

植物雌激素 - 木酚素提取方法建立*

那晓琳¹, 赵新宇², 李丽娜³, 张云波¹, 付政海¹, 郭婧婧¹

摘要:目的 建立一种亚麻木酚素 - 开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷(SDG)的实验室提取和检测方法。方法 在SDG的提取过程中对提取步骤的每一个环节进行单因素实验,观察不同提取方法、溶液及浓度、时间及碱解方法对亚麻籽SDG提取率的影响,用高效液相色谱测定SDG的含量。结果 3种不同提取方法的SDG粗提物固体得率分别为索氏提取器法2.37%、加热回流法3.04%、超声波提取法2.89%;3种不同溶剂的SDG粗提物固体得率分别为甲醇2.76%、乙醇3.04%、丙酮3.86%;在加热回流条件下,用50%的丙酮溶液提取的SDG得率最高,为5.33%;最佳提取时间为2h;提取过程中的碱解方法采用Ca(OH)₂-H₃PO₄系统,SDG粗提物纯度为32.48%。结论 建立的亚麻籽木酚素提取方法比原方法有所改进,提取时间有所缩短。

关键词: 亚麻;木酚素;提取;检测

中图分类号: R 181.2⁺⁴

文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2012)10-1385-03

Extraction of phytoestrogen lignan

NA Xiao-lin^{*}, ZHAO Xin-yu, LI Li-na, et al. (^{*} Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang Province 150081, China)

Abstract: Objective To explore a laboratory method for the extraction of secoisolariciresinol diglucoside(SDG) from flaxseed. **Methods** In the extraction of SDG, all factors were tested, including different extraction methods, the concentration of extract solution, the extraction time and different alkali hydrolysis methods. Flaxseed SDG was detected by high performance liquid chromatography(HPLC). **Results** The SDG extraction is the most efficient with reflux extraction method. The best solution is 50% acetone, and the extraction time is 2 hours. The alkali extraction method is suitable with Ca(OH)₂-H₃PO₄ system. The purity of crude SDG was 32.48%. **Conclusion** More SDG could be extracted in short time using the method established.

Key words: flaxseed; SDG; extraction; detection

近十几年来,植物雌激素的生物学作用研究主要集中在大豆异黄酮降血脂、预防癌症和女性骨质疏松方面^[1-2],对木酚素的研究较少。亚麻籽是植物雌激素 - 木酚素的最佳来源,是一般植物含量的100~800倍^[3]。有研究表明,亚麻籽中的木酚素主要成分被称作开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷(secoisolariciresinol diglucoside,SDG),属于多酚类物质,主要存在于亚麻籽表皮的纤维层中;木酚素进入人体后,在肠道细菌作用下,可分解为哺乳类动物特有的肠二醇(enterodiols,ED)和肠内酯(enterolactone,EL),被机体吸收利用^[4]。另有研究表明,血液中高水平的木酚素与心血管疾病和某些癌症发病危险性的降低具有高度的相关性^[5]。本研究拟建立一种SDG的实验室提取分离和检测方法,为进一步开发和研究SDG的生物活性作用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 (1) 受试物: 亚麻籽(黑龙江省农业科

学院);(2) 主要试剂与仪器: SDG 标准品,纯度 > 95%(哈尔滨博润生物科技有限公司);甲醇、无水乙醇、丙酮、磷酸、氢氧化钠、盐酸、氢氧化钙、硫酸(均为分析纯,沈阳试剂二厂)。岛津 SPD-10A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);电热恒温水浴锅(大连医疗器械厂);旋转蒸发器(上海亚东生化仪器厂);有机溶液过滤器(天津恒奥科技发展有限公司);干燥箱(上海跃进医疗器械厂);超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);索氏提取装置(天津玻璃器材厂)。

1.2 方法

1.2.1 亚麻籽脱脂粉制备 将亚麻籽去除杂质后置干燥箱内60℃烘干4h,用粉碎机将其粉碎后过30目分子筛。取适量置于大烧杯中,加入石油醚^[6](液固比:3:1)室温搅拌脱脂2次,每次1h,抽滤后得固体,80℃干燥5h,得亚麻籽脱脂粉。

1.2.2 不同提取方法对比实验 称取亚麻籽脱脂粉40g,分别用索氏提取器法、加热回流法和超声波提取法^[7]提取SDG。所得固体称重,计算SDG粗提物的固体得率(%)。

1.2.3 不同提取溶剂及配比的选择 参考文献[6],分别选取甲醇、乙醇、丙酮3种溶剂,液固比10:1,根据对SDG的提取效果,确定最佳提取溶剂。

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11531097)

作者单位: 1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室,黑龙江哈尔滨150081; 2. 哈尔滨市结核病防治所; 3. 浙江省上虞市疾病预防控制中心

作者简介: 那晓琳(1964-),女,满族,黑龙江人,教授,博士,主要从事植物雌激素研究工作。

再用体积分数为 30%、50%、70%、90% 的溶剂溶液进行提取分析, 确定最佳溶液的体积分数。

1.2.4 不同提取时间的选择 利用加热回流提取法, 参考文献 [8] 分别选择提取时间 2、4、6、8 h, 提取溶液为 50% 丙酮溶液, 根据得到的 SDG 粗提物的量, 确定最佳提取时间。

1.2.5 SDG 粗提物碱解方法及碱解时间的选择 参考文献 [9-10] 及预实验结果, 选择 NaOH-HCl 系统和 $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4$ 系统对 SDG 粗提物进行碱解, 将碱解后的产物过滤后定容, 用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 测定 SDG 含量, 确定碱解方法; 确定碱解方法后, 分别选择 30、60、90、120、180 min 对粗提物进行碱解, HPLC 测定 SDG 含量, 确定最佳碱解时间。

1.2.6 方法精密度和样品回收率测定 对同一份 SDG 粗提物溶液, 连续 6 次进样进行 HPLC 检测, 计算测定方法的精密度。称取 SDG 粗提物 100 μg , 溶于 10 mL 甲醇中。取该溶液 1 mL (3 份) 分别加入浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SDG 标准应用溶液 1 mL 混合均匀, 分别用 HPLC 检测样品溶液和加标样品溶液 SDG 峰面积, 每次进样 10 μL , 换算浓度, 计算加标回收率。

1.2.7 SDG 粗提物的色谱检测条件 参考文献 [11] 根据实验室条件及与预实验结果, 确定 SDG 的 HPLC 色谱检测条件为: 色谱软件: N2000 浙江大学工作站; 色谱柱: COSMOSIL C_{18} Waters; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 甲醇-水 (70:30); 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μL ; 检测波长: 280 nm。

2 结果

2.1 不同提取方法的对比实验 加热回流提取法得到的 SDG 粗提物固体得率最高, 为 3.04%; 其次为超声波提取法, 为 2.89%, 索氏提取法提取效率最低, 为 2.37%。故后续实验提取方法均选择加热回流提取法。

2.2 不同提取溶液提取效率比较 当用丙酮进行提取时, SDG 粗提物的固体得率最高, 为 3.86%; 其次为乙醇和甲醇, SDG 粗提物固体得率分别为 3.04% 和 2.76%, 因此确定实验提取溶剂为丙酮。在此基础上发现体积分数为 50% 的丙酮溶液提取所得的 SDG 粗提物固体得率最高, 为 5.33%, 其次为 70% 的丙酮溶液, 为 5.29%。30%、90% 丙酮溶液提取得 SDG 粗提物固体得率均不高, 分别为 3.05% 和 4.08%。提示过高和过低体积分数的溶液均不是 SDG 溶解的最佳浓度。

2.3 不同提取时间对 SDG 粗提率影响 在选择的提取时间内, 得到的提取物固体重量无明显提高

(5.33%~5.70%)。提示在 2 h 内, SDG 在极性相似的提取液中 (本实验提取溶液为 50% 丙酮溶液) 已能够较好溶出, 考虑到长时间提取耗费能源和其他干扰因素的影响, 确定实验提取 SDG 的最佳时间为 2 h。

2.4 碱解方法及碱解时间选择 HPLC 检测的 SDG 谱图显示, NaOH-HCl 系统较 $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4$ 系统在 SDG 的提取中更易出现杂质峰, 故确定实验碱解系统为 $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4$ 系统。在进行不同的碱解时间研究中, 发现 SDG 的提取率随碱解时间的增加而增加, 在 30~60 min 内碱解速率最快, 60 min 以后碱解速率趋于缓慢, 碱解 ≥ 90 min SDG 的碱解释放量基本保持恒定, 确定最佳碱解时间为 90 min。

2.5 提取的 SDG 含量测定 分别配制浓度为 2、4、6、8、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SDG 标准溶液, 经检测在该浓度范围内色谱峰面积与 SDG 浓度成线性, 回归方程为 $Y = 5149.5X + 7387.4$, $r = 0.999$ 。同时进行的精密度和回收率实验结果显示, 6 次重复测定的相对标准偏差 $RSD = 5.836\%$, 加标回收率为 104.85%。经检测 SDG 出峰时间为 3.390 min, 提取的 SDG 粗提物的纯度为 32.48%。

3 讨论

中国的研究者通常选用不同浓度的甲醇、乙醇或者异丙醇作为亚麻木酚素的提取溶液^[6-8,10]。本研究根据实验结果并综合考虑溶剂毒性和生产成本等因素, 确定使用丙酮溶液作为亚麻木酚素的提取溶液, 其优点为: 丙酮的沸点 (56.48 $^{\circ}\text{C}$) 较甲醇、乙醇低, 并且不与水形成共沸混合物, 使得在回流提取法中提取温度仅需达到其沸点; 丙酮的挥发性较大, 容易从提取物和提取液在浓缩过程中去除, 并可回收循环使用; 丙酮的毒性远小于甲醇; 用丙酮提取得到的 SDG 粗提物固体得率高于用乙醇提取的得率。Charlet 等^[11] 使用终浓度为 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液碱解 3 h, 使亚麻木酚素从其络合物中释放出来, 再用 2 mol/L HCl、100 $^{\circ}\text{C}$ 酸解 2.5 h。该方法繁琐, 碱解作用不大, 耗费时间长。张文斌等^[12] 提出用 6 mol/L NaOH 溶液室温下碱解 2 h (最终碱浓度为 0.25 mol/L), 再用 6 mol/L 盐酸中和。本研究选择 $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4$ 溶剂系统对亚麻木酚素提取物进行碱解, 结果显示, 碱解时间缩短 (90 min)。同时使用 $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4$ 碱解系统的优点还在于: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 与 H_3PO_4 反应生成微溶于水的 CaHPO_4 , 能够很容易从含有亚麻木酚素水提物中以离心或者抽滤的方式去除, 较少影响 HPLC 检测; 用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 进行碱解可以使亚麻木酚素浓缩液不具有吸湿性, 优于用 NaOH-HCl 进行碱解。

参考文献

[1] 张云波,那晓琳,李丽娜,等.大豆异黄酮对去卵巢大鼠血糖及血脂影响[J].中国公共卫生,2009,25(9):1127-1128.
 [2] 赵净洁,俞鸣,孟令章.大豆异黄酮抗癌防癌机制研究进展[J].中国公共卫生,2011,26(11):1390-1392.
 [3] 胡鑫尧.亚麻种子及亚麻屑的综合利用[J].中国麻业,2003,25(5):235-238.
 [4] 李欣,袁建平,刘昕,等.木脂素——一类重要的天然植物雌激素[J].中国中药杂志,2006,31(24):2021-2025.
 [5] Touiland MS, Thiebaut ACM, Fournier A, et al. Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status [J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(6): 475-486.
 [6] 杨宏志.亚麻籽中木酚素提取工艺的研究[J].农产品加工学刊,2005(4):18-20.
 [7] 徐海娥,李莉,仓公敖.亚麻木酚素提取工艺的研究[J].中国卫生检验杂志,2008,18(2):275-276.
 [8] 孙伟杰,杨宏志,李佩义,等.溶剂法提取亚麻木酚素的工艺研究[J].粮油加工,2009(2):58-61.
 [9] Christina E, Afaf KE, Roger A, et al. High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1012: 151-159.
 [10] 徐海娥,李莉,仓公敖.亚麻木酚素提取工艺的研究[J].中国卫生检验杂志,2008,18(2):275-276.
 [11] Charlet S, Bensaddek L, Raynaud S, et al. An HPLC procedure for the quantification of anhydro secoisolariciresinol. Application to the evaluation of flax lignin content [J]. Plant Physiol Biochemistry, 2002, 40(3): 225-229.
 [12] 张文斌,许时婴.亚麻木酚素的微波辅助提取工艺研究[J].天然产物研究与开发,2006,18:286-290.

收稿日期: 2011-07-17

(王奕编辑 郑新校对)

• 检验技术 •

水中微量藻类毒素免疫亲和层析法分离*

明小燕,黄夏宁,刘诚,彭小雪,谷康定

关键词: 微囊藻毒素-LR; N,N'-羰基二咪唑; 免疫亲和层析; 反相 C₁₈ 柱

中图分类号: R 123.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)10-1387-03

微囊藻毒素-LR (microcystin-LR, MC-LR) 是淡水水华过程中由某些种系蓝藻产生的一类天然毒素,其毒性作用表现为肝脏毒性和肿瘤促进作用等^[1],对人体健康危害极大。中国颁布执行的 GB5749-2006《生活饮用水卫生标准》规定了水中 MC-LR 的限值为 0.001 mg/L。目前,水中 MC-LR 常用检测方法有 ELISA 方法和高效液相色谱法。因环境水体 MC-LR 含量低,在检测之前先需用反相 C₁₈ 柱富集。但由于反相 C₁₈ 柱无特异性,富集后的水样仍含有许多干扰物,效果欠佳^[2],故亟需一种分离效果更好的方法来富集纯化藻毒素,以利于后续分析方法的检测。本研究旨在探索建立具有高选择性和高效性^[3]的免疫亲和层析 (immunoaffinity chromatography, IAC) 法,富集纯化水中 MC-LR,为环境水体中藻毒素的分离、纯化与检测提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料 MC-LR(美国 Sigma 公司),

交联琼脂糖凝胶 4B(sepharose CL-4B 美国 Sigma 公司), N,N'-羰基二咪唑 (N,N'-carbonyldiimidazole, CDI 美国 Sigma 公司), 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA, 德国 Behringwerke 公司), 偶联了 BSA 的 MC-LR 包被抗原 (MC-LR-BSA, 实验室自制), 偶联了匙孔蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 的 MC-LR 抗原的抗兔血清 (MC-LR-KLH, 效价 1:64 000, 实验室自制), 羊抗兔辣根过氧化物酶 IgG (Proteintech Group, Inc.), 其他无机、有机试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备 紫外可见分光光度计 (UV-2401PC, 日本 SHIMADZU), 微量振荡器 (中外合资深圳天南海北有限公司), 酶标仪 (美国 Bio-Tek Instruments 公司), 96 孔酶标板 (美国 Costar 公司), 反相 C₁₈ 柱 (美国 Supelco 公司)。

1.3 免疫亲和柱制备

1.3.1 抗藻毒素抗体准备

1.3.1.1 抗体的纯化与效价的测定 本实验室制备的多克隆抗体用饱和硫酸铵方法纯化,透析后用聚乙二醇浓缩,然后采用紫外分光光度法^[4]检测蛋白浓度 [蛋白测定公式: IgG 的浓度 (mg/mL) = (A₂₈₀ × 1.45 - A₂₆₀ × 0.74) × 稀释倍数], ELISA 方法检测纯化后抗体的效价。

1.3.1.2 抗体分子量的测定 采用聚丙烯酰胺凝

* 基金项目: 国家自然科学基金 (20977038)

作者单位: 华中科技大学同济医学院公共卫生学院环境医学研究所 教育部环境与健康重点实验室 湖北 武汉 430030

作者简介: 明小燕 (1984-), 女, 湖北阳新人, 医师, 硕士, 主要从事劳动卫生和环境卫生研究。

通讯作者: 谷康定, E-mail: kangding@126.com