

高压湿法萃取大豆异黄酮的工艺研究

李长彪, 赵秀红, 刘长江*, 张春红, 孟宪军
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 用高压湿法萃取方法(PLE)从冷冻干燥的大豆提取大豆异黄酮并用高效液相检测, 对不同溶剂、温度、压力等影响因素进行实验, 确立最佳提取方案, 并对 PLE 过程中异黄酮的稳定性进行研究。结果表明: 当 100℃, 100 个标准大气压, 3 个稳定的萃取周期(7min), 70% 的乙醇作为萃取溶剂, 提取率最高为 93%; 温度高于 100℃ 异黄酮游离型糖苷发生降解, 温度高于 150℃ 结合型糖苷发生分解。

关键词: 高压湿法萃取; 异黄酮; 稳定性; 大豆

Study on the Pressurized Liquid Extraction of Isoflavones from Soybeans

LI Chang-biao, ZHAO Xiu-hong, LIU Chang-jiang*, ZHANG Chun-hong, MENG Xian-jun
(College of Food, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Isoflavone derivatives from freeze-dried soybeans were extracted by pressurized liquid extraction (PLE) and determined by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC). At the same time, carry through experiment for

收稿日期 2005-06-18

*通讯作者

基金项目: 辽宁省科技厅科技攻关课题 (2004205001)

作者简介: 李长彪(1974-), 男, 在读博士生, 研究方向为食品生物技术。

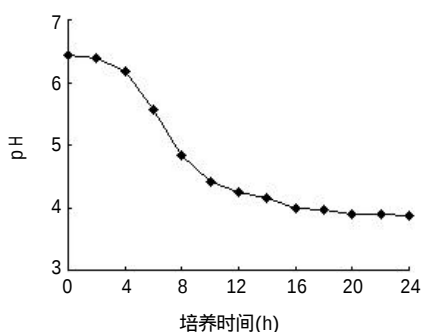


图2 生长过程中 pH 值变化曲线

Fig.2 The pH variety during the growth process

配方为 10% 番茄汁加 10% 胡萝卜汁加 10% 平菇汁; 增菌培养基缓冲盐的最佳配方为 0.1g/100ml CaCO_3 +0.5g/100ml NaAc 。将该乳酸菌在此培养基中培养 10h, 活菌数可达 $8.56 \times 10^8 \text{cfu/ml}$, 与普通液体发酵剂相比, 获得了显著的浓缩效果。

参考文献:

[1] 郭维烈. 实用微生物技术[M]. 北京: 科学技术文献出版

社, 1991. 60-70.

- [2] HLeMing H P. Fermented Vegetables. In; Rose A Eed. Economic Microbiolgy :Fermented Food[M]. New York: Academic Press, 1982, (7): 227.
- [3] Daeschel M A. Food Microbiology, 1984, (1): 303-313.
- [4] 顾瑞霞, 谢继志. 乳酸菌与人体保健[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 1-5.
- [5] 吕嘉彬, 秦俊哲. 嗜酸乳杆菌粉末发酵剂的研制[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(5): 44-46.
- [6] 刘慧, 李铁晶. 新编食品微生物学实验指导[M]. 东北农业大学出版社, 2000. 4-7, 12-13, 18-20.
- [7] 孟祥晨, 李艾黎, 霍贵成. 嗜酸乳杆菌增菌培养基的优化[J]. 食品工业科技, 2002, 23(6): 25-27.
- [8] 李春, 张兰威, 刘丽波. 嗜酸乳杆菌增菌培养基的确定[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(2): 12-13.
- [9] 吕为群, 骆承庠. 乳酸菌在冷冻干燥过程中存活率的影响因素探讨[J]. 中国乳品工业, 1993, 21(5): 217-220.
- [10] 李志成, 蒋爱民. 嗜热链球菌增菌缓冲剂的研究[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(11): 12-14.

influence factor about several extraction solvents, temperatures, pressures, etc. as well as establish the optimization of the extraction protocol: 0.1g of sample, 100°C, three (7min) static extraction cycles and ethanol 70% as extracting solvent. the most rate of picking-up is 93%. The stability of the isoflavones during the PLE was also determined. Indication: degradation of malonyl glucoside forms of the isoflavones takes place using temperatures higher than 100 °C whereas degradation of glucosides takes place above 150°C

Key words: liquid extraction; isoflavone; stability; soybean

中图分类号: 0623.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)09-0207-04

大豆为豆科植物大豆[Glycine max(L.) Merril]的成熟种子, 近年来, 经过大豆化学成份及药理研究表明, 大豆的主要成分为异黄酮类化合物, 其中大豆黄素(Daidzein, 又名大豆甙元)和金雀异黄素(Genistein, 又名染料木素)含量最高。因为这些异黄酮类化合物能降低乳腺癌、前列腺癌等疾病的发病率, 缓解更年期因雌激素分泌减少而引起的停经期综合症和骨质疏松症, 能调节血脂、降低胆固醇预防心血管疾病^[1,2], 所以引起了国内外广泛的关注和研究。大豆中异黄酮提取方法不断发展, 油脂浸提^[3,4]、混合搅拌^[5,6]、有机溶剂或用水混合浸泡提取等方法经常使用, 这些方法有一定的缺陷, 如品质低下, 溶剂消耗量过大, 回收率低等缺点。高压流体萃取方法是用温度和压力来加速从固体和半固体中提取化合物的提取速度的技术, 它的优点是所需要的萃取剂的体积少, 分析时间短, 精确程度高^[7,8], 此方法在大豆异黄酮提取上国内未见报道, 本研究为在惰性气体和无光条件下提取提供可能。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乙醇, 甲醇(色谱醇), 超纯水自制, isoflavones genistin, genistein, daidzein. Isoflavones daidzin (Di), glycitin (Gly), malonyl daidzin (MDi), malonyl glycitin (MGly), malonyl genistin (MGi) 购于 sigma 公司。

高效液相色谱(美国 Water 公司), Dionex ASE200 提取器(美国), 真空冷冻干燥机 LG1.5 上海市离心机械研究所。

1.2 方法

1.2.1 大豆异黄酮的提取

用 Dionex ASE200 提取器进行提取的, 将冷冻干燥的样品放置到纤维过滤装置(含有提取液水, 乙醇, 或 30%~80% 的甲醇溶液)的不锈钢提取电解槽内, 加压(100~200 个大气压)温度为 60~200°C 大豆异黄酮的。提取液经过 5、7 或 10min 三个固定的周期来提取, 提取后用超纯水清洗电解槽再用氮气净化 5min。

1.2.2 大豆异黄酮稳定性的测量

进行稳定性研究来了解温度和气体对萃取结果的影响,

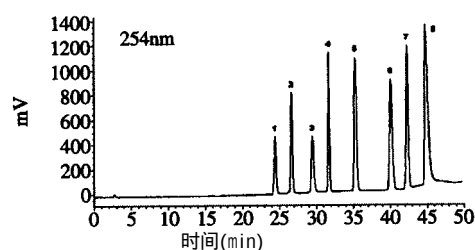
用前面提取的大豆异黄酮物, 在内部有溶剂和溶剂的提取槽进行一系列实验。当样品置于无溶剂的提取槽时由于和空气接触, 化合物发生氧化反应。当提取槽中装有溶剂时, N₂ 作为加压气体且在隔绝空气下进行操作。在压力一定和不同的温度下检测大豆异黄酮各个主要成分的稳定性。

1.2.3 高效液相色谱检测条件

色谱柱: Hyper ODS2 C₁₈(4.6mm × 250mm, 5μm);

流动相: A, B。A 溶液为酸化水(0.1% 的醋酸), B 溶液为甲醇(加 0.1% 的醋酸)梯度洗脱条件为: 0min, 15%B; 10min, 30%B; 20min, 30%B; 25min, 100%。

流速: 0.5ml/min; 2487 紫外检测波长: 254nm; 柱温: 37; 进样体积: 10μl。对大豆异黄酮 8 种标准品进行了高效液相色谱检测, 如图 1。



1) daidzin; (2) glycitin; (3) genistin; (4) malonyl daidzin and malonyl glycitin; (5) malonyl genistin; (6) daidzein; (7) glycitein; and (8) genistein.

图1 大豆异黄酮的标样高效液相色谱图
Fig.1 Chromatogram of standard isoflavones

2 结果与分析

2.1 溶剂的选择

实验用 0.5g 经过冷冻干燥的大豆通过水, 甲醇或乙醇(30%~80%)在 60°C 和 100 标准大气压条件下用三个稳定的 5min 萃取来决定最佳提取条件。结果如图 2 所示

随着乙醇浓度的增加异黄酮提取率增高, 但是超过 70% 以后异黄酮提取率下降。甲醇溶液达到 60% 时候, 异黄酮的提取率达到了最高值为 93%。从食品的安全性和经济性考虑, 乙醇更具有优势。

2.2 温度对大豆异黄酮提取率的影响

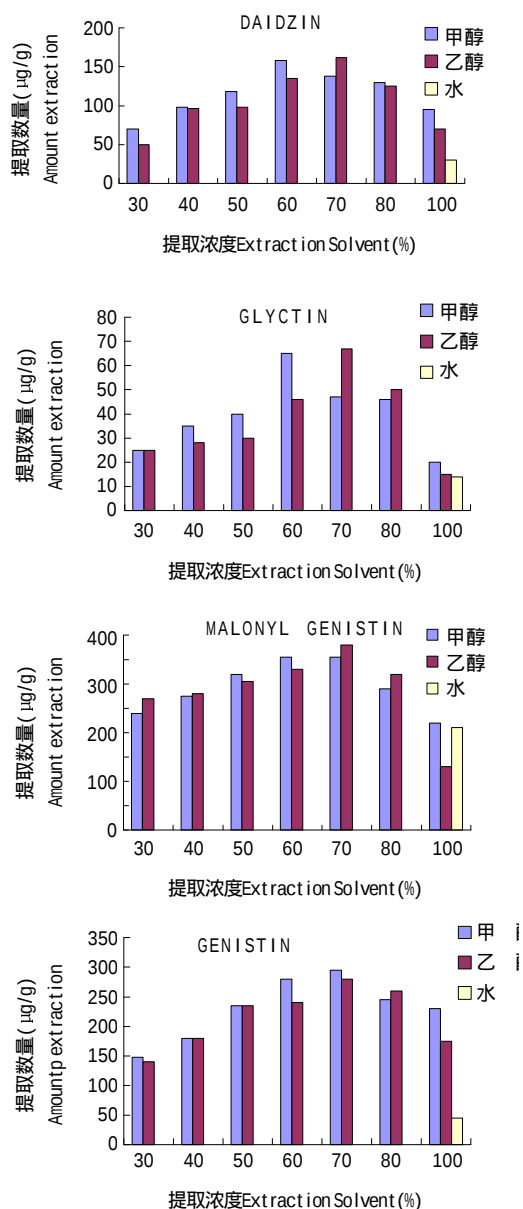


图2 60℃和100标准大气压条件下不同溶剂的大豆异黄酮提取率

Fig.2 Extraction efficiency for tested isoflavones as different solvents were employed (60, 100 atm), 0.5 g of sample

表1 不同温度下大豆提取异黄酮的含量

Table 1 The amount of isoflavones extracted from the soy sample as different temperatures (µg/g)

温度(℃)	Di	De	Gly	Gle	MGi	Gi	Ge
60	165.3	—	66.3	—	386.4	294.9	10.0
80	176.2	—	72.1	—	396.7	338.0	10.2
100	202.4	—	91.8	—	445.7	383.3	11.0
150	290.5	—	128.5	—	203.4	616.1	10.5
200	117.8	108.7	53.6	90.1	—	382.7	153.2

—表示无记录。

使用70%乙醇在不同温度下(60~200℃)实验来确定最佳的提取温度,100标准大气压条件下用三个稳定的

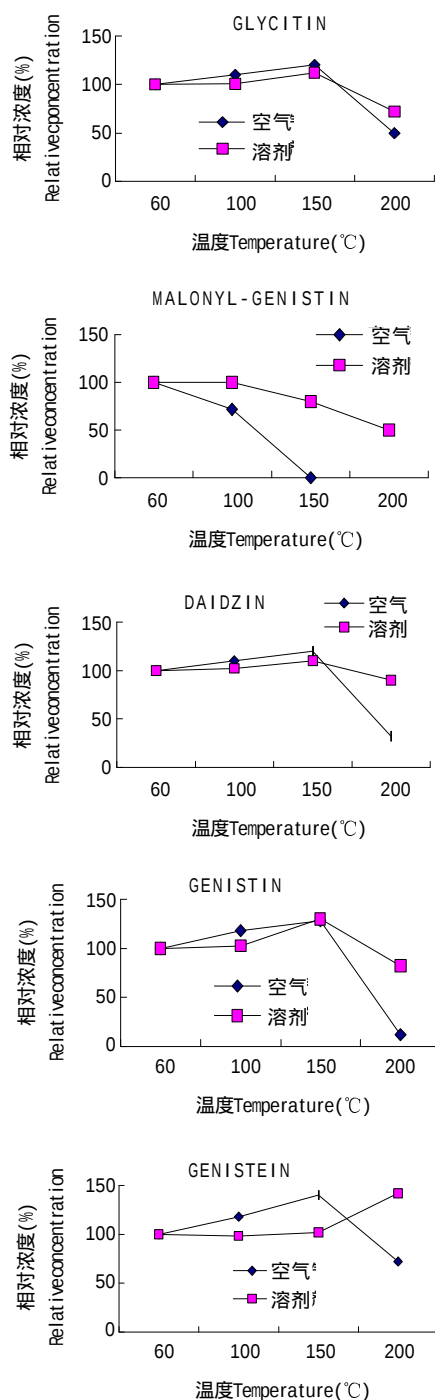
5min来萃取,见表1

从表1中可以看出温度增加时各个被测组分含量的变化情况,综合考虑确定最佳温度是100℃。

2.3 PLE法提取大豆异黄酮的稳定性

将一定量的大豆异黄酮提取物放入提取槽内摸索萃取条件,用提取槽中乙醇(70%)和N₂来进行萃取,见图3

图3反映出了大豆异黄酮的六种主要组分在不同温度下的稳定性,证实了萃取操作中的观察结果。表明100℃是PLE法提取大豆异黄酮的最高温度,超过100℃



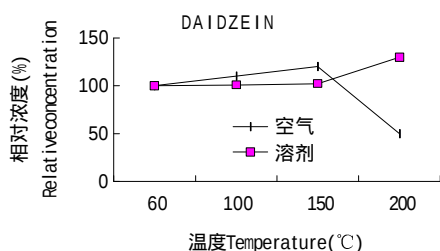


图3 不同温度和气体提取条件下异黄酮各个组分的相对浓度

Fig.3 Relative concentrations of individual isoflavones in the natural extract as different temperatures were employed

各个组分有不同程度的降解。

2.4 压力对大豆异黄酮的影响

100℃条件下70%乙醇，三个5min循环提取结果如表2所示。

表2 不同压力下大豆异黄酮的提取量

Table 2 Amount of isoflavones extracted from the soy sample (μg/g) using different pressures

压力(标准大气压)	Di	Gly	MGi	Gi
100	202.3	91.8	445.6	383.3
200	203.1	85.0	447.3	384.3

由表2可以看出压力对其影响不大。

2.5 不同时间提取周期对大豆异黄酮提取的影响

表3表示了100℃、100个标准大气压、70%乙醇条件下三个不同时间循环提取结果，可

表3 不同提取时间周期对大豆异黄酮提取的量

Table 3 Amount of isoflavones (μg/g) extracted from the soy sample using different static extraction cycle length

提取周期时间(min)	Di	Gly	MGi	Gi
5	213.4	95.0	462.1	440.0
7	236.8	102.3	477.6	510.5
10	239.1	101.9	483.5	508.1

以发现周期由5min延长到7min，提取量有所增加，

表4 不同提取次数不同时间周期大豆异黄酮的量(μg/g)

Table 4 Amount of isoflavones (μg/g) extracted from the soy sample using different extraction cycles and different static extraction cycles

提取周期时间(min)	循环次数	Di	Gly	MGi	Gi
7	1	181	44.9	348.4	236.3
	2	190	77.2	429.0	405.5
	3	237.4	103.0	478.0	511.0
10	2	204.0	87.2	445.0	452.0

而7min到10min则增长不太明显。

2.6 提取次数对大豆异黄酮提取的影响

100℃，100个标准大气压、70%乙醇条件下不同提取次数结果如表4所示：最佳提取周期为7min3个循环，这种方式下四种异黄酮的提取量达到最大值，为其含量的93%以上。

3 结论

经过上述实验确定PLE法最佳的提取工艺条件为：0.1g样品，100℃，100个标准气压，3个稳定的萃取周期(7min)，70%的乙醇作为萃取溶剂，提取率是93%。PLE法提取大豆异黄酮具有对成品污染少，提取率高，节省时间等优点，是一种切实可行的绿色环保的提取工艺方法。

参考文献：

- [1] Anthony M S, Clarkson T B, Hughes C L J, Morgan T M, Burke GL. Soy isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys[J]. J Nutr, 1996, 126(1): 43-50.
- [2] Arjmandi B H, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzalis M, Guo P, Kukreja S C. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis[J]. Nutr, 1996, 126(1): 161-167.
- [3] Chang Li-Hsun, Cheng Ya-Chuan, Chang Chieh-Ming*. Extracting and purifying isoflavones from defatted soybean flakes using superheated water at elevated pressures[J]. Food Chemistry, 2004, 84: 279-285.
- [4] Bennet au Pelissero C {a}, Arnal-Schnebel B, Lamothe V, et al. ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. 2003, 82(4): 645-658.
- [5] Doerge D R, Chang H C, Churchwell M I, et al. Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Drug Metabolism and Disposition, 1999, 28(3): 298-307.
- [6] I U Grün, K Adhikari, C Li, et al. J Agric Food Chem, 2001, 49: 2839.
- [7] R M Alonso-Salces, E Korta, A Barranco, et al. J Chromatogr A, 2001, 993: 37.
- [8] auricio A Rostagno, Miguel Palma*, Carmelo G Barrosoof. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones[J]. Jurnal Chromatography A, 2003, 1012: 119-128.