

大豆胚芽中提纯皂甙和异黄酮的研究

贾建波, 李 东

(淮阴工学院生物工程系, 江苏 淮阴 223001)

摘 要:探讨了以水为介质,对大豆胚芽中的皂甙和异黄酮进行微波和超声波前处理,提取效果和纯溶剂萃取法相比,经正交实验,结果表明:经450W功率微波处理30min,400W功率超声波在40℃处理45min,固液比为1:20,温度为60℃,时间为1h,再经40%的乙醇,浸提2次。异黄酮提取率从1.2%提高到1.74%,皂甙从4.4%提高到5.8%,比溶剂法的提取率分别提高了43%和32%,经聚酰胺柱层析分离纯化,大豆异黄酮和大豆皂甙产品纯度达到38%和94%。

关键词:微波和超声波;大豆胚芽;大豆异黄酮;大豆皂甙

中图分类号:TS 202.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2005)01-40-02

Studies on purification of isoflavone and soysaponin from soybean germ by microwave and ultrasound

JIA Jian-bo, LI Dong

(Huai Yin Institute of Technology, Huai Yin 223001)

Abstract: Isoflavone and soysaponin from the soybean germ was predisposed in the water by microwave and ultrasound. Extraction efficiency of which was contrasted with solvent extraction. The orthogonal test result indicated that the material after disposed with 450W microwave for 30min and 400W ultrawave for 45min at 40℃, the ratio of solid and liquid was 1:20, then extracted by 40% ethanol twice at 60℃ for 1h. The isoflavone recovery was increased from 1.2% to 1.74%, the soysaponin was increased from 4.4% to 5.8%, and were higher than solvent extraction 43% and 32% separately. The purity of isoflavone and soysaponin was 38% and 94% by polyamide column.

Key words: microwave and ultrasound; soybean germ; isoflavone; soysaponin

大豆胚芽是大豆加工业中的副产品,目前,从胚芽中提取大豆异黄酮和大豆皂甙的研究主要采用单纯有机溶剂提取法,此法存在所用溶剂量大,提取时间长,提取率不高等缺点。微波利用交频电磁场作用和超声波对媒介产生空化作用,它们在提取植物细胞中的活性物质具有高效性和强选择性,操作简便、副产物少、产率高、省溶剂和易提纯等优点。研究利用微波和超声波技术,从大豆胚芽中提取大豆异黄酮和皂甙活性物质有效新方法,并对其进行纯化。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验原料与试剂

大豆胚芽:用当地产大豆进行机械分离,脱脂,干燥,备用。

大豆皂甙:实验室按文献^[1]制得。

大豆异黄酮标样:染料木因,染料木甙,黄豆苷,黄豆苷原,均为Sigma产品,无水乙醇,无水甲醇,香草醛,硫酸等,均为分析纯试剂。

聚酰胺:30~60目,国产。

1.1.2 主要仪器

JY92-2D 超声波细胞粉碎机:宁波新芝科技研究所。

Galanz WD750ASL23 型微波炉:顺德格兰氏电器有限公司。

752 紫外可见分光光度计:上海分析仪器厂。

高效液相色谱仪: C₁₈ 反相柱(4.6 × 250mm, 5μm), Wasters 600 泵, Wasters2487 双波长检测器。

层析柱(25 × 600mm):沪西分析仪器厂。

DBS-100 电脑全自动部分收集器:沪西分析仪器厂。

DHL-A 电脑恒流泵:沪西分析仪器厂。

FD-1 型冷冻干燥机:北京博医康技术公司。

ZFQ85A 型旋转蒸发器:上海医械专机厂。

CSS01-SP 超级恒温水浴:重庆四达实验仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程

大豆胚芽加水→微波→超声波前处理→溶剂提取→提取液→聚酰胺层析柱洗脱分离→浓缩→冷冻干燥→成品

1.2.2 大豆异黄酮测定方法 用HPLC分析法测定^[2],分别将标准品染料木甙、染料木因、黄豆苷、黄豆苷原用甲醇配置成0.01~0.05mg/mL五个标准液,吸取各标样10μL进样,测出各峰面积,制成四条

收稿日期:2003-12-26

作者简介:贾建波(1964-),男,江苏淮安人,高级实验师。

标准曲线。称取适量成品用甲醇配成 0.5mg/mL 浓度,超声搅拌 30min,离心 5min,取清液,进样量为 10 μ L,得到样品色谱图。据标准曲线,将色谱图中 4 种成分出峰面积折算成各自含量 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 。由下式计算大豆异黄酮提取率: $G_1 = (C_1 + C_2 + C_3 + C_4) \times 10/W_1 \times 100\%$

$G = G_1 \times \text{成品大豆异黄酮总重量} / \text{大豆胚芽重量} \times 100\%$

式中 G :大豆异黄酮的提取率; W_1 :成品大豆异黄酮取样量(mg); G_1 :成品大豆异黄酮含量; C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 分别为染料木甙、染料木因、黄豆苷、黄豆苷原 4 组分出峰面积折算为标准品的毫克量(mg)。

1.2.3 大豆皂甙的测定方法 以自制大豆皂甙为标样用芳香醛-硫酸显色反应,用分光光度计检测在 560nm 处样品的吸光度,回归标准曲线经测定为:

$A = 3.045X + 0.0151$,相关系数 $r = 0.991$

式中 A :吸光度; X :浓度(mg/mL)。

皂甙提取率 = $C \times V / W \times 100\%$

式中 C :测出样品浓度(mg/mL); V :样品体积(mL); W :大豆胚芽重(mg)

1.2.4 微波前处理条件的确定 称取 10g 胚芽加入一定体积的蒸馏水,对影响提取主要因素:固液比,微波输出功率和微波时间作正交实验,确定微波前处理提取条件。考虑到长时间强热对活性成分有一定影响。按表 1 设计了正交实验。

表 1 微波提取条件正交实验 $L_9(3^3)$

水平	因素		
	固液比	微波输出功率(W)	微波时间(min)
1	1:10	600	10
2	1:20	450	20
3	1:40	300	30

1.2.5 超声波前处理条件的确定^[3] 称取 10g 胚芽加入一定体积的蒸馏水,对影响提取率的主要因素:固液比,超声波输出功率,超声时间和温度按表 2 作正交实验,以确定超声波前处理提取条件。

表 2 超声波提取条件正交实验 $L_9(3^4)$

水平	因素			
	固液比	微波输出功率(W)	微波时间(min)	温度($^{\circ}$ C)
1	1:10	800	15	20
2	1:20	400	30	40
3	1:40	200	45	80

1.2.6 微波和超声波混合提取条件的确定 按 1.2.4 和 1.2.5 正交实验结论分别进行提取前处理。

1.2.7 溶剂法提取大豆异黄酮和皂甙 参考文献 4 的条件,70%乙醇,在 60 $^{\circ}$ C,固液比为 1:20,每次提取 3h,浸提 3 次,检测大豆异黄酮和皂甙提取率。

1.2.8 正交实验确定大豆异黄酮和皂甙最佳提取条件 以微波和超声波处理优化确定最佳固液比,以乙醇为提取溶剂,对影响两活性物质的主要因素:胚芽前处理方法,溶剂浓度,提取时间,提取温度,浸提次数作五因素四水平按表 3 正交实验确定最佳浸提条件。

表 3 浸提条件正交实验 $L_{16}(4^5)$

水平	因素				次数
	前处理方法	乙醇浓度(%)	提取时间(h)	提取温度($^{\circ}$ C)	
1	微波	80	0.5	20	1
2	超声波	60	1.0	40	2
3	微波和超声波	40	2.5	60	3
4	未处理,直接溶剂提取	20	5.0	80	4

1.2.9 柱层析分离纯化 利用皂甙不溶于乙酸乙酯溶液特性,用甲醇-乙酸乙酯溶液洗脱,能使总皂甙和总异黄酮得到较好分离^[5]。用 25 \times 600nm 聚酰胺层析柱将最佳工艺提取的浸提液上柱,分别用乙酸乙酯,10%~45%甲醇-乙酸乙酯以 2mL/min 加入量梯度洗脱上柱样品,在出现吸收峰时收集洗脱液,经压缩处理和真空冷冻干燥后分别得到大豆异黄酮和皂甙,检测其提取率和纯度。

2 结果与讨论

(1)经正交实验确定了用微波和超声波前处理大豆胚芽,提取大豆异黄酮和大豆皂甙最佳工艺条件为:用 450W 功率微波处理 30min 和 400W 超声波在 40 $^{\circ}$ C 处理 45min 后,固液比为 1:20,再经 40%乙醇在温度为 60 $^{\circ}$ C,时间为 1h,浸提 2 次。大豆异黄酮和皂甙提取率分别为 1.74% 和 5.8%,经聚酰胺柱层析分离纯化,大豆异黄酮和皂甙产品的纯度达 38% 和 94%。

(2)经聚酰胺层析柱层析,梯度洗脱,收集洗脱液,检测发现在第 2~4 管间和第 23~35 管间有两个皂甙峰,在第 18~27 管间有一个异黄酮峰,合并两皂甙管数洗脱液,提取,经测定大豆异黄酮纯度为 38%,大豆皂甙的纯度为 94%。

(3)经过微波和超声波前处理后提取大豆异黄酮和皂甙,节省了溶剂,缩短了提取时间,产品的纯度比相关资料报道有所提高,证明前处理更有利于活性物质的纯化,检测方法操作简便,分析的结果精度高。由于受到微波和超声波设备限制,在微波可处理体积量和超声波高频率处理样品方面还有待进一步研究。

参考文献:

- [1]谷利伟.大豆胚芽中大豆皂甙分离与鉴定[J].中国粮油学报,2001,23(2):18-21.
- [2]何继春.大豆异黄酮检测及四标样快速测定法研究[J].粮食与油脂,2001,22(7):25-26.
- [3]刘大川.大豆胚芽中提取皂甙和异黄酮工艺研究[J].食品科学,2000,21(10):29-32.
- [4]邹静梅.超声波对党参皂甙成份提取率影响[J].首都医科大学学报,1997,18(2):168-169.
- [5]汪海波.皂甙和黄酮类物质分离[J].食品科学,2001,22(4):41-44.
- [6]Shiraiwa W et al. Composition and content of saponins in soybean seed according to variety cultivation year and maturity[J]. Agric. Biol. Chem. 1991,55(2):323.