吸附树脂广泛应用于天然产物的富集^[5-7]。文献报道豆粕的乙醇提取物中, 最主要的杂质成分为蛋白质和低聚糖^[8]等, 其中的蛋白质会发生絮凝, 从而引起大孔树脂吸附性能降低和柱阻塞现象, 低聚糖等会与大豆异黄酮在大孔树脂上竞争吸附^[9-10], 导致吸附剂过载。因此, 采用大孔树脂进行富集之前, 需要对提取液中的蛋白、低聚糖等杂质进行去除。

该实验采用超滤法^[11-12]先去除豆粕提取液中的蛋白质和多糖, 然后进一步用 D101 大孔树脂进行富集, 通过对工艺条件和参数的探索, 确立一条 40% 大豆异黄酮产品的制备工艺路线。

1 材料与方法

1.1 实验材料

豆粕乙醇提取液(实验室自制); 95% 乙醇(浙江汇普化工有限公司); 去离子水(浙江工业大学自制); 氢氧化钠(国药集团化学试剂有限公司); 染料木苷、染料木素、大豆苷、大豆苷元(南京泽朗医药科技有限公司); D101 大孔树脂(沧州宝恩化工有限公司)。

1.2 仪器

W201 恒温水浴(上海申顺生物科技有限公司); 分析天平(Mettler ToLedo 公司, JA2003N 型); 超滤膜设备型号 RNF-0460(厦门福美科技有限公司); 聚醚砜超滤膜 2 500 D、5 000 D、10 000 D(美国通用公司)。754PC 紫外分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)。

收稿日期: 2012-04-07

基金项目: 浙江省面向社会发展科技计划项目(2009C33031)。

第一作者简介: 方建(1987-), 男, 在读硕士, 研究方向为中药质量控制技术。E-mail: yamaxun2006@163.com。

通讯作者: 颜继忠(1964-), 男, 教授, 主要从事中药提取技术与质量控制研究。E-mail: yjz@zjut.edu.cn。

1.3 方法

1.3.1 大豆异黄酮的测定 用紫外分光光度法测定大豆异黄酮的总量。准确称取干燥至恒重的染料木苷标准品 0.0146 g,用甲醇定容到 50 mL,分别量取 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 定容到 10 mL,在 260 nm 波长处测定吸光度,绘制吸光度标准曲线。得到标准曲线为 $y = 11.216x - 0.0537$, $R^2 = 0.9999$,在 1.46 ~ 14.57 mg·L⁻¹ 范围内线性良好。

1.3.2 蛋白质、多糖的测定 蛋白质含量参照 GB5009.5 测定。总糖含量的参照 GB/T5009.7 测定。

1.3.3 制备 40% 大豆异黄酮产品工艺路线 豆粕→70% 乙醇溶液提取→超滤→浓缩→D101 大孔树脂吸附→去离子水淋洗→10% 乙醇淋洗→80% 乙醇解析→浓缩→冷冻干燥→40% 大豆异黄酮产品。

1.3.4 豆粕提取液的制备 取豆粕按料液比 1:8 加入体积分数为 70% 的乙醇,在 50℃ 水浴中浸提 8 h,得到提取液。豆粕中大豆异黄酮量为 5.48 g·kg⁻¹ 豆粕。

1.3.5 杂质去除的工艺研究 分别应用超滤法

和醇沉法对豆粕提取液中的蛋白质、多糖等杂质进行去除,通过测定蛋白质、多糖的去除率和大豆异黄酮的得率,确定除杂方式。

1.3.6 大孔树脂吸附工艺研究 通过考察不同流速下 D101 大孔树脂对大豆异黄酮的吸附效果确定最佳上样流速;通过考察不同浓度乙醇对大豆异黄酮的分离效果,确定最佳的洗脱条件。

2 结果与分析

2.1 杂质去除的工艺研究

2.1.1 醇沉工艺除杂 将豆粕提取液浓缩,回收乙醇,然后加入 4 倍浓缩液体积的无水乙醇,搅拌 5 min,放入 4℃ 冰箱保存过夜。大量水溶性的多糖和蛋白质沉淀下来,离心得上清液,旋蒸回收乙醇得样品,测得醇沉后大豆异黄酮的得率为 72.8%,蛋白质、多糖、总杂质的去除率分别为 45.2%、49.1% 和 42.7%。

2.1.2 超滤工艺除杂 调节超滤压力为 5.0 bar,料液流量 11.8 L·h⁻¹,在室温下考察孔径分别为 2 500、5 000、10 000 D 的聚醚砜有机超滤膜的超滤效果,结果见表 1。

表 1 膜孔径的选择
Table 1 The choice of membrane of pore diameter

序号 No.	膜孔径 Pore diameter/D	透析液平均流量 Average flow of dialysate/L·h ⁻¹	大豆异黄酮产品质量 Quality of soybean isoflavones/g	大豆异黄酮纯度 Purity of soybean isoflavones/%	大豆异黄酮得率 Rate of soybean isoflavones/%
1	2500	3.1	28.4	7.1	36.8
2	5000	7.5	39.1	12.2	87.0
3	10000	7.6	60.8	7.9	87.8

从表 1 可以看出,豆粕提取液过孔径为 5 000 D 的超滤膜后,得到的大豆异黄酮产品的纯度最高。

工艺对豆粕提取液中蛋白质、多糖、总杂质的去除率和大豆异黄酮得率,结果见表 2。

2.1.3 醇沉和超滤工艺的比较 比较醇沉和超滤

表 2 不同除杂方式的比较
Table 2 Comparison of different methods to remove impurities

预处理方法 Pretreatment method	蛋白质去除率 Removal rate of protein/%	多糖去除率 Removal rate of polysaccharide/%	总杂质去除率 Removal rate of all impurities/%	大豆异黄酮得率 Rate of soybean isoflavones/%
醇沉 Ethanol precipitation	45.2	49.1	42.7	72.8
超滤 Ultrafiltration	93.7	46.9	56.1	87.0

从表 2 的结果可以看出,用超滤法去除杂质的效果要远远好于醇沉法,因此在后续的工艺操作中,对豆粕提取液的预处理一律采用有机膜超

滤法。

2.2 大孔树脂吸附工艺研究

2.2.1 上样液流速的确定 取 100 mL 浓度为

0.750 mg·mL⁻¹大豆异黄酮上样液(超滤后),以不同的流速进行上样,测定不同流速下 D101 大孔树脂对大豆异黄酮的吸附效果。从图 1 可知,上样液的流速小于 1.0 BV·h⁻¹时,D101 大孔树脂对大豆异黄酮是吸附效果较好。因此在吸附过程中上样液的流速不能大于1.0 BV·h⁻¹。

2.2.2 洗脱方式的考察 取 100 mL 大豆异黄酮上样液(超滤后),控制流速为 1 BV·h⁻¹。上样结束后,先依次用去离子水淋洗、低浓度乙醇洗脱,然后用 80% 的乙醇洗脱,收集第 20 ~ 60 mL 洗脱液,测定其中的大豆异黄酮含量。考察了 5%、10%、15% 的乙醇初步洗脱对杂质的去除情况,结果见表 3。

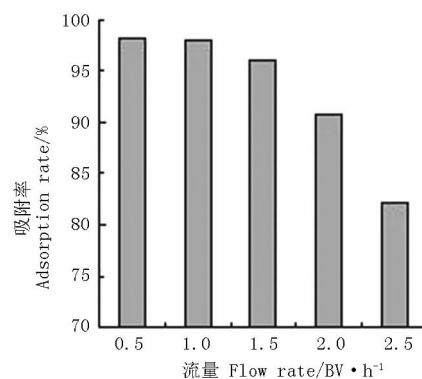


图 1 上样液流速的影响

Fig. 1 Effects of the fluid samples rate

表 3 不同洗脱方式的影响

Table 3 Effects of different elution way

序号 No.	初步洗脱 乙醇浓度 Ethanol concentration for preliminary elution/%	上样大豆异黄 酮总量 Quality of soybean isoflavones for sample/mg	大豆异黄酮 损失量 Loss of soybean isoflavones/mg	大豆异黄酮 产品质量 Quality of soybean isoflavones/mg	大豆异黄酮 产品纯度 Purity of soybean isoflavones/%	大豆异黄酮 得率 Rate of soybean isoflavones/%
1	5	75.0	17.1	128.2	39.6	67.6
2	10	75.0	19.2	123.60	41.2	67.9
3	15	75.0	21.5	119.21	41.3	65.4

从表 3 可以看出,用 10% 和 15% 乙醇初步洗脱时,最终得到的大豆异黄酮产品的纯度相差不大,但是用 10% 乙醇洗脱得到的产品质量要高;用 5% 乙醇初步洗脱时,产品纯度较低,不符合工业要求。因此在后续的实验中,水淋洗后,先用 10% 乙醇进行初步淋洗,再用高浓度乙醇进行洗脱。

2.2.3 洗脱溶剂的考察 取 100 mL 大豆异黄酮

上样液(超滤后),控制流速为 1 BV·h⁻¹。上样结束后,分别用去离子水、10% 乙醇淋洗,淋洗流速为 1.0 BV·h⁻¹,然后分别用不同浓度的乙醇洗脱,收集第 20 ~ 60 mL 洗脱液,测定洗脱液中大豆异黄酮的含量。高浓度乙醇考察了 60%、70%、80%、90% 体积分数的乙醇对大豆异黄酮的洗脱情况,结果见表 4。

表 4 不同浓度乙醇洗脱的影响

Table 4 Effects of elution way with different concentration ethanol

序号 No.	洗脱乙醇浓度 Ethanol concentration for elution/%	上样大豆异黄 酮含量 Quality of soybean isoflavones for sample/mg	大豆异黄酮 损失量 Loss of soybean isoflavones/mg	大豆异黄酮 产品质量 Quality of soybean isoflavones/mg	大豆异黄酮 产品纯度 Purity of soybean isoflavones/%	大豆异黄酮 得率 Rate of soybean isoflavones/%
1	60	75.0	16.1	143.01	39.1	74.5
2	70	75.0	16.1	140.14	39.9	74.5
3	80	75.0	15.5	137.46	41.2	75.5
4	90	75.0	15.9	114.96	42.0	64.3

从表 4 可以看出,随着洗脱溶剂乙醇浓度的提高,大豆异黄酮产品的纯度也相应地提高,但是产品的质量却降低。当使用 80% 乙醇进行洗脱时,大豆异黄酮得率最高,同时产品纯度为 41.2%,满足

了产品中大豆异黄酮含量为 40% 的要求,因此在洗脱大豆异黄酮时,采用 80% 乙醇进行洗脱。

2.2.4 超滤对大孔树脂吸附的影响 取 2 份浓缩液各 100 mL,一份是经有机膜超滤处理,另一份是

未经超滤处理,用 D101 大孔树脂柱纯化,比较大孔树脂对两份溶液中大豆异黄酮的吸附率、解析率以及所得产品的纯度,结果见表 5。

表 5 超滤对大孔树脂吸附的影响

Table 5 Effects of ultrafiltration on macroporous resin adsorption ability

处理 Treatment	吸附率 Adsorption rate/%	解吸率 Desorption rate/%	产品纯度 Product purity/%
超滤预处理 Ultrafiltration pretreatment	97.9	92.3	41.2
未超滤处理 Ultrafiltration unpretreatment	91.7	85.0	37.1

表 5 结果表明,运用超滤法对豆粕提取液进行前处理,可以有效的提高大孔树脂对大豆异黄酮的吸附和解析效果,产品纯度有极大的提高。

3 结 论

对豆粕提取液中的蛋白质、多糖等杂质的去除,超滤法效果较好。最佳的超滤条件是采用孔径为 5 000 D 的聚醚砜有机膜,在 5.0 bar 压力下,料液流量为 11.8 L·h⁻¹,能去除溶液中 56.1% 的杂质,大豆异黄酮的保留率达到 87.0%。

用 D101 大孔树脂纯化,采用上样液浓度为 0.750 mg·mL⁻¹ 大豆异黄酮溶液,流速为 1.0 BV·h⁻¹,然后依次用去离子水、1.0 BV 10% 乙醇、2.0 BV 80% 乙醇淋洗大孔树脂,收集第 20~60 mL 洗脱液,得到大豆异黄酮产品的纯度为 41.21%,得率为 75.53%。

对提取液进行超滤前处理,能够有效提高大孔树脂对大豆异黄酮的吸附率和解析率,有利于纯化效果的提高。

参考文献

[1] Kudou S, Fleury Y, Welti D, et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55 (9): 2227-2233.

[2] 高荣海, 张春红, 赵秀红, 等. 大豆异黄酮研究进展[J]. 粮食与油脂, 2009(5): 1-4. (Gao R H, Zhang C H, Zhao X H, et al. Research progress on soybean isoflavone[J]. Cereals & Oils, 2009 (5): 1-4.)

[3] 陶利, 李禾. 大豆异黄酮的药理作用[J]. 解放军药学报, 2011, 27(4): 360-362. (Tao L, Li H. The pharmacological effects of soybean isoflavones[J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2011, 27(4): 360-362.)

[4] Shaw W, Sayo U, Yuriko K. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possibleim-

mune potentiation[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2002, 56 (6): 302-312.

[5] 何伟, 李伟. 大孔树脂在中药成分分离中的应用[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(2): 134-136. (He W, Li W. Application of macroporous resin in separating ingredient from the Chinese native medicine[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2005, 21(2): 134-136.)

[6] Ahmad K H, Bob S, John S, et al. Process for producing high purity isoflavones; US, 7524526 B2[P]. 2009-04-28.

[7] 石彦国, 毕小磊, 孙冰玉. 不同大孔树脂对大豆糖蜜中异黄酮吸附影响研究[J]. 大豆科技, 2010(2): 25-28. (Shi Y G, Bi X L, Sun B Y. Effect of different type of macrosporous resins on isoflavones adsorption from soybean molasses[J]. Soybean Science & Technology, 2010(2): 25-28.)

[8] 李文治, 杨连生. 大豆低聚糖研究进展[J]. 粮食与油脂, 2002 (7): 50-52. (Li W Z, Yang L S. Progress in study on soybean oligosaccharides[J]. Cereals & Oils, 2002(7): 50-52.)

[9] 李华, 赵振贵, 李丹, 等. 大孔树脂对大豆异黄酮的吸附性能研究[J]. 郑州大学学报, 2011, 32(2): 19-22. (Li H, Zhao Z G, Li D, et al. Adsorption properties of macroporous resin for soybean isoflavones[J]. Journal of Zhengzhou University, 2011, 32(2): 19-22.)

[10] 邢志田, 申晓芳, 郭峰. 大孔树脂法提取大豆废料中金雀异黄素的研究[J]. 科技信息, 2011(17): 473-475. (Xing Z T, Shen X F, Guo F. Study on the extracting genistein from the soybean waste by the method of macroporous resin[J]. Science & Technology Information, 2011(17): 473-475.)

[11] 许浮萍, 梁志家, 田娟娟. 应用膜分离结合醇沉法纯化大豆异黄酮[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 78-82. (Xu F P, Liang Z J, Tian J J. Use of membrane separation combined with alcohol precipitation for the separation and purification of isoflavones from lowdenatured soybean meal[J]. Food Science, 2009, 30(16): 78-82.)

[12] 于殿宇, 关海君, 周凤超, 等. 利用膜技术及醇沉法纯化大豆异黄酮的研究[J]. 食品工业, 2008(1): 21-22. (Yu D Y, Guan H J, Zhou F C, et al. Study on the sublimating soybean isoflavone by the method of membrane technic and ethanol deposit[J]. The Food Industry, 2008(1): 21-22.)