

乙醇/磷酸氢二钾双水相体系 分离大豆异黄酮

范蕊庆, 李晓瑄*

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用乙醇/磷酸氢二钾双水相体系浸提大豆异黄酮固体, 并采用四因素四水平正交试验, 考察了乙醇质量分数、磷酸氢二钾质量分数、温度、时间对大豆异黄酮的分配系数和萃取收率的影响。结果发现, 影响大豆异黄酮萃取收率的因素为: 时间 > 磷酸氢二钾质量分数 > 乙醇质量分数 > 温度。最佳提取条件为: 25% 乙醇/25% 磷酸氢二钾双水相体系, 室温(20℃) 浸提 30 min。大豆异黄酮几乎全部分配在上相, 其上相收率为 97.0%。

关键词: 双水相体系; 乙醇; 磷酸氢二钾; 大豆异黄酮; 浸提

中图分类号: TQ028.8

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2015)01-0099-04

Extraction of soy isoflavone by ethanol/ K_2HPO_4 aqueous two-phase system

FAN Rui-qing, LI Xiao-xuan*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The ethanol/ K_2HPO_4 aqueous two-phase system is used to extract soy isoflavone from crude solid. On the basis of four factors and four levels orthogonal test, the effects of mass fraction of ethanol, mass fraction of K_2HPO_4 , temperature and extracting time on the distribution coefficient and extraction yield of soy isoflavone are studied. The factors that influence the yield of soybean isoflavones are: extracting time > mass fraction of K_2HPO_4 > mass fraction of ethanol > temperature. The optimal condition is obtained as follows: ethanol/ K_2HPO_4 aqueous two-phase system (25% and 25% of ethanol and K_2HPO_4 , respectively) and extracting at 20℃ for 30 min. The soy isoflavone is almost assigned in the top phase. And the extraction yield of soy isoflavone in the top phase can reach 97.0%.

Key words: aqueous two-phase system; ethanol; K_2HPO_4 ; soy isoflavone; extraction

大豆异黄酮具有清除自由基和抗氧化功能, 与人的健康密切相关^[1]。目前大豆异黄酮的提取方法主要有: 溶剂浸提法(包括水提法和醇提法)、微波辅助萃取法、超声波萃取法、大孔树脂提取法、超临界流体萃取法、高压浸提法、离心法及离子交换法等^[2-7]。这些传统方法往往存在提取率不高, 大量溶剂需要回收和成本偏高等问题。

双水相萃取(ATPE)是利用物质在互不相溶的两水相间分配系数的差异来进行萃取的方法^[8], 具有条件温和, 无有机溶剂残留, 便于将体系放大实现工业化生产等优点。传统的双水相体系成相物质多为 2 种聚合物或聚合物和无机盐。近年来研究发现, 异丙醇、乙醇等有机物与无机盐和水以适当比例混合时, 也可以形成双水相体系^[9-10], 从而弥补了传统双水相萃取成相物质成本偏高和不易回收的缺陷, 有利于工业化应用。笔者采用乙醇/ K_2HPO_4 体系分离纯化固体大豆异黄酮^[11], 分离后的成相物质乙醇和盐可循环利用, 降低了分离成本, 环境友好。

1 主要仪器与材料

1.1 仪器

分光光度计 UVmini-1240; 分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产; 低速大容量多管离心机(生产商: 瑞江); 电热恒温水浴锅, 上海森信实验仪器有限公司生产。

1.2 材料

无水乙醇, AR; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司生产; 大豆异黄酮, 质量分数为 99%, Zhengzhou Lion Biological Technology Co., Ltd., 生产; 粗品大豆异黄酮, 郑州荔诺生物科技有限公司生产。

2 实验部分

2.1 相图绘制

采用浊点法^[12]绘制 EtOH/ K_2HPO_4 双水相相图。称取质量分数为 38% 的 K_2HPO_4 溶液 20 g 于

收稿日期: 2014-07-18

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 范蕊庆(1991-), 女, 本科生, fanruiqing001@foxmail.com; 李晓瑄(1970-), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物化学及食品资源综合利用, lixx_jn@qq.com。

大试管中,以质量分数为 50% 的乙醇溶液滴定,振荡混合至恰好浑浊,记录消耗的乙醇溶液体积 V ,加 1 mL 水使试管中的混合液再次澄清,继续滴加乙醇溶液至浑浊,重复上述步骤。计算每次出现浑浊时体系中乙醇和 K_2HPO_4 的质量分数 ω 并作图,即得到 EtOH/ K_2HPO_4 的双水相相图。

2.2 正交试验设计及上、下相组成测定

采用正交试验方法并选择双水相体系考察各因素对萃取收率的影响。正交设计如表 1 所示。

表 1 正交试验 $L_{16}(4^5)$ 因素水平表

水平	因素			
	[A] $\omega_{EtOH}/\%$	[B] $\omega_{K_2HPO_4}/\%$	[C] 提取时间/h	[D] 提取温度/ $^{\circ}C$
1	15	15	0.5	20
2	20	20	1.0	35
3	25	25	1.5	45
4	30	30	2.0	55

按照正交设计配制双水相体系,采用烘干法测定上、下相 K_2HPO_4 的质量分数,根据相图读出上、下相乙醇的质量分数^[13],从而得出体系上、下相溶液的组成。

2.3 分离方法

按正交表配制双水相体系,分别加入 10 mg 大豆异黄酮固体,按照正交设计的提取温度和时间进行浸提。分离上、下相,并分别测定上、下相的体积和 大豆异黄酮浓度。计算相比 R 、分配系数 K 和 大豆异黄酮在上相的萃取收率 $Y\%$ 。

$$R = V_t/V_b \quad (1)$$

$$K = C_t/C_b \quad (2)$$

$$Y\% = C_t \cdot V_t/M \quad (3)$$

式中, V_t 、 V_b 分别为上相和下相的体积; C_t 、 C_b 分别

为上相和下相中大豆异黄酮的浓度; M 为加入的待萃取固体中大豆异黄酮的总质量。

2.4 浓度测定方法

以 50% 乙醇溶解大豆异黄酮 (99%) 配制 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液,取 1.0 mL 标准溶液,用去离子水定容至 10 mL,采用紫外分光光度计在 200 ~ 400 nm 做全波段扫描,选定最大吸收峰波长 260 nm 作为测定大豆异黄酮浓度的分析波长^[14]。绘制大豆异黄酮质量浓度与吸光度的线性曲线。

将双水相分离后的上、下相各取 1 mL,稀释到一定的倍数,在 260 nm 下测定吸光值,根据标准曲线计算上、下相浓度。

2.5 验证试验

根据正交试验结果选择合适的工艺条件对粗品大豆异黄酮进行浸提纯化。在相同固液比条件下,采用一定质量分数的乙醇溶液直接浸取大豆异黄酮,并与双水相萃取进行比较。

3 结果与讨论

3.1 双水相相图

由浊点法滴定结果计算每个混浊点体系中 K_2HPO_4 和 EtOH 的质量分数,所作相图如图 1 所示。曲线的上方为两相区,下方为均相区,双水相萃取体系必须在两相区选点,如图 1 中 M 点。

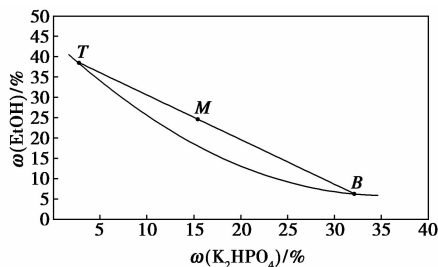


图 1 EtOH/ K_2HPO_4 双水相相图

(上接第 98 页)

[13] Churikov A V, Gamayunova I M, Zapsis K V, et al. Influence of temperature and alkalinity on the hydrolysis rate of borohydride ions in aqueous solution[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 37(1): 335 - 344.

[14] Martelli P, Caputo R, Remhof A, et al. Stability and decomposition of NaBH_4 [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2010, 114(15): 7173 - 7177.

[15] Banus M D, Bragdon R W. Method for preparing borohydrides of alkali metals; US, 2720444 [P]. 1955 - 10 - 11.

[16] Societe des usines chimiques Rohne-Poulenc. Improvements in or relating to the production of potassium borohydride; GB, 717451 [P]. 1954 - 10 - 27.

[17] Churikov A V, Zapsis K V, Ivansichev A V, et al. Temperature-induced transformation of the phase diagrams of ternary systems $\text{NaBH}_4 + \text{NaOH} + \text{H}_2\text{O}$ and $\text{KBH}_4 + \text{KOH} + \text{H}_2\text{O}$ [J]. Journal of Chemical and Engineering Data, 2011, 56: 2543 - 2552.

[18] Šljukić B, Santos D M F, Sequeira C A C, et al. Analytical monitoring of sodium borohydride [J]. Analytical Methods, 2013, 5(4): 829 - 839.

[19] 中国石油和化学工业联合会. HG/T 3584—2011 硼氢化钾 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2012.

[20] 中国石油和化学工业协会. HG/T 3585—2009 工业硼氢化钠 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2010.

[21] Brown J B, Svensson M. The Stability of Potassium borohydride in alkaline solutions [J]. Journal of the American Chemical Society, 1957, 79(15): 4241 - 4242. ■

3.2 双水相体系的上、下相组成分析

以图1所示的M点对应的双水相体系为例,其上相组成用T点表示,下相组成用B点表示。采用

表2 EtOH/K₂HPO₄ 双水相上下相组成 %

编号	M (K ₂ HPO ₄)	M (EtOH)	T (K ₂ HPO ₄)	T (EtOH)	B (K ₂ HPO ₄)	B (EtOH)
1	15	15	15.0	15.0	— ^①	— ^②
2	20	15	7.1	26.2	29.2	7.0
3	25	15	2.3	31.6	36.0	7.0
4	30	15	0.5	48.3	40.2	3.5
5	15	20	7.8	26.3	29.8	7.0
6	20	20	2.8	38.6	34.0	4.8
7	25	20	1.0	46.5	40.0	3.5
8	30	20	0.2	61.5	42.7	2.3
9	15	25	3.3	38.1	33.3	4.5
10	20	25	1.1	48.0	37.4	3.8
11	25	25	0.3	55.4	43.7	2.0
12	30	25	0.0	75.9	43.5	2.0
13	15	30	1.7	43.3	42.6	2.3
14	20	30	0.6	54.6	41.3	3.0
15	25	30	0.2	74.1	39.9	3.5
16	30	30	0.0	85.3	46.0	0.5

注:①②由于选取的第1个体系下相极少,分离意义不大,故第1组数据暂不计入。

烘干法测得上、下相K₂HPO₄的质量分数分别为T(K₂HPO₄)和B(K₂HPO₄),并从相图中读出T点和B点对应的乙醇质量分数T(EtOH)和B(EtOH)。正交试验的双水相体系上、下相组成如表2所示。

3.3 正交试验结果分析

为了研究不同双水相体系对分离效果的影响,采用99%的大豆异黄酮为正交试验分离对象,分别测定双水相体系上、下相中大豆异黄酮的浓度及上、下相体积。结果表明,所有的双水相体系中大豆异黄酮都分配在上相,因此正交试验以上相中大豆异黄酮的收率作为评价指标分析双水相分离效果,结果如表3所示。

由表3中R可知,影响大豆异黄酮萃取收率的因素依次为:时间 > K₂HPO₄质量分数 > 乙醇质量分数 > 温度,根据正交试验得出最优条件为25%乙醇和25%K₂HPO₄组成的双水相体系在35℃下萃取30min,上相收率达到98.47%。表明大豆异黄酮固体中的有效成分几乎都溶于该双水相体系的上相,萃取效率很高。

表3 正交试验设计与结果分析

编号	A	B	C	D	大豆异黄酮上相收率 Y/%
1	1	1	1	1	— ^③
2	1	2	2	2	78.16
3	1	3	3	3	96.41
4	1	4	4	4	91.54
5	2	1	2	3	75.30
6	2	2	1	4	83.61
7	2	3	4	1	94.35
8	2	4	3	2	91.06
9	3	1	3	4	97.00
10	3	2	4	3	95.12
11	3	3	1	2	98.47
12	3	4	2	1	85.84
13	4	1	4	2	92.36
14	4	2	3	1	92.94
15	4	3	2	4	94.98
16	4	4	1	3	96.27
K ₁	3.549	3.529	3.712	3.641	
K ₂	3.443	3.498	3.343	3.600	
K ₃	3.764	3.842	3.774	3.631	
K ₄	3.766	3.647	3.734	3.671	
k ₁	88.70%	88.22%	92.78%	91.04%	
k ₂	86.08%	87.46%	83.57%	90.01%	
k ₃	94.10%	96.05%	94.35%	90.78%	
k ₄	94.14%	91.18%	93.34%	91.78%	
R	8.02%	8.59%	10.78%	1.77%	

注:③由于下相体积极少,双水相分相不明显,故结果不计入。

由正交分析可以发现,萃取温度的影响很小,因此考虑到操作方便和节约能耗,最终选择的最佳萃取条件为:25%EtOH/25%K₂HPO₄双水相体系,萃取温度调整为室温(20℃),萃取时间为30min。分别用99%的大豆异黄酮和粗品大豆异黄酮验证上述分离体系的分离效果,结果如表4所示。结合表2的双水相组成可以发现,配制最佳双水相体系需消耗无水乙醇5g,双水相总体积17mL,其中上相中乙醇的质量分数为55.4%,K₂HPO₄的质量分数为0.3%;下相中乙醇的质量分数为2%,K₂HPO₄的质量分数为43.7%。由于大豆异黄酮都集中在上相,而上相的主要成分是乙醇,因此,为了进一步对

比双水相萃取和单纯采用乙醇溶液浸提效果的差异,在相同的固液比条件下,分别用双水相萃取时消耗的等质量无水乙醇配成的溶液(乙醇质量分数为 32%)和双水相萃取时上相等质量分数(55.4%)的乙醇溶液萃取分离大豆异黄酮,并与双水相萃取效果相对照,结果如表 4 所示。

表 4 双水相体系与乙醇溶液萃取大豆异黄酮的对照

R	K	质量分数为 32% 乙醇溶液		质量分数为 55.4% 乙醇溶液				
		C/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Y/ %	C/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Y/ %	C/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Y/ %	
		99% 大豆异黄酮	1.20	409	1104	97.0	495	85.0
粗品大豆异黄酮	1.17	259	1013	96.8	429	80.6	502	94.3

注:双水相体系组成为 25% EtOH/25% K_2HPO_4 ,所有萃取条件均为 20℃ 固液混合后静置 30 min。

由表 4 可以看出,最佳双水相体系 25% EtOH/25% K_2HPO_4 在相同的萃取时间 30 min,萃取温度由 35℃ 降为 20℃ 时,对于 99% 大豆异黄酮的萃取收率由 98.47% 降为 97.0%,虽然大豆异黄酮略有损失,但能耗降低,更利于实际应用,因此该萃取工艺可行性更好。利用同样的萃取条件分离粗品大豆异黄酮(质量分数 < 90%),结果表明,杂质的存在虽然会对分配系数 K 值有所影响,但上相中大豆异黄酮的萃取收率仍然达到 96.8%,可见对于粗品大豆异黄酮采用双水相萃取可以达到理想的精制提纯效果。

在相同固液比条件下,以双水相体系消耗的等质量无水乙醇配制的溶液(质量分数为 32%)浸提大豆异黄酮固体,其萃取收率和萃取液中大豆异黄酮的质量浓度都远低于双水相体系。而采用上相等质量分数(55.4%)的乙醇溶液直接浸取大豆异黄酮固体时,大豆异黄酮的萃取收率也略低于双水相萃取,但差别较小。这主要是由于大豆异黄酮在乙醇中的溶解度更大。实验证明,大豆异黄酮固体在质量分数 > 50% 的乙醇溶液中才可以完全溶解。随着乙醇质量分数的降低,大豆异黄酮的浸提收率随之下降。然而采用质量分数为 55.4% 的乙醇溶液直接浸提大豆异黄酮时,尽管萃取收率接近双水相萃取,但消耗的无水乙醇用量为双水相萃取时乙醇用量的 1.7 倍,显然采用双水相萃取溶剂消耗少,成

本更低。此外,从萃取液中大豆异黄酮的质量浓度来看,双水相萃取具有明显的浓缩作用,更有利于溶剂的回收。

4 结论

采用乙醇/磷酸氢二钾双水相体系浸提大豆异黄酮固体,不仅在萃取收率上较乙醇溶液浸提占有优势,同时能起到很好的浓缩作用。理想的萃取条件为:25% EtOH/25% K_2HPO_4 双水相体系室温(20℃)萃取 30 min,大豆异黄酮在上相的萃取收率约为 97.0%。利用双水相浸提大豆异黄酮是一种集分离和浓缩为一体的高效、低能耗、操作简便、成相物质便于回收的绿色分离技术,有望在天然黄酮类物质分离领域展现良好的应用前景。

参考文献

- [1] 彭游,余盛禄. 大豆异黄酮提取研究最新进展[J]. 大豆科学, 2012,31(2):320-323.
- [2] 袁建,鞠兴荣,王立峰,等. 水媒法提取大豆异黄酮的工艺优化研究[J]. 中国油脂,2006,31(12):52-55.
- [3] 郭睿,姚占静,张春生,等. 大豆异黄酮提取工艺研究[J]. 陕西科技大学学报,2008,26(1):68-71.
- [4] 于海莲. 微波辅助乙醇提取大豆异黄酮的研究大豆异黄酮提取研究最新进展[J]. 大豆科学,2011,30(1):144-146.
- [5] 王丽娟,张永忠,张丽丽. 超声波辅助法提取大豆酱渣饼中大豆异黄酮[J]. 中国油脂,2009,34(5):52-55.
- [6] 井乐刚,张永忠. 用大孔树脂从大豆乳清中纯化大豆异黄酮的一种有效方法[J]. 化工学报,2006,57(5):1209-1214.
- [7] 张凤清,解丛林,张松龄. 高压浸提法提取大豆异黄酮工艺[J]. 食品工业科技,2006,27(1):113-114.
- [8] Shi J J, Liu Y Z, Yu H B. Technology and application of new type solvent extraction[J]. Journal of Chemical Industry & Engineering, 2005,26(5):15-18.
- [9] 谭平华,林金清,陈培钦,等. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}-\text{K}_2\text{HP}_4-\text{H}_2\text{O}$ 三元体系的溶解度和液液相平衡[J]. 福州化工,2002,(4):45.
- [10] 谭平华,林金清,肖春妹,等. 双水相萃取技术研究进展及应用[J]. 化工生产与技术,2003,10(1):19-24.
- [11] 辜鹏. 无机盐/低分子有机物双水相体系的研究及其在应用[D]. 湘潭:湘潭大学化工学院,2008.
- [12] 谭志坚. 双水相萃取体系在分离纯化芦荟活性成分的应用研究[D]. 长沙:中南大学化工学院,2013.
- [13] 杨善升,陆文聪,包伯荣. 双水相萃取技术及其在应用[J]. 化学工程师,2004,4:37-40.
- [14] 马陶陶,张群林,李俊. 中药总黄酮的含量测定方法[J]. 安徽医药,2007,11(11):1030-1032