

大豆异黄酮的提取纯化及抗氧化性研究

岳爱琴¹, 史少静², 徐海军², 郭春绒², 杜维俊¹, 赵晋忠²

(1. 山西农业大学农学院, 山西太谷 030801; 2. 山西农业大学文理学院, 山西太谷 030801)

摘要 [目的] 对大豆异黄酮提取纯化的最佳工艺条件及其抗氧化活性进行研究。[方法] 通过单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交试验, 确定提取大豆异黄酮的最佳工艺条件, 应用 D101 大孔树脂技术对提取液进行进一步分离纯化, 得出最佳纯化条件, 并对纯化得到的染料木苷和大豆苷进行抗氧化活性研究。[结果] 试验得出, 提取大豆异黄酮的最佳工艺条件为乙醇浓度 70%, 料液比 1:15 g/ml, 提取时间为 3 h, 提取温度为 60 °C, 最高得率达 9.18%; 纯化最佳条件为: 上柱静态吸附时间 5 h, 洗脱时间 30 min, 80% 乙醇作为洗脱剂, 洗脱流速为 1 ml/min, 并分离纯化得到染料木苷和大豆苷; 抗氧化活性研究表明, 染料木苷、大豆苷和大豆总黄酮对超氧阴离子自由基和羟自由基均具有清除作用。[结论] 研究对大豆保健食品开发和天然药物研制具有重要意义。

关键词 大豆异黄酮; 提取; 纯化; 抗氧化性

中图分类号 S565.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)28-09912-04

Extraction, Purification Technology and Antioxidation Activities of Soybean IsoflavonesYUE Ai-qin¹, SHI Shao-jing², XU Hai-jun² et al (1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801; 2. College of Arts and Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

Abstract [Objective] To study the optimum technique conditions and antioxidation activities of extraction and purification of soybean isoflavones. [Method] On the basis of single element experiments and $L_9(3^4)$ orthogonal experiments, the optimum technique conditions for extraction of soybean isoflavone were determined. D101 macroporous resin technology was applied to further purify the liquids. [Result] The optimum extraction conditions were obtained: ethanol concentration 70%, soybean to solvent ratio 1:15 g/ml, extraction time 3 h, temperature 60 °C. The extraction yield could be up to 9.18%. Purification process of soy isoflavones in soybean by using D101 macroporous resin, the optimum purification conditions were obtained: absorption time 5 h, elution time 30 min, ethanol concentration 80%, elution speed 1 ml/min, and obtain high purity of daidzin, genistin monomer. The antioxidation activity was analyzed, and the conclusion revealed that soybean isoflavones possessed superoxide radical and hydroxyl radical scavenging activities. [Conclusion] The study has significance on development of soybean health food and natural medicine.

Key words Soybean isoflavone; Extraction; Purification; Antioxidation activities

大豆异黄酮 (soybean isoflavone) 是大豆生长过程中形成的主要次生代谢产物之一, 具有防治癌症、预防心血管疾病、改善骨质疏松、降低血脂、防止动脉粥样硬化和改善妇女更年期综合症等多种生理功能^[1-3]。近年来, 大豆异黄酮已被开发成多种保健功能产品。20 世纪 90 年代以来, 对大豆异黄酮的提取工艺研究有不少报道^[4-10], 由于大豆中异黄酮的含量较低, 提取成本较高且提取工艺复杂, 因此高效提取纯化仍是目前提取工艺的一个关键性的问题。为高效利用大豆种子中的大豆异黄酮, 笔者对大豆异黄酮的提取、分离和纯化工艺进行了优化, 并且分别检测了染料木苷、大豆苷和大豆总黄酮的抗氧化作用, 对大豆保健食品开发和天然药物研制具有重要意义。

1 材料与方

1.1 材料 供试大豆种子晋大 70, 由山西农业大学农学院大豆育种课题组提供; 所用试剂均为分析纯。主要仪器: 紫外分光光度计, 真空旋转蒸发仪, 高速台式离心机, Brucker-600 型核磁共振仪。

1.2 方法

1.2.1 影响大豆异黄酮提取率的单因素试验。 选取温度、时间、乙醇浓度和提取液料比的不同水平, 考察单因素对大

豆异黄酮提取率的影响。

1.2.2 大豆异黄酮提取工艺的优化试验。 根据单因素的试验结果, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以确定最佳提取工艺条件。

1.2.3 D101 大孔树脂的静态吸附动力学曲线^[11]。 在具塞三角瓶中装入预处理过的 D101 大孔树脂, 向其中加入过量的经初步纯化后的样品液, 在室温下振荡, 每隔 1 h 取一次样, 测定其中大豆异黄酮的含量。以吸附时间为横坐标, 样品液中大豆异黄酮的浓度为纵坐标, 绘制 D101 树脂的静态吸附动力学曲线。再加入 70% 乙醇在室温下振摇进行解吸, 每隔 15 min 取一次样, 测定溶液中大豆异黄酮的含量, 以解析时间为横坐标, 样品液中大豆异黄酮的浓度为纵坐标, 绘制 D101 树脂的静态解析动力学曲线。

1.2.4 D101 大孔树脂最佳吸附浓度的测定。 将浓度分别为 1.0、0.7、0.4 mg/ml 的大豆异黄酮提取液, 以 2.0 ml/min 的流速通过层析柱, 通过检测收集液中大豆异黄酮的浓度, 分析样液浓度与树脂动态吸附性能的关系。

1.2.5 D101 大孔树脂最佳洗脱流速的测定。 将浓度为 1.0 mg/ml 的大豆异黄酮提取液, 分别以 1.0、2.0、3.0 ml/min 的流速通过树脂柱, 通过检测收集液中大豆异黄酮的浓度, 分析样液浓度与树脂动态吸附性能的关系。

1.2.6 大豆异黄酮对超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 的清除能力测定。 采用连苯三酚氧化法^[12]测定。

1.2.7 大豆异黄酮对羟自由基 ($\cdot OH$) 的清除能力测定。 采用 α -脱氧核糖氧化法^[13]测定。

基金项目 山西省科技攻关项目 (20120311005-3); 山西农业大学引进人才科研启动项目 (XB2011012); 山西省科技攻关项目 (20100311069)。

作者简介 岳爱琴 (1975 -), 女, 山西交城人, 副教授, 博士, 从事大豆品质育种研究。

收稿日期 2014-08-18

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮提取工艺单因素条件的研究

2.1.1 温度对大豆异黄酮浸提量的影响。由图 1 可以看出,提取温度低于 60 °C 时大豆异黄酮的提取量随着温度上升而显著提高,高于 60 °C 提取量增加趋势变缓。由于温度过高可能会对大豆异黄酮活性产生影响,因此,60 °C 为大豆异黄酮最佳提取温度。

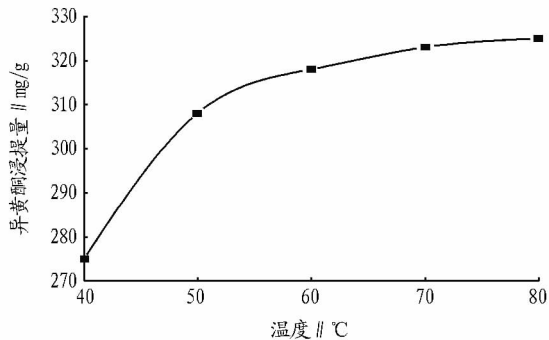


图 1 温度对大豆异黄酮浸提量的影响

2.1.2 浸提时间对大豆异黄酮浸提量的影响。由图 2 可以看出,随着浸提时间的延长,大豆异黄酮提取量增加,但提取时间超过 2.5 h,大豆异黄酮得率的增加幅度变小。因此,提取大豆异黄酮的最佳浸提时间为 2.5 h。

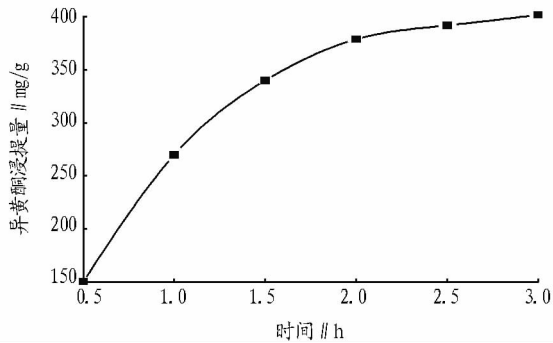


图 2 时间对大豆异黄酮浸提量的影响

2.1.3 乙醇浓度对大豆异黄酮浸提量的影响。从图 3 可以看出,随乙醇浓度的升高,大豆异黄酮的提取量逐渐增高,在乙醇浓度为 70% 时大豆异黄酮浸提量达到最大值,超过 70% 又开始下降,所以 70% 乙醇提取效果较好。

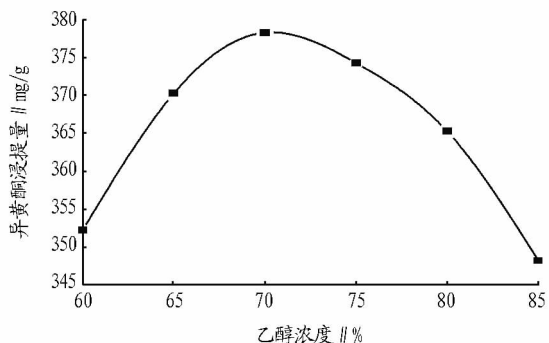


图 3 乙醇浓度对大豆异黄酮浸提量的影响

2.1.4 料液比对大豆异黄酮浸提量的影响。如图 4 所示,大豆异黄酮提取量随料液比中溶剂的增大而增大。当料液

比小于 1:12 g/ml 时异黄酮的提取量增加不明显,如果继续增加料液比中溶剂,成本会提高。因此,大豆异黄酮提取以料液比 1:12 g/ml 为较好。

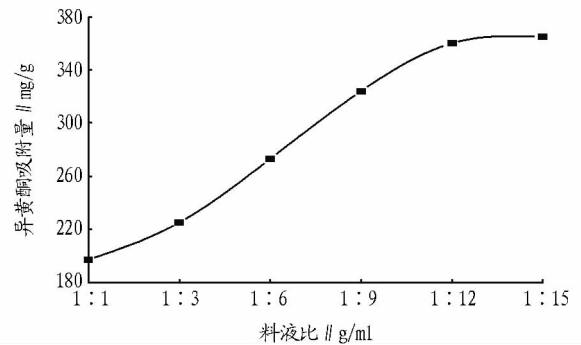


图 4 料液比对大豆异黄酮提取的影响

2.2 大豆异黄酮最佳提取工艺条件的正交试验 为了综合考察温度、时间、乙醇浓度、料液比 4 个因素相应水平对大豆异黄酮浸提量的影响,以寻求最佳提取工艺参数,设计了 $L_9(3^4)$ 正交试验来确定大豆异黄酮提取的最优参数,水平值的设定是通过充分综合考虑试验条件及试验结果的影响程度进行选取,考查指标为异黄酮含量(表 1、2)。

表 1 乙醇浸提的因素水平

水平	因素			
	提取时间 (A) // h	乙醇浓度 (B) // %	提取温度 (C) // °C	料液比 (D) // g/ml
1	2.0	60	55	1:9
2	2.5	70	60	1:12
3	3.0	80	65	1:15

表 2 乙醇浸提的正交试验结果分析 ($n=3$)

试验号	因素				异黄酮含量 mg/g	异黄酮得 率 // %
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	15.33	7.03
2	1	2	2	2	16.32	7.31
3	1	3	3	3	17.42	8.45
4	2	1	2	3	18.43	8.85
5	2	2	3	1	12.96	5.33
6	2	3	1	2	15.32	7.78
7	3	1	3	2	16.11	7.30
8	3	2	1	3	17.44	8.41
9	3	3	2	1	16.87	7.22
K_1	49.07	49.87	48.09	45.16		
K_2	46.71	46.72	51.62	47.75		
K_3	50.42	49.61	46.49	53.29		
极差 R	1.24	0.08	1.71	2.71		
主次顺序	D > C > A > B					
优水平	A ₃	B ₂	C ₂	D ₃		

从表 2 可以得到,4 个因素对大豆异黄酮浸提量影响的顺序依次为:料液比(D) > 萃取温度(C) > 乙醇浓度(A) > 萃取时间(B)。料液比对异黄酮的浸提率的影响最为显著,提取液越多提取效率越高;浸提剂浓度对浸提率的影响也较大,70% 乙醇液与染料木苷的极性相似;异黄酮在温度为 60 °C 时浸提率提高,这与染料木黄酮在较高温度下易溶解的性质相符合。浸提时间对浸提率的影响不大。以异黄酮提取率为指标得到的最优组合为:乙醇浓度为 70%,提取时间为

3 h,提取温度为 60 ℃,料液比为 1:15 g/ml。为了验证正交试验最佳组合的正确性,采用最优组合条件分别进行 3 次验证试验,试验结果为:大豆异黄酮最高含量为 18.93 mg/g,最高得率为 9.18%。

2.3 D101 大孔树脂分离纯化工艺的优化

2.3.1 D101 大孔树脂的静态吸附动力学曲线。从图 5 可以看出,在初始阶段,曲线急速上升,这表明 D101 大孔树脂对异黄酮的吸附速度快,且单位时间内对异黄酮的吸附量大。2 h 时吸附速度逐渐减慢,5 h 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加迅速减少,考虑到工业化生产效率、产品得率等因素,该试验选择 5 h 为上柱静态吸附时间,此时大孔树脂的吸附量已达到饱和吸附量的 91.3%。

从图 6 可以看出,D101 大孔树脂的静态解析速度很快,并且解析率也很高,15 min 解析率达到 63%,30 min 已达到 93.5%。因此选择 30 min 为洗脱时间。

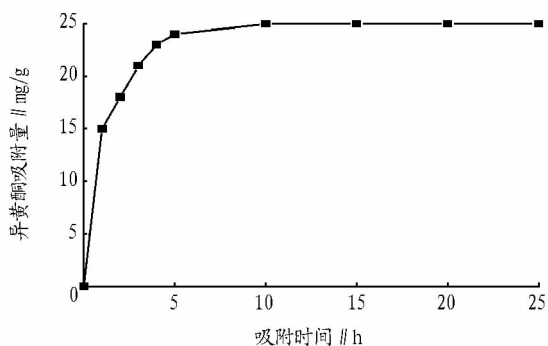


图 5 室温条件下 D101 大孔树脂吸附动力学曲线

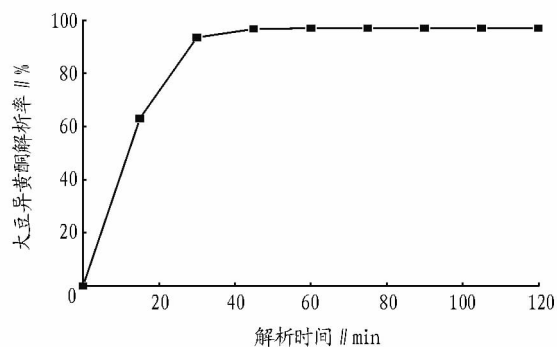


图 6 大豆异黄酮的静态解吸动力学曲线

2.3.2 D101 大孔树脂洗脱剂浓度的确定。从图 7 可以看出,树脂的解析率随着乙醇浓度的升高而增大,当乙醇浓度为 80% 时,树脂的解析率达到最大,乙醇浓度继续增大,大孔树脂的解析率变化不明显。因此,选择 80% 乙醇作为洗脱剂。

2.3.3 D101 大孔树脂最佳吸附浓度和洗脱流速的研究。由图 8 可看出,上柱液浓度分别为 2.0、1.0、0.5 mg/ml 时,对应树脂的穿透体积分别为 20、25、30 ml。这表明随着上样液浓度的增加,树脂的穿透体积随上样液浓度的增加而下降,泄漏点则随之提前,因此可以得出起始浓度越高,吸附量越大。但是,较高的样液浓度会造成树脂的内部孔道阻塞,吸附性

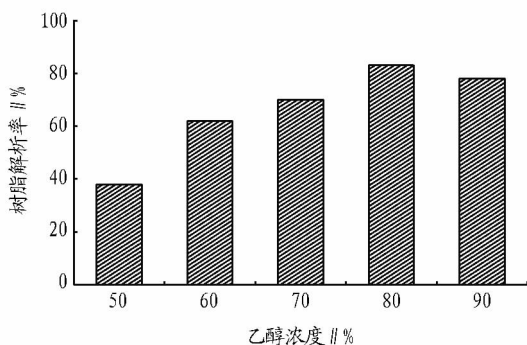


图 7 乙醇浓度与树脂解析率的关系

能降低。该试验中所选的 3 种样液浓度的穿透体积基本相似,而浓度较高时树脂的工作吸附量相对较大。因此,选择上柱液浓度为 2.0 mg/ml。

由图 9 可以看出,当流速分别为 1、2 和 3 ml/min 时,大孔树脂的穿透体积分别为 30、25、15 ml。这表明大孔树脂的工作吸附量随着洗脱流速的加大而减小,泄漏点随之提前,因此吸附效果以 1 ml/min 最好。TLC 检测结果见图 10、11。

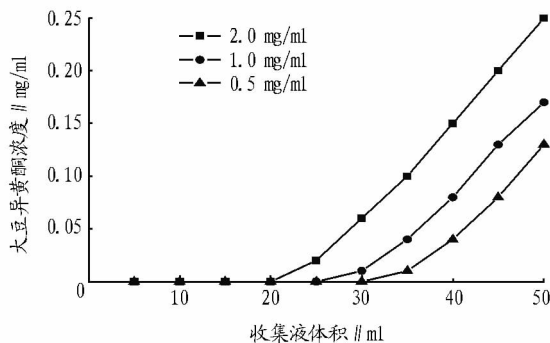


图 8 不同浓度样品的动态吸附曲线

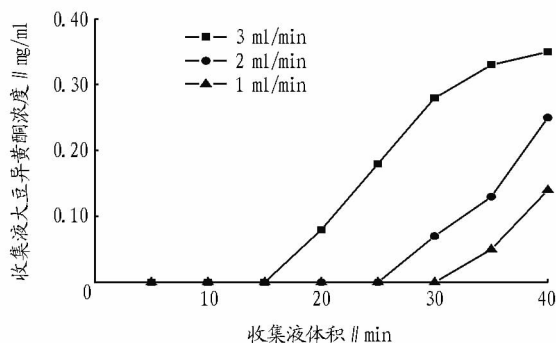


图 9 流速对树脂的动态吸附曲线的影响

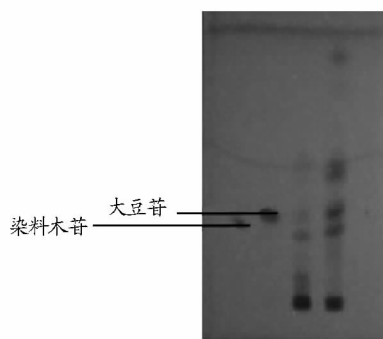


图 10 异黄酮的 TLC 图谱

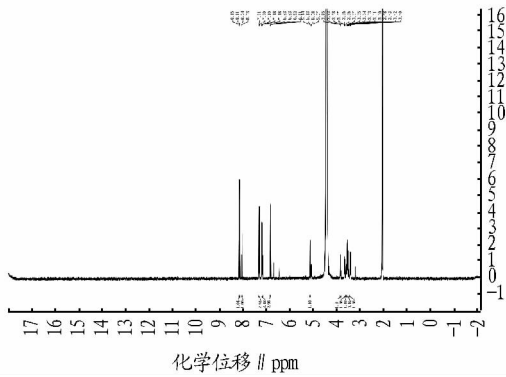


图 11 染料木苷单体核磁共振氢谱

2.4 大豆异黄酮对 $O_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot OH$ 的清除能力 结果表明,染料木苷、大豆苷和总黄酮均对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)具有清除作用。随着时间的增加,各种异黄酮清除 $O_2^{\cdot -}$ 能力不断增强(图 12)。

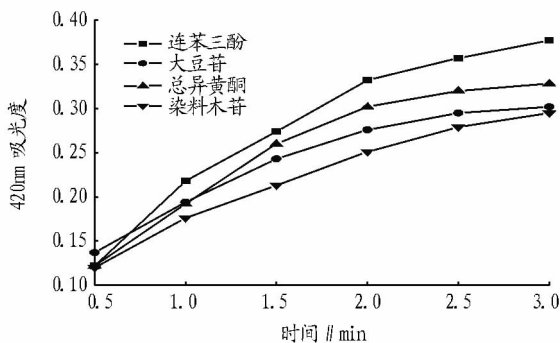


图 12 大豆异黄酮对超氧阴离子自由基的清除作用

从图 13 可以看出,大豆异黄酮、染料木苷和大豆苷对羟自由基($\cdot OH$)有一定的清除作用,且随着大豆异黄酮浓度

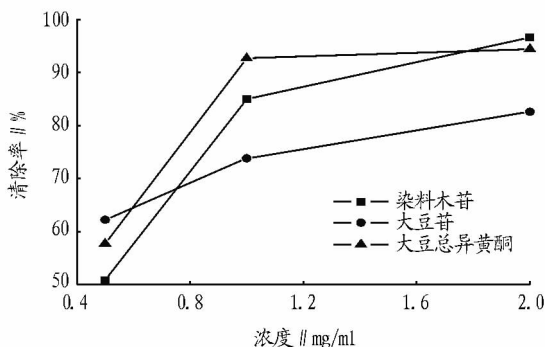


图 13 大豆异黄酮对羟自由基的清除作用

的增大,其对羟自由基的清除能力也随之提高。

3 结论与讨论

单因素浸提试验分析表明,乙醇浓度、料液比、提取时间和提取温度对提取效率有一定的影响。提取率随着料液比中溶剂的增大而提高。在低于 70% 浓度的乙醇范围内,提取效果随着乙醇浓度的增大而提高,高于 70% 浓度的乙醇对其不利,其原因可能是大豆异黄酮中丙二酰基大豆苷和丙二酰基染料木苷含有丙二酸基团,丙二酸基团水溶性较其糖苷形式更强,因而更易溶于低浓度的乙醇溶液,而大豆苷和染料木苷则更易溶于高浓度的乙醇溶液。

应用 D101 大孔树脂技术对提取液进行分离纯化,纯化最佳条件为:上柱静态吸附时间 5 h,洗脱时间 30 min,80% 乙醇作为洗脱剂,洗脱流速为 1 ml/min,并且分离纯化得到染料木苷和大豆苷单体。

抗氧化活性研究表明,染料木苷、大豆苷和大豆总黄酮对超氧阴离子自由基和羟自由基均具有清除作用。

参考文献

- [1] 刘颖,张牧,王小雪,等. 染料木黄酮对人胃癌细胞生长抑制作用研究[J]. 营养学报,2001,23(1):62-65.
- [2] 徐霞,贡沁燕,鲁映青,等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠骨密度和雌激素活性的影响[J]. 中国新药与临床杂志,2002,21(6):321-325.
- [3] MEZEI O, BANZ W J, STEGER R W, et al. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells[J]. The Journal of Nutrition,2003,133(5):1238-1243.
- [4] 袁建,鞠荣. 大豆异黄酮分离与精制工艺研究[J]. 食品科学,2002,23(8):118-121.
- [5] 孙玲,魏振承,徐志宏,等. 大豆异黄酮提取纯化及其抗衰老作用初探[J]. 食品科学,2002,23(8):267-270.
- [6] 胡卫新,王晓磊,张洁,等. 大豆异黄酮提取条件和大豆蛋白质分离工艺研究[J]. 大豆科学,2005,24(1):26-29.
- [7] 张福丽,葛红莲,李婷,等. 大豆渣中异黄酮的提取及抑菌活性[J]. 光谱实验室,2012,29(2):1176-1181.
- [8] 康新莉,田蒙蒙,闫丽萍,等. 大豆异黄酮的纯化工艺研究[J]. 应用化工,2013,42(11):2015-2017.
- [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.
- [10] 孙婕,苏晶莹,尹国友,等. D101 大孔树脂吸附大豆乳清废液中异黄酮的实验研究[J]. 食品科技,2014,39(3):202-206.
- [11] 芦春明,邸铮. 大孔吸附树脂吸附大豆异黄酮的特性研究[J]. 食品与发酵工业,2004,30(1):92-95.
- [12] 井乐刚,路芳,张永忠,等. 大豆异黄酮的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2004,30(2):62-65.
- [13] 赵新淮. 茶叶提取物对自由基的清除能力[J]. 东北农业大学学报,1998,29(3):284-288.

科技论文写作规范——数字

公历世纪、年代、年、月、日、时刻和各种计数和计量,均用阿拉伯数字。年份不能简写,如 1990 年不能写成 90 年,文中避免出现“去年”、“今年”等写法。小于 1 的小数点前的零不能省略,如 0.2456 不能写成 .2456。小数点前或后超过 4 位数(含 4 位数),从小数点向左每 3 位空半格,不用“,”隔开。如 18 072.235 71。尾数多的(5 位以上)的数字和小数点后位数多的小数,宜采用 $\times 10^n$ (n 为正负整数)的写法。数字应正确地写出有效数字,任何一个数字,只允许最后一位存在误差。