

吸附树脂分离大豆异黄酮染料木苷和乙酰基染料木苷的研究*

张波, 马 达, 杨 博, 芦明春, 付绍平, 鱼红闪, 金凤燮

(大连轻工业学院 生物与食品工程学院, 辽宁 大连, 116034)

摘 要 利用 Sepabeads SP207 大孔吸附树脂分离提纯大豆异黄酮。用乙醇从脱脂大豆中提取的大豆异黄酮主要含有染料木苷, 还含有大豆苷、黄豆苷和乙酰基染料木苷等; 经 Sepabeads SP207 大孔吸附树脂的乙醇梯度洗脱, 可分离得到染料木苷和乙酰基染料木苷; 经 HPLC 检测其纯度均为 90% 以上。

关键词 大豆异黄酮, 大孔吸附树脂, 分离

大豆异黄酮是一种含有芳香环的非类固醇化合物, 也是一类重要的生理活性物质, 具有较强的生理功能, 具有抗肿瘤作用, 并能预防和治疗心脑血管疾病、广泛用于公众营养食品和保健食品^[1,2]。目前发现大豆中的异黄酮共有 12 种, 分为游离型的苷元 (Aglycone) 和结合型的糖苷 (Gluconside) 2 类^[3-4]。大豆中的异黄酮苷元只占总异黄酮含量的 2%~3%; 大豆异黄酮糖苷占总量的 97%~98%, 其主要成分是染料木苷^[5]。

大孔树脂是 1990 年代末在凝胶型树脂的基础上发展起来的一类新型树脂。具有稳定性高, 吸附量大, 选择性好和容易再生的优点, 作用广泛^[6,7]。

大豆异黄酮的测定方法主要有高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法、毛细管电泳法^[8~11]。

文中以分离得到大豆异黄酮单体为目标, 主要用修饰溴原子的、极性增大的 Sepabeads SP207 树脂^[12], 尝试了分离大豆异黄酮单体。

1 材料与方法

1.1 实验材料

脱脂豆粕由大连调味品厂提供; Sepabeads SP207 大孔吸附树脂由日本三菱化成公司生产; 薄层层析板 Silica gel 60 F₂₅₄ 为 Merck 公司产品; 4 种大豆异黄酮标准品为 Sigma 公司产品; 其他试剂均为分析纯或生化纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆异黄酮的提取

称取脱脂豆粕 1 kg, 用 6 L 70% 乙醇浸泡 2 d, 过

滤出浸出液, 再向滤渣中加入 5 L 70% 乙醇浸泡 2 d, 收集浸出液, 浓缩至 1/10 体积, 备用。

1.2.2 Sepabeads SP207 大孔吸附树脂及其预处理

所选用的大孔吸附树脂是由日本三菱化成公司生产的 Sepabeads SP207, 它以聚苯乙烯基苯为基体, 并在苯乙烯基体上接了一个溴, 从而增大了树脂的极性, 非常合适分离极性不大的芳香类化合物。其技术指标为: 粒度分布 ≥ 90% (≥ 250 μm); 有效直径 ≥ 0.25 mm; 比表面积 630 m²/g; 微孔容积 1.3 mL/g; 最频度半径 10.5 nm。

预处理: 先于柱内加入相当于装填树脂体积 0.4~0.5 倍的 95% 乙醇, 然后将树脂装入柱中, 使其液面没过树脂层面约 3 cm, 浸泡 24 h; 用 2 倍柱体积 (2BV) 的 95% 乙醇, 以 2BV/h 的流速通过树脂, 洗至流出液不呈白色浑浊后, 用去离子水以同样流速洗净乙醇; 用 2BV 的 2% HCl 以 2BV/h 的流速通过树脂层, 并浸泡 2~4 h, 然后用去离子水以同样流速洗至流出水的 pH 值为中性; 再用 2BV 的 2% 的 NaOH 溶液, 以 2BV/h 的流速通过树脂层, 并浸泡 2~4 h, 然后用去离子水以同样流速洗至流出水的 pH 为中性后待用。

1.2.3 大豆异黄酮的分离

将提取大豆异黄酮的浓缩液上 Sepabeads SP207 大孔吸附树脂, 吸附 2~3 次, 水洗渣滓, 分别用 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 95% 体积分数的乙醇。用薄层层析法对大豆异黄酮进行初步检测。

1.2.4 薄层层析 (TLC) 法检测大豆异黄酮

采用薄层层析法对大豆异黄酮进行初步检测。薄层层析板 (Silica gel 60 F₂₅₄, 德国 Merck 公司), 切成高 5 cm 的板, 在下部 8 mmol/L 处一边吹干一边点样, 点样量 10 μL 左右, 点样圈直径不超过 2 mmol/L。然后在封闭的层析缸中展开, 展开剂为 v

第一作者: 硕士研究生 (金凤燮教授为通讯作者)。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30371744、20476017、30470055) 资助

收稿日期: 2006-11-21, 改回日期: 2007-02-08

(乙酸乙酯): v (丁酮): v (甲醇): v (水) = 10:7:1:1。展开后吹干,紫外线 254 nm 波长下检测大豆异黄酮斑点。

1.2.5 高效液相色谱(HPLC)法检测大豆异黄酮分离产物

仪器为 Waters Alliance 2695—2966 DAD,色谱柱为 HiQ Sil C18 (4.6 mm×300 mm, 5 μ m);检验波长 261 nm;流速 1.0 mL/min;进样量 10 μ L;柱温 35℃。流动相 A 为甲醇,B 为 1.0%的冰乙酸水溶液,梯度洗脱(表 1)。

表 1 梯度洗脱表

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	10	90
5	10	90
20	40	60
40	60	40

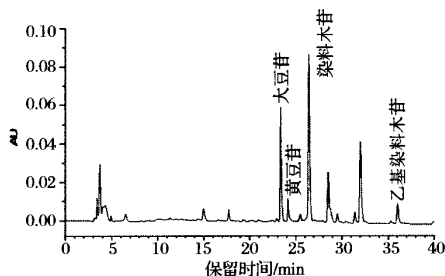


图 1 醇法提取大豆异黄酮的 HPLC 图谱

2 结果与讨论

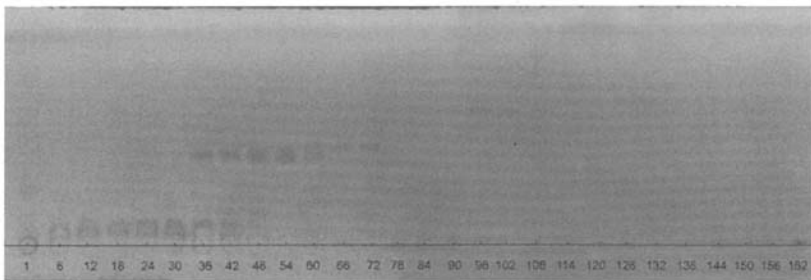
2.1 大豆异黄酮的提取

按照 1.2.1 方法从 1 kg 脱脂豆粕中提取 2 次的大豆浸出液,浓缩蒸干为粉末状,得到 14.5 g 大豆异黄酮粗品,即该脱脂豆粕中大豆异黄酮的提取量为 1.45%。其大豆异黄酮粗品经 HPLC 检测,如图 1 所示。

根据脱脂豆粕的乙醇提取物的 HPLC,并对照大豆异黄酮标准品 HPLC 图谱可知保留时间为 26.5 min 时所对应的峰为染料木苷(Genistin),其含量也最多,为 50%以上;保留时间为 37 min 时所对应的峰为乙酰基染料木苷(Acetygenistin),其含量在 5%左右;保留时间 23.4 min 所对应的峰为大豆苷(Daidzin);保留时间 24.2 min 所对应的峰为黄豆苷(Glycitin)。其粗品用于大豆异黄酮单体的分离。

2.2 Sepabeads SP207 大孔吸附树脂分离提纯大豆异黄酮

从图 1 中可以看到,大豆异黄酮粗品中主要含有染料木苷、大豆苷、黄豆苷和乙酰基染料木苷等。为了分离其单体,实验中用 Sepabeads SP207 大孔吸附树脂法分离。取预处理后的大孔吸附树脂 1 000 mL,吸附大豆异黄酮浸出液 2~3 次,水洗渣滓,分别用 20%,30%,40%,50%,60%,70%,95%体积分数乙醇作为洗脱剂进行洗脱,每个梯度洗 6L,并用锥形瓶接收,每瓶 250 mL。每个梯度各取 4 瓶,洗脱液进行 TLC 检测,薄层层析展开板如图 2 所示。



乙醇体积分数:第 1~24 号瓶为 20%;第 30~48 号瓶为 30%;第 54~72 号瓶为 40%;第 78~96 号瓶为 50%;第 102~120 号瓶为 60%;第 126~144 号瓶为 70%;第 150~162 号瓶为 95%

图 2 Sepabeads SP207 大孔吸附树脂分离提纯大豆异黄酮乙醇提取物所得组分的薄层色谱图

由薄层色谱图可知,从 36 号组分开始出现染料木苷,54 号组分中的洗脱物为较纯的染料木苷带,66—72 号组分中的洗脱物为较纯的乙酰基染料木苷带,60 号为二者的混合带;84~114 号组分中也含有异黄酮的苷元,而 120 号以后(乙醇体积分数为 70%以上)的组分中基本无异黄酮。将较纯的染料木苷和

乙酰基染料木苷组分分别合并,蒸干为粉末状,得到 TLC 单点的染料木苷 1.65 g 和乙酰基染料木苷 0.143 g。

2.3 分离产物的 HPLC 检测

分别将第 54 和 66 号组分经 HPLC 检测,其结果如图 3 和图 4 所示。

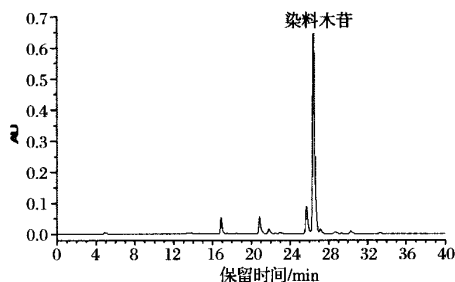


图3 Sepabeads SP207 大孔吸附树脂分离纯化的大豆异黄酮 HPLC 图谱(54 号组分)

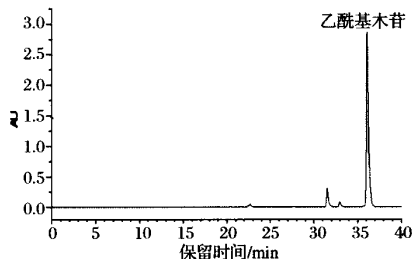


图4 Sepabeads SP207 大孔吸附树脂分离纯化的大豆异黄酮 HPLC 图谱(66 号组分)

从图3和图4种可以看到,上述TLC单点的1.6 g 染料木苷和TLC单点的0.14 g 的乙酰基木苷纯度均为90%以上。说明大孔树脂可分离得到染料木苷和乙酰基木苷单体,但是其他单体的分离有待于进一步的研究。

3 结 论

实验证明,从脱脂大豆中用乙醇提取的大豆异黄酮中主要含有染料木苷,还含有大豆苷、黄豆苷和乙酰基染料木苷等;经Sepabeads SP207 大孔吸附树脂的酒精梯度洗脱,可分离得到染料木苷和乙酰基染料木苷;经HPLC检测,染料木苷和乙酰基染料木苷的纯度均为90%以上。综上所述,用大孔吸附树脂Sepabeads SP207 能成功地分离出大豆异黄酮染料木苷和乙酰基染料木苷2个单体。

大孔吸附树脂具有物理化学稳定性高,比表面积大,吸附和交换容量大,选择性好,吸附和交换速度快,吸附条件温和,再生处理方便,强度高,使用寿命长等优点。这也决定了它在食品活性成分分离中具有广泛应用前景。但“大孔吸附树脂使用安全问题”,即致孔剂和降解物的毒性等也应得到充分考虑,鉴于

此前国家卫生部也明文规定了“在保健食品中采用大孔吸附树脂工艺的技术要求”,其中就成品中二乙烯苯的残留量应小于50ppb及其检测方法和标准作出了规定。文中所采用Sepabeads SP207 大孔吸附树脂是以聚苯乙烯基苯为基体,并在苯乙烯基体上接了1个溴,从而增大了树脂的极性,非常适合分离极性不大的芳香类化合物,通过实验也发现该大孔吸附树脂对大豆异黄酮苷有很好的分离纯化作用。论文中得出的相关大孔吸附树脂工艺条件也必将对今后的研究和生产应用提供科学依据。

参 考 文 献

- 1 谢明杰,高爽,邹翠霞,等. 大豆异黄酮生理功能研究进展[J]. 食品与发酵工业,2004,30(5):94~98
- 2 苗虹,赵云峰,周蕊,等. 高效液相色谱法测定食品中大豆异黄酮含量[J]. 中国食品添加剂,2004,5:92~96
- 3 胡卫新,王晓磊,张洁. 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
- 4 谢明杰,徐春华,刘长江,等. 高产大豆异黄酮糖苷水解酶菌株发酵工艺的研究[J]. 微生物学通报,2004,31(3):41~44
- 5 王松,丁立,周荣琪. HPLC法测定豆粕中大豆异黄酮的含量[J]. 化工进展,2005,24(2):196~199
- 6 罗艳玲,欧仕益. 大孔树脂在食品活性成分分离中的应用[J]. 食品与机械,2005,1(5):81~83
- 7 王跃生,王洋. 大孔吸附树脂研究进展[J]. 中国中药杂志,2006,31(12):961~965
- 8 Nurmi T, Mazur W, Heinonen S, et al. Isoflavone content of the soy based supplements[J]. J Pharm Biomed Anal, 2002,28(1):1~11
- 9 Barnes S, Coward L, Kirk M, et al. HPLC-Mass spectrometry analysis of isoflavones[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1998,217(3):254~262
- 10 常凤启,秦振顺,韩会新. 大豆异黄酮的测定方法研究[J]. 中国卫生检验杂志,2006,6(2):131~134,139
- 11 Mellenthin O, Galensa R. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47 (2):594~602
- 12 屠鹏飞,贾存勤,张洪全. 大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中的应用[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2004,6(3):22~28,85

(下转第75页)

TDF 含量为 92.4%, 其中 SDF 含量达到 14.13% 的高品质膳食纤维发酵产物。

参 考 文 献

- 1 卢敏, 潘瑞. 利用玉米麸皮制取膳食纤维的方法研究 [J]. 粮食与饲料工业, 1996, 11, 39~40
- 2 郑建仙, 高孔荣. 论膳食纤维 [J]. 食品发酵工业, 1994, (4): 71~74
- 3 董文彦, 张东平, 伍立居, 等. 三种膳食纤维降血脂、通便

与减肥作用的比较研究 [J]. 中国粮油学报, 2000, 15(1): 42~44

- 4 Prosky L, Asp N G, Furda I, et al. Determination of total dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. J—Assoc Off Anal Chem, 1985; 68, 677~679
- 5 郑建仙. 功能性食品 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995. 64~65
- 6 钱海伦. 普通高等教育药学类微生物学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993. 106~107

Study on Technology of Producing Dietary Fiber by *Ganoderma lucidum* Fermented on Corn Skin

Wang Hongxun¹, Zhou Shuai², Zhang Xiaoyu²

1(College of Food Science and Technology, Wuhan Polytechnic university, Wuhan 430023, China;)

2(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

ABSTRACT The fermentation technology of producing dietary fiber by *Ganoderma lucidum* fermented on corn skin braised was investigated. The results show that the composition of dietary fiber can be influenced by inoculation amount, nitrogen sources, inorganic ions and inoculation age. The content of composition in dietary fiber is increased by adding strains in the age of pro-logarithm growth or adding KH_2PO_4 and MgSO_4 . The optimal fermentation conditions were: inoculation age 4 d, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, KH_2PO_4 0.5% and MgSO_4 0.25%, 15 d incubation. Under the optimal condition, the total dietary fiber in the fermentation production could reach 92.4%, and the soluble dietary fiber was up to 14.13%.

Key words *Ganoderma lucidum*, corn skin, dietary fiber

(上接第 71 页)

Separate Soybean Isoflavone Genistin and Acetygenistin by Resin

Zhang Bo, Ma Da, Yang Bo, Lu Mingchun, Fu Shaoping,

Yu Hongshan, Jin Fengxie

(College of Biotechnology. & Food Technology, Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116034, China)

ABSTRACT The soybean isoflavone was extracted by alcohol and separated and purified by Sepabeads SP207 macro-pore resin. The extraction from soyabean by 70 % alcohol mainly contained the genistin, daidzin, glycitin and acetygenistin. The pure genistin and acetygenistin were obtained by the Sepabeads SP207 macro-pore resin; the pure genistin and acetygenistin contents were over 90 % by the HPLC method.

Key words soybean isoflavone, resin, separate