

甘薯中去氢表雄酮的提纯工艺研究

杨红花,秦宏伟

(泰山学院生物科学与技术系,山东泰安 271021)

摘要:利用超声波辅助法,对甘薯中的活性成分去氢表雄酮(DHEA)的提纯工艺进行了研究。结果表明,超声波提取DHEA的最佳条件为:60℃水浴下预发酵24h,预发酵液加入鲜甘薯质量2%的浓硫酸,90℃水浴下酸水解24h,水解液经20%的NaOH溶液中中和,抽滤、离心去除水分,超声波辅助下石油醚浸提40min,过柱净化,HPLC定性、定量测定。该方法能有效地纯化分析甘薯功能因子DHEA,具有产物纯度高、方法简便、收率高等优点。

关键词:甘薯,超声波辅助法,去氢表雄酮(DHEA)

Study on extraction technology of DHEA from sweet potato with ultrasonic auxiliary

YANG Hong-hua, QIN Hong-wei

(Biology Science and Technology Department, Taishan University, Taian 271021, China)

Abstract: The purification process of active ingredient dehydroepiandrosterone (DHEA) from sweet potato was studied using ultrasonic auxiliary method. The results showed that the best conditions of DHEA ultrasonic extraction were under 60 degrees for pre-fermentation 24h with additional sulfuric acid 2% fold of the quality of fresh sweet potato in pre-fermentation liquor, 90 degrees for acid hydrolysis 24h in water bath, then neutralization in 20% NaOH and filtration, centrifugation to remove the moisture. The product obtained was lixiviated in petroleum ether for 40min using ultrasonic auxiliary method and detected by HPLC after column purification for qualitative and quantitative determination. This method can effectively purify and analyze DHEA extracted from sweet potato with high product purity, simple way and higher yield.

Key words: sweet potato; ultrasonic extraction method; dehydroepiandrosterone (DHEA)

中图分类号:TS255.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2010)03-0232-04

甘薯 [*Iponioea Batatas*, (L.) Lam.] 又名红薯、甜薯、地瓜和山笋等,属根茎类旋花科一年蔓生草本植物。作为世界上重要的粮食作物,营养价值的研究和加工的研究十分活跃^[1-2]。近年来,甘薯功能性质也逐渐引起了世界各国科学家的重视。去氢表雄酮(Dehydroepiandrosterone,简称DHEA),是人体肾上腺皮质网状层分泌的一种肾上腺激素的前体物质,是制造甾体激素的中间体,它参与合成肾上腺分泌的多种激素^[3]。国外对其生理和病理作用已作了大量研究,已初步证实DHEA具有广泛的生理和病理生理作用^[3-5],国内对甘薯DHEA的提取报道较少^[6-7]。超声波提取法是近年来兴起的新方法,已被应用于植物活性成分的提取^[8-9]。其原理是利用超声波产生的强烈振动、空化效应、粉碎等作用,将植物中所含活性成分提取到溶剂之中,提高提取效率。该方法操作简单,副产品少,提取物易分离,能达到比常规提取法更理想的结果,但其应用于甘薯活性

物质DHEA提取方面国内未见报道。本文创新性地通过实验对超声波提取甘薯中活性成分DHEA的工艺进行了研究,并取得了预期的结果,研究结果将对甘薯的深加工及为DHEA生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

经鉴定为北京553、烟薯251、94-260、鲁薯8号、甘868、高系14等六个甘薯品种。山东农业大学农学院提供;石油醚、丙酮、苯、浓硫酸、盐酸、氢氧化钠、硅藻土、无水硫酸钠、乙醚等均为分析纯试剂;甲醇 色谱纯;标准DHEA 美国Sigma公司。

超声波清洗器,UV-2100紫外可见分光光度计(日本),PHILIPS组织捣碎机,TLC低速离心机,电子天平,pH计,层析柱,EYELA旋转蒸发器,CTO-10AS VP高效液相色谱(日本),紫外光谱检测仪(日本),恒温鼓风干燥箱,恒温水浴锅等。

1.2 实验方法

从DHEA的结构和性质分析,去氢表雄(甾)酮是一种非共轭的 $\Delta^{5,6}$ -双键及可酯化的3- β -羟基甾体,易溶于石油醚、甲醇、氯仿、苯等溶剂,属于植

收稿日期:2009-04-14

作者简介:杨红花(1976-),女,副教授,研究方向:植物资源利用。

基金项目:泰山学院2007引进人才项目(Y07-2-21)。

甾萜类化合物,与薯蓣皂甙元的结构类似,可以认为 DHEA 在甘薯中是以皂甙的形式存在,由此本文确定通过预发酵、酸水解、超声波辅助提取等工艺流程从甘薯中提取 DHEA。

提取工艺流程如下:鲜甘薯→清洗去杂→匀浆→预发酵→加酸水解→加碱调 pH 为 6~7→抽滤(离心)→添加石油醚超声波提取→减压浓缩→过硅胶、无水硫酸钠填充柱洗脱净化→浓缩定容→经 0.45 μ m 滤膜过滤后待进样→HPLC 定性定量 DHEA

新鲜甘薯清洗去杂、称重,用打浆器匀浆成细颗粒状,置水浴锅中预发酵,按鲜甘薯重的 3% 的比例加入浓硫酸,搅拌均匀并置于水浴锅中水解,冷却并以 20% 的 NaOH 水溶液滴定至 pH 为 7 左右,烘干去除水分,添加石油醚并封口,超声波提取(范围为 30~50Hz),提取液减压浓缩,过硅胶、无水硫酸钠填充柱洗脱净化,浓缩定容后经 0.45 μ m 滤膜过滤后待进样,HPLC 定性、定量测定。

2 结果与分析

2.1 预发酵对 DHEA 提取率的影响

预发酵能提高皂素产率,主要作用为酶解作用。酶解的主要作用是使一部分甾萜醇皂素转化为螺甾醇皂素,而螺甾醇皂素比甾萜醇皂素更易转化为薯蓣皂甙元。预发酵中的发酵温度、发酵时间对后续 DHEA 的提取有重大影响。由图 1、图 2 可以看出,预发酵的最佳温度是 60 $^{\circ}$ C;并且随着发酵时间的延长,DHEA 的提取率随之增大。

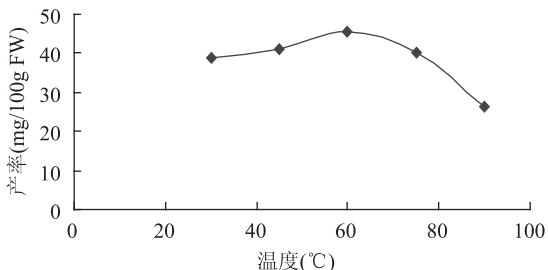


图 1 预发酵中的发酵温度对 DHEA 产率的影响

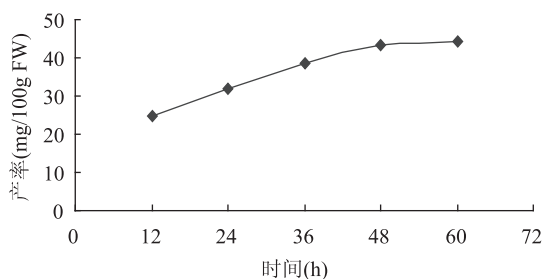


图 2 预发酵中的发酵时间对 DHEA 产率的影响

2.2 酸水解对 DHEA 提取率的影响

资料表明,甾键易被稀酸催化水解,反应一般在水溶液或稀醇中进行,所用的酸一般为硫酸、盐酸等。薯蓣皂甙元通常是以硫酸或盐酸在一定温度下酸解薯蓣根茎,再以石油醚等溶剂萃取水解后残渣而制得。因此本文认为 DHEA 也是以皂甙元的形式存在,相应的实验结果见图 3。由图 3 可以看出,用硫酸比用盐酸水解效果好,而且随水解时间的延长和水解温度的提高,所得产物的收率提高,可见提高

水解温度及延长水解时间对实验结果有利。

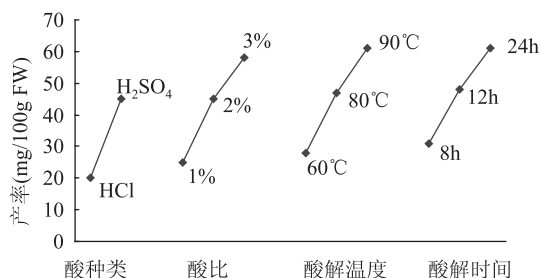


图 3 酸水解对 DHEA 提取率的影响

2.3 超声波提取时间对 DHEA 提取率的影响

由于提取有效成分的关键是选取合适的提取溶剂,皂甙元不溶于极性溶剂,而易溶于石油醚、苯、乙醚等低极性溶剂中。考虑到苯作为溶剂对提取物 DHEA 的毒性和乙醚在实验操作中的危险性,结合前人对皂甙元提取溶剂的选择,本文选用石油醚作为实验提取溶剂。由于 DHEA 在甘薯中含量很低,本实验采用超声波提取,提高提取效率,达到既操作简单,副产品少,提取物易分离,最大限度地提取有效功能成分,又可以节约溶剂和能源的目的,实验结果如图 4。

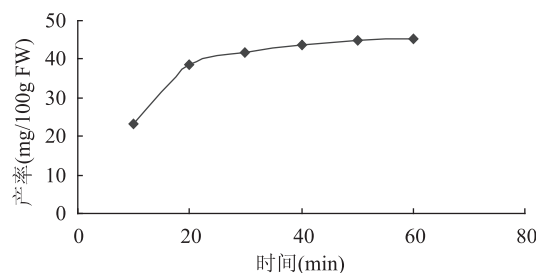


图 4 提取时间对 DHEA 提取产率的影响

2.4 正交实验

由工艺路线可知,DHEA 的提取工艺主要有预发酵、酸水解、超声波提取等工序,对各项工序的影响因素分别做了单因素重复实验,确定了主要影响因素及水平,如表 1 所示。

表 1 甘薯中 DHEA 提取的影响因素及水平

水平	预发酵			酸水解		超声提取
	A 温度 ($^{\circ}$ C)	B 时间 (h)	C 加酸比 (%)	D 温度 ($^{\circ}$ C)	E 时间 (h)	F 时间 (min)
1	30	12	1	60	12	40
2	60	24	2	80	24	50
3	90	48	3	90	36	60

据此,本文选用 $L_{18}(3^6)$ 正交表安排实验,共 18 组实验,每组实验重复一次,分别称取清洗去杂的甘薯 200g,分别匀浆置于烧杯中预发酵,然后加酸水解,水解物料以 20% 的 NaOH 调整 pH 为 7 左右,物料再经脱除水干燥等,加入石油醚并封口超声波浸提,提取液过柱子洗脱(洗脱液:丙酮:石油醚 = 1:1)净化,减压蒸干,色谱甲醇定容到 10mL,HPLC 定性、定量测定,以每百克鲜甘薯 DHEA 的含量为指标,结果见表 2。

由正交实验表及结合生产实际可知:甘薯中功能因子 DHEA 提取最佳条件为 $A_2B_2C_2D_3E_3F_1$,即在 60 $^{\circ}$ C 水浴条件下预发酵 24h、预发酵料液加鲜甘薯质

表2 正交实验结果表

实验号	A	B	C	D	E	F	DHEA 含量 (mg/100g FW)
1	1	1	1	1	1	1	18.150
2	1	2	2	2	2	2	2.148
3	1	3	3	3	3	3	38.889
4	2	1	1	2	2	3	19.066
5	2	2	2	3	3	1	45.298
6	2	3	3	1	1	2	1.976
7	3	1	2	1	3	2	0.978
8	3	2	3	2	1	3	5.155
9	3	3	1	3	2	1	34.751
10	1	1	3	3	2	2	3.332
11	1	2	1	1	3	3	3.545
12	1	3	2	2	1	1	31.196
13	2	1	2	3	1	3	5.672
14	2	2	3	1	2	1	28.928
15	2	3	1	2	3	2	1.205
16	3	1	3	2	3	1	32.898
17	3	2	1	3	1	2	1.206
18	3	3	2	1	2	3	4.893
K ₁	97.260	80.096	77.923	58.470	63.355	191.221	
K ₂	102.145	86.28	90.185	91.668	93.118	10.845	
K ₃	79.881	112.910	111.178	129.148	122.813	77.220	
R	22.264	32.814	33.255	70.678	59.458	180.376	
R/6	3.711	5.469	5.543	11.780	9.910	30.063	

表3 不同品种甘薯中 DHEA 含量

品种	北京 553	鲁薯 8 号	94-260	烟薯 251	甘 868	高系 14
含量(mg/100gFW)	45.298	41.573	48.110	39.035	44.792	46.899

量 2% 的浓 H₂SO₄, 90℃ 条件下水解 36h, 水解料液经加碱液中和、脱水干燥处理, 加石油醚密闭条件下超声波浸提 40min, 提取液过柱层析净化后, 蒸干样品提取液, 并以色谱甲醇定容, 做 HPLC 定性、定量分析。此条件下, 做回收率实验, 其回收率可达 90% 以上, 说明该方法切实可行。

2.5 DHEA 的 HPLC 定性、定量分析

对 DHEA 标准溶液进行紫外光谱检测, 发现其最大吸收波长为 215nm, 流动相在此波长无响应。甲醇用量在 60% 以上与检测灵敏度关系不大, 为使测定组分与杂质很好分离且保证色谱峰峰形较好, 实验中选择 6 种比例的流动相: 甲醇: 水 = 60:40、甲醇: 水 = 70:30、甲醇: 水 = 80:20、甲醇: 水 = 90:10、甲醇: 水 = 98:2、纯甲醇, 结果发现以纯甲醇最好。

色谱分析: 量取 10μL 标准溶液及试样溶液注入色谱仪中, 以保留时间定性, 以试样峰高或峰面积与标准比较定量。色谱图如图 5、图 6。

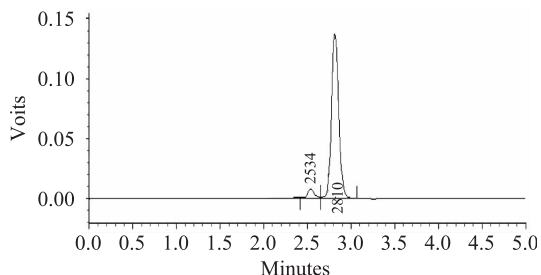


图5 标准样品 DHEA 的 HPLC 色谱图

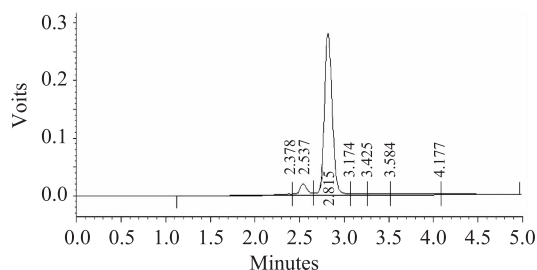


图6 样品中 DHEA 的 HPLC 色谱图

本文又对甘薯样品中 DHEA 做了三个浓度的添加回收率实验, 平均回收率为 90.9%, 方法的添加回收率在 80%~120% 之间, 变异系数小于 20%, 证明该方法分离效果好、杂质干扰少、精度高, 是切实可行的。

2.6 不同甘薯品种间的 DHEA 含量的测定

依据上述的甘薯功能成分 DHEA 提纯工艺和 HPLC 定性、定量分析方法, 选用山东农业大学农学院提供的经鉴定为北京 553、烟薯 251、94-260、鲁薯 8 号、甘 868、高系 14 等六个甘薯品种进行分析, 结果如表 3。由表 3 可知, 94-260、高系 14 品种 DHEA 含量较高, 而烟薯 251、鲁薯 8 号含量较低。从 DHEA 生产原料选择及甘薯加工经济效益考虑对甘薯进行评价, 94-260、高系 14 质量较好, 烟薯 251、鲁薯 8 号较差。

3 结论

本实验结合前人对薯蓣皂甙元提取纯化的经

验,通过预发酵、酸水解、超声波浸提等主要工序的单因子实验、正交实验,创新性地从资源丰富的甘薯中通过超声波辅助提纯得到功能因子 DHEA。甘薯功能因子 DHEA 提纯的最佳参数为:60℃水浴下预发酵 24h,预发酵液加入鲜甘薯质量 2% 的浓硫酸,90℃水浴下酸水解 24h,水解液经 20% 的 NaOH 溶液中和,抽滤、离心去除水分,超声波辅助下石油醚浸提 40min,提取液经过柱净化,HPLC 定性、定量测定,得到纯度很高的 DHEA 功能因子。该流程能有效地纯化分析甘薯功能因子 DHEA,具有产物纯度高、方法简便、收率高等优点,对于天然产物功能因子 DHEA 的开发利用以及为我国资源丰富的甘薯的深加工,具有较好的开发应用前景和参考价值,另外也为不同加工甘薯品种的培育及选择提供了依据。

参考文献

[1] 张彧,吴祎南,陈莉,等.红薯茎叶化学组成的研究进展[J].食品科学,2006,27(3):252-255.
 [2] 吴祎南,张彧,耿晓璐,等.红薯茎叶提取物抗氧化性的研究[J].食品科学,2005,26(9):521-523.

[3] Bodensteiner K J, Stone I J, Ghiraldi L L.Effects of Dehydroepiandrosterone sulfate and progesterone on spatial learning and memory in young and aged mice [J].The Journal of General Psychology,2008,135(3):271-286.
 [4] Thon V, Härle P, Schölmerich J, et al.Lack of dehydroepiandrosterone in type I and II hereditary angioedema and role of danazol in steroid hormone conversion [J].Allergy, 2007, 62:1320-1325.
 [5] Christian G, Daniel S P, Johanna M P B, et al.Cortisol and DHEA-S are associated with startle potentiation during aversive conditioning in humans [J].Psychopharmacology, 2006, 186: 434-441.
 [6] 姚菊英,彭辉.红薯中 DHEA 的提取[J].江西教育学院学报,22(6):39-40.
 [7] 杨志坚.甘薯 DHEA 检测体系及其含量的影响因素研究[D].福建:福建农林大学,2008.
 [8] 秦宏伟,杨红花,史春余,等.甘薯中 β-胡萝卜素提取工艺研究[J].食品科学,2007,28(1):123-125.
 [9] 张霖,王丰俊,王建中.超声波辅助提取甘薯根颈多糖[J].食品科学,2008,24(5):132-135.

(上接第 231 页)

表3 革兰氏阴性菌特征

特征	7	8	9	10	
个体形态	形状 革兰氏染色 芽孢情况 鞭毛情况 运动情况 菌苔形状 菌落颜色 菌落形状 菌落隆起度 菌落边缘 菌落表面状态 菌落光泽 菌落质地 菌落透明度	单细胞杆状 - 无 极生鞭毛 运动 扩展的 淡黄色 圆形 稍隆 整齐 光滑 有光泽 奶油状 半透明	单细胞杆状 - 无 极生鞭毛 运动 扩展的 白色 圆形 稍隆 整齐 光滑 有光泽 奶油状 半透明	单细胞杆状 - 无 极生鞭毛 运动 扩展的 淡黄色 圆形 凸脐状 整齐 光滑 有光泽 湿润 半透明	杆菌 - 无 周身鞭毛 运动 扩展的 白色 圆形 隆起 整齐 光滑 有光泽 湿润 半透明
生理生化实验	氧化酶实验 过氧化氢实验 葡萄糖氧化发酵实验 精氨酸双水解酶实验	+ / 氧化产酸 +	+ / 氧化产酸 +	+ / 氧化产酸 +	- / 发酵产酸 /
初步鉴定结果	假单胞菌属	假单胞菌属	假单胞菌属	肠杆菌科	

3.2 本实验仅对菌种鉴定做了常规的菌落特征、形态特征和部分生理生化实验,并未按照菌种鉴定程序进行硝酸盐还原实验、水解明胶实验、水解淀粉实验、牛乳石蕊实验、V.P 反应、糖醇反应实验等及分子生物学鉴定,所以本实验对低硝灌肠制品的腐败菌只初步鉴定到属和科,进一步鉴定到种还需要大量的工作。

参考文献

[1] Fennema O R.Food Chemistry(2nd edition)[M].Revised and Expand,1985:645-646.

[2] 中华人民共和国国家标准食品卫生微生物学检验染色法、培养基和试剂 GB/T4789.28-2003 [S].
 [3] 中华人民共和国国家标准食品卫生微生物学检验菌落总数测定 GB/T4789.2-2003 [S].
 [4] 周德庆.微生物实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1983.
 [5] Brown M H.Meat Microbiology [M].New York: Applied Science Publishers,1982:474-475.
 [6] 陈保新.软罐头食品生产的理论与实际[M].北京:中国轻工业出版社,1986:39.