

豆粕中大豆异黄酮提取工艺及检测方法优化

刘 星,林亲录,胡叶碧,阳仲秋

(中南林业科技大学 食品科学与工程学院,湖南 长沙 410004)

摘 要:以大豆异黄酮 6 种主要成分大豆甙、黄豆甙、染料木甙、大豆甙元、黄豆黄素、染料木素作为对照物,通过单因素实验和正交实验的比较,确定了从脱脂大豆粕中提取大豆异黄酮的最佳条件,为其工业化生产提供了参考依据。提取的最佳条件为乙醇浓度 70 %,回流提取时间 3 h,温度 90 °C,物料比 1 :15,提取次数 1 次。建立了一种同时测定原料中大豆异黄酮 6 种成分的高效液相色谱法,使常见的大豆异黄酮 6 种主要成分得以分离和检测。

关键词:单因素实验;正交试验;高效液相色谱;二极管阵列检测器

中图分类号:TS 201.2;TS 229 **文献标识码:**A **文章编号:**1007 - 7561(2009)06 - 0018 - 03

Optimization of determination and extraction technique of soybean isoflavones from soybean meal

LIU Xing, LIN Qin-lu, HU Ye-bi, YANG Zhong-qiu

(College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha Hunan 410004)

Abstract: Taking 6 major components of soybean isoflavones, daidzin, genistin, daidzein, glycitein and genistein, as the contrast, comparing single factor experiments and orthogonal experiment, The optimum condition to extract soybean isoflavones from the defatted soybean meal was studied, which provide a frame of reference for the industrial-scale production of soybean isoflavones. The optimum condition was that the concentration of ethanol was 70 %, extracting time 3h, temperature 90 °C, ratio of defatted soybean meal to solvent 1 :15, extracting once. A high performance liquid chromatography - photodiode array detector for determining soybean isoflavones at the same time was established to separate and detect them.

Key words: single factor experiment; orthogonal experiment; high performance liquid chromatography; photodiode array detector

大豆异黄酮(Soybean Isoflavones,简称 ISO)是一类从大豆中分离提取出的天然活性成分,具有重要的生理和药理功能^[1]。研究表明,大豆异黄酮可以作为天然的抗氧化剂和自由基清除剂,具有明显的防癌、抗衰老、降低血脂、改善骨质疏松、以及妇女更年期综合症等药理效果,在食品加工、医药保健等其他行业中应用越来越广泛^[2-4]。

大豆中天然存在的大豆异黄酮总共有 12 种,可以分为 3 类,即黄豆苷(daidzin)类、染料木苷(genistin)类、黄豆黄素苷(glycitin)类,以游离型、葡萄糖苷型、乙酰基葡萄糖苷型、丙二酰基葡萄糖苷型等 4 种形式存在^[5-6]。

大豆制油后所残留的豆粕中含有大量的异黄酮,已有不少文献对用乙醇从豆粕中提取大豆异黄酮的工艺进行了报导。但是,乙醇提取条件对大豆异黄酮中糖苷和苷元组成的影响尚未见研究报导。

目前国内外测定大豆异黄酮的方法主要有比色法、纸色谱法、薄层色谱法、气相色谱法(yPLC)、紫

外分光光度法和高效液相色谱法等^[7-10]。比色法干扰多,专一性差,测定结果偏差较大,并需要进行较为复杂的样品前处理;纸色谱法及薄层色谱法存在分离效果差,定量不准确等缺点,GC 法采用了样品衍生后进行测定,存在操作烦琐,条件不易控制、杂质干扰严重等问题;高效液相色谱法则具有样品不需要预处理、测定快速、定量准确的优势。本研究采用高效液相色谱法(HPLC),并避开毒性大且较贵的乙腈,以 0.1 %甲酸/甲醇溶液作为流动相,同时对大豆异黄酮 6 种主要成分大豆甙、黄豆甙、染料木甙、大豆甙元、黄豆黄素和染料木素进行分离定量,探讨了乙醇浓度、物料比、提取时间及提取次数对提取物中异黄酮组成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

脱脂豆粕:黑龙江产桦川豆粕,由吉林农大提供。

1.2 仪器与试剂

岛津 LC - 20AT 高效液相色谱仪;配岛津二极管阵列检测器(PDA)、SIL - 20A 自动进样器、摩尔超纯水机、旋转蒸发器、离心机、真空抽滤器。

大豆甙、黄豆甙、染料木甙、大豆甙元、黄豆黄

收稿日期:2009 - 05 - 13

基金项目:国家 863 课题(2006AA10Z341);湖南省稻米深加工重大专项课题(2007HJ1007)

作者简介:刘星(1984 -),男,湖南长沙人,硕士研究生。

素和染料木素标准品 上海同田生化有限公司;甲醇(色谱纯)、甲酸(色谱纯)、无水乙醇(分析醇)。

1.3 实验方法

脱脂豆粕—干燥—粉碎—过筛—乙醇回流提取→合并提取液—旋转蒸发—HPLC 测定—回收乙醇

1.3.1 乙醇浓度对提取物中异黄酮组成的影响

准确称取脱脂豆粕 10 g,共 4 份,分别加入 50 %、60 %、70 %、80 %的乙醇 150 mL,70 °C回流 3 h,过滤去渣后取滤液旋转蒸发浓缩后用乙醇定容至 50 mL。取出少量浸提液,采用 HPLC 测定。

1.3.2 物料比对提取物中异黄酮组成的影响

准确称取脱脂豆粕 10 g,共 4 份,分别加入 50、100、150、200 mL 70 %的乙醇,70 °C回流 3 h,过滤去渣后取滤液旋转蒸发浓缩后用乙醇定容至 50 mL。取出少量浸提液,采用 HPLC 测定。

1.3.3 正交实验

根据文献,提取时间、温度和重复提取次数对提取都有重要的影响,而且在实际操作中,他们之间的影响是相互联系的,因此为了全面考查影响因素,设计了一个四因素三水平的正交实验,以研究这些因素对提取的影响(见表 1)。

表 1 正交实验的水平及因素

水平	A 温度 / °C	B 时间 / h	C 提取次数 / 次	D 空列
1	70	1	1	1
2	80	2	2	2
3	90	3	3	3

1.3.4 色谱条件

色谱柱为 Hypersil C18 色谱柱 (150 mm ×4.6 mm,5 μm),柱温为 30 °C,流速为 1.0 mL/min;流动相为 70/30(v/v) 0.1 %甲酸/甲醇溶液,进行梯度洗脱 pH=2.80;检测波长为 260 nm;进样量为 10 μL,色谱图见图 1。

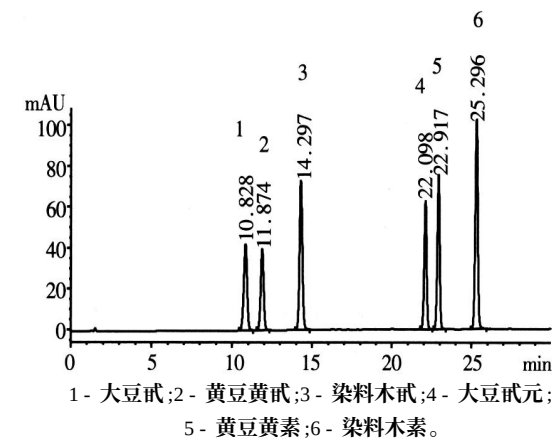


图 1 6 种大豆异黄酮混标溶液的色谱图

1.3.5 标准曲线的绘制

精密称取大豆异黄酮标准品 10.0 mg 于 100 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,使之成为 100

μg/mL 的标准储备液。分别精确吸取 0.5、1、2、5、10 mL 标准溶液至 10 mL 容量瓶中,并用甲醇浓液定容,摇匀,使之成为浓度为 5、10、20、50、100 μg/mL 标准使用液,经 0.45 μm 的滤膜过滤,按色谱条件进行测试。以组分峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线(见图 2、表 2)。

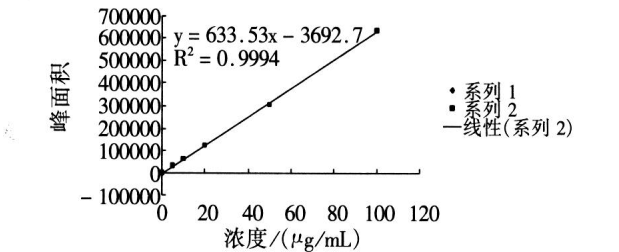


图 2 标准曲线

表 2 标准曲线及回归方程

组分	回归方程	相关系数 R²
大豆甙	y = 6335.3 x - 3692.7	0.9994
黄豆黄甙	y = 6489.7 x - 4056.2	0.9994
染料木甙	y = 9970.6 x - 6542.4	0.9994
大豆甙元	y = 9950.0 x - 6793.6	0.9995
黄豆黄素	y = 8250.7 x - 7274.6	0.9994
染料木素	y = 13327 x - 10823	0.9993

1.3.6 样品测定

从 50 mL 容量瓶中吸取 4~5 mL 样液,以 10000 r/min 的转速离心 20 min,取上清液,经 0.45 μm 的滤膜过滤,待测。

根据标准曲线计算出样品中大豆异黄酮的浓度。各种大豆异黄酮的得率计算公式如下:

得率(%) = HPLC 测定浓度 ×50/ 1000000/ 10 ×100

2 结果与讨论

2.1 乙醇浓度对提取物中异黄酮组成的影响

采用 SPSS 软件对所得数据进行分析,结果见表 3。

乙醇浓度为 50 %和 80 %时有显著差异,且异黄酮均值总体呈上升趋势,而乙醇浓度为 50 %时,提取液较混浊难以抽滤;在乙醇浓度为 70 %时,得率达到最大,而乙醇浓度为 70 %和 80 %时其得率没有显著差异,且提取液较清亮,因此可根据实验确定提取异黄酮的最佳浓度为 70 %。

2.2 物料比对提取物中异黄酮组成的影响

从表 4 可知,异黄酮的提取率不是随物料比的增大而提高的,即乙醇的用量增大,提取率并不随之增大。在物料比为 1:5 和 1:10 时,总黄酮得率并没有显著性差异,而物料比为 1:5 和 1:15 时,总黄酮得率有显著性差异,且总黄酮得率均值明显上升;当物料比为 1:15 和 1:20 时,总黄酮得率的差异不显著,显然再增大物料比对提高异黄酮的提取率的影响不再明显。由此可见,物料比为 1:15 时为最佳。

表 3 乙醇浓度对提取物中异黄酮各组分得率的影响(%,mean±SD)

浓度/ %	大豆甙	黄豆黄甙	染料木甙	大豆甙元	黄豆黄素	染料木素	总素	总甙
50	0.31±0.028 ^a	0.063±0.006 ^a	0.34±0.033 ^a	0.07±0.013 ^a	0.0029±0.00051 ^a	0.0051±0.00055 ^a	0.078±0.013 ^a	0.79±0.080 ^a
60	0.39±0.068 ^a	0.075±0.011 ^a	0.42±0.068 ^a	0.086±0.008 ^{ab}	0.0035±0.00029 ^a	0.0070±0.0031 ^a	0.096±0.011 ^{ab}	0.97±0.158 ^a
70	0.36±0.001 ^a	0.068±0.003 ^a	0.39±0.000 ^a	0.087±0.0055 ^{ab}	0.0035±0.00009 ^a	0.0081±0.00062 ^a	0.099±0.005 ^{ab}	0.91±0.008 ^a
80	0.38±0.015 ^a	0.074±0.003 ^a	0.42±0.011 ^a	0.094±0.001 ^b	0.0036±0.00009 ^a	0.0087±0.0011 ^a	0.11±0.002 ^b	0.98±0.032 ^a

注:同一列中带不同字母的表示在 5 %水平上差异显著(n=3)。

表 4 物料比对提取物中异黄酮各组分得率的影响(%,mean±SD)

物料比	大豆甙	黄豆黄甙	染料木甙	大豆甙元	黄豆黄素	染料木素	总素	总甙
1 5	0.26±0.018 ^a	0.051±0.0035 ^a	0.30±0.018 ^a	0.071±0.004 ^a	0.0027±0.0002 ^a	0.0061±0.0004 ^a	0.080±0.004 ^a	0.70±0.045 ^a
1 10	0.32±0.043 ^{ab}	0.062±0.0082 ^a	0.36±0.046 ^{ab}	0.084±0.009 ^a	0.0032±0.0004 ^a	0.0071±0.0007 ^a	0.094±0.010 ^a	0.84±0.108 ^{ab}
1 15	0.34±0.006 ^b	0.068±0.0009 ^b	0.38±0.007 ^b	0.086±0.002 ^a	0.0034±0.0004 ^a	0.0071±0.0003 ^a	0.096±0.002 ^a	0.88±0.016 ^b
1 20	0.35±0.005 ^b	0.069±0.0017 ^b	0.38±0.004 ^b	0.086±0.005 ^a	0.0032±0.0004 ^a	0.0060±0.0014 ^a	0.096±0.007 ^a	0.89±0.017 ^b

注:同一列中不同字母表示在 5 %水平上差异显著(n=3)。

2.3 正交实验

表 5 正交实验

试验号	A	B	C	D	总甙得率/ %
1	1	1	1	1	0.94
2	1	2	2	2	0.94
3	1	3	3	3	0.91
4	2	1	2	3	0.86
5	2	2	3	1	0.91
6	2	3	1	2	1.03
7	3	1	3	2	0.95
8	3	2	1	3	1.08
9	3	3	2	1	1.28
K ₁	2781.965	2747.926	3054.794	3132.452	
K ₂	2802.139	2929.866	3078.115	2909.266	
K ₃	3310.315	3216.627	2761.512	852.701	
X ₁	927.3217	915.9753	1018.265	1044.151	
X ₂	934.0463	976.622	1026.038	969.7553	
X ₃	1103.438	1072.209	920.5033	950.9003	
R	176.1167	156.2337	105.535	93.25033	

根据极差 R 的大小,进行因素的主次排队。R 越大,表示该因素的水平变化对试验的影响越大;反之,R 越小,这个因素就越不重要。

由表 5 可知,本试验中 A 因素,即温度为最重要因素,其次为 B 因素,即时间,而 C 因素,即提取次数为不重要因素。三个因素的主次关系是 A > B > C。

计算空列的 R_e 值,以确定误差界限并以此判断各因素的可靠性。各因素的效应是否真正对试验有影响,须将 R 值与空列的 R 值相比较。因为在有空列的正交试验中,空列的 R_e 代表了试验误差,所以各因素指标的 R 值只有大于 R_e 才能表示其因素的效应存在。所以本试验三个因素的效应可靠。

选出最优的水平组合,即根据因素的主次顺序,将对试验有主要影响的因素,选出最好水平;而对于次要因素,既可以根据试验选取最好水平,又可以根据某些既定条件选取具体水平。

本试验 A、B 为重要因素,按照各因素的最好水平选取为 A₃B₃,即温度取 90℃,时间取 3 h 形成提取

的最优组合。而提取次数为次要因素,选取操作简单的 1 次即可。

3 结论

由以上实验可知,从豆粕中提取大豆异黄酮的最佳条件为乙醇浓度 70 %,回流提取时间 3h,温度 90℃,物料比 1 15,提取次数 1 次。优化了用高效液相色谱 - 二极管阵列法测定大豆异黄酮的检测方法,采用 Hypersil C18 4.6×150 mm 色谱柱,柱温为 30℃,流动相为 0.1 %甲酸/ 甲醇溶液,流速 1.0 mL/min,二极管阵列检测器于 260 nm 波长下进行检测,可将 6 种大豆异黄酮主要成分大豆甙、黄豆黄甙、染料木甙、大豆甙元、黄豆黄素、染料木素完全分离。

参考文献:

[1]Brouns F. soya isoflavones :a new and promising ingredient for the health foods sector[J]. Food reserch International ,2002 ,(35) :187 - 193.

[2]鄢玉香,夏延斌. 大豆异黄酮在腊八豆生产中的稳定性[J]. 湖南农业大学学报,2002,3(28) :237 - 238.

[3]蔡秋声. 大豆异黄酮生理功能及其开发利用[J]. 粮食与油脂, 1999,(2) :31 - 35.

[4]Kay L. Fritz , C. M. Seppanen , MindyS. Kurzer. The in vivo oantioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects[J]. Nutrition Research ,2003 ,(23) :479 - 487.

[5]Kudou S,Shimoyamada M, Inura T, etal A new isoflavone glycoside in soybean seeds (Glycinemax Merrill) , Glycitein 7 - O - B - D(6 - O - Acety) Gucopyranoside[J]. Agrcultural and Biological Chemistry , 1991, 55(3) :859 - 860.

[6]Kudou S, Fleury Y, WeltiD,etal Maonyl isoflavone glycoside in soybean seeds (Glycinemax Merrill) [J]. Agricultural and Biological Chemistry , 1991,55(9) :2227.

[7]Franke A. A ,et al. Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrgens from legumes andfrom human urine[J]. Proc. Soc. Exp. Med. 1995,208(1) : 18 - 26.

[8]Barnes KA ,et al. A microbore HPLC/ ESI - MS method for the determination of the phytoestrgens genistein and daidzein in comminuted baby foods and soyaflour ,Rapid Commun[J]. Mass Spectrom,1998,12(3) : 130 - 138.

[9]Kinoshita E,et al. Differentiationof soy sauce types by HPLC profile pattern recognition. Isolation of novel isoflavones[J]. Adv expmep boil , 1998 ,(439) :117 - 129.

[10]鞠兴荣,袁建,汪海峰. 三波长紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量的研究[J]. 食品科学,2001,22(5) :46 - 48. 完