

响应面优化黑豆总黄酮微波辅助提取工艺及其抗氧化性能评价

康永锋¹, 薛永刚², 韩巧英¹

(1. 上海海洋大学 食品学院/食品科学与工程国家级实验教学示范中心(上海海洋大学)/农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306; 2. 正宁县人民医院, 甘肃 庆阳 745300)

摘要:为优化微波提取黑豆总黄酮化合物的工艺,并对其抗氧化性进行初步研究,在单因素试验的基础上,选取液料比、乙醇体积分数和微波功率为自变量,总黄酮得率为响应值的三因素三水平的响应曲面分析法,模拟得到二次多项式回归方程的预测模型。结果表明:提取工艺的最佳条件为功率 600 W、液料比 40:1、乙醇体积分数 60%,在此条件下,总黄酮得率达到 22.1 mg·g⁻¹。抑制油脂过氧化作用的研究结果表明黑豆黄酮是一种天然的抗氧化剂。
关键词:黑豆;黄酮;微波;响应曲面法;提取
中图分类号:S565.1;Q946.889;R284.2 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.06.0958

Optimization of Technology Using Response Surface Analysis for Extracting Flavonoids from Black Bean Assisted by Microwave and Its Antioxidant Activity Evaluation

KANG Yong-feng^{1,2}, XUE Yong-gang², HAN Qiao-ying¹

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University/National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Science and Engineering (Shanghai Ocean University)/Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 2. Zhengning County People's Hospital, Qingyang 745300, China)

Abstract: To optimize the extraction process of flavones from black bean by microwave and studied its antioxidant activity, on the basis of single factor tests, selected the ratio of ethanol to material, volume fraction of ethanol and the microwave power as the independent variables and the yield of flavones as response value, the method of response surface analysis with 3 factors and 3 levels was adopted. A quadratic regression equation of prediction model was acquired. The results showed that the optimal conditions for extraction was as follows: Power 600 W, ratio of ethanol to material 40:1 and volume fraction of ethanol 60%. Under those conditions, the yield of the flavones was up to 22.1 mg·g⁻¹. The flavonoids in black bean, which were a kind of good source for natural antioxidants, showed relatively strong antioxidant activities on oil.
Keywords: Black bean; Flavones; Microwave; Response surface analysis;Extraction

微波辅助萃取法(MAE)与超声波辅助萃取法(SE)、超临界流体萃取法(SFE)等都是近年来应用广泛的天然产物的提取新技术。微波由于能够穿透萃取溶剂和物料体系,从而使其加热均匀,升温迅速,增大了扩散系数。同时,微波产生的交变电场能够使物料中极性分子相互碰撞和摩擦,增大细胞破碎的程度,加速目标物质被萃取到溶剂中。因其具有方便、省时、能耗低、有效成分得率高、选择性强等优点而被广泛关注。与超声波辅助萃取多用于实验室相比,超临界流体萃取则因为设备复杂、成本高昂、应用范围窄等使其应用受到限制^[1]。

与超声波辅助萃取法和超临界流体萃取法相比,微波萃取技术具有设备相对简单,成本低,易操作等特点,是最有工业应用前景的萃取新技术。
大豆异黄酮类化合物是天然的抗氧化剂和自由基清除剂,具有明显的抗氧化、抗突变、防癌、抗衰老、降低血脂、治疗心血管疾病、改善骨质疏松、以及妇女更年期综合征等药理效果^[2-3],在保健品、医药、化妆品等领域被广泛应用,需求量也不断增加,是一类极具开发前景的天然产物,也是食品与营养学研究的热点之一。在营养学上,大豆异黄酮是唯一具有特别意义的食物资源^[4]。但是文献中

收稿日期:2017-07-13
基金项目:上海市教委实验技术队伍建设项目(B1-5407-13-0000-7);上海海洋大学公共化学课程群教学团队(B1-5003-15-000112);国家海洋局海洋可再生能源专项资金项目(SHME2011SW02)。
第一作者简介:康永锋(1968-),男,博士,副教授,主要从事食品安全分析、天然产物提取和有机合成化学研究。E-mail: yfkang@shou.edu.cn。
通讯作者:薛永刚(1971-),男,主治医师,主要从事外科医学研究。E-mail:327307665@qq.com。

多以大豆、豆渣、豆粕、豆皮等为原料提取大豆异黄酮类化合物^[5-10],鲜见以黑豆为原料提取大豆异黄酮类化合物的研究报道^[11]。研究表明黑豆中异黄酮类活性物质含量高于野生大豆和栽培大豆^[12-14],可以作为大豆异黄酮类化合物的主要原料,因此对其异黄酮类化合物提取工艺的研究就具有重要的意义。

本研究以黑豆为原材料,采用微波辅助提取方法,在单因素试验结果的基础上,利用响应曲面法的 Box-Behnken 模式,对微波辅助提取黑豆中总黄酮物质的提取条件进行优化。建立并分析了微波功率、乙醇浓度和提取液料比与总黄酮得率关系的数学模型,得到了提取黑豆中总黄酮的最佳工艺参数。同时利用黑豆黄酮抑制油脂氧化能力对其抗氧化性能进行了评价,为进一步开发利用黑豆资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑豆,产地内蒙古通辽,市售;芦丁,购于中国生物制品检定所;无水乙醇、亚硝酸钠、磷酸、硝酸铝、氢氧化钠、石油醚均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

DHG-9000A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海和呈仪器制造有限公司;UV-2000 型紫外可见分光光度计,尤尼柯上海仪器有限公司;SHD-111 型循环水式多用真空泵,上海比朗仪器有限公司;PL203 型电子分析天平,梅特勒-托利多公司;离心机,湘仪离心机仪器公司;XH-MC-1 型微波催化合成萃取仪,北京祥鹄科技发展有限公司;DFY-800 型中草药粉碎机,上海隆拓设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料的预处理 称取 200 g 黑豆,60℃烘箱中烘 12 h 至恒重,冷却后粉碎,过 80 目筛后用 400 mL 的石油醚回流脱脂 1 h,然后烘干备用。

1.3.2 标准曲线的制作 采用硝酸铝络合分光光度法测定黄酮含量。称取烘干至恒重的芦丁标准品 0.010 0 g,放于 50 mL 容量瓶中,用 60% 乙醇溶解并定容,得到浓度为 0.2 mg·mL⁻¹ 的芦丁标准溶液。分别量取芦丁标准溶液 0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL,倒入 6 支 10 mL 容量瓶后,加入 60% 的乙醇分别使其体积至 5 mL,然后加入 10% 的 NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀,静置 5 min,再加入 10% 的 Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,摇匀,静置 5 min,之后再加入 5% 的 NaOH 溶液 4 mL,加水定容,摇匀,静置 15 min,在波长 508 nm 处测吸光度 A,得芦丁含量

$y(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ 与吸光度 A 之间的回归方程式: $y = 0.0855A + 0.0004 (R^2 = 0.9996)$ 。

1.3.3 黑豆总黄酮的提取和测定 在 50 mL 烧瓶中称取 1 g 脱脂豆粉,按照试验方案,加入一定量的乙醇溶液,放入微波萃取器,设定好微波功率和提取时间,进行微波辅助萃取。萃取液离心后进行过滤,滤液用 60% 的乙醇溶液定容于 50 mL 容量瓶中,按 1.3.2 的方法测定总黄酮含量。总黄酮的得率(Y ,以芦丁计)是指每克黑豆粉提取所得总黄酮的质量。可根据下式计算: $Y = m_1/m_2$ 。式中 m_1 为提取的总黄酮质量(mg); m_2 为称取的黑豆粉质量(mg)。

1.3.4 单因素试验

(1)乙醇体积分数对黑豆总黄酮得率的影响:在微波功率为 500 W,提取液料比为 20:1,pH6 提取时间为 30 min 的条件下研究乙醇体积分数分别为 20%、35%、50%、65% 和 80% 对黑豆总黄酮提取效果的影响。

(2)pH 对黑豆总黄酮得率的影响:在微波功率为 500 W,提取液料比为 20:1,乙醇体积分数为 65%,提取时间为 30 min 的条件下探讨提取 pH 值分别为 2,4,6 和 8 对提取总黄酮得率的影响。

(3)微波功率对黑豆总黄酮得率的影响:在提取液料比为 20:1,乙醇体积分数为 65%,pH6,提取时间为 30 min 的条件下探讨微波功率分别为 200,300,400,500 和 600 W 对提取总黄酮得率的影响。

(4)提取液料比对黑豆总黄酮得率的影响:在微波功率为 500 W,乙醇体积分数为 65%,pH6,提取时间为 30 min 的条件下探讨液料比分别为 10:1、20:1、30:1、40:1 和 50:1 对提取总黄酮得率的影响。

(5)提取时间对黑豆总黄酮得率的影响:在微波功率为 500 W,液料比为 20:1,乙醇体积分数为 65%,pH6 的条件下探讨提取时间分别为 10,20,30,40,50 和 60 min 对提取总黄酮得率的影响。

1.3.5 响应面优化试验的设计 在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 试验设计方案进一步优化试验结果。

1.3.6 黑豆总黄酮抗氧化性试验 通过黑豆总黄酮抑制油脂氧化试验评价其抗氧化性。取 250 mL 的锥形瓶分别加入微波辅助提取的黑豆黄酮提取物 10,50,100 mg,超声波辅助提取的黑豆黄酮提取物 100 mg、VC 40 mg,加入植物油 50 g 于 (70±1)℃ 的烘箱中,每隔一定时间测定其过氧化值。并做试剂空白对照试验。其过氧化值的测定方法按 GB5538-2005 执行。

油脂过氧化值(POV)计算公式:

$$POV(\text{meq}\cdot\text{kg}^{-1})=(V_1-V_2)\times N/W\times 1000$$

式中: V_1 : 试样消耗硫代硫酸钠溶液体积, mL;
 V_2 : 空白试验消耗的硫代硫酸钠溶液体积, mL; N : 硫代硫酸钠溶液的当量浓度; W : 试样重量, g。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇体积分数对黑豆总黄酮得率的影响

由图 1 可知,随着乙醇体积分数从 20% 增加到 65%,黄酮的得率相应增大。但当乙醇体积分数超过 65% 以后,其得率开始下降,这可能是因为乙醇体积分数增大,沸点降低,挥发较大所致。同时一些色素类物质、亲脂性强的成份等醇溶性杂质增加,在与乙醇结合时与黄酮类化合物产生竞争,从而导致黄酮提取率下降,因此提取乙醇体积分数选择 65% 较合适。

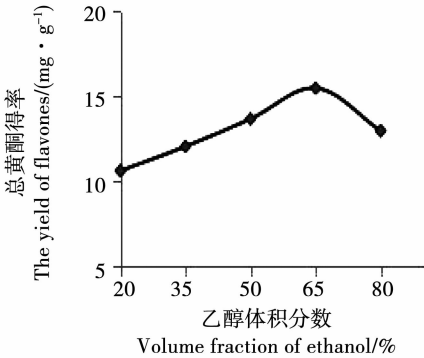


图 1 乙醇体积分数对黄酮得率的影响
Fig. 1 The effect of volume fraction of ethanol on flavones yield

2.1.2 pH 对黑豆总黄酮得率的影响 由图 2 可以看出,在 pH 小于 6 时提取得率变化不大,在 pH6 时提取得率最大。在碱性环境下提取有波动,但是整体的变化不显著。可能是黑豆中黄酮的溶出组分和氢氧根离子结合不稳定导致的。因此选取 pH6 比较合适。

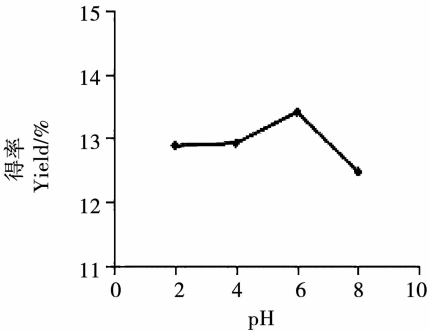


图 2 pH 对黄酮得率的影响
Fig. 2 The effect of pH on flavones yield

2.1.3 微波功率对黑豆总黄酮得率的影响 由图 3 所示,随着微波功率增大,黄酮得率增加,在 500 W 时得率最大,再增大功率得率反而降低。这可能由于功率过小时,提取物内部升温不明显,黄酮溶出的速率较小所致。提取功率增大后,强烈的加热作用会导致其有效成分的破坏,从而降低总黄酮得率。因此,选择微波功率为 500 W。

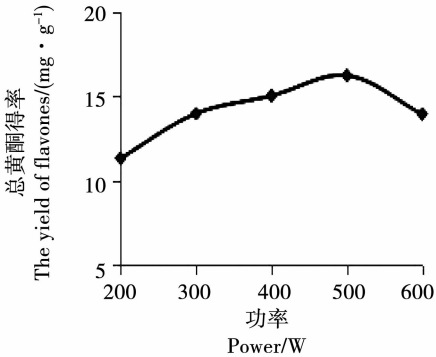


图 3 功率对黄酮得率的影响
Fig. 3 The effect of power on the flavones yield

2.1.4 提取液料比对黑豆总黄酮得率的影响 从图 4 可知,随着液料比增大,总黄酮的得率不断提高,当液料比增加到 30:1 时,达到最大值,之后变化趋于平稳。这可能是由于开始增加提取溶剂,会增加与物料的接触面,使黄酮得率增加。但随着提取液增加,黄酮溶出达到平衡,高于 30:1 后,会溶出更多其它的杂质,对黄酮的溶出不显著所致。因此,选择 30:1 为最佳料液比。

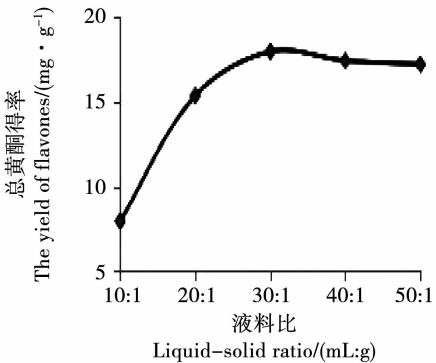


图 4 提取液料比对黄酮得率的影响
Fig. 4 The effect of liquid-solid ratio on flavones yield

2.1.5 提取时间对黑豆总黄酮得率的影响 从图 5 可知,在 30 min 之前,总黄酮得率随着时间的延长而增加,30 min 后得率有平缓降低的趋势,但变化幅度较小。这可能是由于提取时间的增加使其它物质溶出增多,影响了黄酮得率的增加。因此,提取时间选择 30 min 比较适宜。

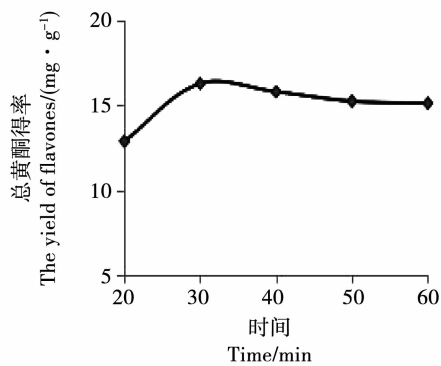


图5 提取时间对总黄酮得率的影响

Fig. 5 The effect of extraction time on flavones yield

2.2 响应曲面试验结果

在单因素试验的基础上,选取对黄酮得率影响较大的3个因素即提取液料比(mL: g)、提取功率(W)、乙醇体积分数(%),采用三因素三水平的响应面分析方法进行优化,并用 X_1 、 X_2 、 X_3 来表示,同时以-1、0、+1分别代表变量水平,按照 $x_i = (X_i - X_0)/\Delta X$ 对自变量进行编码。公式中, x_i 代表变量的编码值, X_i 代表自变量的真实值, X_0 代表试验中心点变量的真实值, ΔX 是变量的变化步长,因子编码及水平列于表1,试验值与预测值见表2。

表1 响应面分析因素与水平

Table 1 Analytical factors and level of RSA

水平 Level	因素 Factor		
	功率 Power(x_2 , B)/W	液料比 Liquid-solid ratio (x_1 , A)/(mL: g)	乙醇体积分数 Volume fraction of ethanol(x_3 , C)/%
-1	400	20	50
0	500	30	65
1	600	40	80

表2 试验设计和结果

Table 2 Response surface design and results of flavones yield

试验号 No.	功率 Power (x_1)	液料比 Liquid-solid ratio (x_2)	乙醇体积分数 Volume fraction of ethanol (x_3)	得率真实值 Actual yield /(mg · g ⁻¹)	得率预测值 Predicted yiled /(mg · g ⁻¹)
1	-1	-1	0	17.50	17.37
2	1	-1	0	17.76	17.43
3	-1	1	0	18.25	18.57
4	1	1	0	20.96	21.09
5	-1	0	-1	18.54	18.32
6	1	0	-1	20.64	20.62
7	-1	0	1	16.47	16.49
8	1	0	1	16.57	16.79
9	0	-1	-1	17.65	18.00
10	0	1	-1	21.28	21.17
11	0	-1	1	15.80	15.91
12	0	1	1	17.95	17.60
13	0	0	0	21.84	21.86
14	0	0	0	21.60	21.86
15	0	0	0	21.88	21.86
16	0	0	0	22.32	21.86
17	0	0	0	21.68	21.86

采用 Design Expert 7.0 软件,以表2中的试验数据对方程进行多元回归拟合,得到黄酮提取得率与时间、微波功率、乙醇体积分数的二次多项回归方程:

$$Y = 21.86 + 0.65X_1 + 1.22X_2 - 1.42X_3 + 0.61X_1X_2 - 0.5X_1X_3 - 0.37X_2X_3 - 1.68X_1^2 - 1.57X_2^2 - 2.13X_3^2$$

由表3可知,该模型的 $F = 67.84 > F_{0.01}(9,4)$

$= 14.66; P < 0.0001 < 0.01$,说明回归模型极显著;失拟项 $F = 2.6 < F_{0.05}(9,3) = 8.81; P = 0.1897 > 0.05$,表明不显著;校正决定系数(R^2_{Adj})为0.9741,表明此模型拟合性优,仅有2.6%的黄酮得率变异不能由此模型进行解释,信噪比21.415 > 4,说明该模型具有足够强的信号。因此可以用此模型来分析和预测黑豆中黄酮类物质的提取工艺结果。

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for fitted quadratic polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Variance resource	SS	DF	MS	F value	P value
模型 Model	80.26	9	8.920	67.84	<0.0001
残差 Residual	0.92	7	0.130		
失拟项 Lack of fit	0.61	3	0.200	2.60	0.1897
纯误差 Pure error	0.31	4	0.078		
总和 Total	81.18	16			

由表 4 可知,该模型的一次项 X_1 不显著,而 X_2 、 X_3 、 X_2X_3 则不显著。
 X_3 极显著;二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 极显著;交互项 X_1X_2 、 X_1

表 4 回归模型系数的显著性检验

Table 4 Test results of significance for regression coefficient

系数项	回归系数	自由度	标准差	95% 置信下限	95% 置信上限	P 值
Coefficient	Regression coefficient	DF	Standard deviation	95% confidence lower limit	95% confidence upper limit	P value
截距 Intercept	21.86	1	0.16	21.48	22.25	
X_1	0.65	1	0.13	0.34	0.95	0.0015
X_2	1.22	1	0.13	0.91	1.52	<0.0001
X_3	-1.42	1	0.13	-1.72	-1.11	<0.0001
X_1X_2	0.61	1	0.18	0.18	1.04	0.0118
X_1X_3	-0.50	1	0.18	-0.93	-0.071	0.0282
X_2X_3	-0.37	1	0.18	-0.80	0.059	0.0806
X_1^2	-1.68	1	0.18	-2.10	-1.26	<0.0001
X_2^2	-1.57	1	0.18	-1.98	-1.15	<0.0001
X_3^2	-2.13	1	0.18	-2.55	-1.71	<0.0001

2.3 响应面分析与优化

模型的响应曲面以及等高线的组图可以直观地反映各个因素对得率的影响。当乙醇体积分数为 65% 时,液料比为 (20~40):1 和功率为 400~600 W 的范围内,总黄酮得率不断上升,之后,得率有下降的趋势,在功率为 540 W,液料比为 35:1 时达到极值点(图 5)。

当液料比为 30:1,功率为 400~600 W,乙醇体

积分数为 50%~80% 时,乙醇体积分数对总黄酮得率的影响非常显著,表现为曲线较陡,在乙醇体积分数为 57%,功率为 520 W 总黄酮得率出现极值(图 6)。

当功率为 500 W,液料比为 (20~40):1,乙醇体积分数为 50%~80% 时,总黄酮得率不断上升,乙醇体积分数对黄酮得率的影响较大,在乙醇体积分数为 57%,液料比为 25:1 出现极值(图 7)。

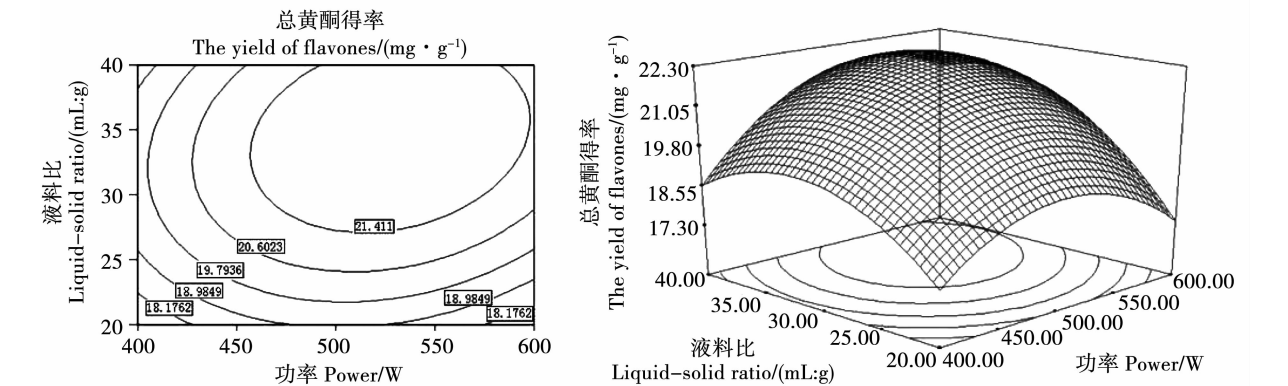


图 5 液料比与微波功率的等高线和响应面图
Fig. 5 Response surface plot and contour plot ratio of ethanol to material and microwave power

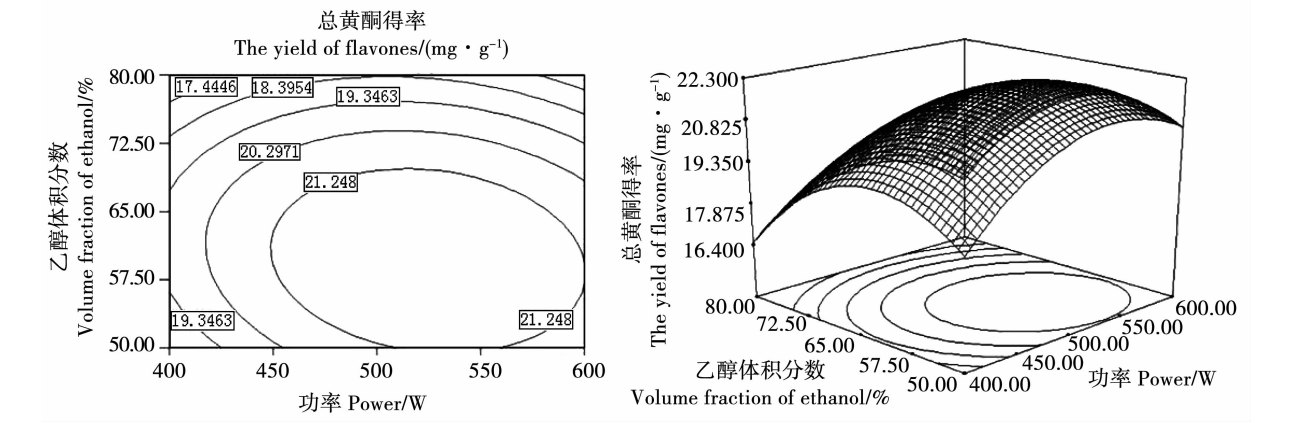


图 6 功率与乙醇体积分数的等高线和响应面图

Fig. 6 Response surface plot and contour plot of microwave power and volume fraction of ethanol

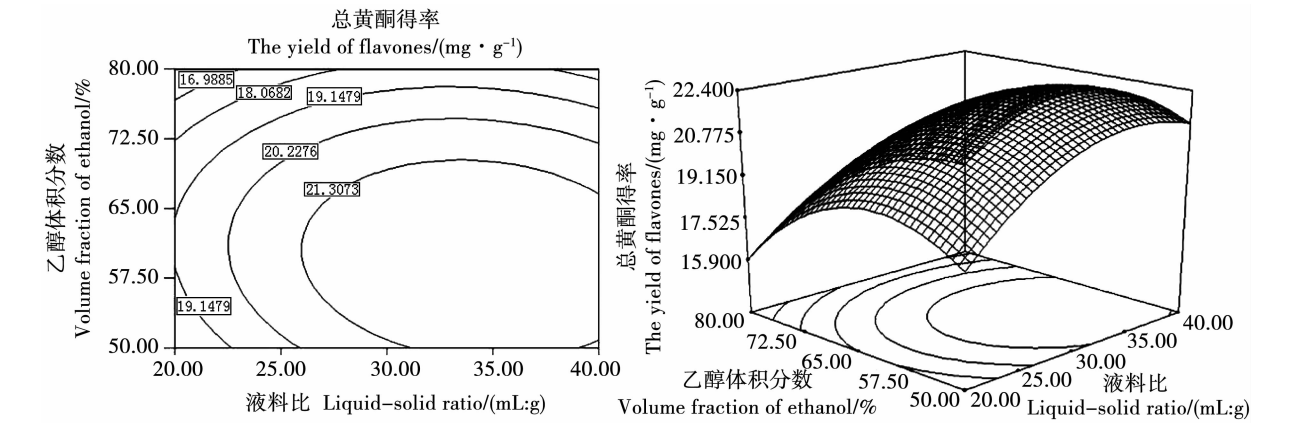


图 7 乙醇体积分数与液料比的等高线和响应面图

Fig. 7 Response surface plot and contour plot of volume fraction of ethanol and ratio of ethanol to material

交互效应的强弱可以由等高线的形状反映出来,椭圆形表示两因素交互作用显著,圆形表示两因素交互作用不显著。由图 5 等高线可知,提取时间与功率之间的交互作用显著,提取时间与乙醇体积分数、乙醇体积分数和微波功率之间的相互作用较小。

经计算得出提取黑豆总黄酮的最佳工艺条件为液料比 36.45:1;微波功率 600 W;乙醇体积分数 57.41%。考虑到提取操作的便利,将此条件进行了适当的修改:液料比 40:1,微波功率 600 W,乙醇体积分数 60%,得到黑豆中的总黄酮得率为 22.1 mg·g⁻¹。

2.4 微波辅助提取法与超声波辅助提取法的比较

在相同的提取条件下,将微波辅助提取法与超声波辅助提取法进行比较。采用超声波辅助提取法进行提取,黑豆总黄酮得率为 21.1 mg·g⁻¹。与微波辅助提取法相比,黑豆总黄酮得率稍低。超声波辅助提取法和微波辅助提取法的优点是提取时间短、效率高。超声波和微波都能作用于黑豆细胞,使有机溶剂容易渗透穿过细胞壁和细胞膜进行提取,并促进细胞内物质释放到溶剂中,从而加速了

细胞内黄酮的萃取过程。但是微波具有内加热作用,可以使胞内温度和溶剂温度迅速升高到溶剂沸点。而超声辅助提取法的原理主要是空化效应、热效应和机械作用,在宏观上提取黑豆黄酮时产生的热效应不足以使溶剂温度升高到溶剂乙醇的沸点。所以,温度的差异可能造成超声波辅助提取法比微波辅助提取法的得率低。

2.5 黑豆总黄酮抗氧化性能

通过抑制油脂氧化试验来评价微波辅助提取的黑豆总黄酮的抗氧化性能,并与超声波辅助提取的黑豆总黄酮、维生素 C 的抑制油脂氧化试验结果进行对比(图 8)。结果表明,在试验的前 2 d 时间内,不同浓度的黄酮以及不同提取方法得到的黄酮、维生素 C 对油脂抗氧化效果基本一致,从第 3 天后,微波辅助提取的黑豆黄酮对油脂的抗氧化作用随着浓度增大而增大。其中黄酮添加量在 50 mg (0.1%) 时抑制油脂氧化效果与加入 40 mg 维生素 C 的抑制效果接近,当黄酮添加量为 100 mg (0.2%) 时抑制油脂的氧化作用优于维生素 C。当黄酮添加量为 100 mg (0.2%) 时,超声波辅助提取

的黑豆总黄酮的抑制油脂氧化作用也优于维生素C,但低于微波辅助提取的黑豆黄酮对油脂的抗氧化作用。这可能是超声波辅助提取的黑豆总黄酮中杂质较多,其黄酮的实际含量稍低于微波辅助提取的黄酮所致。试验表明黑豆总黄酮作为油脂的天然抗氧化剂是可行的,具有较好的应用前景。

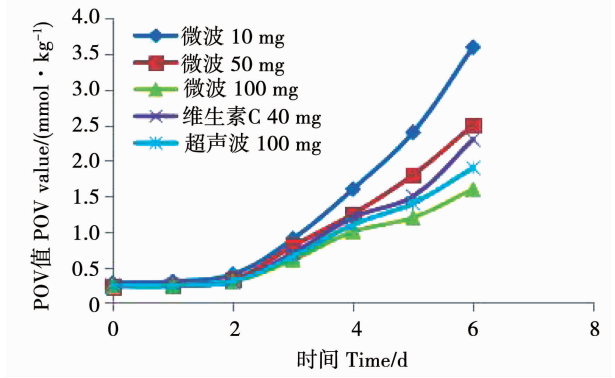


图8 不同量的黄酮和维生素C抑制油脂氧化作用
Fig.8 The antioxidation of different doses of flavones and vitamin C on oil

3 结 论

采用微波辅助方法提取黑豆总黄酮,通过单因素试验,考察了乙醇体积分数、液料比、微波功率、微波提取时间和 pH 值对黑豆总黄酮得率的影响。并利用响应面法优化提取工艺条件。结果表明:最佳工艺条件为液料比 36.45:1,微波功率 600 W,乙醇体积分数 57.41%。考虑到操作的便利,对此条件进行了适当的修改,液料比 40:1,微波功率 600 W,乙醇体积分数为 60%,得到黑豆中的总黄酮的得率为 22.1 mg·g⁻¹,高于超声波辅助提取法。抗氧化性试验证明黑豆总黄酮有较好的抑制油脂氧化效果,具有剂量效应关系,随添加量增加,其抗氧化效果增加,可以作为天然抗氧化剂使用,具有较大的开发应用价值。

参考文献

[1] 谢明勇,陈奕.微波辅助萃取技术研究进展[J].食品与生物技术学报,2006,25(1):105-114. (Xie M Y, Chen Y. The research progress of microwave-assisted extracting technology [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2006, 25 (1): 105-114.)

[2] Fred D B. Soya isoflavones: A new and promising ingredient for health foods sector[J]. Food Research International, 2002, 35: 187-193.

[3] Song T T, Gendirch S, Murphy P A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 1607-1610.

[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(5): 1-4. (Gao R H, Zhang C H, Zhao X H, et al. Research progress on soybean isoflavone [J]. Cereals & Oils, 2009(5): 1-4.)

[5] 梁晓芳,王步军.大豆中异黄酮和皂苷的提取、制备研究进展[J].大豆科学, 2014;33(1):128-134. (Liang X F, Wang B J. Research progress of extraction and preparation methods of soybean isoflavones and soyasaponins [J]. Soybean Science, 2014: 33 (1):128-134.)

[6] 岳爱琴,史少静,徐海军,等.大豆异黄酮的提取纯化及抗氧化性研究[J].安徽农业科学,2014,42(28): 9912-9915. (Yue A Q, Shi S J, Xu H J, et al. Extraction, purification technology and antioxidation activities of soybean isoflavones [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(28): 9912-9915.)

[7] 王丹.脱脂豆粕中大豆异黄酮提取工艺的研究[J].食品研究与开发, 2017, 38(6): 52-55. (Wang D. Study on the extraction technology of isoflavones from defatted soybean meal [J]. Food Research and Development, 2017, 38(6): 52-55.)

[8] 张红波,孙婕,申娟利,等.响应面法优化大豆异黄酮的提取工艺[J].食品研究与开发, 2014, 35(24): 60-63. (Zhang H B, Sun J, Shen J L, et al. Study on isoflavones extracting from soybean by response surface analysis [J]. Food Research and Development, 2014, 35(24): 60-63.)

[9] 张晓峥,邢蓬蕊,张显香,等.发酵豆粕中大豆异黄酮的提取及含量测定[J].泰山医学院学报,2015(1):57-60. (Zhang X Z, Xing P R, Zhang X X, et al. The extraction and content determination of soybean isoflavonesin in the fermented soybean meal [J]. Journal of Taishan Medical College, 2015(1): 57-60.)

[10] 汪美汐,胡佳文,马丽,等.超声波法从酱油渣中提取大豆异黄酮工艺条件研究[J].华中师范大学学报(自然科学版), 2015, 49(2): 233-236. (Wang M X, Hu J W, Ma L, et al. Study on isoflavones extracting from soy source cake by ultrasonic method [J]. Journal of Central China Normal University (Natural Sciences), 2015, 49(2): 233-236.)

[11] 郑丽娜,孔祥辉,刘晓红.黑豆中异黄酮的提取条件研究[J].粮油食品科技, 2007, 15(1): 32-33. (Zheng L N, Kong X H, Liu X H. Study on the conditions of extracting isoflavones from black soybean [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2007, 15(1): 32-33.)

[12] 周三,关崎春雄,岳旺,等.野生大豆、黑豆和大豆的异黄酮类成分比较[J].大豆科学, 2008, 27(2): 315-319. (Zhou S, Sekizaki H, Yue W, et al. Comparison of isoflavones among wild, black and yellow soybeans [J]. Soybean Science, 2008, 27(2): 315-319.)

[13] 迟晓星,张涛,崔洪群.四种豆子中大豆异黄酮含量比较研究[J].大豆通报, 2007(6): 37-39. (Chi X X, Zhang T, Cui H Q. Comparison of isoflavone content in four beans [J]. Soybean Bulletin, 2007(6): 37-39.)

[14] 郭婕,张杰.黄豆、黑豆、黄豆芽总黄酮含量及抗氧化活性[J].周口师范学院学报, 2009, 26(5): 83-85, 92. (Guo J, Zhang J. The total flavones content and the antioxidant activity of soybean, black bean and soybean sprout [J]. Journal of Zhoukou Normal University, 2009, 26(5): 83-85, 92.)