

豆粕中异黄酮的分离与精制 工艺研究

牛新春, 张守勤, 王长征
(吉林大学生物与农业工程学院, 吉林长春 130022)

摘要: 采用高效液相色谱法和紫外分光光度法检测大豆异黄酮含量, 通过比较大豆异黄酮分离与精制条件, 提出了一条工艺路线, 即大豆提取液在 40 条件下进行超滤, 透过液用 ADS-21 型大孔树脂吸附, 蒸馏水洗脱糖等杂质, 80% 乙醇洗脱异黄酮, 浓缩后冷冻干燥得到大豆异黄酮制品, 纯度可达 42.7%。

关键词: 大豆异黄酮, 超滤, 大孔树脂, 精制

Abstract: The content of soybean isoflavones was determined by HPLC and ultraviolet spectrophotometer. The isolated and purified conditions of isoflavones were studied by contrast exam, and the best techniques were confirmed. The extractive solution of soybean was ultrafiltered at 40 , and the ultrafiltrate was purified by resin ADS-21. The impurity such as sugar can be eluted by distilled water and isoflavones were eluted by 80% ethanol, then the eluate was concentrated and freeze-dried into powder, the content is 42.7%.

Key words: soybean isoflavones; ultrafiltration; macroporous resin; purification

中图分类号: TS210.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)07-0112-04

大量资料显示, 大豆异黄酮作为大豆中多种有益健康的植物化学成分之一, 具有阻止癌细胞增生、抗氧化及增强机体免疫力等生理功能^[1,2], 因此, 大豆异黄酮制品的开发受到研究者的广泛关注。为得到异黄酮含量较高的大豆提取物, 实现良好的经济效益和社会效益, 研究大豆异黄酮的精制工艺就显得尤为重要。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆异黄酮提取液 本实验室自制; 大豆苷元、染料木黄酮、大豆苷、染料木苷对照品 北京禾原天

然产物有限公司; D101、AB-8 大孔吸附树脂 上海摩速科技有限公司; ADS-21 大孔吸附树脂 天津南开合成科技有限公司。

高效液相色谱仪、UV-2550 紫外可见分光光度计 日本岛津公司; 超滤装置 颇尔过滤器(北京)有限公司; RJ-TDL-40B 低速台式大容量离心机 无锡瑞江分析仪器有限公司; RE-52 旋转蒸发器 上海安亭电子仪器厂; FD-1C 冷冻干燥机 北京博康实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆异黄酮含量检测 紫外分光光度法扫描大豆异黄酮最大吸收波长, 测定大豆异黄酮总量; 选择高效液相色谱检测流动相, 确定流速、柱温、酸度、流动相比例等, 检测其中大豆苷元、染料木黄酮、大豆苷、染料木苷的含量, 并对该方法进行方法学考察。

1.2.2 供试品溶液的制备 按正交实验确定的提取异黄酮的最佳工艺条件: 料液比(g/mL)1 50, 50%乙醇, 在 70 条件下浸提 7h。提取液以 5000r/min 速度离心 10min, 取上清液待用。

1.2.3 超滤膜分离大豆异黄酮 分别考察膜截留分子量、过膜压力、过膜温度及过膜溶液初始浓度对膜通量的影响, 绘制各因素对膜通量的关系曲线, 确定各因素的最适水平值。

1.2.4 大孔树脂精制大豆异黄酮 实验每种树脂的饱和吸附量、吸附率及解吸率, 从中筛选出效果较好的树脂进行进一步静态及动态动力学特性研究。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的确定

色谱柱, Shim-Pack CLC ODS 150 \times 4.6mm; 流动相, (A) 乙腈, (B) 0.5% 乙酸水, 50min 内 83%A 线性变化到 55%A; 流速, 0.4mL/min; 柱温, 38 ; 检测波长, 260nm。大豆提取液及对照品色谱图如图 1、图 2 所示。

2.2 线性方程的确定

紫外分光光度法在检测波长 260nm 处测定大豆

收稿日期: 2006-11-10

作者简介: 牛新春(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品贮藏与加工工程。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30472135)。

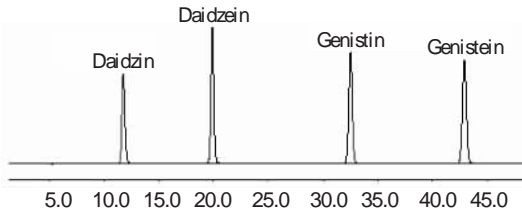


图1 大豆异黄酮对照的 HPLC 色谱分析图

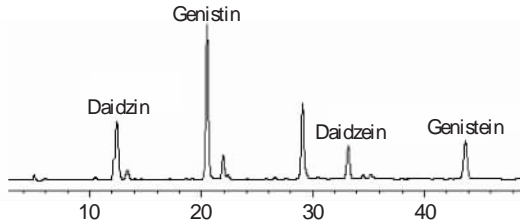


图2 大豆异黄酮纯化液的 HPLC 色谱分析图

异黄酮总量, 得到浓度 $C(\text{mg/mL})$ 与吸光值 A 的标准工作曲线为: $C=0.00508A-0.00004$ ($r=0.99989$)。

高效液相色谱法得到大豆苷元、染料木黄酮、大豆苷、染料木苷四种大豆异黄酮对照品溶液的峰面积 $Y(\times 10^5)$ 与对照品进样量 $X(\times 10^{-5}\text{mg})$ 的一元回归方程, 如表 1 所示。

表 1 线性方程及相关系数

测定物质	线性方程	相关系数(r)
大豆苷元(Den)	$Y=0.895X-0.021$	0.9999
染料木黄酮(Gen)	$Y=1.257X-0.109$	0.9998
大豆苷(Din)	$Y=1.864X-0.134$	0.9999
染料木苷(Gin)	$Y=2.695X-0.268$	0.9996

对该方法进行精密度实验、稳定性实验及重现性实验等方法学考察, 各实验中检验成分的相对标准差均小于 1%, 说明该方法检测异黄酮结果准确、稳定可靠。

2.3 大豆异黄酮的超滤条件

截留分子量由 10000Da 降至 1000Da, 膜通量下降至原来的 1/2, 透过液中异黄酮损失量由 0.36 $\mu\text{g/mL}$ 增加到 1.69 $\mu\text{g/mL}$, 异黄酮损失量提高了近 5 倍。

在较低的压力下 (<10Psi), 膜通量受压力影响较大, 当压力超过一定数值后 (20Psi), 膜通量受压力差影响减小。溶液超滤过程中, 膜面液流过程是增浓的过程, 施加压力可以使小分子溶质通过膜孔, 压力越大小分子溶质通过膜孔的速度就越快, 但同时压力的增大也加快了溶液中的大分子溶质在膜表面的沉积速度, 大分子溶质的沉积则阻碍了小分子溶质的透过, 使小分子溶质透过膜的速度增加缓慢。另外, 大分子溶质在膜表面的沉积, 堵塞膜孔, 增大膜清洗的难度, 甚至减少膜使用寿命。

温度升高, 物料的粘度降低, 流体的湍动程度加大(雷诺准数增大), 从而有利于减小覆盖层厚度、减轻浓差极化的影响, 使小分子通过覆盖层和膜孔的阻力减小, 有利于小分子溶质通过膜孔, 加快过膜速

度。过膜温度达到 40 时, 溶液过膜速度达到 22.72mL/h, 是室温条件下过膜速度的近 4 倍。另外, 温度升高后透过液中异黄酮损失量由 1.02 $\mu\text{g/mL}$ 减少到 0.36 $\mu\text{g/mL}$, 是常温过膜异黄酮损失量的 35%。

溶液过膜速度随浓缩倍数的增加而降低, 且溶液浓缩倍数越大, 过膜速度受时间影响越不显著, 当溶液浓缩至原体积的 1/4 ~ 1/6, 即异黄酮浓度分别为 0.25 和 0.374mg/mL 时, 过膜所用时间最少。

由以上结论得到大豆异黄酮超滤条件为: 膜截留分子量为 10000Da、过膜压力 20Psi、过膜温度 40、过膜溶液初始浓度为 0.25 ~ 0.374mg/mL。将溶液过膜前后形状以及制得粗粉性状进行比较, 由表 2 可见, 超滤液粗粉纯度可达到 1.74%, 比未过膜溶液粗粉纯度提高了 26.1%, 说明超滤有效地除去了大豆提取液中的蛋白质等大分子物质。

表 2 过膜、未过膜溶液及粗粉比较

	溶液颜色	澄清度	干粉重量(g)	纯度(%)
未过膜	黄白色	较差	1.133	1.38
过膜	淡黄色	好	0.8939	1.74

2.4 大孔树脂的选择

根据文献报道, 选择三种较适宜吸附大豆异黄酮的树脂 D101、AB-8、ADS-21 进行比较, 从中筛选一种树脂来纯化异黄酮, 结果见表 3。

表 3 三种树脂的吸附解吸性能

树脂型号	吸附量(mg/g 湿树脂)	吸附率(%)	解吸率(%)
AB-8	18.2	89.2	83.5
D101	18.3	92.8	79.8
ADS-21	34.5	89.3	92.4

由表 1 可见, 从吸附率上看, AB-8、D101、ADS-21 三种大孔树脂都在 90% 左右, 吸附效果较好。但是解吸率大小依次为 ADS-21 > AB-8 > D101, 而且从饱和吸附量上看, ADS-21 大孔树脂为 34.5mg/g, 明显高于另两种大孔树脂。因此, 实验重点考察 ADS-21 的静态及动态吸附动力学特性。

2.5 动力学吸附曲线

吸附动力学特征反映的是随时间的延长, 树脂对样品分子吸附量的变化趋势。经过 i 次取样后, 大豆异黄酮浓度(C)与树脂吸附量(q)之间的关系可用下式表示, 式中 V_0 为大豆异黄酮溶液的体积(mL), m 为湿树脂重量(mg)。

$$q = \left\{ \sum_{i=1}^n (C_{i-1} - C_i) [V_0 - 0.2(i-1)] \right\} / m$$

以吸附时间(t)为横坐标, 吸附量(mg/g)为纵坐标作吸附动力学曲线, 如图 3 所示。从图 3 可以看出, 起初曲线急速上升, 表明在这段时间内 ADS-21 树脂吸附异黄酮速度快, 且单位时间内对异黄酮的吸附

量大;2h时吸附速度逐渐减慢,曲线斜率逐渐减小,6h后曲线开始趋于平缓。这说明当单位质量树脂吸附量达到一定程度时,随着时间的延长,吸附速度和吸附量增量迅速减少,工业生产中可以选择2-6h为吸附时间。从生产周期、产品得率等方面考虑,本实验选择4h作为上柱液静态吸附时间,此时大孔树脂的吸附量已达到饱和和吸附量的90.6%。

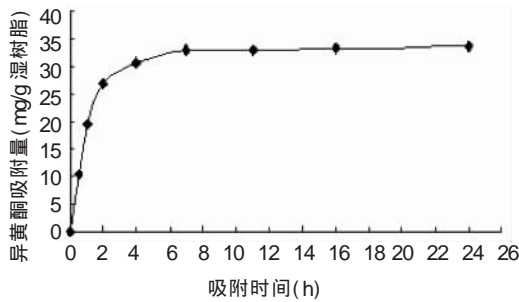


图3 室温条件下 ADS-21 树脂吸附动力学曲线

2.6 蒸馏水动态洗脱曲线

以蒸馏水用量(BV)为横坐标,溶液中糖浓度($\mu\text{g/mL}$)为纵坐标作曲线,见图4。从图中可以看出,随着蒸馏水洗脱量的增加,水洗液中糖浓度迅速减少,说明树脂中的糖已经大量的被洗脱下来。当蒸馏水用量达到6BV时,洗脱液中糖浓度已降至2.95 $\mu\text{g/mL}$,树脂中糖几乎完全被冲洗干净。

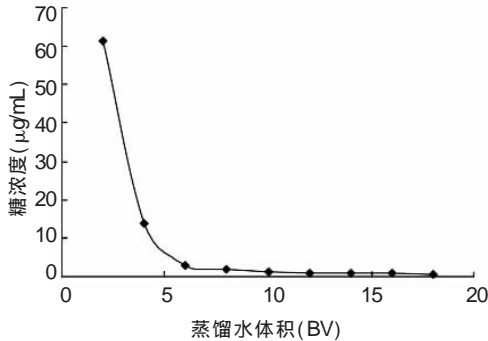


图4 蒸馏水动态洗脱曲线

2.7 乙醇动态解吸曲线

分别用紫外分光光度法和高效液相色谱法测定大豆异黄酮的总量及 Den、Gen、Din、Gin 的含量,以乙醇用量(BV)为横坐标,洗脱液中异黄酮浓度(mg/mL)为纵坐标作图,见图5、图6。

由图5可见,解吸液中异黄酮总量随着乙醇用量的增大明显下降,当乙醇量超过10BV后,吸附柱中异黄酮几乎完全被洗脱。图6表明,随着乙醇用量增加,解吸液中 Den、Gen、Din、Gin 含量均降低,其中 Gen 下降速度较慢,4BV 后洗脱液中 Gen 的含量已超过其他三种异黄酮成分。在整个洗脱过程中,Den 和 Gen 的总量始终高于 Din 和 Gin 含量,这是由于异黄酮苷元极性远小于异黄酮糖苷,更易溶于弱极性或非极性溶剂中,因此在使用80%乙醇淋洗树脂柱

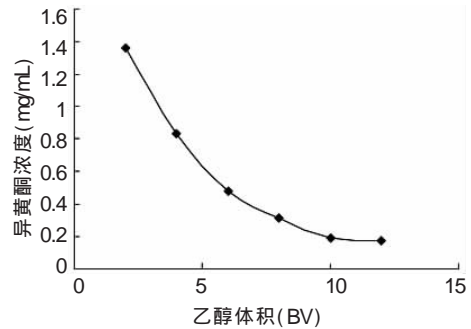


图5 乙醇动态解吸曲线

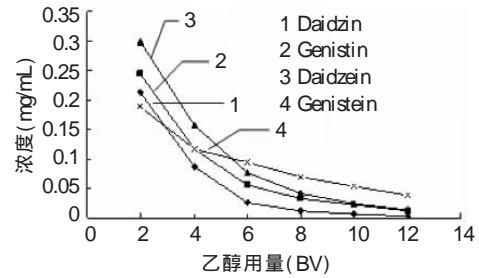


图6 乙醇解吸液中四种异黄酮含量变化曲线

的过程中,异黄酮苷元更易被洗涤下来。当乙醇洗脱量增大到8BV后,洗脱液中几乎降至最低点,继续洗脱树脂柱,四种异黄酮含量变化甚微。

2.8 不同处理法的对比实验

检测三种精制异黄酮方法,即超滤——树脂吸附()、醇沉——树脂吸附()和树脂吸附()中异黄酮损失量及浓缩成粉后异黄酮纯度,结果如图7,方法得到的异黄酮纯度最高,达42.7%,是方法得到干粉纯度的3.5倍。而异黄酮的损失量却仅为方法的51%。三种方法中超滤与树脂分离相结合分离、精制大豆异黄酮,效果最好。

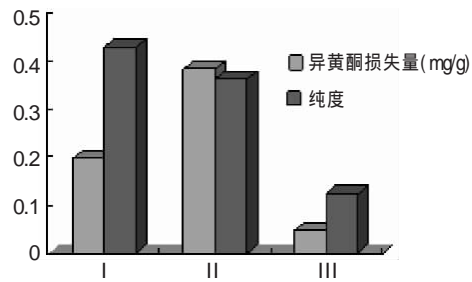


图7 不同方法精制后结果的比较

3 结论

大豆提取液首先经超滤膜分离,有效地除去了溶液中大豆蛋白质等大分子物质,粗粉纯度提高了26.1%。超滤技术与大孔树脂分离技术相结合分离、精制大豆异黄酮,整个过程大豆异黄酮损失少,仅为0.196 mg/g ,而且得到产品纯度高,可达42.7%。

大豆异黄酮分离、精制工艺为:大豆异黄酮提取液浓缩至0.25-0.374 mg/mL ,控制压力在20Psi、温度

(下转第177页)

峰, 它们的频率之间符合公式 $V_s=345.5+0.876V_{as}$; 在 1580cm^{-1} 和 1420cm^{-1} 出现的吸收峰分别是羧酸根离子的反对称伸缩振动 $V_{as}(\text{COO}^-)$ 和对称伸缩振动 $V_s(\text{COO}^-)$; 在 557cm^{-1} 和 461cm^{-1} 分别存在 $\text{Ca}-\text{N}$ 的伸缩振动峰和 $\text{Ca}-\text{O}$ 的伸缩振动峰, 进一步说明二亮氨酸钙螯合物的形成^[3]。 3400cm^{-1} 附近的吸收峰变宽, 表明螯合物中有水分子存在。由于羧酸根离子中只有一个氧原子参与配位, 水分子很可能在两个螯合物分子中形成氢键。

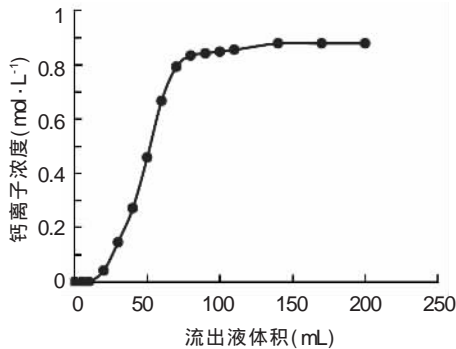


图8 树脂的再生曲线

2.3.2 TG- DTA 分析 从图 11 可以看出, 螯合物的

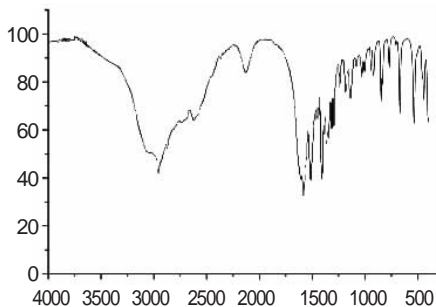


图9 L-亮氨酸的红外谱图

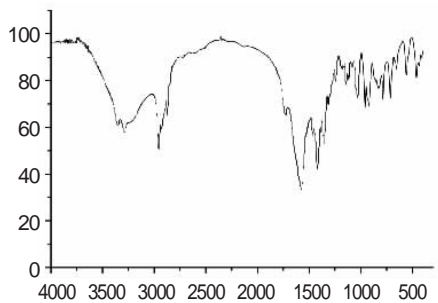


图10 螯合物的红外谱图

DTA 曲线在 143 上有一吸热峰, 同时在 TG 曲线上有失重现象, 失重率为 5.58%, 为螯合物的失水过程, 相当于失去 1 个 H_2O 分子, 与理论计算值 5.65% 一致, 说明螯合物中有结晶水存在。到 743 失重恒定, 残余质量为原螯合物的 18.45%, 最终分解产物为氧化钙, 与理论计算值 18.63% 相吻合。

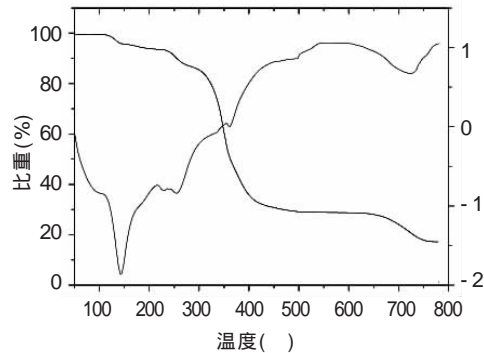


图11 螯合物的热重-差热分析谱图

3 结论

3.1 在静态实验中, 交换达到平衡的时间为 15min, 交换可在室温下进行, 氢氧化钠与亮氨酸的最适配比为 1-1.33 1, 溶液中亮氨酸浓度低于 $0.3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 适宜的树脂加入量为 10g。

3.2 在动态实验中, 流速控制可以在 $5\text{mL}/\text{min}$, 浓度控制在 $0.2\text{mol}/\text{L}$, 树脂再生需再生液 150mL。

3.3 通过 IR、TGA 对产物进行定性表征, 证实通过离子交换树脂法制备了一种新的物质 L-亮氨酸钙。

参考文献:

- [1] 段惠敏, 李淑芳, 郭光美, 等. 补钙与钙营养制剂 CCM[J]. 食品科技, 2002(1): 64-65.
- [2] 中本一雄. 无机和配位化合物的红外和拉曼光谱[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991.
- [3] Kazuo Nakamoto. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds [M]. 4th Ed New York: Wiley & Sons, 1986.

(上接第 114 页)

40, 过截留分子量为 10 000Da 的膜, 透过液用 ADS-21 型大孔树脂吸附, 蒸馏水洗脱糖等水溶性杂质, 再用 80%乙醇洗脱大豆异黄酮, 浓缩得到大豆异黄酮精制产品。

参考文献:

- [1] Birt D F, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids [J]. Pharmacology and Therapeutics, 2001 (90): 157-177.
- [2] Bravo L. Polyphenols Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance[J]. Nutrition Reviews, 1998 (56): 317-333.