

发酵豆粕中大豆异黄酮的超声波提取工艺

孙体健 王浩江 曹晓峰 刁海鹏
(山西医科大学,山西 太原 030001)

摘要:为提高大豆异黄酮的提取率,以发酵豆粕为原料,采用超声波提取技术,通过单因素实验及正交实验对大豆异黄酮提取工艺中提取溶剂、料液比、时间、次数等因素进行探讨。结果表明:采用80%乙醇为提取剂,料液比1 g 15 ml,提取时间20 min,提取2次,大豆异黄酮提取率最高,可达到0.548%。超声波提取发酵豆粕中大豆异黄酮是一种较为理想的方法。

关键词:发酵;黄豆;异黄酮类;超声学;分光光度法

Study on Conditions of Ultrasonic Extraction of Soybean Isoflavones from Fermented Soybean Cake

SUN Ti-jian, WANG Hao-jiang, CAO Xiao-feng, DIAO Hai-peng
(Shanxi Medical University, Shanxi Taiyuan 030001, China)

Abstract: In order to extract more isoflavones from soybean cake, the ultrasonic technology were used. The soybean isoflavones were extracted from fermented soybean cake by ultrasonic technology, and the influences of extraction solvent and extraction time, ratio of sample to extractant and the number of repeated extraction were studied by single factor and systematical lineartest. The results showed that the optimum extraction technology was as follows: solvent: 80% ethanol; extraction time: 20 min; the ratio of sample to solvent: 1: 15 (g: ml); repetition of extraction: 2 times. The extraction rate of this method can reach 0.548%.

Key word: Fermentation; Soybeans; Isoflavones; Ultrasonic; Spectrophotometry

开展先发酵大豆(或副产品)后提取异黄酮的研究,对提高异黄酮产品的生物活性,开发富含大豆异黄酮苷元的保健品具有重要的意义。近年来,人们采用超声波提取植物中的活性物质取得了很好的效果,已有文献表明^[1,2],超声波技术在生物活性物质的提取、分离方面有广泛的应用价值,在发酵制品中异黄酮的提取尚处探索阶段。本文以发酵豆粕为原料,采用超声波技术,研究了从发酵豆粕中提取异黄酮的工艺条件。为开发和研制大豆异黄酮的保健品、医药品提供一定的科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

原料 大豆粕(太原市粮油质量监测所提供)。沪酿3.042米曲霉(上海迪发酿造生物制品有限公司)。金雀异黄素标准品(北京中医药大学)。甲醇、95%乙醇、氯化钠等均为分析纯。

UV-760CRT双光束分光光度计(上海精密仪器厂)、HH-S型恒温水浴锅(江苏金坛医疗仪器

厂)、ZK-82A型电热真空干燥箱(上海实验仪器厂)、KQ-250DE型超声波清洗器(40KHz,昆山市超声仪器有限公司)、800型离心机(上海手术器械厂)。

1.2 方 法

1.2.1 发酵豆粕的制备 豆粕 蒸煮 冷却 接种 制曲 发酵 真空干燥 成品

1.2.2 大豆异黄酮的测定方法 参照文献[3],以金雀异黄素为标准,根据异黄酮化合物在250~270 nm紫外区有特征吸收,对标准样和提取液样品进行紫外扫描,实验测定表明,标准样品和提取液在260 nm处均有最大吸收。用金雀异黄素配制标准溶液,在260 nm处绘制工作曲线,校正曲线方程为 $y = 6.294x + 0.057$, $r = 0.9998$ 。式中, x 为吸光度值, y 为标准样品浓度, $\mu\text{g/ml}$ 。

1.2.3 大豆异黄酮的超声波提取方法 称取一定量粉碎后的发酵豆粕于具塞试管中,加入提取剂后,立即放入超声清洗器中,设定超声功率(200 W),25 保温,进行超声波提取,定时取出,4000 r/min离心,倾出上清液,适当稀释后,仪器测定。

大豆异黄酮提取率(%) = $\frac{\text{提取液中大豆异黄酮总量}}{\text{发酵豆粕量}} \times 100\%$

基金项目:山西省教委科技开发项目(2003009)

作者简介:孙体健 女 教授

通讯作者:曹晓峰 女 教授

1.2.4 最佳提取条件的确定 在上述条件下,选择以提取溶剂、提取时间、提取次数、料液比 4 个可能影响提取效果的因素做单因素实验,在此基础上做正交实验,研究多因素对提取率的影响,以确定超声波提取大豆异黄酮的最佳条件。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 提取溶剂的选择 以甲醇、不同浓度的乙醇为提取剂,采用超声波法提取发酵豆粕中大豆异黄酮,重复 3 次测定平均值。60%乙醇的提取率为 0.367%,70%乙醇的提取率为 0.425%,80%乙醇的提取率为 0.441%,95%乙醇的提取率为 0.216%,甲醇的提取率为 0.430%。

由结果可见,用 80%乙醇提取发酵豆粕中大豆异黄酮的效果最好,甲醇的提取效果与之相当,考虑到在生产过程中采用乙醇作为提取剂,可避免有毒、有害物质残留,故本次实验选用 80%乙醇作为提取剂。

2.1.2 超声波提取时间对大豆异黄酮提取率的影响 以 80%乙醇为提取剂,其它条件相同,控制不同的提取时间,5 min 时的提取率为 0.230%,10 min 时的提取率为 0.371%,20 min 时的提取率为 0.429%,30 min 时的提取率为 0.432%,50 min 时的提取率为 0.424%。可见超声波提取时间越长,大豆异黄酮成分浸出越充分,但达到一定时间后,提取率则趋于恒定。超声波在 20 min 内可对大豆异黄酮进行充分提取。

2.1.3 料液比和提取次数对大豆异黄酮提取率的影响

固定超声波强度,在超声提取时间为 20 min 的条件下进行提取次数和料液比的实验,结果见表 1。

表 1 提取次数和料液比与大豆异黄酮提取率的关系 %

提取次数	料液比(g/ml)			
	1 5	1 10	1 15	1 20
1	0.256	0.373	0.437	0.492
2	0.472	0.498	0.530	0.533
3	0.501	0.519	0.545	0.541

由表 1 可以看出,一定时间内,大豆异黄酮的提取率不仅与所加溶剂的量有关,而且与提取次数相关。一定量的发酵豆粕中,随着溶剂用量的增大,提取次数的增多,提取率逐渐增加;但若溶剂用量太大(>1 15),提取率趋于平稳,综合考虑提取剂用量,提取效率等因素,采用 1 15 的料液比,提取次数选定为 2 次。

2.2 正交实验 在以上单因素实验的基础上,以提取时间、提取次数、料液比 3 个因素,正交设计下面

的因素水平表(见表 2)。

表 2 正交实验因素水平表 $L_9(3^3)$

水平	时间 (min) A	次数 B	料液比(g/ml) C
1	5	1	1 5
2	10	2	1 10
3	20	3	1 15

以粉碎的发酵豆粕为原料,按上表进行正交实验,结果见表 3。

表 3 超声波提取大豆异黄酮正交实验结果

实验号	时间 (min)	次数	料液比 (g/ml)	大豆异黄酮提取率 (%)
1	1	1	1	0.203
2	1	2	2	0.335
3	1	3	3	0.445
4	2	1	2	0.309
5	2	2	3	0.545
6	2	3	1	0.395
7	3	1	3	0.434
8	3	2	1	0.478
9	3	3	2	0.515
K_1	0.983	0.946	1.076	
K_2	1.249	1.358	1.159	
K_3	1.427	1.355	1.424	
k_1	0.328	0.315	0.359	
k_2	0.416	0.453	0.386	
k_3	0.476	0.451	0.474	
R	0.148	0.138	0.115	

注: K_1 、 K_2 、 K_3 :表示各水平下的提取率总和, k_1 、 k_2 、 k_3 :表示各水平下的平均提取率,R:极差。

由表 3 看出,用超声波提取发酵豆粕中大豆异黄酮时,各因素影响提取率的主次顺序为提取时间 > 提取次数 > 料液比,最优组合为 A3B2C3,即:料液比为 1 15(g/ml),提取时间 20 min,提取 2 次,在此条件下,用 80%乙醇作提取剂,大豆异黄酮的提取率可达 0.548%。

2.3 常规浸泡法与超声波法提取效果的比较 以 80%乙醇作提取剂,分别用室温静置法和超声波法提取发酵豆粕中大豆异黄酮,比较两种方法的提取效果,实验结果见表 4。

表 4 提取方式的比较

提取方式	时间 (min)	大豆异黄酮提取率 (%)
室温静置	120	0.218
	180	0.357
	240	0.421
超声波	20	0.434

由表 4 可看出,超声波提取 20 min 所得的提取率与室温静置 4 h 所得提取率基本相等。室温静置

气相色谱法测定肉中己二烯雌酚残留量

周艳明 牛 森

(沈阳农业大学,辽宁 沈阳 110161)

摘要:为保证肉品安全,利用 GC-ECD 测定肉中己二烯雌酚残留量。样品用甲醇提取,经离心和阴离子交换柱层析净化,七氟丁酸酐衍生,气相色谱仪配电子捕获检测器测定,外标法定量。方法的检出限为 0.01 $\mu\text{g/g}$,线性范围为 0.01 ~ 100 $\mu\text{g/g}$,相关系数为 0.999 6,相对标准偏差小于 3.88%,回收率在 85.8% 以上。该方法可用于食品安全监控工作,用以测定肉品中己二烯雌酚的残留量。

关键词:肉;己烯雌酚;药物残留量;丁酸类;色谱法;气相

Determination of Dienestrol Residue in Meat by GC-ECD

ZHOU Yan-ming, NIU Sen

(Shenyang Agriculture University, Liaoning Shenyang 110161, China)

Abstract: An analytical method for determination of the residues of Dienestrol in meat by GC-ECD was developed. The sample was extracted with methyl alcohol, purified by centrifuge and anion exchange Chromatography, derivatized with heptafluorobutyric anhydride (HFBA), determined by Gas Chromatography with Electron Capture Detector and quantitated by external standard. The minimum detection limit was 0.01 $\mu\text{g/g}$, the line scope was 0.01 ~ 100 $\mu\text{g/g}$, the correlation coefficient was 0.999 6, the relative standard deviation (RSD) was < 3.88%, and the average recovery rate was 85.8%. The method can be used to determine the residues of Dienestrol in meat products.

Key word: Meat; Diethylstilbestrol; Drug Residues; Butyric Acids; Chromatography, Gas

己二烯雌酚(Dienestrol, DIE)是一种根据天然雌激素的结构特征合成的非甾体激素类人造雌激素,与己烯雌酚同为作用较强的人造雌激素。在畜牧业上,DIE最初用于对乳牛催乳,后又作为饲料添加剂,可增加食欲,促使蛋白质、钙、磷的蓄积增加;促进牲畜增重,提高饲料利用率,提高产量并使肉质鲜嫩。但研究证明,残留在畜禽肉中的己二烯雌酚

能扰乱消费者激素平衡,导致妇女更年期紊乱、生育能力下降,女童性早熟,男性女性化,并有强致癌作用,对消费者健康极为不利,是许多国家和地区明令禁用的兽药之一。DIE在肉类中残留量的测定方法在国内外少有报道,不便于其残留监测,本文建立了肉中己二烯雌酚残留量测定的气相色谱方法。

120 min 提取的异黄酮仅为 0.218%,而利用超声波提取 10 min 就达 0.371%。同时,采用乙醇加热回流法与超声波法作比较,乙醇加热回流法仍采用 80%乙醇作提取剂,料液比为 1:15,在温度为 70℃下提取 3 h,提取 2 次,提取率为 0.515% (另文撰述)。而超声波法在室温下提取 20 min (其它条件相同),大豆异黄酮的提取率可达 0.548%,说明超声波法的提取效果优异。

参考文献

- [1] 郭孝武. 超声技术在中草药成分提取中的应用[J]. 中草药,1993,24(10):548.
- [2] 张福成,林书玉,郭孝武,等. 超声萃取干燥过滤研究的新进展[J]. 声学技术,1994,13(4):155-188.
- [3] 张玉梅,孙学斌,高旭年,等. 紫外分光光度法测定大豆总异黄酮的含量[J]. 中国食品卫生杂志,2000,12(4):7-8.

[收稿日期:2006-05-24]

中图分类号:R15;O657;Q56 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2006)05-0418-03

作者简介:周艳明 女 教授