

大豆异黄酮超声波辅助提取条件优化的研究

徐美蓉,李玉芳,董 颀,寇向龙

(甘肃省农业科学院 质量与检测标准研究所,甘肃 兰州 730070)

摘 要:以大豆为原料,甲醇为浸提溶剂,5种大豆异黄酮提取率为指标,利用超声波辅助提取,通过单因素实验初步确定提取工艺条件。然后在单因素实验的基础上采用3因素3水平的响应面分析法,建立了总大豆异黄酮含量与各影响因子的回归方程,并得到以总大豆异黄酮提取率为响应值的响应面图和等高线图,进而得出最佳提取工艺条件为固液比1:50、甲醇提取液浓度85%、提取时间45 min。在此条件下提取2次,大豆异黄酮的总提取率可达0.308%。

关键词:响应面法;大豆异黄酮;超声波提取

中图分类号:TS201.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2013)01-0102-05

Optimization of Soy Isoflavone Extraction Assisted with Ultrasonic

XU Mei-rong, LI Yu-fang, DONG Jiong, KOU Xiang-long

(Quality and Testing Standards Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: The objective of this study was to optimize the extraction conditions of soybean isoflavone, taking soybean as raw material, using the methanol as extraction solvent and ultrasonic assisted extraction method. The extraction parameters was preliminary determined through the single factor experiment. Then the 3 factors 3 levels of response surface analysis method was established using Design-Expert 7 experimental design software, and got the response surface chart and contour map with the response value of the total soybean isoflavones extraction efficiency. The result showed that the best extraction technology conditions was at the ratio of material and solvent 1:50, with 85% methanol extract concentration and extracting for 45 min. On this condition extracting for 2 times, total soybean isoflavone extraction ratio could reach 0.308%.

Key words: Response surface method; Soy isoflavone; Ultrasonic assisted extraction

研究发现大豆异黄酮具有多种生理功能,除其自身具有抗氧化作用外,还可作为雌性激素的替代品用以改善妇女更年期综合征^[1-4],目前在医药、食品行业中得到广泛的应用。大豆异黄酮在大豆种子中含量为0.1%~0.5%,由于其本身比重较小,绝对含量不高^[5],因此精确检测大豆异黄酮含量对异黄酮研究和应用尤为重要。

超声波具有空化、粉碎、搅拌等特殊作用,可以大幅度地提高有效成分的提取率^[6],缩短提取时间,提高工作效率,节省溶剂,简化提取操作步骤。

响应面分析法是采用多元二次回归方法作为函数估计的工具,将多因子实验中因素与指标的相互关系用多项式近似拟合,依此可对函数的响应面和等高线进行分析,研究因子与响应面之间、因子与因子之间的相互关系^[7]。本实验采用响应面法对微波辅助甲醇提取大豆异黄酮工艺进行优化,旨在为大豆异黄酮的高效提取提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters2595 高效液相色谱仪(美国 Waters),

2487 紫外检测器(美国 Waters), Waters-sunfire-C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 昆山舒美 KQ2200E 超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司, 超声最大功率600 W), Sartorius BS124S 电子天平(德国 Sartorius)。

1.2 原料与试剂

大豆样品(甘肃农业科学院旱地农业研究所大豆课题组提供), 大豆苷等5种大豆异黄酮标准品(美国 Sigma, 纯度≥99%), 甲醇(天津 凯信), 实验用水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆异黄酮的提取 将大豆样品用粉碎机粉碎后过40目筛,称取0.50 g置于50 mL尖底离心管中,加甲醇后超声波提取一定的时间,再用甲醇提取液定容一定体积,离心5 min,用注射器抽取一定量上清液,过0.45 μm滤膜,试液经高效液相色谱进行大豆异黄酮检测^[8]。3次平行实验取其平均值。提取率(E)的计算方法如下:

$$E(\%) = \frac{C \times V}{m} \times 100$$

式中,C 为大豆异黄酮所测的质量浓度(g·

收稿日期:2012-09-22

第一作者简介:徐美蓉(1978-),女,在读硕士,研究方向为农产品质量标准与检测技术研究。E-mail:xxxchz@qq.com。

通讯作者:李玉芳(1964-),女,高级实验师,从事农产品安全及品质检测技术研究。E-mail:gs_lyf@163.com。

mL^{-1}); V 为加入甲醇提取液的体积(mL); m 为大豆粉的质量(g)。

1.3.2 标准曲线的绘制

分别精密称取 5 种大豆异黄酮标准品,加甲醇溶解,定容到 10 mL 容量瓶中,摇匀,5 种大豆异黄酮标准品浓度值、进样体积见表 1,每个样重复 3 次,记录峰面积,绘制标准曲线。

表 1 五种大豆异黄酮标准品溶液进样体积及回归曲线

Table 1 Solution injection volume and regression curve of five soy isoflavones standard sample

标准品 Standard sample	配置浓度 Concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	进样量 Injection volume/ μL						回归曲线 Regression curve
大豆苷 Daidzin	12.2	2.5	5	10	15	20		$Y = 2\text{E-}05x + 0.0578, R^2 = 0.9998$
大豆苷元 Daidzein	9.8	2.5	5	10	15	20		$Y = 1\text{E-}05x + 0.4149, R^2 = 0.9989$
染料木素 Genistein	24.0	2.5	5	10	15	20		$Y = 0.001x + 0.865, R^2 = 0.9994$
染料木苷 Genistin	25.1	2.5	5	10	15	20		$Y = 1\text{E-}05x + 0.8499, R^2 = 0.9999$
黄豆黄苷 Glycitin	21.6	2.5	5	10	15	20		$Y = 2\text{E-}05x + 0.0599, R^2 = 0.9987$

其中 Y 为 5 种大豆异黄酮峰面积($\text{mAU}\cdot\text{s}$); x 为进样量(μg)。

Y is the peak area of five soy isoflavones($\text{mAU}\cdot\text{s}$); x is the injection volume(μg).

1.3.3 色谱条件 色谱柱: Waters-sunfire-C18 柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$);柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;流动相: 甲醇:水(0.5%的冰乙酸) = 48:52(V/V);流速 $0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;波长 $\lambda = 260\text{ nm}$ 。

1.4 数据分析

利用 Design-Expert 7.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 固液比 称取 0.50 g 大豆粉,甲醇提取液浓度 80%,提取 45 min,设置固液比为 1:35、1:40、1:45、1:50、1:55($\text{g}:\text{mL}$)。如图 1 所示,随固液比的增加,染料木素在 1:45 时提取率最高,大豆苷和染料木苷在 1:50 时提取率最高,大豆苷元和黄豆黄苷提取率变化不明显。考虑到总大豆异黄酮总提取率,固液比最终确定为 1:50。

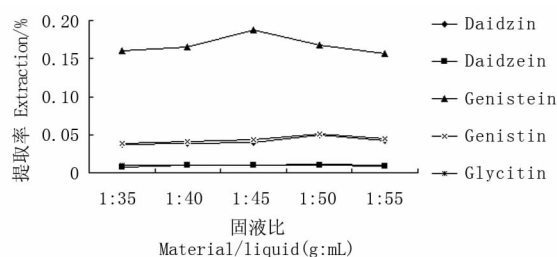


图 1 固液比对提取率的影响

Fig.1 Effect of material to liquid ratio on the extraction rate

2.1.2 甲醇提取液浓度 在 0.50 g 大豆粉,甲醇 25 mL,提取 45 min 条件下,分别以 50%、60%、70%、80%、95% 的甲醇进行提取。如图 2 所示,随着甲醇提取液浓度的增加,5 种大豆异黄酮的提取率变化存在差异,甲醇提取液浓度超过 60% 时 5 种大豆异黄酮提取率有明显的提高,当甲醇提取液浓度超过 80%

时染料木苷提取率略有提高,染料木素提取率明显下降趋势,大豆苷、大豆苷元和黄豆黄苷提取率下降趋势不明显。考虑到大豆异黄酮总提取率,甲醇提取液浓度最终确定为 80%。

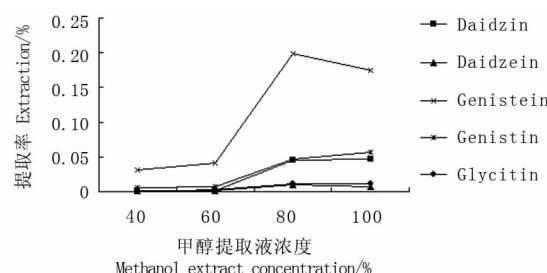


图 2 不同的甲醇提取液浓度对提取率的影响

Fig.2 The impact of different methanol extract concentration on the extraction rate

2.1.3 提取时间 在 0.50 g 大豆粉,甲醇提取液浓度 80%,固液比 1:50 条件下,分别提取 5、15、30、45、60 min。如图 3 所示,随着提取时间的延长,染料木素提取率变化最明显,其他 4 种大豆异黄酮提取率相对变化较小,5 种大豆异黄酮在提取 45 min 时提取率达到最大值,随后提取率有下降趋势,这可能是由于提取时间过长,提取液由于超声波作用温度不断上升,使得溶液黏度增大,大豆异黄酮被吸

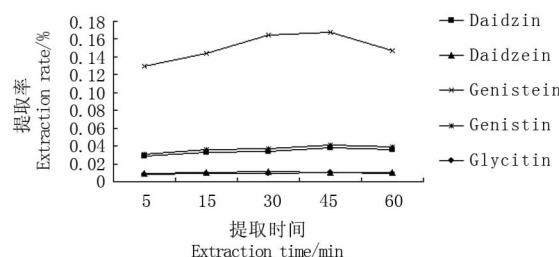


图 3 不同提取时间对提取率的影响

Fig.3 Effect of different extraction time on the extraction rate

附在固体基质上而不易被提取出来,影响结果。因此最佳提取时间确定为 45 min。

2.2 响应面分析

2.2.1 因素的选取及实验结果 选择固液比、甲醇

提取液浓度、提取时间 3 个因素,进行 3 因素 3 水平共 17 个实验点(5 个中心点)的响应面分析实验。表 2 为响应面实验设计表,实验数据见表 3。

表 2 提取工艺因素水平表

Table 2 Levels of each factor

编码 Coding	X ₁ 固液比 Material to liquid/g:mL	X ₂ 提取时间 Extraction time/min	X ₃ 甲醇提取液浓度 Methanol extract concentration/%
-1	1:40	30	60
0	1:50	45	80
1	1:60	60	100

表 3 响应面试验方案及结果

Table 3 Scheme and experimental results of response surface design

实验号 Number	x ₁	x ₂	x ₃	实验值 Experimental values(R ₁)/%
1	0	0	0	0.2881
2	-1	0	-1	0.1998
3	1	0	-1	0.1945
4	1	1	0	0.2274
5	0	1	1	0.2365
6	-1	0	1	0.2106
7	0	1	-1	0.1945
8	-1	1	0	0.2473
9	1	-1	0	0.2271
10	0	0	0	0.2657
11	0	0	0	0.2764
12	0	0	0	0.2881
13	0	0	0	0.2799
14	0	-1	-1	0.1696
15	0	-1	1	0.2278
16	1	0	1	0.2086
17	-1	-1	0	0.2343

2.2.2 模型评价 利用 Design-Expert 7.0 软件对表 3 数据进行二次多项式逐步回归拟合,得到的数学模型为 $Y = 0.28 - 0.0043X_1 + 0.005863X_2 + 0.016X_3 - 0.025X_1^2 - 0.003175X_2X_1 - 0.021X_2^2 + 0.000825X_3X_1 - 0.00405X_3X_2 - 0.052X_3^2$,模型方差分析结果和各项系数显著性检验结果见表 4。

从表 4 可知,模型的 F 值为 13.14、 P 值为 0.0013(P 值小于 0.05),说明本实验所采用的二次模型显著。模型 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 的 P 值均小于 0.05,说明甲醇提取液浓度以及 3 个因素的二次项都具有显著影响;而交互项、固液比、提取时间及缺失项显著性较差,也说明三者的交互作用不大。决定因素 R^2 值为 0.9441,也说明模型能够很好的反应响应值的变化,拟合度好。各因素的效应关系为甲醇提取

液浓度 > 提取时间 > 固液比。

2.2.3 响应面分析 如图 4 所示,当固液比和提取时间都固定时,提取率随甲醇提取液浓度的变化幅度较大,而提取率随着固液比以及提取时间变化幅度较小,所以,甲醇提取液浓度对提取率的影响较为显著。通过最优化分析,最佳的提取条件为固液比 1:58.72、提取时间 45.89 min、甲醇提取液浓度 83.12%,预测提取率为 0.317%。但考虑到实际操作的局限性,将提取工艺修正为固液比为 1:50、提取时间为 45 min、甲醇提取液浓度为 85%。在此条件下,对 0.50 g 大豆粉经过 2 次提取,5 种大豆异黄酮的提取率总和为 0.308%,实际值与预测值基本相符,证实了响应面法所得回归方程的准确性和实用性。

表 4 回归模型各项方差分析

Table 4 Variance analysis of regression model

方差来源	自由度	平方和	均方和	F	P
Variance origin	Degree of freedom	Sum of squares	Sum of mean		
模型 Model	9	0.020	2.172×10^{-3}	13.14	0.0013
X ₁	1	1.479×10^{-4}	1.479×10^{-4}	30.89	0.3757
X ₂	1	2.750×10^{-4}	2.750×10^{-4}	1.66	0.2382
X ₃	1	1.956×10^{-3}	1.956×10^{-3}	11.83	0.0108
X ₁ X ₂	1	4.032×10^{-5}	4.032×10^{-5}	0.24	0.6365
X ₁ X ₃	1	2.722×10^{-6}	2.722×10^{-6}	0.016	0.9015
X ₂ X ₃	1	6.561×10^{-5}	6.561×10^{-5}	0.40	0.5487
X ₁ ²	1	2.563×10^{-3}	2.563×10^{-3}	15.50	0.0056
X ₂ ²	1	1.847×10^{-3}	1.847×10^{-3}	11.17	0.0124
X ₃ ²	1	0.011	0.011	67.80	<0.0001
残差 Residuals	7	1.157×10^{-3}	1.653×10^{-4}		
缺失项 Missing items	3	8.093×10^{-4}	2.698×10^{-4}	3.10	0.1515
纯误差 Pure error	4	3.480×10^{-4}	8.701×10^{-5}		
总和 Total	16	0.021			

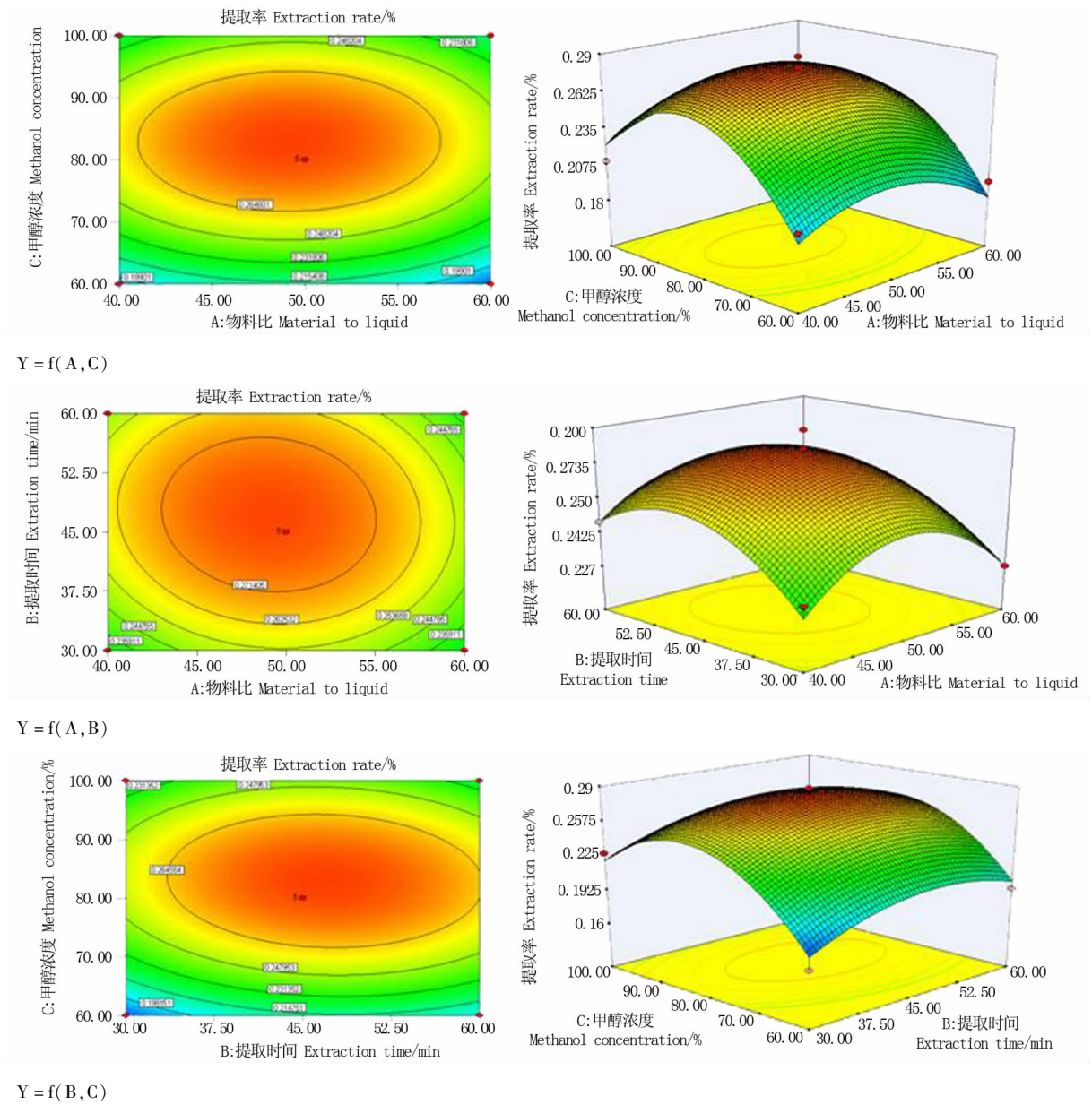


图 4 各两因素的响应面和等高线图

Fig. 4 Response surface and contour plots showing the pairwise interactive effects of three factors on extraction rate of five soy isoflavones

3 结 论

以 5 种大豆异黄酮总提取率为指标,采用单因素实验及响应面法对超声波辅助提取 5 种大豆异黄酮的工艺条件进行优化,通过回归分析建立相关性良好的方程,确定最佳工艺条件为:固液比 1:50、提取时间 45 min、甲醇提取液浓度 85%,在此条件下对供试样品提取 2 次,5 种大豆异黄酮总提取率可达 0.308%。

参考文献

- [1] 徐春华,张治广,谢明杰,等. 大豆异黄酮的抗氧化和抗肿瘤活性研究[J]. 大豆科学,2010,29(5):870-873. (Xu C H, Zhang Z G, Xie M J, et al. Antioxidant and anti-tumor activity of soy isoflavones[J]. Soybean Science,2010,29(5):870-873.)
- [2] Zhou H B, Cai J T, Du L, et al. The anti cancer activity of genistein on implanted tumor of human primary gastric carcinoma cells in nude mice [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2007, 23: 2379-2384.
- [3] 李俏俏,王清路,薛金艳,等. 大豆异黄酮对绝经女性血清中脂类物质的影响[J]. 大豆科学,2009,28(1):172-174. (Li Q Q, Wang Q L, Xue J Y, et al. Effect of soy isoflavone on the serum lipid level of postmenopausal women[J]. Soybean Science,2009,28(1):172-174.)
- [4] 高荣海,张春红,赵秀红,等. 大豆异黄酮研究进展[J]. 粮食与油脂,2009,22(5):1-4. (Gao R H, Zhang C H, Zhao X H, et al. Research progress on soybean isoflavone[J]. Cereals and Oils, 2009,22(5):14.)
- [5] 胡斌,邓放明,唐春江. 大豆异黄酮的生理功能及检测方法研究进展[J]. 农产品加工,2008(5):82-85. (Hu B, Deng F M, Tang C J. Soy isoflavones physiological functions and detection method research progress[J]. Processing of Agricultural Products, 2008(5):82-85.)
- [6] 万水昌,王志祥,乐龙,等. 超声提取技术在中药及天然产物提取中的应用[J]. 西北药学杂志,2008(2):61-63. (Wan S C, Wang Z X, Le L, et al. Ultrasonic extraction technology in traditional Chinese medicine and natural product extraction[J]. Northwest Pharmaceutical Journal,2008(2):61-63.)
- [7] 赵娟娟. 超声波法和微波法提取番茄红素的比较研究[J]. 中国酿造,2010(9):109-111. (Zhao J J. Ultrasonic and microwave extraction of lycopene comparison[J]. China Brewing,2010(9):109-111.)
- [8] 崔力剑,石素琴,刘敏彦,等. 淡豆豉中多指标成分的含量测定方法研究[J]. 大豆科学,2012,31(1):127-130. (Cui L J, Shi S Q, Liu M Y, et al. Study on the determination of the semen sojae multiple indicator ingredients[J]. Soybean Science,2012,31(1):127-130.)

科学出版社生物分社新书推介

《油料作物育种学》



编著者:(加)Rajcan I. 等编著,卢长明 主译

初版时间:2012 年 3 月

书号:9787030337955

定价:98.00 元

《油料作物育种学》用 19 章的篇幅介绍了油料作物遗传育种概论,食用与非食用植物油的遗传改良,以及 17 种油料作物(大豆、甘蓝型油菜、其他十字花科油菜、向日葵、亚麻、棉花、花生、蓖麻、油棕、椰子、橄榄、红花、罂粟、油用裸仁南瓜、油用玉米、雷斯克勒和萼距花)的育种理论、技术方法和最新研究进展。本书针对每种作物,分别介绍了该作物起源进化、品种分类、遗传资源、育种目标、育种技术方法、育种成就、生物技术和种子生产等方面内容,既涉及单子叶植物又涉及双子叶植物,既涉及生育期很短的一年生植物,也涉及寿命达 2000 年的木本植物。育种方法涵盖了无性系育种、纯系育种、杂交育种、杂交种育种和生物技术育种等方面。

《油料作物育种学》可供从事农学、分子生物学、植物生理学、植物病理学和食品科学等专业的读者参考。

购书指南

网上购书:淘宝商城科学出版社旗舰店 <http://kxcbs.tmall.com/>

电话购书:联系人:贾海涛;电话:010-64017321