

# 大豆异黄酮提取工艺优化及其活性研究

周建芹

(苏州大学药学院, 苏州 215123)

**摘要** 研究大豆异黄酮提取的最佳工艺条件及其活性。在单因素试验和  $L_9(3^4)$  正交试验的基础上, 确定乙醇-水体系提取大豆异黄酮的最佳工艺条件: 乙醇浓度 80%, 液料比(溶剂: 原料) 24: 1, 提取温度 50 °C。对异黄酮分别进行清除自由基和抑菌的活性研究, 结果表明: 大豆异黄酮有良好的清除羟基自由基和超氧自由基的能力; 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及米根霉的生长有明显的抑制作用。

**关键词** 大豆异黄酮; 提取工艺; 清除自由基活性; 抑菌活性

**中图分类号** TS201.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0276-04

## OPTIMIZATION OF EXTRACTION TECHNOLOGY OF SOYBEAN ISOFLAVONES AND ITS PHYSIOLOGICAL ACTIVITY ANALYSIS

ZHOU Jian-qin

(School of Pharmacy, Suzhou University, Suzhou 215123)

**Abstract** The paper mainly concerned with the extraction and activities of soybean isoflavones. On the basis of single element experiments and  $L_9(3^4)$  orthogonal experiments, the optimum extraction conditions were obtained: ethanol concentration 80%, solvent to soybean ratio 24: 1, temperature 50 °C. Free-radical scavenging and anti-microbial activities of soybean isoflavones were analyzed, and the conclusion revealed that soybean isoflavones possessed superoxide radical and hydroxyl radical scavenging activities and suppressed the growth of *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and *Rhizopus oryzae*.

**Key words** Soybean isoflavones; Extraction technology; Free-radical scavenging activity; Anti-microbial activity

大豆是人类的重要食物资源, 大豆异黄酮是其主要功能成分之一, 具有防治癌症、降低血脂、防止动脉粥样硬化、抗氧化、预防骨质疏松和改善妇女更年期综合症等多种生理功能<sup>[1~4]</sup>。已被开发成多种保健功能产品。为高效利用大豆中的异黄酮, 本文对大豆异黄酮的提取工艺进行了优化, 并且检测了分离产品的抗自由基和抗菌性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

大豆, 市售; 大豆苷元和染料木素标品购自 Sigma 公司; 其余试剂均为分析纯。

供试菌种: 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大

收稿日期: 2005-07-11

基金项目: 苏州大学青年基金项目(Q3132531)

作者简介: 周建芹(1975-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为酶工程, 生物制药。

肠杆菌、米根霉和黑曲霉均由本实验室提供。

仪器:紫外分光光度计,分析天平,真空旋转蒸发仪,高速台式离心机。

## 1.2 大豆粉脱脂处理

将大豆清洗后放在干燥箱中干燥 12 h,粉碎过 40 目筛。将大豆粉 200 g 中加入 200 mL 正己烷,水浴搅拌 1 h。同法处理两次,干燥后备用。

## 1.3 大豆异黄酮提取方法、含量测定和提取率计算

称取 2 g 脱脂豆粉,加入一定体积乙醇溶液,于一定温度水浴锅中保温浸提 1 h 后,以 12,000 r/min 的转速离心 5 min,取上清液测定总体积和大豆异黄酮含量。按文献[5]方法采用紫外分光光度法测定大豆总异黄酮含量。大豆异黄酮提取率(%)以单位质量大豆粉提取的异黄酮质量表示。

## 1.4 影响大豆异黄酮提取率的单因素试验

选取乙醇浓度、提取温度和提取液料比的不同水平,考察单因素对大豆异黄酮提取率的影响。

## 1.5 大豆异黄酮提取工艺的优化试验

根据单因素的试验结果,设计  $L_9(3^4)$  正交试验,对结果进行分析,以确定最佳提取工艺条件。

## 1.6 大豆异黄酮清除羟基自由基的测定

按文献[6]方法,反应体系中含 8.8 mmol/L  $H_2O_2$  1 mL、9 mmol/L  $FeSO_4$  1 mL、9 mmol/L 水杨酸—乙醇 1 mL、不同浓度的异黄酮样品溶液 1 mL。其中  $H_2O_2$  最后加入体系中以启动反应,37 °C 下反应 0.5 h。以蒸馏水作参比,在 510 nm 下测定不同异黄酮浓度下的吸光度  $A_x$ 。以 1 mL 蒸馏水代替异黄酮测定  $A_0$ ,以 1 mL 蒸馏水代替  $H_2O_2$  测定异黄酮溶液的本底吸光度  $A_{x0}$ 。羟自由基清除率(%) =  $[A_0 - (A_x - A_{x0})] / A_0 \times 100\%$

## 1.7 大豆异黄酮清除超氧自由基的测定

按照参考文献[6]和[7]的方法,取 4.5 mL 50 mmol/L Tris—HCl 缓冲液(pH 8.2),4.2 mL 蒸馏水,混匀后在 25 °C 水浴中保温 20 min。取出后立即加入在 25 °C 预热过的 3 mmol/L 邻苯三酚 0.3 mL (以 10 mmol/L HCl 配制,空白管用 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液),迅速摇匀后倒入比色杯,325 nm 下每隔 30 s 测定吸光度,计算线性范围内每分钟吸光度的增加,即为邻苯三酚的自氧化速率  $\Delta A_0$ 。将蒸馏水换成不同浓度的异黄酮样品,按上述方法测定  $\Delta A$ 。超氧自由基抑制率(%) =  $(\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A_0 (100\%, \Delta A_0$  和  $\Delta A$  的单位均为吸光度每分钟的增值。

## 1.8 大豆异黄酮抑菌实验

采用滤纸片法<sup>[8]</sup>测定大豆异黄酮对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、米根霉和黑曲霉的抑制效果。

# 2 结果与讨论

## 2.1 大豆异黄酮提取工艺的单因素条件确定

2.1.1 乙醇浓度对提取率的影响 图 1 所示,乙醇浓度对大豆异黄酮提取率影响极大。当乙醇浓度低于 80% 时,虽然能保证较高的提取率,但提取液比较混浊,蛋白质不容易分离除去,影响异黄酮产品纯度。而用无水乙醇提取时,仅有很少的异黄酮被提取,原因可能是无水乙醇使豆粉颗粒表面的蛋白质迅速变性凝固,形成一个保护膜,使异黄酮难以提取出来。以 80% 的乙醇提取效果最佳,提取率较高,而且提取液中的蛋白质比较容易分离除去。

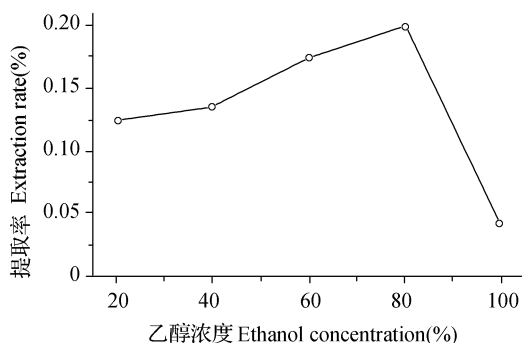


图 1 乙醇浓度对提取率的影响  
(温度 50 °C, 液料比 20: 1)

Fig. 1 Effects of ethanol concentration on extraction rate  
(temperature 50 °C, solvent to soybean ratio 20: 1)

2.1.2 提取温度对提取率的影响 从图 2 看出,当提取温度为 50 °C 时,提取率最高。温度升高或降低,提取率都有所下降。温度较高时提取率降低的原因可能是高温引起活性物质的分解,并且 70 °C 时提取,提取液中所含的蛋白质较多,经一次离心不能除去,需要静置 12 h 以上才能离心除去。所以,提取温度选取 50 °C 较合适。

2.1.3 提取液料比对提取率的影响 大豆异黄酮的提取率和液料比紧密相关(图 3)。当液料比较小时,随着溶剂用量的增加,异黄酮的提取率增加,当液料比大于 20: 1 后,提取率上升的趋势变缓。

## 2.2 大豆异黄酮最佳提取工艺条件的正交试验

表 1 正交实验设计与结果

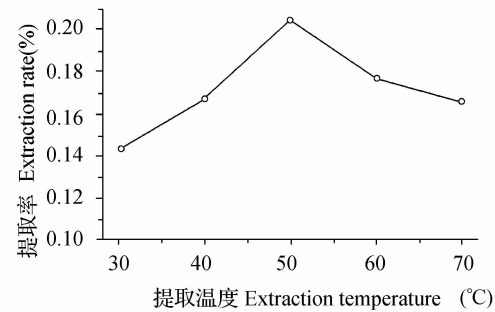


图2 提取温度对提取率的影响  
(乙醇浓度 80% ,液料比 20: 1)

Fig.2 Effects of temperature on extraction rate  
(ethanol concentration 80% ,solvent volume  
to soybean weight 20: 1)

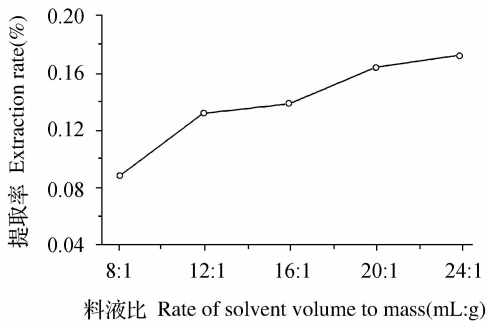


图3 液料比对提取率的影响(乙醇浓度 80% ,温度 50 ℃)

Fig.3 Effects of solvent volume to soybean  
weight on extraction rate (ethanol concentration  
80% ,temperature 50 ℃)

Table 1 Arrangements and results of the orthogonal experiments

试验号 No.	A 乙醇浓度 Ethanol conc. (%)	B 液料比 Rate of solvent volume to mass (mL: g)	C 温度 Temp. (℃)	提取率 Extraction rate (%)
1	1 (60)	1 (8: 1)	1 (30)	0.104
2	1	2 (16: 1)	2 (50)	0.184
3	1	3 (24: 1)	3 (70)	0.204
4	2 (80)	1	2	0.127
5	2	2	3	0.212
6	2	3	1	0.161
7	3 (100)	1	3	0.083
8	3	2	1	0.064
9	3	3	2	0.146
K1	0.492	0.341	0.329	
K2	0.500	0.460	0.437	

在单因素试验的基础上,按照正交表  $L_9(3^4)$  的因素水平组合,提取时间定为 1 h,进行正交试验,以异黄酮的提取率为考核指标,结果见表 1。极差分析表明,乙醇浓度对提取率的影响最大,其次是液料比。最佳条件组合是  $A_2B_3C_3$ ,即乙醇浓度 80%、液料比 24: 1、温度 70 ℃。由于提取温度不是影响异黄酮提取率的显著因素,而且提取温度为 70 ℃时,提取液中所含的蛋白质较多,需要静置 12 h 以上才能离心除去,所以综合单因素和正交试验结果,最佳条件组合选取  $A_2B_3C_2$ ,即乙醇浓度为 80% ,液料比 24: 1,温度 50 ℃。

采用该优化工艺提取大豆异黄酮进行验证实验,提取率为 0.234% ,而且其中的蛋白质易于用离心的方法除去,提取过程简单易行。

2.3 大豆异黄酮抗氧化特性分析

羟基自由基和超氧自由基的大量产生可以导致细胞膜脂质发生过氧化反应,使蛋白质交联变性和核酸断裂,是生物体系过氧化的主要表现之一。图 4 表明,大豆异黄酮具有显著活性氧自由基清除能力,并且随异黄酮浓度的增大其清除自由基的效果增强,在异黄酮浓度为 150  $\mu\text{g/mL}$  时羟基自由基和超氧自由基清除率分别可以达到 80% 和 45% 左右。

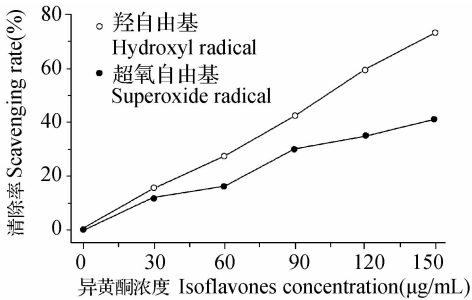


图4 大豆异黄酮清除氧自由基的浓度效应

Fig.4 Concentration response of soybean  
isoflavones scavenging oxygen free radicals

2.4 大豆异黄酮抑菌性能的研究

由大豆异黄酮的抑菌试验结果可以得出异黄酮对枯草芽孢杆菌和黑曲霉没有抑制作用,而对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和米根霉有明显抑制作用,并且对三者的抑制作用基本上都随浓度的增大而增强(图 5),异黄酮对金黄色葡萄球菌的抑制作用大于对大肠杆菌的抑制作用,当异黄酮浓度在 100  $\mu\text{g/mL}$  以下时对米根霉的抑制作用明显高于其它两种细菌。

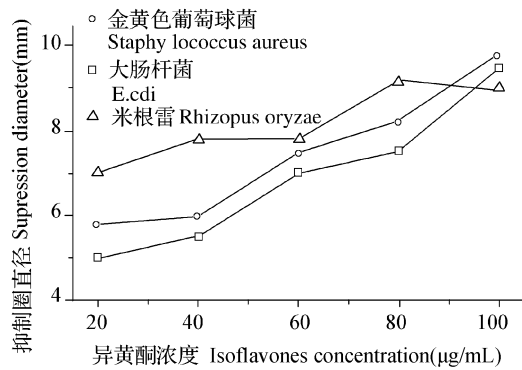


图5 大豆异黄酮对三种菌的抑菌效果  
Fig. 5 Anti-microbial effects of soybean isoflavones

3 结论

3.1 乙醇-水体系提取大豆异黄酮的最佳工艺条件是:乙醇浓度 80%,液料比 24: 1(溶剂: 原料),温度 50 ℃,在此条件下大豆异黄酮的提取率为 0.234。

3.2 大豆异黄酮对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和米根霉都有抑制的作用,并且对三者的抑制作用基本上都随浓度的增大而增强。

3.3 大豆异黄酮对羟基自由基和超氧自由基有比较好的清除作用,异黄酮的浓度越大清除的效果越明显。

参 考 文 献

[1] Hendrich, Suzanne. Bioavailability of isoflavones [J]. Journal of Chromatography B, 777 (1-2): 203-210.

[2] Li-Hsun chang, Ya-Chuan Cheng, Chieh-Ming Chang. Extracting and purifying isoflavones from defatted soybean flakes using superheated water at elevated pressures [J]. Food Chemistry, 2004, 84 (2): 279-285.

[3] Fritz Kay L, Seppanen C M, Kurzer Mindy S., et al. The in vivo antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects [J]. Nutrition Research, 2003, 23 (4): 479-487.

[4] Rostagno Mauricio A, Palma Miguel, Barroso Carmelo G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1012 (2): 119-128.

[5] 李晓霞,王宏雁,金华丽,等. 大豆异黄酮、大豆皂甙的提取工艺研究 [J]. 中国油脂, 2002, 27 (6): 41-44.

[6] 陈留勇,孟宪军,贾薇,等. 黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基、提高免疫活性研究 [J]. 食品科学, 2004, 25 (1): 167-170.

[7] 邹国林,桂兴芬,钟晓凌,等. 一种 SOD 的测活方法-邻苯三酚自氧化法的改进 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 4: 71-73.

[8] 周建新,孙明,汪海峰,等. 芝麻素的应用性能研究 [J]. 食品科学, 2004, 25 (1): 102-105.