

复合有机酸催化大豆异黄酮糖苷水解成苷元的工艺研究

于丽颖¹, 罗亚楠¹, 郑凤梅²

(1. 吉林化工学院 化学与制药工程学院, 吉林 吉林 132022;

2. 吉化炼油厂, 吉林 吉林 132021)

摘要:通过单因素实验和正交实验,以水解率为评价指标,研究复合有机酸催化大豆异黄酮糖苷水解成苷元的工艺参数。结果表明,最佳水解工艺为:反应温度 135 ℃,反应时间为 160 min,复合有机酸配比(苹果酸:柠檬酸)为 4:3,水解率达到 97.0% 以上。复合有机酸催化水解工艺绿色环保,水解产物无需分离,可直接作为保健食品原料,具有较高的应用价值。

关键词:异黄酮糖苷;异黄酮苷元;复合有机酸;水解

中图分类号:TS 201.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2016)05-0035-03

Research on hydrolysis of soybean isoflavone glycosides catalyzed with complex organic acid

YU Li - ying¹, LUO Ya - nan¹, ZHENG Feng - mei²

(1. College of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemistry Technology, Jilin Jilin 132022;

2. Jilin Petrochemical Refinery, Jilin Jilin 132021)

Abstract:The parameters of hydrolysis of soybean isoflavone glycosides catalyzed with complex organic acid were researched by single - factor experiment and orthogonal experiment with hydrolysis rate as the evaluation index. The results showed that the optimal hydrolysis parameters was reaction temperature 135 ℃, reaction time 160 min, ratio of composite acid (malic acid: citric acid) 4:3, hydrolysis rate can reach to above 97.0%. The hydrolysates can be used in health food as raw material without been separated. The hydrolysis process is green environmental protection with application value.

Key words:isoflavone glycosides; isoflavone aglycones; complex organic acid; hydrolysis

近年来,大豆食品的保健功能得到了普遍认可,流行病学和临床实验都证明大豆异黄酮不但能够有效地降低患各种癌症的风险,还能够预防人体内激素分泌的紊乱^[1],甚至将其当作雌激素的天然替代品被广泛地用于治疗女性更年期综合症。研究发现,目前市售大豆异黄酮保健品中主要含有糖苷型异黄酮,这种分子较大,需要在体内消化酶作用下转化为苷元型异黄酮被吸收,由于个体之间差异,转化效率有很大不同,若体外能够先水解,后服用,消除这种个体之间的差异,能够更好地发挥异黄酮的生物活性^[2-4]。

无机酸催化大豆异黄酮糖苷水解成苷元的方法中最常用的酸是硫酸和盐酸^[5],由于酸性较强,副反应较大,产品后处理麻烦,体外水解应用受阻。酶也可以催化水解^[6],但成本高,同样不易于工业化应用。

有机酸柠檬酸和苹果酸可以参与人体正常代谢,本文采用有机复合酸为催化剂,将大豆异黄酮糖苷水解成更易吸收的异黄酮苷元,水解产物无需分离,可以直接用于保健食品原料,能够更好地发挥异黄酮保健功效,弥补了现有工艺中的技术缺陷,为大豆异黄酮糖苷体外水解工艺产业化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆异黄酮糖苷标准品:染料木苷、大豆苷、黄豆苷,购于天津马克生物有限公司。大豆异黄酮糖苷型提取物含量为 91.64%。柠檬酸和苹果酸均为分析纯;所用甲醇为色谱纯。

1.2 主要仪器

北京医用天平厂天平;KQ-250VDE 型双频数控超声清洗器;昆山市超声仪器有限公司;CS101-3 型电热鼓风干燥箱;重庆实验设备厂;高效液相色谱仪:大连依利特分析仪器有限公司。

收稿日期:2016-03-20

基金项目:吉林省教育厅(2014346)

作者简介:于丽颖,1967 年出生,女,教授。

通讯作者:罗亚楠,1979 年出生,女,博士。

1.3 实验步骤

称取原料大豆异黄酮 30 mg,置于锥形瓶中,加入 3 mL 的乙醇使其溶解,再加入一定量的苹果酸和柠檬酸混合液,超声至溶液澄清,将反应液转移到高压釜中,关闭高压釜,在一定的压力和温度下水解反应,反应结束后将高压釜冷却到室温,用移液枪移取 1 mL 反应液至容量瓶中,用甲醇定容至刻度线,摇匀,通过 HPLC 检测反应前后各自糖苷的含量,计算水解率:

大豆异黄酮糖苷水解率 = 水解前后大豆异黄酮糖苷含量之差 / 水解前大豆异黄酮糖苷含量 × 100%。

1.4 高效液相色谱法测定反应前后糖苷的含量

1.4.1 HPLC 色谱条件

色谱柱: ODS - C18 柱 (4.6 × 250 mm); UV230 紫外检测器。流动相: 0 ~ 10 min, 30% ~ 35% 甲醇; 10 ~ 20 min, 35% ~ 40% 甲醇; 20 ~ 30 min, 40% ~ 55% 甲醇; 30 ~ 40 min, 55% ~ 65% 甲醇。检测波长: 254 nm; 柱温: 25 °C; 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μL。

1.4.2 标准曲线的绘制

分别准确称取标准品黄豆黄苷 1.942 mg、大豆苷 3.038 mg、染料木苷 1.519 mg,用甲醇分别定容至 25 mL 容量瓶中精密吸取一定量标准溶液,用甲醇稀释配制成系列标准溶液,按照 1.4.1 分析色谱条件测定标准溶液,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,对各组分浓度与峰面积进行回归分析,得回归方程分别为:

大豆苷: $A = 85.532C + 65.878, R = 0.999 0$

黄豆黄苷: $A = 76.436C - 42.541, R = 0.998 2$

染料木苷: $A = 99.995C + 12.048, R = 0.999 5$

式中: A 为糖苷的峰面积, C 为糖苷的浓度,线性范围是 5 ~ 60 μg/mL。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 不同配比的复合酸对大豆异黄酮糖苷水解率的影响

含量为 91.64% 的大豆异黄酮糖苷 30 mg,反应温度为 130 °C,反应时间为 2 h,复合酸用量为 7 mL,改变复合酸的配比,探索不同复合酸的摩尔比对大豆异黄酮糖苷水解率的影响。结果见表 1。

表 1 不同配比复合酸对水解率的影响

苹果酸:柠檬酸 / (mol/mol)	反应温度/°C	时间/min	水解率/%
1:6	130	120	86.72
2:5	130	120	88.82
3:4	130	120	90.57
3.5:3.5	130	120	92.23
4:3	130	120	89.05
5:2	130	120	88.67
6:1	130	120	85.64

实验结果表明,随着苹果酸相对量的提高,大豆异黄酮糖苷的水解率先提高,当苹果酸:柠檬酸 = 3.5:3.5 时,水解率达到最大,为 92.23%。苹果酸为天然果汁的重要成份,与柠檬酸相比酸度更大(酸味比柠檬酸强 20%),但味道柔和(具有较高的缓冲指数),具特殊香味,不损害口腔与牙齿,代谢上有利于氨基酸吸收,不积累脂肪。苹果酸与柠檬酸共用时,可呈现强烈的天然果实风味,为天然有机酸的引入打下基础。因此,在单因素水解反应实验中,复合酸最佳配比为苹果酸:柠檬酸 = 3.5:3.5,为了进一步考察酸配比对大豆异黄酮糖苷水解率的影响,选择 3:4、3.5:3.5、4:3 进行正交实验。

2.1.2 不同反应时间对大豆异黄酮糖苷水解率的影响

含量为 91.64% 的大豆异黄酮 30 mg,苹果酸:柠檬酸 = 3.5:3.5,复合酸用量为 7 mL,反应温度为 130 °C,改变反应时间,探索不同反应时间对大豆异黄酮糖苷水解率的影响。结果见表 2。

表 2 不同反应时间对水解率的影响

反应时间/min	酸配比/(mol/mol)	温度/°C	水解率/%
80	3.5:3.5	130	65.25
100	3.5:3.5	130	74.32
120	3.5:3.5	130	92.23
140	3.5:3.5	130	93.45
160	3.5:3.5	130	95.61
180	3.5:3.5	130	97.19

实验结果表明,随着反应时间的延长,大豆异黄酮的水解率不断增加,反应 3 h 时水解率达到 97% 以上。食用糖苷型大豆异黄酮,人体自身消化酶也能够部分分解,所以大豆异黄酮糖苷水解率达到 90% 更具有实际意义。在单因素水解反应实验中,确定最佳反应时间为 140 min。为了进一步考察反应时间对大豆异黄酮糖苷水解率的影响,选择 120、140、160 min 进行正交实验。

2.1.3 不同反应温度对大豆异黄酮糖苷水解率的影响

含量为 91.64% 的大豆异黄酮 30 mg,苹果酸:柠檬酸 = 3.5:3.5,反应 140 min,改变反应温度,探索不同反应温度对大豆异黄酮糖苷水解率的影响。结果见表 3。

表 3 不同反应温度对水解率的影响

反应温度/°C	时间/min	酸配比/(mol/mol)	水解率/%
110	140	3.5:3.5	52.77
115	140	3.5:3.5	64.50
120	140	3.5:3.5	73.61
125	140	3.5:3.5	82.71

续表

反应温度/℃	时间/min	酸配比/(mol/mol)	水解率/%
130	140	3.5:3.5	93.45
135	140	3.5:3.5	94.18
140	140	3.5:3.5	95.74

从表3中可以得出,随着反应温度的提高,大豆异黄酮糖苷的水解率逐渐提高。在单因素水解反应实验中,将最佳的水解温度确定为130℃,此时水解率为93.45%。为了进一步考察反应温度对大豆异黄酮糖苷水解率的影响,选择反应温度分别为125、130、135℃进行正交实验。

2.2 正交实验

根据单因素实验结果,构建正交实验表,进一步确立水解反应的最佳工艺条件。

2.2.1 正交实验设计

正交实验因素水平设计见表4。

表4 正交因素水平设计

水平	A	B	C
	反应温度/℃	酸配比/(mol/mol)	反应时间/min
1	125	3:4	120
2	130	3.5:3.5	140
3	135	4:3	160

2.2.2 正交实验结果

按正交实验表进行实验,结果见表5。

表5 正交实验结果

实验号	A	B	C	空白	水解率/%
1	1	1	1	1	86.97
2	1	2	2	2	86.13
3	1	3	3	3	89.93
4	2	1	2	3	92.00
5	2	2	3	1	91.58
6	2	3	1	2	93.47
7	3	1	3	2	94.87
8	3	2	1	3	91.21
9	3	3	2	1	97.52
K ₁	263.0	273.84	271.65	276.07	
K ₂	277.1	268.92	275.65	274.47	
K ₃	283.6	280.92	276.38	273.14	
极差	20.6	12.0	4.73		
最优方案	A ₃	B ₃	C ₃		

根据表5实验结果,进行方差分析,见表6。

表6 方差分析

方差来源	Q	f	MS	F	F _{0.01}	F _{0.05}	F _{0.10}	显著性
A	524.8	2	262.4	43.6	99	19	9	**
B	0.6	2	0.3	0.05	99	19	9	
C	157.2	2	78.6	13.1	99	19	9	*
误差	12.3	2	6.0					
总计	694.9	8						

注:**指极显著(P<0.01),*指显著(P<0.05)。

由方差分析表可得,影响因素主次顺序为:A>C>B,即反应温度>反应时间>复合酸配比,三因素的最佳水平组合为A₃B₃C₃,即最佳工艺条件为:反应温度135℃,反应时间为160min,复合酸配比苹果酸:柠檬酸=4:3时,进行实验,实验结果水解率达到97.82%。结果表明,水解温度对大豆异黄酮糖苷的水解效果具有显著影响。

2.3 工艺验证性实验

为考察上述优选工艺的稳定性,按该工艺条件重复提取3次,计算水解率,结果见表7。

表7 正交实验最佳反应条件的平行实验结果

次数	1	2	3
水解率/%	97.00	97.80	96.97

根据三组平行实验测得大豆异黄酮糖苷的水解率分别为97.00%、97.80%、96.97%,平均为97.26%,表明本实验优选的工艺稳定可靠。

3 结论

实验通过复合酸催化方法使糖苷型大豆异黄酮转化为生物活性更高的苷元型大豆异黄酮。在单因素实验的基础上,进行正交实验,进一步探究糖苷型大豆异黄酮水解的最优实验条件。优化后的工艺条件为91.64%糖苷型大豆异黄酮30.0mg,反应温度135℃,反应时间160min,催化剂混合酸的配比(苹果酸:柠檬酸)4:3,该条件下水解率平均达到97.0%以上。

用复合有机酸做催化剂,催化大豆异黄酮糖苷转化成苷元,避免目前工业上采用无机酸、碱等催化水解的弊端,水解产物无需分离直接用于功能性食品。本文为大豆异黄酮糖苷体外转化苷元的开发利用提供了理论依据,具有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] MATSUDA S, MIYAZAKI T, MATSUMOTO Y. Hydrolysis of isoflavones in soybean cooked syrup by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* IFO 3425 [J]. *Fermentation and Bioengineering*, 1992, 74: 301-304.
- [2] 何倩琼,郑理. 保健食品中异黄酮类化合物的测定[J]. *食品工业*, 2000, 6: 37-38.
- [3] 汪大敏,杨国武,李皎. 大豆异黄酮的特性及其应用前景展望[J]. *中国食品添加剂*, 2008, 4: 104-108.
- [4] 何继春,卫巍. 大豆异黄酮检测及四标样快速测定法研究[J]. *粮食与油脂*, 2001(7): 46-47.
- [5] 韩锋,翟桂香. 大豆异黄酮及其水解研究进展[J]. *粮油食品科技*, 2004, 12(3), 35-36.
- [6] 冯艳丽. 酶法水解大豆异黄酮的研究进展[J]. *四川食品与发酵*, 2008, 2: 25-28. ☉