

萃取结晶法富集大豆油脚中的辅酶 Q₁₀

李朝艳

(南阳理工学院 生物与化学工程学院,河南 南阳 473004)

摘要:利用萃取结晶法从大豆油脚中富集辅酶 Q₁₀,通过高效液相色谱法对分离产物进行了检测,考察了萃取过程中正己烷、丙酮、乙醇、水用量以及结晶温度和时间对辅酶 Q₁₀回收率和纯度的影响。结果表明:最佳的工艺条件为100 g的大豆油脚,加300 mL正己烷分2次进行萃取,过滤。滤液加0.5 g NaCl盐析,分层,取油相旋转蒸发浓缩,回收正己烷,浓缩液中加100 mL丙酮分2次萃取,过滤,滤饼回收卵磷脂,滤液旋转蒸发,回收丙酮,油相加入100 mL 95%乙醇溶解,加入20 mL H₂O,0℃结晶6 h。在该工艺条件下,辅酶 Q₁₀的回收率达到93.30%,纯度达到73.31%。

关键词:大豆油脚;辅酶 Q₁₀;萃取;结晶

中图分类号:TQ645.9 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0920

Enrich Coenzyme Q₁₀ from Soybean Oil Stocks by Extractive Crystallization Method

LI Zhao-yan

(Nanyang Institute of Technology School of Biological and Chemical Engineering, Nanyang 473004, China)

Abstract: In this study, coenzyme Q₁₀ were enriched from soybean oil stocks by extractive crystallization method and the production were tested by HPLC. The suitable condition was: use 300 mL n-hexane dissolve 100 g soybean bottom oil twice, filtrate it and add 0.5 g NaCl, separate organic phase, rotary evaporation to remove n-hexane, use 100 mL acetone extraction concentrate twice, filtrate, recycling lecithin from filter cake, rotary evaporation to remove acetone from liquid, mix 100 mL 95% ethanol to liquid, add 20 mL H₂O, put mix liquid at 0℃, collect crystallization after 6 h. The results showed that the coenzyme Q₁₀'s purity was 73.31%, yield was 93.30% under the optimal condition.

Key words: Soybean oil stocks; Coenzyme Q₁₀; Extraction; Crystallization

辅酶 Q₁₀,又称泛醌,广泛存在于动物、植物和微生物中^[1-3]。辅酶 Q₁₀可以改善和治疗充血性心力衰竭、高血压、神经系统和皮肤性疾病,因此被广泛应用于医药保健品和美容化妆品中^[4-6]。辅酶 Q₁₀的制备方法主要有化学合成法、微生物发酵法和动植物组织提取法^[7]。其中,动植物组织提取法又包括丙酮研磨提取法、乙醇浸提法、碱皂化法和一些新型分离方法如超声波法、分子蒸馏法、超临界萃取法等^[8-11]。

大豆油脚是大豆生产豆油过程中产生的副产品,其中含有较多的辅酶 Q₁₀^[12]和油脚中还含有很多脂溶性功能物质(如卵磷脂、维生素 E、甾醇等),在提取辅酶 Q₁₀的过程中可同时分离其他功效成分,使原料利用率达到最大化,增加经济效益。然而,多数豆油生产企业将之作为废物弃掉,既浪费资源,又造成环境污染。本研究以大豆油脚为原料,采用萃取结晶的方法提取辅酶 Q₁₀,对其工艺条件进行优化,以期为大豆油脚提取辅酶 Q₁₀提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆油脚,河南银河油脂股份有限公司;辅酶 Q₁₀

标准品,BBI公司,纯度大于99.9%;正己烷、95%乙醇及丙酮均为分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;RE-2000A旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;Agilent 1200高效液相色谱仪,美国安捷伦公司。

1.2 试验设计

称取100 g的大豆油脚,加正己烷分2次进行萃取,过滤。滤液加约0.5 g NaCl盐析,分层,取油相旋转蒸发浓缩,回收正己烷,用丙酮对浓缩液分2次萃取,过滤,滤饼回收卵磷脂,滤液旋转蒸发,回收丙酮,浓缩液加入95%乙醇溶解后加入H₂O,降温结晶,即可得到辅酶 Q₁₀。

1.2.1 正己烷用量的确定 在150 mL丙酮、80 mL 95%乙醇、20 mL H₂O的用量下,-5℃结晶6 h,考察100,150,200,250,300和350 mL正己烷用量对辅酶 Q₁₀回收率的影响。

1.2.2 丙酮用量的确定 在300 mL正己烷、80 mL 95%乙醇、20 mL H₂O的用量下,-5℃结晶6 h,考察60,80,100,120和140 mL丙酮用量对辅酶 Q₁₀回收率的影响。

1.2.3 乙醇用量的确定 在300 mL正己烷、100 mL丙酮、20 mL H₂O的用量下,-5℃结晶6 h,考察40,60,80,100和120 mL 95%乙醇用量对辅酶

Q₁₀回收率的影响。

1.2.4 水用量的确定 在300 mL正己烷、100 mL丙酮、100 mL 95%乙醇的用量下, -5℃结晶6 h, 考察5, 10, 15, 20和25 mL水用量对辅酶 Q₁₀回收率的影响。

1.2.5 结晶温度和时间的确定 在所确定的正己烷、丙酮、乙醇和水最佳用量的条件下, 分别考察-25, -15, -5, 0, 5, 15℃, 结晶时间6 h条件下辅酶 Q₁₀回收率和0℃, 1, 2, 4, 6, 9 h结晶时间条件下的辅酶 Q₁₀回收率。

1.3 辅酶 Q₁₀含量的测定

采用 HPLC 法^[13]测定前述得到的辅酶 Q₁₀, 色谱条件为: 色谱柱选用 Kromasil C₁₈, 用甲醇与无水乙醇(体积比为 1:3)作流动相, 体积流量为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35℃, 检测波长 275 nm。取标准系列溶液进行 HPLC 进样分析, 进样量 10 μL, 以峰面积对浓度进行线性回归, 得到回归方程 $Y = 11\,798X + 1\,370.4$ 。R² = 0.999 2 (n = 5) 表明辅酶 Q₁₀ 在 4 ~ 240 g·mL⁻¹ 内积分面积和浓度线性关系良好。取浓度 80 μg·mL⁻¹ 的标准溶液连续进样 5 次, 其峰面积 RSD = 0.5%。记录辅酶 Q₁₀ 峰面积, 利用回归方程求的其含量。

$$\text{辅酶 Q}_{10}\text{回收率}(Y) = \frac{c_2 \cdot m_2}{c_1 \cdot m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中: c_2 —检测物中 Q₁₀ 含量, m_2 —检测物质量,

c_1 —大豆油脚中 Q₁₀ 含量, m_1 —大豆油脚质量。

1.4 数据分析

利用 ORIGIN 8.0 的 One-Way ANOVA 对试验结果进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 萃取过程中不同溶剂用量对 Q₁₀回收率和纯度的影响

2.1.1 正己烷 正己烷用量大, 辅酶 Q₁₀回收率高, 溶解的其他杂质含量也高, 正己烷用量小, 辅酶 Q₁₀回收率低^[10]。如图 1a 所示, 随着正己烷的加入, 辅酶 Q₁₀的回收率不断提高, 在 300 mL 时, 辅酶 Q₁₀回收率可达 97.08%; 加入量不超过 300 mL 情况下, 辅酶 Q₁₀纯度基本维持恒定 (72.94% ~ 74.56%), 但当正己烷加入量大于 300 mL 时, 辅酶 Q₁₀纯度大幅度下降, 这可能是由于正己烷加入量过多, 溶解过多杂质所引起的, 综合考虑回收率和纯度结果正己烷最佳加入量为 300 mL。

2.1.2 丙酮 油脚经过盐析分水, 旋转蒸发除正己烷后, 有较多油脂和磷脂混杂在一起, 依据磷脂不溶于丙酮的性质, 使用丙酮进行溶解, 过滤去除油脚中的磷脂。如图 1b 所示, 随着丙酮加入量的增加,

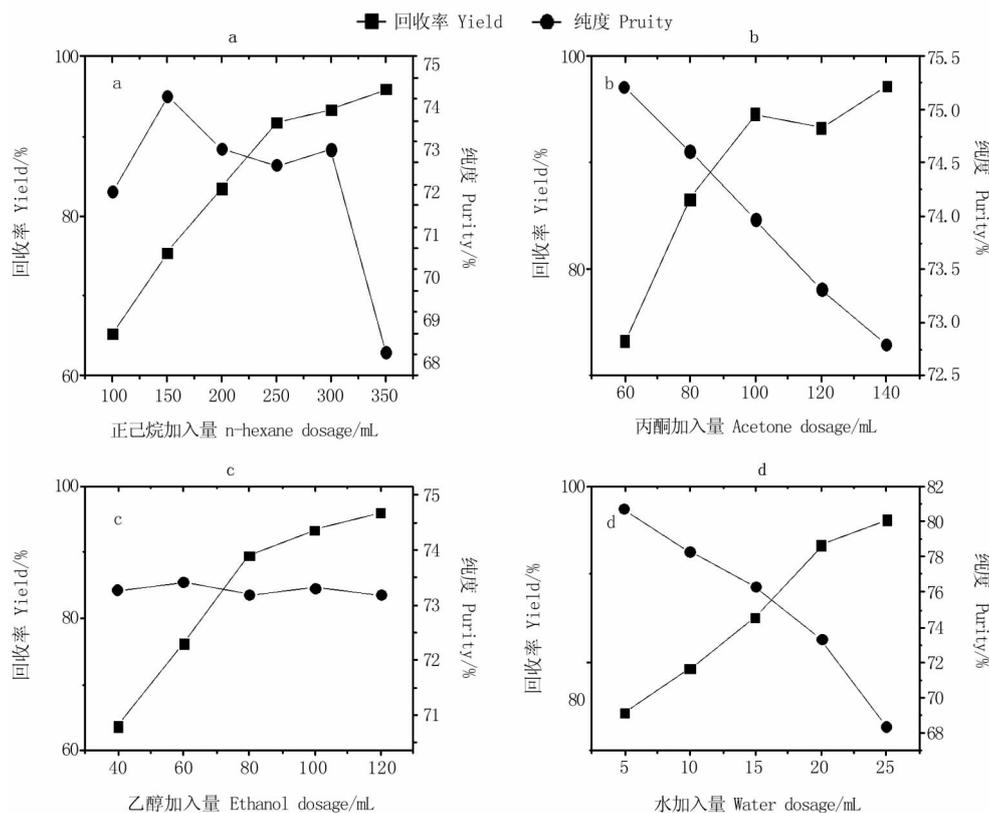


图 1 不同溶剂用量对辅酶 Q₁₀回收率和纯度的影响

Fig. 1 Effect of solvents dosage on yield and purity of coenzyme Q₁₀

辅酶 Q₁₀ 的回收率不断提高,油脚中的卵磷脂回收率和辅酶 Q₁₀ 纯度却一直下降,当丙酮加入量为 100 mL 时,辅酶 Q₁₀ 回收率达到 95.61%,继续增加丙酮用量,回收率增加不明显,因此确定丙酮用量为 100 mL。

2.1.3 乙醇 如图 1c 所示,乙醇的加入对辅酶 Q₁₀ 的纯度基本没影响,不过对辅酶 Q₁₀ 回收率影响较大,乙醇用量越多,辅酶 Q₁₀ 的回收率越高,当乙醇用量达到 100 mL 时,辅酶 Q₁₀ 的回收率可达到 95.32%,继续增加用量,回收率基本不变,因此确定适宜的乙醇用量为 100 mL。

2.1.4 水 通过水的加入,改变溶剂极性,可有效将辅酶 Q₁₀ 结晶析出。如图 1d 所示,在本研究范围

内,水的用量越多,辅酶 Q₁₀ 的回收率越高,而辅酶 Q₁₀ 纯度也越低,当水的用量达到 20 mL 时,辅酶 Q₁₀ 的回收率可以达到 94.59%,辅酶 Q₁₀ 纯度达到 73.25%,继续增加水的用量,虽然辅酶 Q₁₀ 回收率仍可小幅提高,不过辅酶 Q₁₀ 纯度却继续下降,综合考虑,确定适宜的水的用量为 20 mL。

2.2 结晶温度和时间的确定

2.2.1 温度 如图 2a 所示,结晶温度对辅酶 Q₁₀ 的回收率和纯度都有影响,当结晶温度低于 0℃ 时,辅酶 Q₁₀ 纯度较低,辅酶 Q₁₀ 回收率较高,而当结晶温度高于 0℃ 时,辅酶 Q₁₀ 纯度可以小幅提高,辅酶 Q₁₀ 回收率却较低,综合考虑辅酶 Q₁₀ 回收率和纯度的要求,确定适宜的结晶温度为 0℃。

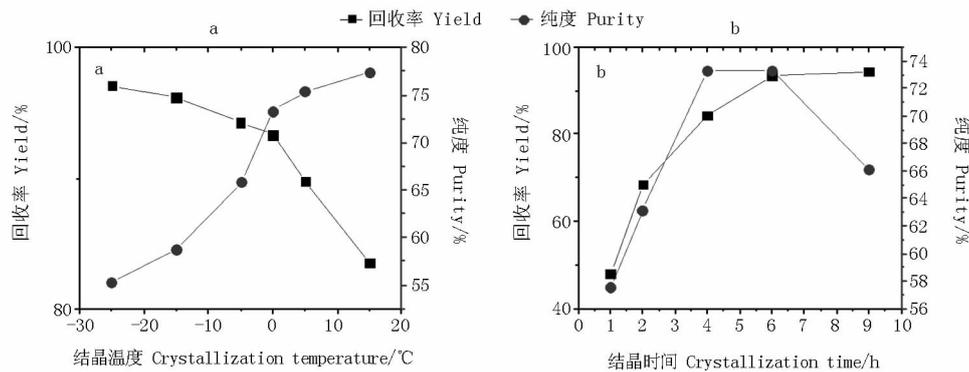


图 2 结晶温度和结晶时间对辅酶 Q₁₀ 回收率和纯度的影响

Fig. 2 Effect of crystallization temperature and time on yield and purity of coenzyme Q₁₀

2.2.2 时间 如图 2b 所示,结晶时间对辅酶 Q₁₀ 回收率和纯度都有一定影响,时间太短,辅酶 Q₁₀ 无法形成足够大晶粒,回收率低,而且纯度也不高,随着结晶时间的延长,辅酶 Q₁₀ 回收率不断提高,当达到 6 h 时,辅酶 Q₁₀ 回收率可以达到 93.31%,继续延长结晶时间,辅酶 Q₁₀ 回收率增长不大;而辅酶 Q₁₀ 纯度却有一定程度降低,这可能是由于结晶时间过长,部分非目标产物也结晶析出造成的。因此,确定适宜的结晶时间为 6 h。

2.3 验证试验

采用上述试验条件对大豆油脚中的辅酶 Q₁₀ 进行提取,回收率和纯度分别可以达到 93.30% 和 73.31%。

3 结论

对大豆油脚中辅酶 Q₁₀ 提取工艺条件进行了优化:100 g 的大豆油脚,加 300 mL 正己烷分 2 次进行萃取,过滤。滤液加 0.5 g NaCl 盐析,分层,取油相

旋转蒸发浓缩,回收正己烷,浓缩液中加 100 mL 丙酮分 2 次萃取,过滤,滤饼回收卵磷脂,滤液旋转蒸发,回收丙酮,浓缩液加入 100 mL 95% 乙醇溶解,加入 20 mL H₂O,0℃ 结晶 6 h。在此条件下提取的 Q₁₀ 的回收率和纯度分别可以达到 93.30% 和 73.31%。

参考文献

- [1] 张双奇,咎林森,田万强,等.牛心肌中辅酶 Q₁₀ 的提取及测定[J].中国农学通报,2007,23(4):16-18. (Zhang S Q, Zan L S, Tian W Q, et al. Extraction and determination of coenzyme Q₁₀ from cattle heart[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(4):16-18.)
- [2] 李祖明,冯斯雯,季越,等.类球红细菌 3757 产辅酶 Q₁₀ 和 SOD 的提取与稳定性研究[J].食品科技,2013,38(4):2-6. (LI Z M, Feng S W, Ji Y, et al. Extraction and stability of coenzyme Q₁₀ and SOD from rhodobacter sphaeroides 3757[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(4):2-6.)
- [3] Li C Y, Zhao C J, Zu Y G, et al. Simultaneous separation of solanescosol and coenzyme Q₁₀ from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) extract using supercritical carbon dioxide[J]. Chemistry and Industry of

- Forest Products, 2010, 30(6):1-6.
- [4] 姜传福. 辅酶 Q₁₀ 的制备及其药物功能[J]. 石油化工高等学校学报, 2005, 18(4):52-53, 79. (Jiang C F. Preparation of coenzyme Q₁₀ and its pharmonic function[J]. Journal of Petrochemical Universities, 2005, 18(4):52-53, 79.)
- [5] Dong B Y. Levodopa and parkinsons[J]. Chemical Education, 2004, 25(6):8-10.
- [6] Wang G H, Qian H. Q₁₀ and its heathy function[J]. Jiangsu Food and Fermentation, 2002, (2):16-17.
- [7] 吕春茂, 李英华, 安艳秋, 等. 辅酶 Q₁₀ 几种提取工艺的优化研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12):132-135. (Lyu C M, Li Y H, An Y Q, et al. Optimization of several extraction technique of coenzyme Q₁₀[J]. Food Science, 2007, 28(12):132-135.)
- [8] 王丽霞, 刘坤, 张秀媛, 等. 丙酮研磨法提取麦麸中辅酶 Q₁₀ 的工艺研究[J]. 河南农业科学, 2013, 42(2):149-151. (Wang L X, Liu K, Zhang X Y, et al. Study on the technology for extracting coenzyme Q₁₀ from wheat bran by acetone method[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2013, 42(2):149-151.)
- [9] 吴琼, 代永刚, 陈星. 醇碱皂化法提取大豆油脚中辅酶 Q₁₀ 的研究[J]. 农业机械, 2011(11):87-90. (Wu Q, Dai Y G, Chen X. Extracting coenzyme Q₁₀ from soybean oil stocks by alcohol[J]. Farm Machinery, 2011(11):87-90.)
- [10] 王改玲, 宋瑞雯, 陶志杰, 等. 花生中辅酶 Q₁₀ 的提取工艺及含量测定[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(5):236-239. (Wang G L, Song R W, Tao Z J, et al. Extraction technology and content determination of coenzyme Q₁₀ in peanut[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(5):236-239.)
- [11] 李聚海, 岳田利, 袁亚宏. 辅酶 Q₁₀ 超声波破碎法提取工艺条件研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(5):207-211. (Li J H, Yue T L, Yuan Y H. Study on the technology of the coenzyme Q₁₀ extraction with ultrasonic cell-break method[J]. Journal of Northwest A & F University(Natural Science Edition), 2007, 35(5):207-211.)
- [12] 陈星, 刘蕾, 吴琼. 分子蒸馏法从大豆油脚中提取辅酶 Q₁₀ 的研究[J]. 中国油脂, 2011, 36(10):73-76. (Chen X, Liu L, Wu Q. Extraction of coenzyme Q₁₀ by molecular distillation technique from soybean oil sediment [J]. China Oils and Fats, 2011, 36(10):73-76.)
- [13] Sakiko T, Yuki O, Hiroaki K, et al. Metabolic engineering of coenzyme Q by modification of isoprenoid side chain in plant[J]. FEBS Letts, 2006, 580:955-959.
-
- (上接第 919 页)
- [7] 张瑞芬, 徐金瑞, 张名位, 等. 黑大豆种皮花色苷提取物抗兔动脉粥样硬化作用[J]. 营养学报, 2007, 29(5):479-484. (Zhang R F, Xu J R, Zhang M W, et al. The anti-atherogenic effects of black soybean coat anthocyanin extracts in rabbits[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2007, 29(5):479-484.)
- [8] Byun J S, Han Y S, Lee S S. The effects of yellow soybean, black soybean, and sword bean on lipid levels and oxidative stress in ovariectomized rats[J]. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 2010, 80(2):97-106.
- [9] Jung J H, Kim H S. The inhibitory effect of black soybean on hepatic cholesterol accumulation in high cholesterol and high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 60:404-412.
- [10] 徐金瑞, 张名位, 刘兴华, 等. 黑大豆种皮花色苷体外抗氧化活性研究[J]. 营养学报, 2007, 29(1):54-57. (Xu J R, Zhang M W, Liu X H, et al. The antioxidant effect of anthocyanin in seed coat of black soybean *in vitro*[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2007, 29(1):54-57.)
- [11] Kwon S H, Ahn I S, Kim S O, et al. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins [J]. Journal of Medical Food, 2007, 10(3):552-556.
- [12] Kwak J H, Lee J H, Ahn C W, et al. Black soy peptide supplementation improves glucose control in subjects with prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus[J]. Journal of Medical Food, 2010, 13(6):1307-1312.
- [13] Kurimoto Y, Shibayama Y, Inoue S, et al. Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity *via* the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(23):5558-5564.
- [14] 冯彩婷, 贾华丽. 豆类中钙含量的测定[J]. 河南化工, 2010, 27(10-下):56-57. (Feng C T, Jia H L. Calcium content measuring of soybean species [J]. Henan Chemical Industry, 2010, 27(10-Third):56-57.)
- [15] Byun J S, Lee S S. Effect of soybeans and sword beans on bone metabolism in a rat model of osteoporosis[J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2010, 56(2):106-112.
- [16] Yao Y, Sang W, Zhou M, et al. Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activity of colored grains in China [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2010, 58(2):770-774.
- [17] Zou Y, Chang S K. Effect of black soybean extract on the suppression of the proliferation of human AGS gastric cancer cells *via* the induction of apoptosis[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2011, 59(9):4597-4605.
- [18] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9):1069-1072. (Huang J H, Huang X H, Chen Z Y, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study [J]. Chinese Journal of Clinic Pharmacology Therapy, 2004, 9(9):1069-1072.)
- [19] Ho S C, Chan S G, Yi Q, et al. Soy intake and the maintenance of peak bone mass in Hong Kong Chinese women[J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2001, 16:1363-1369.
- [20] Mateos-Aparicio I, Redondo Cuenca A, Villanueva-Suárez M J, et al. Soybean, a promising health source[J]. Nutricion Hospitalaria, 2008, 23(4):305-312.