

表面活性剂协同微波 提取大豆黄酮的研究

王纯荣, 郑国栋, 颜贤仔

(江西农业大学 食品科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 研究表面活性剂协同微波辐射提取大豆豆荚中总黄酮的工艺条件。在单因素试验的基础上, 选择微波提取时间、液料比和十二烷基二甲基甜菜碱(BS - 12) 含量为随机因素进行三因素三水平的 Box - Behnken 中心组合设计, 采用响应面法(RSM) 分析 3 个因素对响应值的影响。结果表明, 提取大豆豆荚黄酮的最佳工艺条件为: BS - 12 用量为 4.4 g/L、微波提取时间 4 min 20 s、液料比为 26 (mL: g)、微波功率为 400 W。在此条件下, 大豆豆荚黄酮提取率达到 9.36%, 与理论预测值基本吻合, 说明响应面法优化表面活性剂协同微波提取大豆豆荚总黄酮可行。

关键词: 表面活性剂; 微波提取; 豆荚; 黄酮; 响应面分析

中图分类号: TS214.2 文献标志码: A 文章编号: 1000 - 2286(2011) 01 - 0151 - 06

A Study on the Extraction of Flavonoids in Soybean Pods with Surfactant and Microwave

WANG Chun-rong, ZHENG Guo-dong, YAN Xian-zai

(College of Food Science and Engineering, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: Surfactant and microwave extraction was applied to the extraction of flavonoids from soybean pods. Response surface methodology (RSM) was applied to optimizing the extraction conditions. Based on the signal factor test, microwave power, the ratio of liquid to solid and dodecyl dimethyl betaine (BS - 12) mass ratio, were chosen as casual factors, and a three - factor and three - level Box - Behnken central composite design was performed to attain the highest weighed value of yields of soybean pods flavonoids. RSM method was used to investigate the three factors impacting the response value of yields of soybean pod flavonoids. The optimal microwave extraction assisted with surfactant conditions was determined as follows: extraction time 4 min 20 s, ratio of liquid to solid 26 (mL: g), dodecyl dimethyl betaine 0.44% and microwave power 400 W. Under these conditions, the extraction ratio of soybean pod flavonoids was 9.36%, which was consistent with the predicted values. These results demonstrate the validity of microwave extraction assisted with surfactant process for flavonoids in soybean pods.

Key words: surfactant; microwave extraction; soybean pods; flavonoids; responsive surface analysis

黄酮类化合物属于多酚类物质, 广泛存在于高等植物及以植物为原料的食品中, 是植物在长期自然选择过程中产生的一些次级代谢的产物。黄酮类化合物作为重要的食品添加剂和营养强化剂, 具有抗

收稿日期: 2010 - 09 - 09 修回日期: 2010 - 11 - 17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000820) 和江西农业大学博士启动基金项目(2313)

作者简介: 王纯荣(1975—), 男, 博士, 讲师, 主要从事生物化工研究, E-mail: erwang07@126.com。

氧化、抗衰老、抗骨质疏松和抗肿瘤等多种生物活性^[1-5]。目前,有关黄酮类化合物的研究较多,然而受其原料价格影响,黄酮类化合物的开发利用并不顺利^[6-7]。

大豆具有较高的营养价值,作为黄酮化合物的重要来源,在我国已经有5 000多年的种植历史。近年来,人们发现大豆豆荚中含有丰富的黄酮类化合物^[8-9]。大豆豆荚作为大豆子实脱壳后的副产品,在农村常作为废物丢弃,其来源非常丰富。这一发现可为大豆黄酮化合物的开发利用提供廉价充足的原料,并对大豆产品深加工和环境保护具有重要意义。

目前,有关大豆豆荚黄酮提取工艺的研究尚处于起步阶段^[10-11],使用的提取溶剂以乙醇为主,花费时间较长^[10],成本较高^[8],这一现状对于大豆豆荚黄酮的大规模开发利用十分不利。近年来,有部分科研工作者利用表面活性剂的增溶作用^[12-13],进行表面活性剂协同提取天然成分^[14-18]。然而,目前尚未见表面活性剂协同微波辐射提取大豆豆荚黄酮的相关研究报道。本研究利用表面活性剂辅助微波提取大豆豆荚黄酮,考察表面活性剂、微波和液料比等因素对黄酮提取率的影响,并通过响应面法对提取工艺进行优化。

1 材料与方法

1.1 原料和仪器

原料:大豆豆荚采购自黑龙江省虎林市八五〇农场,45℃下干燥至恒重,用粉碎机粉碎,过60目筛后备用。芦丁标准品:购自中国医药(集团)上海化学试剂公司;其余药品购自天津市永大化学试剂开发中心;亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇等均为分析纯;十二烷基硫酸钠(SDS)、吐温80(Tween 80)、十二烷基二甲基甜菜碱(BS-12)、十二烷基三甲基氯化铵(DTAC)等为化学纯。

仪器:UV754N型紫外-可见分光光度计;KD23B-QQ2型美的微波炉;RE-52AA型旋转蒸发器。

1.2 方法

1.2.1 提取工艺 取适量的大豆豆荚粉末,加入一定质量分数的表面活性剂水溶液,微波法提取。提取液趁热抽滤,收集液体,滤渣重复该过程;合并浸提液,减压蒸馏浓缩,然后在20℃、鼓风条件下干燥,得黄酮物质。工艺流程如下:豆荚→粉碎→微波提取→过滤→浓缩→干燥→黄酮。

1.2.2 测定方法 提取液中黄酮采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定^[10]。在最大吸收波长503 nm处测定提取液吸光度,确定所含黄酮质量浓度。因在一定范围内,提取液中黄酮质量浓度与其吸光度值呈良好的线性关系,为简便起见,试验直接以不同工艺条件下提取液中黄酮的吸光度为指标,进行大豆豆荚粉末中黄酮提取率的计算。相关的标准曲线回归方程及参数如表1所示。

表1 芦丁-表面活性剂(0.1%)溶液的标准曲线回归方程和参数

Tab.1 Rutin-surfactant (0.1%) solution of the standard curve regression equation and parameters

溶液 Solutions	标准曲线公式 Standard curve regression equations	K	R ²
芦丁-SDS	$y = 0.0344x - 0.0004$	0.0344	0.9983
芦丁-Tween 80	$y = 0.0939x + 0.0057$	0.0939	0.9994
芦丁-BS-12	$y = 0.8184x + 0.0016$	0.8184	0.9973
芦丁-DTAC	$y = 0.2231x + 0.0033$	0.2231	0.9992

1.2.3 大豆豆荚类黄酮提取率的计算 在不同的提取工艺条件下,分别多次从提取大豆豆荚粉末,直到提取液中检测不到黄酮为止。收集各次提取液,并测定其体积 V_i 和吸光度 A_i ,然后合并各次提取液,测出其总体积 $V_{\text{总}}$ 和吸光度 $A_{\text{总}}$,则第*i*次提取的提取率计算公式为:

$$\text{提取率} = [(A_i \times V_i) / (A_{\text{总}} \times V_{\text{总}})] \times 100\% \quad (1)$$

试验均以不同提取条件下第1次提取的黄酮提取率为考察指标,进行不同提取条件下提取率的比较及工艺优化。

1.2.4 单因素水平实验验证表面活性剂增溶作用 以水为提取液,选取5个因素(表面活性剂种类和质量浓度、微波功率、提取时间、液料比)进行研究,按照1.2.1方法提取大豆豆荚黄酮,并计算得率,然后在单因素试验的基础上进行RSM法设计。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 表面活性剂的选择 取等量的大豆豆荚粉,分别用 1 g/L 的不同种类的表面活性剂 Tween 80、SDS、DTAC 和 BS-12,在相同微波功率(400 W)下提取 4 min。按 1.2.3 的方法测定吸光度,并计算提取率。由表 2 可知,同样条件下,加入表面活性剂后黄酮提取率有明显提高。这是因为表面活性剂特有的双亲分子结构在黄酮提取过程中降低了豆壳颗粒与溶剂之间的界面张力,从而使溶剂分子更易渗入颗粒中,加快了内扩散过程。同时,由于黄酮属大分子植物类色素,其分子结构中的酚羟基多与糖类结合成苷,相对分子量较大,表面活性剂对这一类大分子色素具有增溶作用,因此表面活性剂与微波在提取黄酮过程中具有协同效应,能显著地提高提取效果。试验所试的几种表面活性剂中,以 SDS 提取黄酮效率最高,然而 BS-12 毒性较小,综合考虑选择 BS-12 作为本工艺研究中使用的增溶剂。

表 2 不同表面活性剂的提取效果

Tab. 2 Effects of surfactant on the extraction yield of soybean pods flavonoids

表面活性剂种类 Surfactant	Tween 80	SDS	DTAC	BS-12	H ₂ O
豆荚黄酮提取率 Y/%	4.05	4.62	3.83	4.51	3.02

2.1.2 提取时间对黄酮提取率的影响 取等量的大豆豆荚粉,加入 1 g/L 的 BS-12 水溶液,在微波功率(400 W)下提取不同的时间。由图 1 可以看出,随着提取时间的增加,得率呈先递增后减小的趋势。原因可能是微波提取可以把能量直接传到细胞内部,快速加热,有利于黄酮溶出,但长时间加热不利于黄酮稳定,导致得率下降。综合考虑选择提取时间 3~5 min 为进一步优化范围。

2.1.3 微波功率对黄酮提取率的影响 取等量的大豆豆荚粉,加入 1 g/L 的 BS-12 水溶液,在不同微波功率下提取 4 min。由图 2 可以看出,随着微波功率增加,豆荚黄酮提取率呈现先递增后减小的趋势,当微波功率为 400 W 左右达到最大值。当微波功率较小时,提取不完全;当微波功率过大时,又会引起黄酮类化合物结构被氧化破坏,使提取率受到影响。综合考虑选取微波功率 400 W 进行优化。

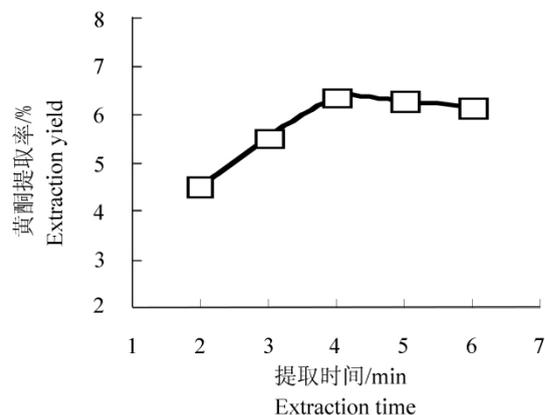


图 1 提取时间对豆荚黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effects of extraction time on the extraction yield of soybean pods flavonoids

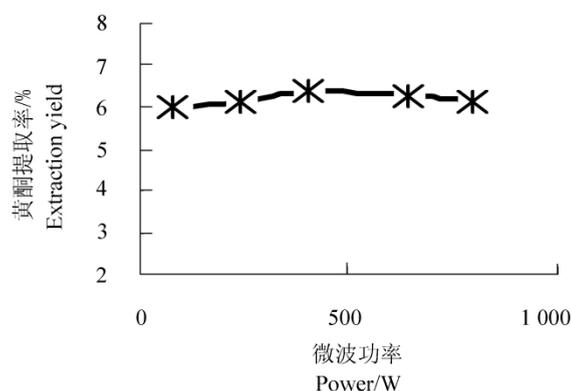


图 2 微波功率对豆荚黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effects of microwave on the extraction yield of soybean pods flavonoids

2.1.4 液料比对黄酮提取率的影响 取等量的大豆豆荚粉,加入 1 g/L 的 BS-12 水溶液,在不同的液料比条件下,微波(400 W)提取 4 min。由图 3 可以看出,随着液料比的增加,黄酮提取率呈现先迅速增加后缓慢减小的趋势。当溶剂量较少时,随着溶剂增加,豆荚粉末可以被表面活性剂充分增溶,所以黄酮提取率会随着溶剂增加而明显提高;但在该试验条件下,大部分黄酮已经进入提取液,继续增加溶剂量,可能会使豆荚中部分杂质进入提取液中,使光谱测定结果偏低。本着节约溶剂使用量的原则,选择液料比 10~30 作为提取豆荚黄酮的进一步考察范围。

2.1.5 BS-12 用量对黄酮提取率的影响 取等量的大豆豆荚粉,分别加入不同质量浓度的 BS-12 水溶液,微波(400 W)提取 4 min。由图 4 可知,初始阶段,随着 BS-12 用量增大,黄酮的提取量也随之提高,这可能是由于 BS-12 用量的增加导致形成的胶束增多,从而对黄酮的增溶作用增强。然而,当 BS

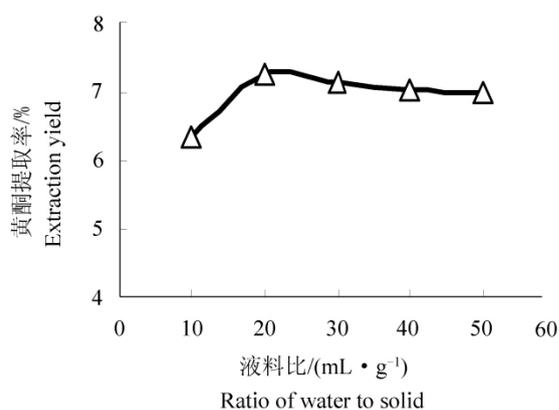


图3 液料比对豆荚黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effects of the ratio of water to solid on the extraction yield of soybean pods flavonoids

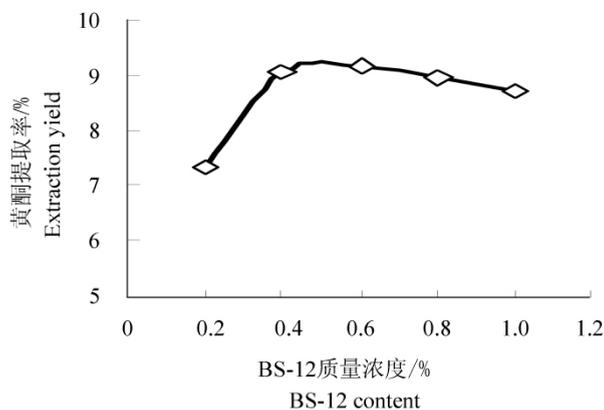


图4 BS-12用量对豆荚黄酮提取率的影响

Fig. 4 BS-12 content on the extraction yield of soybean pods flavonoids

-12 浓度继续增加,对黄酮的提取率反而有微弱下降。这一方面可能是由于大部分黄酮已经被胶束提取出来,再增加 BS-12 效果不明显;另一方面可能是由于部分杂质进入提取液,使光谱测定结果偏低。综合两方面因素,本着节约试剂使用量的原则,选择 BS-12 用量为 2~6 g/L 作为提取豆荚黄酮的考察条件。

2.2 响应面法优化豆荚黄酮提取工艺

为优化 BS-12 辅助微波提取豆荚黄酮的工艺条件,根据 Box-Behnken 试验设计原理^[19],在单因素试验基础上,选取微波提取时间(X_1)、液料比(X_2)和 BS-12 质量浓度(X_3)这 3 个对黄酮提取率影响较大的因素进行提取工艺响应面分析,其具体试验方案及结果分别见表 3 和表 4。

2.2.1 响应面分析方案及试验结果 响应面分析方案和试验结果见表 3。

2.2.2 模型的建立及其显著性检验 利用 Design-Expert 7.0 软件对表 3 中试验数据进行二次多项式逐步回归拟合,得到的数学模型为:

表3 Box-Behnken 试验因素水平及设计方案和结果

Tab. 3 Box-Behnken experimental design factors, outcome levels and results

试验号 Experiment No.	X_1 /min	X_2 /(mL: g)	X_3 /%	Y/%
1	0(4)	0(20)	0(0.4)	9.05
2	1(5)	1(30)	0(0.4)	8.67
3	0(4)	-1(10)	1(0.6)	7.71
4	0(4)	0(20)	0(0.4)	9.07
5	-1(3)	-1(10)	0(0.4)	5.89
6	1(5)	0(20)	-1(0.2)	7.88
7	0(4)	1(30)	-1(0.2)	8.43
8	1(5)	0(20)	1(0.6)	7.87
9	1(5)	-1(10)	0(0.4)	7.19
10	0(4)	0(20)	0(0.4)	9.10
11	-1(3)	1(30)	0(0.4)	6.96
12	0(4)	1(30)	1(0.6)	9.17
13	0(4)	0(20)	0(0.4)	9.11
14	-1(3)	0(20)	-1(0.2)	6.49
15	0(4)	0(20)	0(0.4)	9.06
16	0(4)	-1(10)	-1(0.2)	6.35
17	-1(3)	0(20)	1(0.6)	6.97

$$Y = 9.08 + 0.66X_1 + 0.76X_2 + 0.32X_3 + 0.10 X_1X_2 - 0.12 X_1X_3 - 0.16 X_2X_3 - 1.26 X_1^2 - 0.64 X_2^2 - 0.52 X_3^2 \quad (2)$$

模型的可靠性可从方差分析及相关系数来考察(表 3)。当“ $P > F$ ”值小于 0.05 时,即表示该项指标显著。结果表明,对黄酮提取率所建立的二次多项模型具有高度显著性($P < 0.000 1$);失拟项 $P < 0.000 1$,极显著。模型的调整确定系数 $R^2 = 0.940 7$,该模型能解释 94.07% 响应值的变化,因而该模型拟合程度比较好,试验误差小,可以用此模型对表面活性剂协同微波提取大豆黄酮进行分析和预测。

模型方程回归系数及其显著性检验同样见表 3。结果表明:模型一次项 X_1 、 X_2 和 X_3 均极显著;二次项 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 同样极显著;交互项不显著,因此各个具体试验因素与响应值都不是线性关系。

表 4 回归统计分析结果

Tab. 4 Regression analysis

方差来源 Sources	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F	$P > F$
X_1	3.51	1	3.51	47.08	0.000 2
X_2	4.64	1	4.64	62.16	0.000 1
X_3	0.83	1	0.83	11.07	0.012 6
X_1^2	6.65	1	6.65	89.13	<0.000 1
X_1X_2	0.042	1	0.042	0.56	0.477 3
X_1X_3	0.06	1	0.06	0.80	0.399 5
X_2^2	1.75	1	1.75	23.41	0.001 9
X_2X_3	0.096	1	0.096	1.29	0.293 7
X_3^2	1.13	1	1.13	15.21	0.005 9
模型 Model	19.60	9	2.18	29.20	<0.000 1
一次项 Linear	8.97	3	2.99	3.49	0.047 1
二次项 Quadratic	10.43	3	3.48	46.61	<0.000 1
交互项 Interactions	0.20	3	0.066	0.06	0.979 5
失拟项 Lack of fit	0.52	3	0.17	258.42	<0.000 1
纯误差 Pure error	0.002 68	4	0.000 6 7		
残差 Residual	0.52	7	0.075		
总和 Total	20.12	16			

2.2.3 提取工艺的响应曲面分析与优化 通过模型方程所作的响应曲面图,可直观地描述各因素对响应值(黄酮提取率)的影响和各个因素间的交互作用。由图 5 可以看出,响应曲面均是开口向下的凸面,等高线近似为圆形,它们的中心位于所考察区域内,说明在考察的区域范围内存在响应值的极大值,

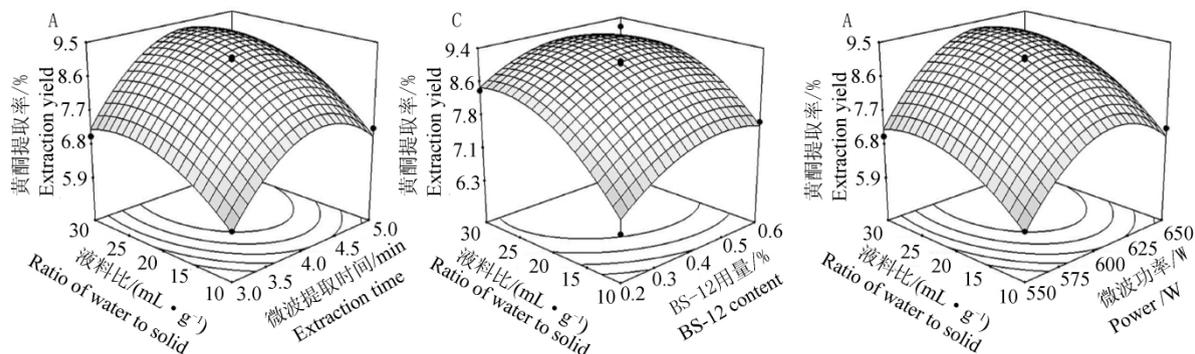


图 5 微波提取时间、液料比和 BS-12 质量浓度对大豆黄酮提取率影响的响应曲面和等高线

Fig. 5 Responsive surfaces and contour showing the effects of microwave extraction time, ratio of water to solid and BS-12 content on the extraction yield of soybean pods flavonoids

同时响应面为高度卷曲的曲面,即简单的一次线性方程难以解析。通过软件分析,表面活性剂辅助微波提取豆荚黄酮的最佳条件为微波提取时间 4.3 min、液料比为 25.9 (mL:g) 和表面活性剂(BS-12)质量浓度为 4.4 g/L。在此条件下黄酮得率可达 9.43% $P=0.86$ 。

为检验 RSM 法的可靠性,采用上述最优提取条件进行豆荚黄酮的提取试验,同时考虑到实际操作的情况,将豆荚黄酮最佳提取条件修正为微波提取时间为 4 min 20 s、表面活性剂浓度为 4.4 g/L、液料比为 26(mL:g)、微波炉功率为 400 W,实际测得的黄酮得率为 9.36%,与理论预测值基本吻合。因此,采用响应曲面法优化得到的表面活性剂微波提取条件参数基本准确可靠,具有一定的实用价值。

3 结 论

通过试验探讨了表面活性剂协同微波提取大豆豆荚黄酮的工艺条件,结果表明,该法对于黄酮提取,具有效率高、时间短的特点,是较理想的一种提取新工艺。通过单因素和响应曲面分析,得到胶束辅助微波法提取豆荚黄酮的最佳工艺条件为:微波提取时间 4 min 20 s、液料比为 26 (mL:g)、BS-12 用量为 4.4 g/L、微波功率为 400 W。在此条件下黄酮提取率可达 9.36%。

参考文献:

- [1] Mortensen A, Kulling S E, Schwartz H, et al. Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, 53 (S2): 266-309.
- [2] Peterson C, Schnell J, Kubas K, et al. Effects of soy isoflavone consumption on bone structure and milk mineral concentration in a rat model of lactation-associated bone loss [J]. *European Journal of Nutrition*, 2009, 48(2): 84-91.
- [3] Tracy A, Ryan B, Borchers J, et al. Soy isoflavones modulate immune function in healthy postmenopausal women [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, 83: 1118-1125.
- [4] Ming-yen J, Cheng-chun C. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC14715 [J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(5): 586-591.
- [5] Kovicich N, Saleem A, Arnason J T, et al. Functional characterization of a UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase from the seed coat of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(11): 1253-1263.
- [6] 赵二劳, 赵小花, 范建凤. 金莲花黄酮微波辅助提取及其抗氧化性 [J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(1): 81-85.
- [7] 李核, 李攻科, 张展霞. 密闭系统中微波辅助萃取机制探讨 [J]. *分析测试学报*, 2004, 23(5): 12-16.
- [8] 王桃云, 陈鹏, 董五科, 等. 超声波提取豆荚总黄酮优化工艺与抗氧化性研究 [J]. *中国粮油学报*, 2009, 24(6): 114-117.
- [9] Takehiko Uesugi, Yutaka Fukui Y Y. Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal Japanese women: a four-week study [J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2002, 21(2): 97-102.
- [10] 赵卫星, 任子君, 孙治强 等. 大豆荚壳总类黄酮提取及纯化研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2008, 30(4): 328-322.
- [11] Kamaljit Vilku, Raymond Mawson, Lloyd Simons D B. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry——A review [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, 9(2): 161-169.
- [12] Chanukya B S, Rastogi N K. Extraction of alcohol using emulsion liquid membrane consisting of paraffin oil as an organic phase and lecithin as a surfactant [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2010, 85(2): 243-247.
- [13] Huie W J, H A C W. Salting-out surfactant extraction of porphyrins and metalloporphyrin from aqueous non-ionic surfactant solutions [J]. *Talanta*, 1992, 39(5): 487-492.
- [14] 赵二劳, 范建凤, 张小燕. 表面活性剂增效微波提取沙棘叶黄酮的研究 [J]. *日用化学工业*, 2009, 39(1): 22-24.
- [15] Kittisak Kiathest, Motonobu Goto, Mitsuru Sasaki, et al. Extraction and concentration of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by non-ionic surfactant solution [J]. *Separation and Purification Technology*, 2009, 66(1): 111-117.
- [16] Chen Sun Y X A H L. Microwave-assisted micellar extraction and determination of glycyrrhizic acid and liquiritin in licorice root by HPLC [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2007, 15(4): 474-477.
- [17] 黎或. 表面活性剂协同微波提取紫背天葵色素的研究 [J]. *分析测试学报*, 2005, 24(4): 95-97.
- [18] 杨铭, 余林. 表面活性剂——微波协同提取灯心草总黄酮的研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2009(6): 95-99.
- [19] 陈海华, 鲁军. 响应曲面法优化鳕鱼皮明胶的微波辅助提取工艺 [J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(8): 168-174.