

## 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

郭建,王梦凡,齐 巍,苏荣欣,何志敏

(天津大学 化工学院 化学工程研究所,天津 300072)

**摘要:**设计了一条绿色高效地提取纯化大豆异黄酮,并联产制备大豆分离蛋白和低聚糖的工艺。首先通过单因素实验和响应面(RSM)优化,确定了超声辅助提取大豆异黄酮的工艺条件:超声功率 250 W,70%乙醇,提取温度 70℃,提取时间 120 min,大豆异黄酮提取量为  $2\,104.25\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,提取率 85.34%;并通过三步简单的分离纯化从豆粉中得到  $1\,838.00\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、纯度为 62.09% 的异黄酮,最终收率 74.54%;最后以提取异黄酮后的剩余豆渣为原料,联产制备了大豆分离蛋白( $216.25\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )和低聚糖( $73.75\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ),全过程无废液废渣排出。

**关键词:**大豆异黄酮;响应面优化;提取;纯化;综合利用

中图分类号:TS218

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)04-0655-07

## Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Soybean Isoflavones by Response Surface Methodology and Simultaneous Preparation of Protein Isolates and Oligosaccharides

GUO Jian, WANG Meng-fan, QI Wei, SU Rong-xin, HE Zhi-min

(Chemical Engineering Research Center, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** An effective and green strategy was developed to obtain isoflavones from soybean. Soy protein isolates and oligosaccharides were also obtained from soybean dregs simultaneously. Firstly, the optimal extraction conditions were investigated by single factor experiments and RSM optimization. A high extraction amount ( $2\,104.25\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and yield (85.34%) of isoflavones were achieved under the optimal extraction conditions: ultrasonic power of 250 W, 70% ethanol, 70℃, 120 min. Secondly, the purified isoflavones of  $1\,838.00\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  was obtained with purity of 62.09% and recovery of 74.54% via three simple purification steps. Finally, the amount of soy protein isolates and oligosaccharides obtained from soybean dregs achieved  $216.25\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $73.75\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively. There is no waste liquid and solid generated from the whole process. The soybean could be utilized comprehensively through this strategy.

**Key words:** Soybean isoflavones; Extraction; Purification; Comprehensive utilization

大豆异黄酮是大豆生长过程中产生的一类次级代谢产物,是雌激素的一种<sup>[1]</sup>。诸多研究表明大豆异黄酮对多种疾病均有预防和医疗作用,如乳腺癌、结肠癌、心脑血管疾病、更年期综合征等<sup>[2-4]</sup>。目前,已发现的大豆异黄酮有 12 种单体,包括 3 种异黄酮苷元和其相应的糖苷(glycoside)、乙酰基(acetyl)糖苷和丙二酰基(malonyl)糖苷<sup>[5-6]</sup>。

大豆异黄酮的提取工艺多以乙醇水溶液为提取剂,提取方式也有多种,如加压溶剂提取<sup>[7]</sup>,微波辅助提取<sup>[8]</sup>,超临界二氧化碳萃取<sup>[3]</sup>等,虽然效果理想,但耗能较大、设备复杂。在天然产物提取过程中,超声波强烈的震动和空化作用可加速活性成分的浸出,大大缩短提取时间<sup>[9]</sup>,因此超声辅助手段在天然产物提取研究中得到了广泛应用,但针对大豆异黄酮提取工艺的开发尚缺少系统分析,尤其是利用响应面法优化超声辅助提取参数的报道还

很少。本文考察了超声辅助提取过程中各因素对提取效果的影响,通过响应面优化确定最优工艺条件,并分离制备纯度较高的大豆异黄酮样品,同时对全流程中使用的溶剂(乙醇,乙酸乙酯)进行有效回收;最后以异黄酮制备过程中剩余的豆渣为原料,联产制备分离蛋白和低聚糖,为大豆的综合开发利用提供有益参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂 大豆异黄酮标准品购于 Aladdin,贮存于 -45℃ 冰箱内;脱脂豆粉为实验室自制,异黄酮含量为  $2\,465.67\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ;超纯水为实验室自制;乙腈为市售色谱纯;其他溶剂如乙醇,乙酸乙酯,NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  等皆为市售分析纯。

1.1.2 仪器 高效液相色谱系统:Agilent1200 型,

收稿日期:2012-05-29

基金项目:国家自然科学基金项目(20976125,31071509);天津市应用基础研究计划项目(10JCYBJC05100)。

第一作者简介:郭建(1986-),男,在读硕士,研究方向为天然产物提取。E-mail:0510802009@163.com。

通讯作者:齐巍(1973-),女,教授,博士生导师,从事酶工程与技术研究。E-mail:qiwei@tju.edu.cn。

紫外检测器,手动进样器,四元泵,安捷伦科技有限公司;Vydac 218TP 型色谱柱(C18, 5  $\mu\text{m}$   $\times$  4.6 mm  $\times$  250 mm),美国 GRACE 公司;AT-132 型柱温箱, Autoscience 公司;超声细胞破碎仪 IID 型,新芝科技股份有限公司;DF-II 型集热式磁力加热搅拌器,江苏省荣华仪器制造有限公司;R-50 型旋转蒸发器,上海申生科技有限公司;SHB3 型真空泵,上海申生

科技有限公司;1810-C 型石英自动双重纯水蒸馏器,金坛市医疗仪器厂。

## 1.2 实验方法

1.2.1 提取纯化工艺流程 本文设计的提取纯化大豆异黄酮及联产分离蛋白和低聚糖的工艺流程如图 1 所示。

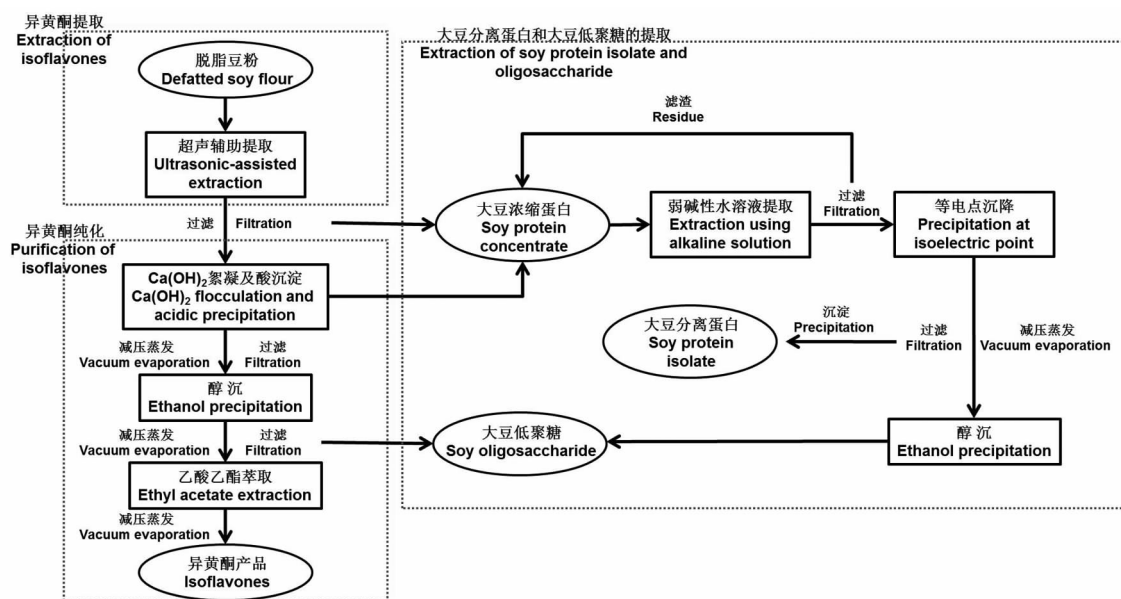


图 1 工艺流程

Fig. 1 The flow sheet

1.2.2 大豆异黄酮的分析检测 以 4 种常见大豆异黄酮,即大豆黄苷(daidzin),染料木苷(genistin),大豆苷元(daidzein),染料木素(genistein)作为目标产物,利用高效液相色谱法(HPLC)分析检测,色谱条件为:流动相,乙腈/水;梯度洗脱检测,30 min 内乙腈浓度从 10% 升至 37%;紫外检测波长 254 nm;柱温箱恒定 40℃。以色谱峰面积对进样浓度做线性回归分析,建立 4 种大豆异黄酮的标准曲线,根据标准曲线方程计算提取液中各种异黄酮含量,进而得出总异黄酮提取率。

1.2.3 超声辅助提取大豆异黄酮 称取 10 g 脱脂豆粉,放入 250 mL 三口烧瓶内,置于恒温水浴锅中,以乙醇水溶液为提取剂进行超声辅助提取,为避免连续超声引发局部高温,超声装置设置为开 2 s 停 2 s,提取完成后,趁热过滤,取滤液利用 HPLC 分析检测,滤渣贮存备用。

实验分为单因素实验和响应面优化两部分,单因素实验时,保持其他条件相同,分别考察提取温度(30, 40, 50, 60, 70, 80℃)、提取时间(40, 60, 80, 100, 120, 140 min)、乙醇浓度(20%, 35%, 50%, 65%, 80%, 95%)及超声功率(0, 50, 100, 150, 200, 250 W)对单位豆粉大豆异黄酮提取量的影响;以单

因素实验为基础,利用响应面优化并最终确定超声辅助提取的最佳工艺条件,单位豆粉大豆异黄酮提取量与提取率计算公式如下:

$$\text{单位豆粉大豆异黄酮提取量} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{提取液中异黄酮总量}}{\text{豆粉质量}}$$

$$\text{提取率} (\%) = \frac{\text{提取液中的异黄酮总量}}{\text{大豆中含有的异黄酮总量}} \times 100$$

1.2.4 大豆异黄酮的分离纯化 具体操作步骤为:1)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  絮凝及酸沉淀:在提取液中加入  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节 pH 至 9.0 ~ 10.0,常温下沉淀 1 h,滤去沉淀,用 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 调节 pH 至 4.5,常温下静置沉淀 1 h,滤去沉淀(此沉淀大部分为大豆蛋白,贮存备用),利用旋蒸仪蒸去液体,烘干称重;2) 醇沉:向上步烘干样品中加入无水乙醇 100 mL,4℃下沉淀 5 h,滤去沉淀(此沉淀大部分为大豆低聚糖,贮存备用),真空蒸去乙醇,烘干称重;3) 乙酸乙酯萃取:向上步所得样品中加入 70 mL 超纯水和 100 mL 乙酸乙酯,200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  转速下,常温萃取 4 h,通过分液漏斗静置分层,取上层乙酸乙酯相,真空蒸发,烘干称重,得大豆异黄酮样品。每步纯化步骤所得异黄酮纯度和异黄酮最终收率计算公式如下:

纯度(%) =

$\frac{\text{各步纯化所得单位质量豆粉总异黄酮质量}}{\text{各步纯化所得单位质量豆粉样品的总质量}} \times 100$

最终收率(%) =  $\frac{\text{最后纯化所得总异黄酮质量}}{\text{异黄酮的理论含量}} \times 100$

1.2.5 大豆分离蛋白和低聚糖的制备 以超声辅助提取异黄酮后剩余的豆渣为原料,烘干后粉碎,以 pH 8.0~9.0 的 NaOH 水溶液为提取剂,料液比(m:v)1:20,60℃下搅拌提取 1 h,过滤,取上清液,用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 HCl 调节 pH 至 4.5 后,静置 1h,取沉淀干燥即为大豆分离蛋白;真空蒸发浓缩上清液至 5 mL 左右,向浓缩液中加入 50 mL 乙醇,4℃下静置沉淀 5 h,取沉淀干燥即为大豆低聚糖样品。

## 2 结果与讨论

### 2.1 超声辅助提取大豆异黄酮单因素试验

2.1.1 提取温度对异黄酮提取量的影响 由图 2 可知,在 65% 乙醇,提取时间 120 min,超声功率 200 W 条件下,随着温度的升高大豆异黄酮提取量明显提高,当温度为 70℃ 时,提取量达到最大值为 2 052.05 μg·g<sup>-1</sup>,其中大豆黄苷(daidzin) 866.12 μg·g<sup>-1</sup>,染料木苷(genistin) 1 099.03 μg·g<sup>-1</sup>,大豆苷元(daidzein) 42.85 μg·g<sup>-1</sup>,染料木素(genistein) 44.05 μg·g<sup>-1</sup>,此时提取率为 83.22%;继续升高温度,异黄酮提取量下降,此现象是由于异黄酮在高温环境中发生降解所致,综合考虑确定适宜的提取温度为 70℃。

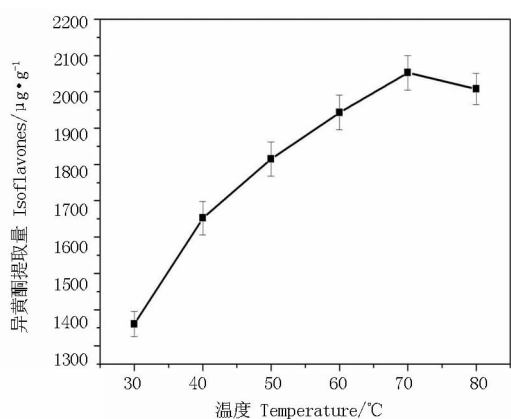


图2 提取温度对异黄酮提取量的影响

Fig.2 Isoflavones obtained at different extraction temperature

2.1.2 提取时间对异黄酮提取量的影响 如图 3 所示,在 65% 乙醇,提取温度为 70℃,超声功率 200 W 条件下,异黄酮的提取量随提取时间的延长而不断提高,当提取时间为 120 min 时,提取量达到 2 106.27 μg·g<sup>-1</sup>,其中,大豆黄苷(daidzin) 857.23 μg·g<sup>-1</sup>,染料木苷(genistin) 1 160.12 μg·g<sup>-1</sup>,大豆

苷元(daidzein) 45.82 μg·g<sup>-1</sup>,染料木素(genistein) 43.10 μg·g<sup>-1</sup>,此时异黄酮提取率为 85.42%;140 min 时,提取量为 2 116.44 μg·g<sup>-1</sup>,增幅已不明显,故选择适宜的提取时间为 120 min。由于超声装置设置为开 2 s 停 2 s,实际超声时间为 60 min。

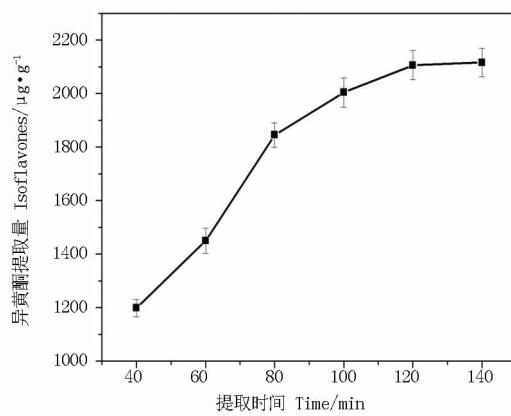


图3 提取时间对异黄酮提取量的影响

Fig.3 Isoflavones obtained at different time

2.1.3 乙醇浓度对异黄酮提取量的影响 如图 4 所示,在提取时间为 120 min,提取温度 70℃,超声功率 200 W 条件下,随着乙醇浓度的升高,异黄酮提取量明显增加,当乙醇浓度为 65% 时,异黄酮提取量达到 2 050.58 μg·g<sup>-1</sup>,其中大豆黄苷(daidzin) 855.72 μg·g<sup>-1</sup>,染料木苷(genistin) 1 119.17 μg·g<sup>-1</sup>,

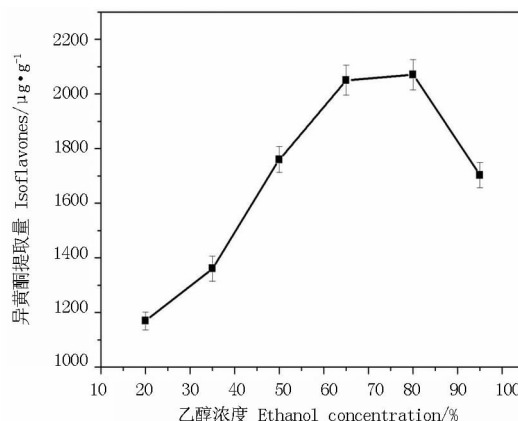


图4 乙醇浓度对异黄酮提取量的影响

Fig.4 Isoflavones obtained at different ethanol concentration

大豆苷元(daidzein) 40.14 μg·g<sup>-1</sup>,染料木素(genistein) 35.55 μg·g<sup>-1</sup>,此时提取率为 83.17%;继续提高乙醇浓度,提取量增幅不大,当乙醇浓度为 95% 时,提取量反而显著下降。这可能是因为 65% 乙醇的极性和异黄酮的极性较为接近,故确定适宜的乙醇浓度为 65%。

2.1.4 超声功率对异黄酮提取量的影响 如图 5 所示,在 65% 乙醇,提取时间为 120 min,提取温度为 70℃ 的条件下,随着超声功率的提高,异黄酮提

取量明显增加,当超声功率为 200 W 时,异黄酮提取量达到 2 099.27  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,其中大豆黄苷(daidzin) 840.43  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,染料木苷(genistin)1 173.02  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,

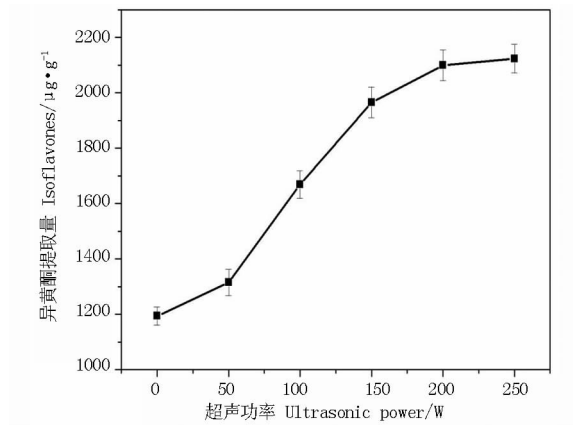


图 5 超声功率对异黄酮提取量的影响

Fig.5 Isoflavones obtained at different ultrasonic power

大豆苷元(daidzein) 44.79  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,染料木素(genistein)41.03  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,此时提取率为 85.14%;超声功率继续升高,提取量增加幅度变缓。这是因为超声功率越大,空化效应和震动作用越强,越有利于破坏细胞壁对异黄酮浸出的阻碍,当功率达到一定值后,细胞破壁已较彻底,提取量增幅明显减小,故确定适宜的超声功率为 200 W。

## 2.2 响应面优化超声辅助提取大豆异黄酮工艺条件

2.2.1 实验因素选择与实验设计 以单因素实验为基础,选取对响应值提取量影响较显著的提取因素(超声功率  $X_1$ ,乙醇浓度  $X_2$ ,提取温度  $X_3$ ),设计三因素三水平 18 个实验点 6 个中心点的响应面优化实验,响应面因素水平见表 1。

2.2.2 实验结果分析 响应面实验方案及结果见表 2。

表 1 响应面因素水平

Table 1 The level and factor table of response surface methodology

水平编码 Level code	$X_1$ 超声功率 Ultrasonic power/W	$X_2$ 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	$X_3$ 温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$
-1	150	50	60
0	200	65	70
1	250	80	80

表 2 响应面实验方案及结果

Table 2 Experimental design and results of response surface methodology

试验号 Test number	$X_1$ 超声功率 Ultrasonic power/w	$X_2$ 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	$X_3$ 温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	单位豆粉异黄酮提取量 Isoflavones amount / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
1	-1	0	-1	1872.56
2	0	0	0	2076.22
3	0	-1	-1	1633.87
4	1	1	0	2116.12
5	0	0	0	2045.98
6	0	-1	1	1744.25
7	0	1	1	2034.98
8	-1	-1	0	1615.21
9	1	0	-1	1989.56
10	1	-1	0	1802.45
11	-1	0	1	1939.98
12	1	0	1	2088.21
13	0	1	-1	2001.23
14	0	0	0	2068.29
15	-1	1	0	1982.67
16	0	0	0	2070.12
17	0	0	0	2069.45
18	0	0	0	2081.32

利用软件 design expert 针对上述实验结果进行多元回归拟合,得到二次回归方程如下:

$$R1 = 2068.56 + 73.24X_1 + 167.40X_2 + 38.78X_3 - 13.45X_1X_2 + 7.81X_1X_3 - 19.16X_2X_3 - 35.23X_1^2 - 154.22X_2^2 - 60.76X_3^2$$

该模型的方差分析结果见表 3,可知:模型  $F = 302.75 > F_{0.01}(9,8) = 5.91, P < 0.0001$ ,回归显著;失拟项  $F = 1.16 < F_{0.05}(3,5) = 5.41, P = 0.4117$ ,失

拟项不显著;模型决定系数  $R^2 = 0.9971$ ,表明此模型误差较小,拟合程度较好,可用于指导超声辅助提取大豆异黄酮工艺优化。

超声辅助提取异黄酮回归模型系数显著性检验结果如表 4 所示:模型的一次项  $X_1, X_2, X_3$  显著,二次项  $X_1^2, X_2^2, X_3^2$  显著,交互项  $X_2X_3$  显著,交互项  $X_1X_2, X_1X_3$  不显著,表明各因素对提取效果的影响不是简单的线性关系。

表 3 回归方程各项方差分析  
Table 3 Analysis of variances for the developed regression model

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean squares	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	424300	9	47139.77	302.75	<0.0001	显著
残差 Residual	1245.65	8	155.71	—	—	
失拟项 Lack of fit	511.00	3	170.33	1.16	0.4117	不显著
纯误差 Pure error	734.65	5	146.93	—	—	
总和 Total dispersion	425500	17	—	—	—	

表 4 超声辅助提取异黄酮回归模型系数显著性检验  
Table 4 Significance test for each term in the regression model for ultrasonic-assisted extraction of isoflavones

参数项 Term	自由度 Degree of freedom	回归系数 Regression coefficient	标准误差 Standard error	F 值 F value	P 值 P value
Intercept	1	2068.56	5.09		
$X_1$	1	73.24	4.41	275.60	<0.0001
$X_2$	1	167.40	4.41	1439.82	<0.0001
$X_3$	1	38.78	4.41	77.25	0.0009
$X_1X_2$	1	-13.45	6.24	4.65	0.0632
$X_1X_3$	1	7.81	6.24	1.57	0.2461
$X_2X_3$	1	-19.16	6.24	9.43	0.0153
$X_1^2$	1	-35.23	5.97	34.78	0.0004
$X_2^2$	1	-154.22	5.97	666.56	<0.0001
$X_3^2$	1	-60.76	5.97	103.45	<0.0001

2.2.3 响应面分析与优化 由回归模型所得响应面如图 6 所示。

为了得到最佳提取条件,对回归方程取一阶偏导,得到三元一次方程组,求解可得  $X_1 = 0.981, X_2 = 0.481, X_3 = 0.306$ ,此值转化为实际提取条件为:249.05 W,72.22% 乙醇,73.06℃,在此条件下异黄酮的提取量为  $2\,147.44\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。考虑操作因素,选取提取条件为:超声功率 250 W,70% 乙醇,提取温度 70℃,提取时间 120 min,此条件下大豆异黄酮实际提取量为  $2\,104.25\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,其中大豆黄苷(daidzin)  $862.49\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,染料木苷(genistin)  $1\,156.36$

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,大豆苷元(daidzein)  $45.59\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,染料木素(genistein)  $39.81\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,提取率 85.34%。

2.3 大豆异黄酮的分离纯化

10 g 脱脂豆粉经超声辅助提取后,乙醇提取液中大豆异黄酮的质量为 21.04 mg,其中含有较多的大豆蛋白,低聚糖等杂质,纯度仅为 1.05%。分离纯化异黄酮包括以下步骤:首先  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  絮凝及酸沉淀可除去大部分蛋白,经过此步纯化,异黄酮纯度达到 3.84%,异黄酮的质量为 23.16 mg,比提取液中异黄酮的质量反而增加,这是因为在碱性条件下乙酰基和丙二酰基糖苷型异黄酮中的酯键可断

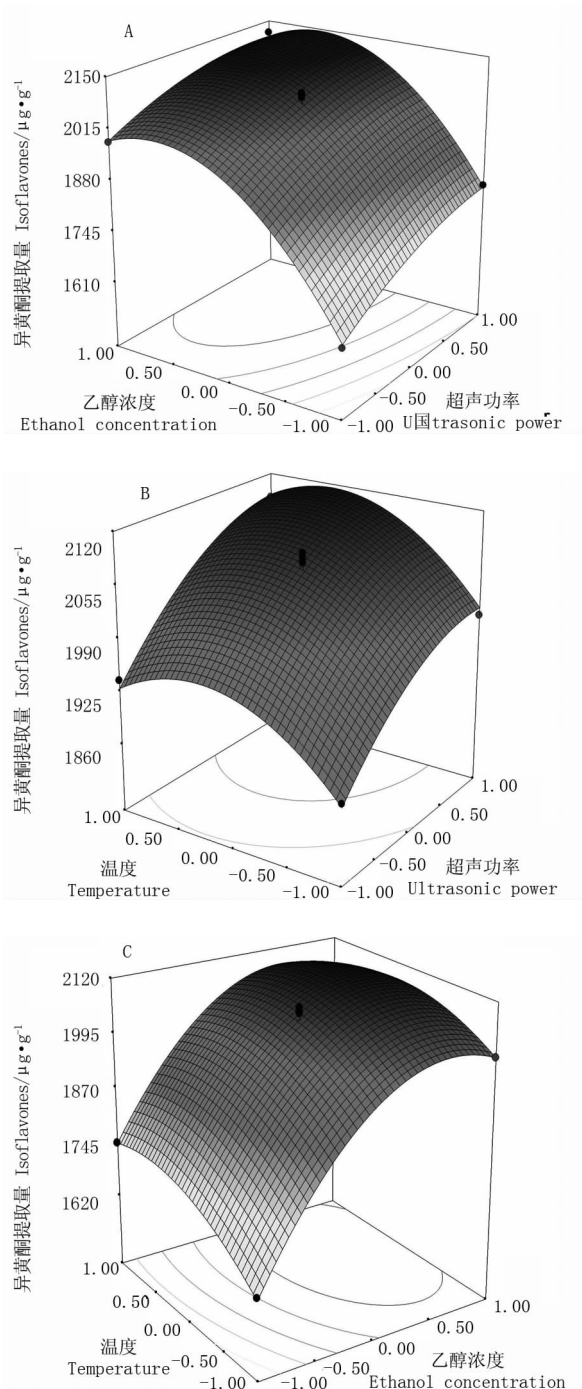


图6 不同因素互作对异黄酮提取量影响的响应面图

Fig.6 The response surface diagram for the interactive effects between ethanol concentration and ultrasonic(A), temperature and ultrasonic power (B), and temperature and ethanol concentration (C) on the amount of soy isoflavones

裂形成大豆黄苷 (daidzin) 和染料木苷 (genistin), 有利于异黄酮总量的提高; 其次, 经过醇沉后, 少量蛋白和大部分低聚糖等被除去, 异黄酮纯度达到 19.59%, 其中绝大部分蛋白在  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  絮凝及酸沉淀步骤被除去, 因此醇沉步骤所产生沉淀绝大部

分为低聚糖, 回收干燥即可作为大豆低聚糖产品。最后, 通过乙酸乙酯-水双相萃取纯化异黄酮, 由于异黄酮在乙酸乙酯中溶解度较大, 而水相可进一步除去剩余的蛋白、低聚糖和  $\text{Ca}^{2+}$  等杂质, 所以最后可得到  $1\,838.00\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  豆粉, 纯度为 62.09% 的异黄酮, 最终收率为 74.54%。各纯化步骤结果如表 5 所示, 最终异黄酮样品的 HPLC 分析结果如图 7 所示。

## 2.4 大豆分离蛋白和低聚糖的制备

本研究以碱提取酸沉淀法制备大豆分离蛋白, 此工艺应注意以下几点: 1) 高温有利于大豆蛋白的溶出, 但温度过高会使提取液成糊状而难以分离, 故提取温度选择  $60^\circ\text{C}$ ; 2) 料液比也是影响提取效果的一个重要因素, 随着料液比的增加, 蛋白的提取量增大, 但料液比达到一定值时, 对蛋白质提取量的影响不再明显, 考虑各种因素, 料液比选定为 1:20 (m:v); 3) pH 是影响提取效果的另一个重要因素, 当 pH 大于 7.0 时, 大豆蛋白在水中的溶解度随 pH 增加而增大, 但 pH 大于 11 时, 则会导致蛋白质变性, 甚至产生有毒物质如赖丙氨酸, 因此大豆蛋白的最佳提取 pH 应限制在 8.0~9.0<sup>[10]</sup>; 4) 提取时间也影响提取效果, 但提取时间过长会造成时间和能源的浪费, 因此, 提取时间确定为 1 h; 5) 大豆分离蛋白的等电点为 pH 4.5, 因此利用 HCl 调节 pH 至 4.5 左右可使绝大部分分离蛋白沉淀, 此步骤需要特别注意的是, 加酸速度和搅拌速度极为关键, 若控制不好, 会对蛋白的提取率产生极大影响, 搅拌的速度不宜过快, 控制在  $30\,\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  左右为宜, 当 pH 调节至 4.5 时, 应立即停止搅拌, 静置 1 h 左右, 以便蛋白能形成较大的颗粒快速沉淀下来, 最后大豆分离蛋白得率为  $216.25\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

绝大部分大豆蛋白已在其等电点 (pH 4.5) 沉淀, 因此制取大豆分离蛋白后的上清液中主要成分为大豆低聚糖, 可用醇沉的方法使低聚糖沉淀, 最后大豆低聚糖得率可达  $73.75\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

## 3 结 论

通过单因素实验和响应面法优化, 确定了超声辅助提取大豆异黄酮的提取条件: 超声功率 250 W, 70% 乙醇, 提取温度  $70^\circ\text{C}$ , 提取时间 120 min, 大豆异黄酮实际提取量为  $2\,104.25\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 提取率 85.34%; 并通过三步纯化制得产量为  $1\,838.00\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、纯度为 62.09% 的异黄酮, 最终收率 74.54%; 最后以提取大豆异黄酮后的剩余豆渣为原料, 联产制得分离蛋白 ( $216.25\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 低聚糖 ( $73.75\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 为大豆的综合利用提供了有益参考。

表 5  各纯化步骤大豆异黄酮的得率和纯度  
Table 5  Yield and purity of isoflavones in each purification step

实验步骤 Steps	样品总质量 Total amount of sample /mg · g <sup>-1</sup>	异黄酮质量 Isoflavones amount /μg · g <sup>-1</sup>	纯度 Purity /%
超声辅助 (Ultrasonic-assisted extraction)	200.11	2104.25	1.05
碱絮凝、酸沉 Alkaline flocculation, acidic precipitation	60.24	2316.00	3.84
醇沉 Ethanol precipitation	11.22	2198.00	19.59
乙酸乙酯萃取 Ethyl acetate extraction	2.96	1838.00	62.09

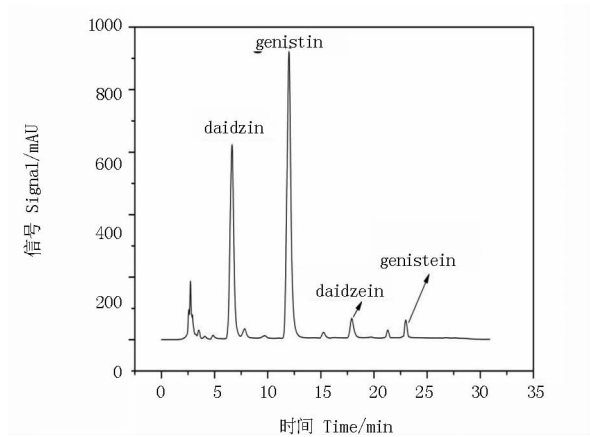


图 7  异黄酮样品的 HPLC 谱图  
Fig. 7  HPLC chromatogram of the final products

参考文献

[1] Elizabeth J Z, Ka M N, Kathy Q L. Extraction and purification of isoflavones from soybeans and characterization of their estrogenic activities[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55 (17) : 6940-6950.

[2] Cohen L A, Zhao Z, Pittman B, et al. Effect of intact and isoflavone-depleted soy protein on NMU-induced rat mammary tumorigenesis[J]. Carcinogenesis, 2000, 21 (5) : 929-935.

[3] 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.

[4] Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols [J]. The Journal of Nutrition, 2000, 130 (8) : 2073S-2085S.

[5] Shao S, Duncan A M, Yang R, et al. Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products[J]. Food Research International, 2011, 44 (8) : 2425-2434.

[6] Izumi T, Piskula M K, Osawa S, et al. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans[J]. The Journal of Nutrition, 2000, 130 (7) : 1695-1699.

[7] Rostagno M, Palma M, Barroso C. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 522 (2) : 169-177.

[8] 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.

[9] Rostagno M A, Palma M, Barroso C G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1012 (2) : 119-128.

[10] Lopes Barbosa A C, Lajolo F M, Genovese M I. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates[J]. Food Chemistry, 2006, 98 (4) : 757-766.

欢迎订阅 2013 年《植物遗传资源学报》

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊,为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。

报道内容为大田、园艺作物,观赏、药用植物,林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如,种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新,信息学、管理学等;起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊,大 16 开本,128 页。定价 20 元,全年 120 元。各地邮局发行。  
邮发代号:82-643。国内刊号 CN11-4996/S,国际统一刊号 ISSN1672-1810。  
本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加 3 元。  
地 址:北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部  
邮 编:100081 电话:010-82105794 010-82105796(兼传真)  
网 址:www.zwyczy.cn  
E-mail:zwyczyxb2003@163.com zwyczyxb2003@sina.com