

超声波法提取异黄酮的研究进展

汪美汐,胡佳文,马丽,刘畅,万端极,周宝晗

(湖北工业大学 轻工学部,湖北 武汉 430068)

摘要:通过超声波与传统的加热回流和索氏提取方法、新型的亚临界水萃取方法、正交试验方法和其它辅助的超声波提取法的比较,对超声波法提取异黄酮的技术进行总结和归纳。结果表明:超声波能快速、高效的从各种原料中提取异黄酮,并对设备要求较低,因此超声波作为一种经济型的提取方式,是一个可持续发展行业的需求。文章为进一步简化工艺流程,提高提取率提供了理论基础。

关键词:超声波; 异黄酮; 提取; 研究进展

中图分类号:TS214.2 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.04.0717

Research Progress on Isoflavon Extraction by Ultrasonic Method

WANG Mei-xi, HU Jia-wen, MA Li, LIU Chang, WAN Duan-ji, ZHOU Bao-han

(Light Industry Division, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: The research progress about isoflavones extraction and purification was briefly reviewed. Compared ultrasonic method with conventional heating reflux extraction and Soxhlet extraction, subcritical water extraction, the orthogonal experiment and other auxiliary ultrasonic extraction method, ultrasonic extraction technology of isoflavones was summarized and analyzed. The results showed that isoflavones could be quickly, high efficiently extracted from various raw materials, and low requirement on equipment by ultrasonic method. So the ultrasonic extraction was an economical alternative to traditional extraction processes, which could meet the industry demand for a sustainable development. This review provided theoretical foundation for further simplifying technological process and improving extraction rate of soybean isoflavones.

Keywords: Ultrasonic; Isoflavones; Extraction; Research progress

异黄酮是植物苯丙氨酸代谢过程中,由肉桂酰辅酶A侧链延长后环化形成以苯色酮环为基础的酚类化合物,属于黄酮类化合物中的一种,主要存在于豆科植物中,如大豆、葛根、苜蓿和绿豆等。这是一类以3-苯基苯并吡喃酮为母体的多羟基酚类,由于其结构与雌二醇相似,故称为植物雌激素。不同来源的异黄酮化合物的主要成分和含量也有所不同。其中异黄酮含量最高的只有苜蓿和大豆,一般苜蓿中异黄酮的含量为0.5%~3.5%,大豆中异黄酮含量为0.1%~0.5%。按结构划分,异黄酮类化合物主要有3类:葡萄糖苷配基、葡萄糖苷、酰基化葡萄糖苷,在植物中主要以后两种形式存在,少量以游离配基的形式存在。研究表明,这3种类型中以葡萄糖苷配基的生物活性最高。

异黄酮类化合物具有多种生理活性,如抗菌、抗炎、抗癌、治疗心血管疾病、植物雌激素作用等^[1-3],异黄酮还是一种有效的抗氧化剂,能猝灭氧自由基的生成,而氧自由基是一种强致癌因素。可见异黄酮的抗癌作用有多种方式和途径,因此一直被认为具有维生素P的活性,并不断被发现有更多生理活性,从而对机体代谢起调节的作用^[4]。许多

异黄酮衍生物(如染料木素、大豆黄素、樱黄素、异芒柄花黄素)是药物研究的重点。其中,染料木素是大豆中的主要异黄酮成分,其结构与17 β -雌二醇相似,能结合雌激素受体,具有减少与荷尔蒙分泌相关的癌症发病率的作用,还可以抑制蛋白质酪氨酸激酶的活性,从而具有抗氧化剂的功能;大豆黄素类似于染料木素具有广泛的生理活性,其对免疫系统的促进作用强于染料木素,可用作保健品,促进钙吸收,治疗骨质疏松,而且因其具有雌激素作用,也可用来治疗妇女更年期综合症;樱黄素可有效抑制线粒体醛脱氢酶(ALDH-1);芒柄花黄素可显著降低血中胆固醇和甘油三酯的含量,因此可用于防治动脉粥样硬化及高血脂症。

异黄酮类化合物因其广泛的生物活性和独特的结构特点得到了学术界和工业的重视,目前异黄酮的提取主要有溶剂萃取法^[5]、超声波法^[6-8]、酸解法^[9-10]、微波辅助提取法^[11]、超临界流体萃取法^[12]、亚临界水萃取法^[13]等。

溶剂萃取法是提取异黄酮最普遍的方法,其利用相似相溶的原理,将异黄酮溶解在有机溶剂中,然后除去溶剂。常用的提取溶剂主要有甲醇、乙

收稿日期:2014-08-08
基金项目:湖北工业大学大学生创新创业训练计划(201310500008)。
第一作者简介:汪美汐(1993-),女,主要从事药理学研究。E-mail: 18064070277@189.com。
通讯作者:周宝晗(1980-),女,博士,副教授,主要从事有机合成研究。E-mail: zhoubaohan@126.com。

醇、正丁醇、丙酮等,提取方式包括常温浸提、加热回流、渗漉法等。这种方法虽然操作简单,对仪器要求不高,但往往存在提取效率低,提取时间长,有机溶剂消耗大的缺点。

酸水解法是将结合型异黄酮水解为游离型异黄酮,这样既有利于分离纯化,也有利于异黄酮的检测。但酸水解多采用盐酸,需要的温度较高,水解程度大,但因异黄酮产品主要用于保健食品方面,所以对酸性条件下水解得到的苷元的安全性存在怀疑。

微波辅助萃取法的本质是微波(波长1 mm ~ 1 m)对萃取溶剂和物料的加热作用。主要是利用微波射线辐射于溶剂并透过细胞壁到达细胞内部,由于溶剂及细胞液吸收微波能,致使细胞内部温度升高,压力增大,当压力超过细胞壁的承受能力时,细胞壁破裂,位于细胞内部的有效成分从细胞中释放出来,传递转移到溶剂周围被溶剂溶解,从而达到提取目的。微波萃取具有适用范围广、重现性好、提取时间短、提取率高等特点。但是目前微波萃取基本上还停留在试验室小样品的提取及分析,使用设备简陋,工业化微波提取设备少见报道。

超临界流体(SCF)是指其温度及压力均处于临界点以上的流体,是处于气态与液态之间的一种特殊状态,超临界流体的粘度接近于气体,密度接近于液体,扩散系数介于气体和液体之间,兼有气体和液体的优点,既像气体一样容易扩散,又像液体一样有很强的溶解能力。超临界流体萃取法具有无有机溶剂残留,提取效率高、生产周期短,极少损失易挥发组分或破坏生理活性物质等特点。

亚临界水提取技术(subcritical water extraction)是目前国内外研究较热的一种提取技术。亚临界水也被称为过热水、高温水、高压热水或热液态水,是指在一定压力下,将水加热到100℃以上,临界温度374℃以下的高温,水体仍然保持在液体的状态。通过对亚临界水温度和压力的控制改变水的极性、表面张力和黏度,从而增加水对待提取物质的溶解能力。与其它提取方法相比,亚临界水法具有提取率高,提取时间短,成本低,安全无毒,环境友好等特点。

但是超临界流体方法和亚临界水提取方法由于设备复杂、运行成本高、提取范围有限等缺点使其应用受到限制。

超声波法^[14]是利用空化作用对细胞膜进行破坏,使提取液不断震荡,从而让细胞膜破裂,释放和溶出异黄酮。而且超声波可以促使溶质的扩散,其热效应可以使水温保持稳定,给原料营造了恒温的环境。因此,使用超声波法可以缩短时间,节约原料,从而提高有效成分的提取率。近年来,超声技

术广泛应用于提取植物中的生物碱、苷类、生物活性物质、动物组织浆的毒质等^[15]。而且,试验表明超声波提取异黄酮比传统的振荡提取法要更经济、快捷、高效,在异黄酮提取应用范围内越来越受到重视。

超声波技术以其工艺简单、无需加热、提取快速、提取率高等特点,在异黄酮的提取中发挥着重要的作用。目前已有许多篇文章对异黄酮的提取方法进行了综述^[16-18],但对具体的超声波提取异黄酮的方法综述较少,为此,本文对超声波的方法进行总结概括,旨在为异黄酮高效提取奠定理论基础。

1 超声波方法与传统方法的比较

2003年,Rostagno等^[19]采用EtOH、MeOH、MeCN这3种不同的溶剂,和水以不同比例混合,分别在10℃和60℃的温度下,比较了混合搅拌提取与超声辅助从冷冻干燥的大豆中(freeze-dried ground soybeans)提取大豆异黄酮的收率。从收率曲线中可以发现,温度对异黄酮的萃取影响很大,无论是超声波(UAE)还是混合搅拌(MS),温度从10℃提高到60℃,异黄酮的提取率都得到了提高。但是相对于混合搅拌来说,超声波方法得到了更高的提取率。结果表明UAE(ultrasound-assisted extraction)相对于混合搅拌(mix-stirring)来说是比较好的一种方式来提取大豆异黄酮,而50%的乙醇因其廉价、低毒、环境友好的特点成为提取大豆异黄酮最好的溶剂。

然后,Rostagno等^[20]在2007年,再次采用超声波(UAE)的方法从大豆和果汁混合饮料中提取异黄酮。研究表明,最优化的条件是在45℃水浴中,样品和溶剂的比率为0.2:1,超声波20 min。虽然提取的异黄酮的量与传统方法相比,并没有很大的区别,但是,这种方法却避免了将样品冷冻干燥的步骤,将工艺简单化。

谢明杰等^[21]、田琳等^[22]对比了超声波法和加热回流法对脱脂豆粕和脱脂豆芽粉中大豆异黄酮的提取率的影响。前者通过比较料液比1:20(g:mL)、乙醇浓度60%时,分别加热回流提取1次(120 min)、提取2次(240 min)、超声提取1次(30 min)的平均提取率为0.310%、0.451%、0.452%(大豆异黄酮提取率(%)=提取液中大豆异黄酮总量/所用脱脂豆粕量×100)。

结果表明,超声波法提取大豆异黄酮具有省时、节能、提取率高等优点,提取一次,30 min所得大豆异黄酮的提取率比加热回流法提取120 min的提取率高约46%,与加热回流提取二次,240 min的提取率一致。

后者通过在料液比 1:15 (g:mL)、乙醇浓度 80%、提取时间 30 min 的情况下,于温度 70℃ 下加热回流 2 次的平均提取率 0.072%;与室温下,超声提取 2 次的平均提取率 0.949% 进行比较(大豆异黄酮提取率 = 提取液中大豆异黄酮的总量/脱脂豆芽粉重量)。结果表明:用超声波法的提取率比加热回流法高了约 12 倍;然后通过做正交试验进一步确定超声波法对大豆异黄酮的最佳提取条件:时间为 30 min,乙醇浓度为 70%,超声功率为 450 W,料液比为 1:15 (g:mL)。

肖虹等^[23]则比较了索氏法与超声法、甲醇与乙醇提取大豆中异黄酮的效果。分别以体积分数 80% 甲醇、60% 乙醇、80% 乙醇和 100% 乙醇 4 种溶剂为样品提取液,采用超声法与索氏提取法进行样品中大豆异黄酮的提取,用高效液相色谱法进行检测。其中,索氏法在溶剂用量 300 mL 中,通过提取、浓缩、定容等步骤处理 8~10 h 的提取效率较高;而超声法的溶剂用量为 5 mL,时间为 30 min 所得大豆苷元、染料木素的含量稍低。

结果表明:利用超声波能快速、高效提取大豆异黄酮,在相同超声条件下,分别利用乙醇与甲醇对大豆异黄酮进行提取,具有相同的提取效果。因而超声法提取大豆异黄酮优于索氏法,可用更安全的乙醇作为提取液来取代甲醇。

2 超声波方法与新型方法的比较

近年来,亚临界水萃取技术应用于天然产物分析过程预处理的研究逐年增多,因此也被用来应用于异黄酮的提取。

丛艳波^[24]以中药槐角为原料,分别采用微波辅助法、超声辅助法及亚临界水法三种方法提取槐角异黄酮,并对 3 种提取方法进行了比较。微波辅助法最佳工艺:料液比 1:12.5 (g:mL)、乙醇浓度 60%、时间 7 min、温度 60℃、功率 500 W、提取率 77.0 mg·g⁻¹。超声辅助法最佳工艺:料液比 1:20 (g:mL)、乙醇浓度 80%、时间 40 min、温度 60℃、功率 200 W、提取率 156.3 mg·g⁻¹。亚临界水法最佳工艺:料液比 1:12.5 (g:mL)、时间 45 min、温度 130℃、提取率 232.8 mg·g⁻¹ [提取率 = 提取液中异黄酮的质量(mg)/槐角粉质量(g)]。

结果表明:亚临界水法提取槐角异黄酮的得率明显高于超声辅助法及微波辅助法。

周丽^[25]以野葛为原料,探索了野葛中异黄酮的提取工艺,从而为葛根异黄酮的利用和生产提供参考。并对亚临界水法和超声辅助提取法所得的葛根异黄酮提取率进行了比较,表明超声辅助法在料液比 1:30 (g:mL)、乙醇浓度 70%、时间 45 min、温

度 50℃、功率 400 W 时,提取率最高为 6.76%;亚临界法在料液比 1:25 (g:mL)、时间 30 min、温度 130℃、压力 0.9 MPa 时,提取率最高为 7.85%。

对比试验结果,不难发现新型方法中亚临界水法提取异黄酮的得率明显高于超声辅助提取,但是这种提取法对仪器设备要求较高,目前只适用于较小的规模的试验研究。

3 超声波正交试验提取法

潘廖明^[26]、郭建等^[27]均利用超声辅助分别提取脱脂豆粕和脱脂豆粉中的异黄酮,潘廖明比较了醇提法与超声及超声加搅拌辅助提取大豆异黄酮的效果,正交试验结果显示,当超声频率为 25 kHz、超声功率为 160 W、乙醇浓度为 50%、料液比为 1:6 (g:mL)、60℃ 超声处理 60 min 时,大豆异黄酮的得率和含量分别可达 4.23 mg·g⁻¹ 和 2.74%,与醇提法相比分别提高了 3.93% 和 7.87%;采用相同条件下的超声加搅拌(300 r·min⁻¹)处理,大豆异黄酮得率可达 4.36 mg·g⁻¹,与单纯超声辅助提取法相比提高了 3.07%。而郭建通过单因素试验和响应面(RSM)优化,确定了超声辅助提取大豆异黄酮的工艺条件:料液比 1:20 (g:mL)、乙醇浓度 70%、超声时间 120 min、温度 70℃、功率 250 W 时,提取率最高为 2.104% (注:提取量(mg/g) = 大豆异黄酮质量/豆粕质量)。

由于两者用的料液比、溶剂浓度、超声功率、时间、温度都不相同,所以从脱脂豆粕中提取的异黄酮的量和从脱脂豆粉中提取的异黄酮量的相差较大。

左蕾蕾等^[28]将葛根分离淀粉后的残渣用于提取葛根异黄酮,豆亚静等^[29]通过超声波法提取黑豆异黄酮,两者都通过单因素、正交试验研究得到了不同原料中超声辅助提取异黄酮的最佳条件。结果表明,葛根粉最佳提取条件:料液比 1:18 (g:mL)、乙醇浓度 60%、超声时间 30 min、温度 60℃、功率 100 W 时,提取率最高为 88.3% (葛根总异黄酮提取率 = [(吸光度 - 0.0015) × 25 × 50 × 1] / [0.0748 × 溶液体积 × 葛根粉质量 × 多次提取累加得到的葛根异黄酮总含量(%)])。黑豆粉最佳提取工艺:料液比 1:46 (g:mL)、乙醇浓度 60%、超声时间 51 min、温度 52℃ 时,提取率最高为 1.883% [黑豆异黄酮提取率(%) = 黑豆中异黄酮的含量/黑豆的重量 × 100]。

两者的结果有很大的差异,也许是由于两者的原料的不同,左蕾蕾等^[28]将葛根分离淀粉后的残渣用于提取葛根异黄酮,而豆亚静等^[29]则通过超声波法直接从黑豆中提取异黄酮,最后异黄酮的提取率

算法也不同。

刘军海^[30]、李万林^[31]、孙体健等^[32]以豆粕或者发酵豆粕为原料,采用超声辅助提取异黄酮。在单因素试验的基础上,前者通过响应面试验设计优化了异黄酮提取的工艺条件;后两位通过正交试验确定提取豆粕中大豆异黄酮的最佳工艺条件。结果分别为:料液比 1:21 (g:mL)、乙醇浓度 79%、超声时间 25 min、温度 52℃、提取 1 次,平均提取率为 0.412%;料液比 1:20 (g:mL)、乙醇浓度 80%、超声时间 30 min、温度 60℃、提取 1 次,平均提取率为 0.352%;料液比 1:15 (g:mL)、乙醇浓度 80%、超声时间 20 min、温度 25℃、提取 2 次,平均提取率为 0.548% [大豆异黄酮提取率(%) = 提取液中大豆异黄酮总量/发酵豆粕量 × 100]。

虽然从结果来看,发酵豆粕中异黄酮的平均提取率最高(0.548%),但是这是因为提取了两次的原因。

超声提取法被史娟^[33]、刘建平等^[34]运用在天然产物活性成分分离中,以大豆豆渣为原料,采用超声提取法,运用单因素试验(分别以三单因素和四单因素为考量对象)与正交试验确定最佳提取条件,通过两者对比可明显得出超声温度对提取率具有重要影响。结果表明,在相同的料液比 1:20 (g:mL)、超声时间 40 min 下,前者于 70% 乙醇中,室温处理所得的提取量为 0.944 mg·g⁻¹;后者于 50% 乙醇浓度中,用 70℃ 温度超声处理得最高提取量为 3.094 mg·g⁻¹ [异黄酮提取率(mg·g⁻¹) = 提取液中大豆异黄酮总量/大豆豆渣样品质量]。

通过比较上述结果可以发现,两者的研究在料液比和超声时间相同,乙醇浓度相差不太大的情况下,提取量有很大的区别,可能是由于温度的影响。史娟^[33]的研究中超声温度为室温,而刘建平等^[34]的研究中超声温度为 70℃。

黄芸等^[35]在超声循环条件下,探讨从中药淡豆豉中提取总异黄酮的工艺,考察了不同固液比、提取温度、乙醇体积分数、超声时间、超声次数、超声功率对总异黄酮提取率的影响。通过单因素试验和正交试验 L₉(3⁴) 确定最佳工艺条件为:提取温度 50℃,乙醇体积分数为 60%,超声功率 800 W,超声时间 90 (30, 30, 30) min。按最佳工艺扩试 3 次,淡豆豉中总异黄酮平均提取率达 1.697% (异黄酮提取率 = 提取液中大豆异黄酮总量/淡豆豉样品质量),相对标准偏差(RSD)为 2.0% (n=3)。

4 其它方法辅助的超声提取法

陈雅维等^[36]采用纤维素酶解-超声偶联新工艺对葛根中总异黄酮提取进行优化,以提高其收

率。纤维素酶是作为细胞壁降解酶来探索异黄酮从葛根中溶解出的可能性。在单因素试验的基础上,利用 Box-Behnken 响应面试验设计,以蒸馏水作为提取溶剂,对温度、酶浓度、时间进行三因素三水平的试验设计优化。结果表明最佳提取工艺条件为:温度 34℃、酶浓度 0.63 mg·mL⁻¹、时间 62 min。在此条件下,葛根总异黄酮提取率为 7.10%,与预测值的相对误差为 0.34%。酶解-超声偶联工艺是一种新型、快速、有效的总异黄酮提取方法。

李翠鸥等^[37]采用油相萃取-水相 β-葡萄糖苷酶解两相体系,通过单因素与正交试验,考察超声时间、温度、酶量、pH 等因素对超声辅助酶水解法提取游离型异黄酮苷元效果的影响,筛选优化提取条件。从而建立起两相体系超声辅助酶水解法转化提取异黄酮苷元的制备工艺。结果表明两相体系超声辅助酶水解法提取异黄酮苷元的最佳工艺条件是:超声时间 60 min,超声温度 45℃,酶量 10 U·100 mL⁻¹,水解液 pH 为 5,提取率为 0.214%。在此条件下,β-葡萄糖苷酶发挥了最佳的水解转化活性。该工艺流程简便,溶剂使用量少,酶解时间短,适用于规模化生产制备。

范蕴芳等^[38]探讨超声-微波辅助技术提取葛根异黄酮的最佳工艺条件。以 50% 乙醇作为提取溶剂,句容葛根作为原料,通过采用超声-微波辅助技术进行提取,以异黄酮得率为指标,考察微波功率、提取时间、料液比等因素对提取效果的影响,确定最佳的提取工艺参数。超声-微波辅助技术提取葛根异黄酮的最佳工艺条件为:提取时间 31.2 min,料液比 1:30 (g:mL),微波功率 98 W,超声功率 50 W,在此条件下,葛根异黄酮得率为 8.92% [葛根异黄酮得率 = (葛根异黄酮提取量/葛根质量) × 100%]。超声-微波提取法不仅缩短了提取时间,而且提高了葛根异黄酮的得率,是一种适合葛根异黄酮的高效提取方法。

徐化能^[39]研究了葛藤异黄酮的超声浸取分离提取,试验测定了不同的超声电功率下,采用不同组成的乙醇水溶液和正丁醇/水两相系统超声强化浸取葛藤异黄酮,考察了浸取时间、超声电功率和溶剂组成对总异黄酮得率的影响,结果表明,提高超声电功率可以促进植物组织的破坏和溶剂的渗透,因此可以提高总异黄酮的浸取得率和浸取速率,建立超声强化浸取模型,即 50% 乙醇水溶液和 1:1 正丁醇/水两相系统分别是浸取总异黄酮的最优单相浸取剂和两相浸取剂,此时总异黄酮的得率随着超声处理时间的延长和超声电功率的增加而增加。

超声强化浸取技术具有这种高效、增产、节能等特点,在有效成分的浸取方面有着广泛的应用前

景,又由于该技术与超临界萃取,微波辅助浸取等其它高新的浸取技术相比较而言,设备成本低,操作工艺简单,因此其在工业上的推广也有着很大的可行性。

张艳^[40]首先建立了超声提取-三波长测定的优化体系。利用超声波法作为提取方法,以鞠兴荣等^[41]确定的三波长紫外分光光度作为测定方法,通过单因素试验分析了超声提取功率,乙醇浓度,料液比和提取时间对大豆异黄酮提取效果的影响;又以此为依据,利用 $L_9(3^4)$ 正交表设计这四个因素的正交试验,试验结果表明超声波提取最佳条件为:乙醇浓度 50%,提取时间 30 min,料液比 1:20,超声功率 100 W。

综合近年来超声波辅助的异黄酮提取研究进展,不难发现,乙醇浓度 50%,温度 45℃,提取时间 60 (30, 30) min,提取功率越高(取决于试验中涉及的所有设备)所得异黄酮提取率越高。但这种应用目前还多是手工操作,主要用在小型试验室,要想应用于大规模的工业生产,尚需解决工业设备放大的问题。超声波辅助萃取快速、价廉、提取率高。在各种样品中,无论是对有机物还是无机物,超声波辅助萃取都有较广泛的应用。尽管超声萃取技术的应用时间不长,但已受到广大科技工作者的关注。超声波辅助萃取可以说是一项符合可持续发展有利于环保的“绿色技术”。随着人们对超声萃取技术的进一步了解,其应用前景将会更加广阔。

参考文献

[1] 高秀芝,刘慧,丁雪莲,等. 大豆异黄酮的研究与应用进展[J]. 食品科学,2004,25(11):386-391. (Gao X Z, Liu H, Ding X L, et al. Progress on the study and application of soybean isoflavones[J]. Food Science,2004,25(11):386-391.)

[2] 孙玲,魏振承,徐志宏,等. 大豆异黄酮提取纯化及其抗衰老作用初探[J]. 食品科学, 2002,23(8):267-270. (Sun L, Wei Z C, Xu H Z, et al. Preliminary study on extraction, purification and anti-senility function of isoflavones[J]. Food Science, 2002,23(8):267-270.)

[3] 孙克杰,汤坚. 异黄酮类化合物在不同氧化体系中的作用研究[J]. 食品科学, 2001,22(3):21-26. (Sun K J, Tang J. Study on the effect of isoflavones in different oxidation system[J]. Food Science, 2001,22(3):21-26.)

[4] 刘志胜,李里特,辰巳英三. 大豆异黄酮及其生理功能研究进展[J]. 食品工业科技,2000,21(1):78-80. (Liu Z S, Li L T, Tatsumi Eizo. The research on soybean isoflavones and its physiological functions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2000, 21(1):78-80.)

[5] Terigar B, Balasubramanian S, Boldor D, et al. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system; Design and performance evaluation [J] . Bioresource Technology, 2010, 101 (7) : 2466-2471.

[6] 江英,邓辉,党亚丽,等. 大豆异黄酮提取条件的研究[J]. 食

品研究与开发,2004,25(3):67. (Jiang Y, Deng H, Dang Y L, et al. Research of soybean isoflavone extraction conditions[J]. Food Research and Development,2004, 25(3):67.)

[7] 袁龙, 王晓磊, 刘建周. 大豆中异黄酮提取条件及其在提取液中的存在形式[J]. 徐州师范大学学报(自然科学版),2004, 22(3):55. (Yuan L, Wang X L, Liu J Z. Study on the extraction conditions of isoflavones from soybean meal and their existing forms in the extracting solvent[J]. Journal of Xuzhou Normal University (Natural Science Edition),2004, 22(3):55.)

[8] 王丽娟,张永忠,张丽丽. 超声波辅助法提取大豆酱油饼中大豆异黄酮[J]. 中国油脂,2009,34(5):52-55. (Wang L J, Zhang Y Z, Zhang L L. Ultrasound-assisted extraction isoflavone from soybean sauce cake[J]. China oils and fats,2009,34(5):52-55.)

[9] 张炳文,宋永生,郝征红,等. 大豆异黄酮酸水解工艺的研究探讨[J]. 中同粮油学报,2003,18(3):44. (Zhang B W, Song Y S, Hao Z H, et al. Research process on soybean isoflavones acid hydrolysis[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2003,18(3):44.)

[10] 汪海波,刘大川,李永明,等. 酸水解法提取大豆异黄酮甙元工艺研究[J]. 食品科学,2003,42(4):98. (Wang H B, Liu D C, Li Y M, et al. Acid hydrolysis method to extract soybean isoflavone aglycone[J]. Food Science,2003,42(4):98.)

[11] 刘中华,赵锦慧,梁少君. 微波辅助提取豆粕中大豆异黄酮[J]. 大豆科学,2012,31(6):993-995. (Liu Z H, Zhao J H, Liang S J. Microwave-assisted extraction of soybean isoflavone from soybean meal[J]. Soybean Science,2012,31(6):993-995.)

[12] Zuo Y B, Zeng A W, Yuan X G, et al. Extraction of soybean isoflavones from soybean meal with aqueous methanol modified supercritical carbon dioxide[J]. Journal of Food Engineering,2008, 89(4):384-389.

[13] 陈赞,李建明,章丽娟,等. 亚临界水萃取技术及其在天然产物分析中的应用[J]. 中药材,2009,32(4):636-641. (Chen Y, Li J M, Zhang L J, et al. Subcritical water extraction technology and its application in the analysis of natural products [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials,2009,32(4):636-641.)

[14] Kamaljit V, Raymond M, Lloyd S, et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry -A review[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2008,9:161-169.

[15] 刘祥义. 超声波提取元宝枫叶总黄酮方法研究[J]. 云南化工,2003,30(1):27. (Liu X Y. Study on the extraction of flavonoids from the leaves of acer truncatum by ultreasonic treatment [J]. Yunnan Chemical Technology,2003,30(1):27.)

[16] 钱丽丽,左锋,唐彦军. 大豆异黄酮提取方法的研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2006,18(5):64-67. (Qian L L, Zuo F, Tang Y J. Research on several extraction methods of soy isoflavone[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University,2006,18(5):64-67.)

[17] 史宣明,岳琳,武丽荣. 大豆异黄酮的提取与精制[J]. 中国油脂, 2001, 26(2):3-5. (Shi X M, Yue L, Wu L R. The extraction and refining of Soybean isoflavone[J]. China Oils and Fats, 2001, 26(2):3-5.)

[18] 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. (Peng Y, Yu S L. Advances in extraction of soy isoflavones [J]. Soybean Science, 2012, 31(2):320-323.)

- [19] Mauricio A, Rostagno, Miguel P, et al. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones [J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1012(2):119-128.
- [20] Mauricio A, Rostagno, Miguel P, et al. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597: 265-272.
- [21] 谢明杰,宋明,邹翠霞. 超声波提取大豆异黄酮[J]. 大豆科学,2004,23(1):75-76. (Xie M J, Song M, Zou C X. Ultrasonic extraction of soybean isoflavones [J]. *Soybean Science*, 2004, 23(1):75-76.)
- [22] 田琳,尉震,石军,等. 超声波法在大豆异黄酮提取中的应用[J]. 科技创新导报,2009(12):111. (Tian L, Wei Z, Shi J, et al. The ultrasonic method in the application of the soybean isoflavone extraction [J]. *Science and Technology Innovation Herald*, 2009(12):111.)
- [23] 肖虹,张晓丽,申纯渥,等. 超声乙醇法提取大豆异黄酮的研究[J]. 食品与发酵工业,2006(5):138-139. (Xiao H, Zhang X L, Shen C W, et al. Study of extraction isoflavone from soybean by ultrasonic ethanol method [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006(5):138-139.)
- [24] 丛艳波. 槐角异黄酮的提取、纯化及水解工艺的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2011. (Cong Y B. *Fructus sophorae isoflavone extraction, purification and research of hydrolysis process* [D]. Harbin:Northeast Agricultural University,2011.)
- [25] 周丽. 葛根异黄酮的提取、纯化及水解工艺的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2012. (Zhou L. *The extraction, purification of pueraria isoflavones and hydrolysis process research* [D]. Harbin:Northeast Agricultural University,2012.)
- [26] 潘廖明,姚开,贾冬英,等. 超声辅助提取大豆异黄酮的研究[J]. 中国油脂,2003,28(11):85-87. (Pan L M, Yao K, Jia D Y, et al. Extraction of soybean isoflavone assisted by ultrasonic wave [J]. *China Oils and Fats*, 2003, 28(11):85-87.)
- [27] 郭建,王梦凡,齐威,等. 响应面优化超声辅助提取大豆异黄酮联产分离蛋白和低聚糖[J]. 大豆科学,2012,31(4):655-660. (Guo J, Wang M F, Qi W, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of soybean isoflavones by response surface methodology and simultaneous preparation of protein isolates and oligosaccharides [J]. *Soybean Science*, 2012, 31(4):655-660.)
- [28] 左蕾蕾,刘文洁,曾凡骏. 葛根综合利用与超声辅助提取葛根异黄酮工艺的研究[J]. 食品与发酵科技,2011,47(4):60-63. (Zuo L L, Liu W J, Zeng F J. The comprehensive utilization of pueraria and ultrasonic assisted extraction of isoflavones from pueraria residue [J]. *Food and Fermentation Technology*, 2011, 47(4):60-63.)
- [29] 豆亚静,张晓龙,常丽新,等. 响应面优化超声波法提取黑豆异黄酮的工艺研究[J]. 食品工业科技,2013,34(5):259-263. (Dou Y J, Zhang X L, Chang L X, et al. Research of ultrasonic wave extraction of isoflavone from black soybean by response surface methodology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(5):259-263.)
- [30] 刘军海,耿敬章. 响应面法优化超声辅助提取豆粕中异黄酮工艺研究[J]. 中国油脂,2013,38(4):72-74. (Liu J H, Geng J Z. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of isoflavone from soybean meal by response surface methodology [J]. *China Oils and Fats*, 2013, 38(4):72-74.)
- [31] 李万林. 豆粕中大豆异黄酮的超声辅助提取工艺研究[J]. 皮革与化工,2014,31(1):13-16. (Li W L. Study on technology of ultrasound-assisted extracting for soy isoflavones in soybean meal [J]. *Leather and Chemicals*, 2014, 31(1):13-16.)
- [32] 孙体健,王浩江,曹晓峰,等. 发酵豆粕中大豆异黄酮的超声波提取工艺[J]. 中国食品卫生杂志,2006,18(5):418-420. (Sun T J, Wang H J, Cao X F, et al. Study on conditions of ultrasonic extraction of soybean isoflavones from fermented soybean cake [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2006, 18(5):418-420.)
- [33] 史娟. 豆渣中大豆异黄酮的超声提取研究[J]. 江苏调味副食品,2010,27(4):10-13. (Shi J. A research on extraction of soybean isoflavones from soybean residue by ultrasound [J]. *Jiangsu Condiment and Subsidiary Food*, 2010, 27(4):10-13.)
- [34] 刘建平,杨小敏,王雪芳,等. 大豆豆渣中异黄酮的超声提取工艺研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(4):2042-2043. (Liu J P, Yang X M, Wang X F, et al. Study on the ultrasonic extraction technology of isoflavone from soybean residues [J]. *Journal of Anhui Agriculture*, 2010, 38(4):2042-2043.)
- [35] 黄芸,崔力剑,窦玉红,等. 中药淡豆豉异黄酮类化合物的超声循环提取[J]. 精细化工,2008,25(3):231-233. (Huang Y, Cui L J, Dou Y H, et al. Ultrasonic and circulated extraction of total isoflavones from semen sojae praeparatum [J]. *Fine Chemicals*, 2008, 25(3):231-233.)
- [36] 陈雅维,周惠云,王建普. 纤维素酶解-超声偶联法提取葛根中总异黄酮的工艺优化[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(7):933-938. (Chen Y W, Zhou H Y, Wang J P. Cellulase coupling with ultrasound assisted extraction of total isoflavonoids from radix puerariae [J]. *Natural Product Research and Development*, 2012, 24(7):933-938.)
- [37] 李翠鸥,陈敬荣,郑尧杰,等. 两相体系超声辅助酶水解法提取异黄酮苷元[J]. 广东药学院学报,2013,29(5):525-529. (Li C O, Chen J R, Zheng Y J, et al. Study on extracting isoflavone aglycones with ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis in two-phase solvent system [J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2013, 29(5):525-529.)
- [38] 范蕴芳,胡碧纯,陈慧,等. 超声-微波辅助提取葛根异黄酮工艺研究[J]. 安徽农业科技,2013,41(12):5495-5497. (Fan Y F, Hu B C, Chen H, et al. Study on the ultrasonic microwave assisted extraction technology of isoflavonoids from radix pueraria [J]. *Journal of Anhui Agriculture*, 2013, 41(12):5495-5497.)
- [39] 徐化能. 葛藤异黄酮的浸取与分离过程研究[D]. 杭州:浙江大学,2007. (Xu H N. *Extraction and separation of isoflavones from stem of Pueraria lobata (Wild.) Ohwi* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007.)
- [40] 张艳. 大豆异黄酮测定方法的优化及大豆 F3H 基因沉默表达载体的构建[D]. 吉林:吉林大学,2011. (Zhang Y. *The optimization of the determination of soybean isoflavones and soybean F3H gene silencing construction of expression vector* [D]. Jilin: Jilin University, 2011.)
- [41] 鞠兴荣,袁建,汪海峰. 三波长紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量的研究[J]. 食品科学,2001,22(5):46-48. (Ju X R, Yuan J, Wang H F. Studying on the determination of soybean isoflavone content by three wavelengths UV spectrophotometry [J]. *Food Science*, 2001, 22(5):46-48.)