

摘要

本文主要包含三部分内容，首先是以低温脱脂豆粕为原料，提取大豆异黄酮糖苷；其次以大豆分离蛋白乳清废液为原料，分别以硫酸、 α -淀粉酶、强酸型阳离子交换树脂等为催化剂研究了大豆异黄酮糖苷的水解；最后研究了超临界 CO_2 萃取法提取异黄酮苷元的工艺，并以 HPLC 对异黄酮苷元进行了分离并表征了结构。

以碱性水溶液为溶剂，从低温脱脂豆粕中提取大豆异黄酮糖苷。由单因素试验可知：pH 值、提取时间、提取温度、料液比等对提取结果具有影响。通过正交试验优化提取条件为：提取温度 25 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 11，料液比 1:8，提取时间 2 h，大豆异黄酮糖苷的提取率为 77.6%。比较了碱性水溶液提取法、乙醇提取法和超临界 CO_2 提取法提取大豆异黄酮糖苷的结果，结果表明：碱性水溶液提取法比乙醇提取法的效果稍差，超临界 CO_2 萃取法提取率最低。

以大豆分离蛋白乳清废液为原料，分别以酸、 α -淀粉酶、强酸型阳离子交换树脂为催化剂，研究了大豆异黄酮糖苷的水解，结果表明：在现有试验条件下酸水解为最佳选择。硫酸水解最佳工艺条件：硫酸浓度为 2.5 mol/L，水解时间为 2 h，水解温度为 80 $^{\circ}\text{C}$ ，按照最佳条件对结果进行验证，异黄酮苷元的相对转化率为 98.7%。硫酸在超声条件下和微波条件下水解异黄酮糖苷的能力都很强。

对大豆分离蛋白乳清废液为原料，水解得到的混合物进行超临界 CO_2 萃取提取异黄酮苷元研究，试验结果表明：以 70% 的乙醇为夹带剂，夹带剂用量为 8%；萃取压力为 30 MPa；萃取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ ；萃取时间为 120 min；在此条件下，异黄酮苷元的提取率为 79.2%。

采用 HPLC 技术对超临界 CO_2 提取物进行单体分离，以 UV、IR、HPLC、ESI/MS 对产品进行了结构表征。

关键词： 分离蛋白乳清液；异黄酮苷元；水解；超临界 CO_2 提取

ABSTRACT

There are mainly three parts of contents in this thesis. Firstly, the isoflavone glycosides were extracted from defatted soy flakes and SPI milk serum. Secondly, the isoflavone glycosides were hydrolyzed by means of different catalyst such as acid, α -amylase and strong acidic cationic-exchanged resin *etc.* Thirdly, the isoflavone glycosides hydrolyzed from SPI milk serum were isolated by SFE-CO₂ extraction and purified by HPLC.

The soybean isoflavone glycosides were extracted by basic solvent from defatted soy flakes. It has been learned that extraction results were effected by pH value, time, temperature and the ratio of material to solvent were effective conditions. The optimum extraction conditions were optimized by single factor tests and orthogonal tests, the experimental results confirmed as follows: temperature 25 °C, pH 11, the ratio of material to solvent 1:8, time 2 hours and the extraction rate of soybean isoflavone glycosides was 77.6% under this condition. This method was compared with ethanol extraction method and supercritical fluids extraction method. The experimental results indicated that ethanol extraction method was the best and the extraction method under basic solvent was better than the supercritical fluids extraction method.

The soybean isoflavone glycosides extracted from the SPI milk serum were hydrolyzed by different catalysts such as acid, α -amylase and strong acidic cationic-exchanged resin *etc.* Hydrolysis efficiency was studied through orthogonal experiment and it indicated that acid hydrolysis was the best choice under present experiment condition. The optimum conditions of sulfuric acid hydrclysis were confirmed as follow: the concentration of sulfuric acid 2.5 mol/L, the reaction time 2 h and the reaction temperature 80 °C., the relative translation ratio of isoflavone aglycones confirmed under the optimum conditions was 98.7%. By the way, the acid hydrolysis method was compared with ultrasound hydrolysis and microwave hydrolysis.

The hydrolysate from the SPI milk serum was extraced by SFE-CO₂ extraction. The experimental results indicated that the perfect extraction ratio of isoflavone aglycones was 79.2 %, which was obtained under the extraction pressure of 30 MPa, the extraction temperature of 60 °C, the extraction time of 120 min and with 70% ethanol as entrainment reagent at the percentage of 8% referenced to CO₂ amount.

Finally, the extractive was purified by HPLC and the isoflavone aglycones most abundant in extractive were confirmed as Daidzein and Genistein, which were characterized

by UV、IR、HPLC and ESI/MS.

Key words: SPI milk serum; isoflavone aglycones; Hydrolysis; Supercritical CO₂ extraction

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包括其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得河南工业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

论文作者签名： 孟冬 日期： 2007.5.26

关于论文使用授权的说明

本人完全了解河南工业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；本人授权河南工业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。（保密的论文在解密后应遵守此规定）

论文作者签名： 孟冬 日期： 2007.5.26

导师签名： 王鹏 日期： 2007年5月26日

第一章 前言

1.1 立题的目的和意义

大豆异黄酮是大豆次生代谢产物，是近年来食品与营养学研究的热点之一。我国是大豆的故乡，大豆资源十分丰富。目前我国大豆加工业主要以加工油脂产品为主。对大豆异黄酮等活性有效物质的提取，大豆资源综合利用的研究是近几年来研究的热点。据有人估算^[1]，对大豆生物活性成分进行开发利用，可以极大地提高大豆的附加值，投入产出比将高达 1:5.5 以上。大豆异黄酮具有改善妇女更年期综合症、防治骨质疏松、预防心血管病、抗氧化性、抗菌等多种生理功能，可广泛应用于药品和保健食品中。

目前，大豆异黄酮提取工艺主要是以豆粕为原料，利用乙醇等有机溶剂进行提取。该工艺存在产品纯度低、生产成本高等问题。超临界 CO₂ 萃取技术是一种环境友好的提取方法，是当前分离技术新的发展方向，特别适用于天然产物中生理活性物质的提取与分离，在化工、食品、中药等研究领域已引起广泛的关注。如果能研究出一种以超临界 CO₂ 萃取技术为主的提取方法，可以为异黄酮的提取提供一条对环境友好的工艺路线。

异黄酮的结构是以色原酮为主体的多元酚，是弱酸性化合物，在碱性水溶液中是以离子状态存在的，所以在碱性条件下其具有极好的水溶性，以此为出发点，可以考虑研究以碱性水溶液为溶剂的提取异黄酮。

醇法制备浓缩蛋白和碱提酸沉法生产分离蛋白，是目前生产植物蛋白的方法。在分离蛋白的生产过程中，会产生大量的分离蛋白乳清废液，目前，这些乳清液仅是经过简单处理后直接排放到环境中去，这样不但会造成水体富营养污染问题，而且对分离蛋白乳清液中具有高附加值的生物活性成分（如大豆异黄酮等）没有充分利用。如果能将这部分异黄酮进行回收，不仅可以增加大豆产品的附加值，而且对污水的治理有一定的作用，具有良好的经济效益和社会效益。

1.2 大豆异黄酮的结构、理化性质与生理功能

异黄酮是黄酮类化合物的一类，与黄酮类化合物的广泛分布不同，异黄酮的分布范

围很窄, 主要分布于豆科植物 *Papilionoideae* 亚科的一些属中^[2]。其中含量较高的有苜蓿、红三叶草和大豆, 一般苜蓿中异黄酮的含量为 0.5%~3.5%, 红三叶草中异黄酮含量为 1.5%~2.5%, 大豆中异黄酮的含量为 0.1%~0.5%^[3]。大豆异黄酮主要分布于大豆种子的子叶和胚芽中, 种皮中含量极少。微生物发酵液中的异黄酮都来自培养基中的豆粕。人体摄入的异黄酮几乎全部来自大豆及豆类食物^[4]。大豆异黄酮含量的种间差异很大, 也受种植时间、气候等因素的影响^[5], 不同的大豆食品中异黄酮主要存在形式和含量差异很大^[6-8]。由于这类化合物与雌二醇的结构相似, 所以在人们体内具有微弱的雌激素活性, 合称为异黄酮植物雌激素^[9]。

早在 1930 年人们就发现在大豆中存在异黄酮, 它是豆制品苦涩味的主要来源, 对动物有雌激素作用, 长期以来被认为是一种抗营养因子^[10,11]。1982 年以前没有异黄酮对人体作用的任何研究报道, 在九十年代对大豆异黄酮的生理与营养作用的研究和重新评价成为世界性的热点^[12]。1986 年, 美国科学家发现大豆中抑制癌细胞的异黄酮。1990 年 6 月, 美国国家癌症研究院组织全美著名学者研讨了大豆的抗癌效果, 肯定大豆异黄酮是其最佳的天然物质。此后又证实大豆异黄酮可以防止骨质疏松症、减轻妇女更年期不适症及降低冠心病的发病率。1998 年美国食品及药物管理局正式批准大豆为健康食品。1998 年 Wake Forest 大学的 Baptist 医学中心发表报告指出大豆中防癌抗癌和降低胆固醇的关键物质是大豆异黄酮, 并非蛋白质。在过去几年中, 约有 1000 多项研究结果发表, 阐述异黄酮对人体的健康益处。

1995 年 11 月, 世界上第一个以大豆异黄酮为主要原料的功能性食品在芬兰市场上出现。次年, 美国 FDA 批准大豆异黄酮作为健康食品上市。美国 ADM 公司在 1998 年开始建设世界上第一家大豆异黄酮生产厂, 1999 年正式生产纯度为 40% 的大豆异黄酮产品 *Phytonutrients*TM。美国中央大豆公司的主要产品为强化大豆异黄酮的大豆蛋白制品, 应用于促进健康的日常饮食补充物和功能性疾病中。*Soy health* 和 *Schouten* 公司的主要产品为大豆胚芽与胚芽提取物 (*isolife*TM)。在日本已有商品“大豆胚芽茶”“ソイアクト”以及“フジフラボン”等出售, 主要是一些用于预防骨质疏松症、调节骨代谢等保健食品。

目前, 国内开发异黄酮主要作为食品、保健品、特别是医药中间体和药物组分。生产异黄酮产品纯度低, 一般都在 40% 左右, 并且生产成本低, 工艺复杂, 因此有必要系统地研究节能、高效的提取方法。

1.2.1 大豆异黄酮的结构和分布

天然存在的大豆异黄酮主要有 12 种，分为游离型苷元和结合型糖苷，其结构见图 1-1 和表 1-1。

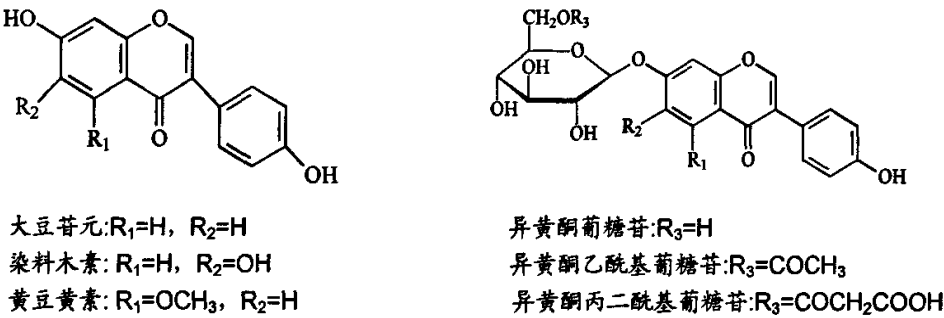


图 1-1 大豆异黄酮的结构

大豆异黄酮的三种苷元分别是大豆苷元 (Daidzein)，染料木素(Genistein)和黄豆黄素(Glycitein) [13]。在大豆籽粒中只有少量异黄酮以游离形式存在,占总量的 2~3%，97~98%的异黄酮以各种糖苷形式存在，其中 60~70%是丙二酰化的异黄酮糖苷[14]。

表 1-1 大豆异黄酮

大豆异黄酮	R_1	R_2	R_3
Daidzein	-H	-H	—
Genistein	-OH	-H	—
Glycitein	-H	-OCH ₃	—
Daidzin	-H	-H	-H
Genistin	-OH	-H	-H
Glycitin	-H	-OCH ₃	-H
6'-O-Acetyldaidzin	-H	-H	-COCH ₃
6'-O-Acetylgenistin	-OH	-H	-COCH ₃
6'-O-Acetylglycitin	-H	-OCH ₃	-COCH ₃
6'-O-Malonyldaidzin	-H	-H	-COCH ₂ COOH
6'-O-Malonylgenistin	-OH	-H	-COCH ₂ COOH
6'-O-Malonylglycitin	-H	-OCH ₃	-COCH ₂ COOH

大豆籽粒的异黄酮含量受大豆品种、产地、生产年份的影响，其变化范围约为 0.05%~0.7%。大豆胚轴（包括胚根和胚芽）中异黄酮含量约为子叶的 6 倍，在大豆胚芽中异黄酮含量为 1.4%~1.76%，种皮中含量很少。但由于子叶占大豆籽粒重的 95% 以上，因此大豆子叶中异黄酮的绝对含量远远大于胚轴^[15]。大豆各部位的异黄酮含量见表 1-2^[16]。

表 1-2 大豆各部位的异黄酮含量($\mu\text{g/g}$)

名称	大豆苷	染料木苷	大豆苷元	染料木素	总量
全粒	963	864	20	21	1868
子叶	530	687	25	27	1269
胚轴	8327	1883	83	15	10308
种皮	41	44	176	65	326

大豆籽粒中约 50%~60%的异黄酮苷元为染料木素(Genistein)，约 30%~35%的异黄酮苷元为大豆苷元(Daidzein)，约 5%~15%的异黄酮苷元为黄豆黄素(Glycitein)。在大豆加工中，不同的异黄酮流失程度不同，因此大豆产品中各种异黄酮所占比例与未加工的大豆有所不同。除个别产品外，大多数大豆食品中，染料木素含量最高，其次是大豆苷元，黄豆黄素的含量相当少。

1.2.2 大豆异黄酮的理化性质

纯大豆异黄酮是无色的晶体物质，染料木素(Genistein)为无色片状结晶，大豆苷元(Daidzein)为无色针状结晶，工业上的大豆异黄酮产品为白色或淡黄色粉末^[17]。大豆异黄酮具有苦味、收敛性和干涩感觉，是产生大豆苦涩味的因子之一，其中苷元比糖苷具有更强的不愉快风味，但同时也受到加工条件的影响。

大豆异黄酮是一种弱酚酸，易溶于碱性溶液以及丙酮、甲醇、乙醇、乙酸乙酯等极性溶剂中。紫外灯下多为显紫色。异黄酮苷元不具有旋光性，但对于染料木苷和大豆苷而言，由于结构中引入了糖基，因而具有旋光性^[17]。

游离型的大豆异黄酮基本不溶于水；糖苷一般易溶于水，但染料木苷(Genistin)除外，其溶解度在 4~50 $^{\circ}\text{C}$ 之间没有明显变化，在 70~90 $^{\circ}\text{C}$ 之间其溶解度随着温度的升高而显著增加。因此，在水溶液提取大豆异黄酮时，温度应超过 70 $^{\circ}\text{C}$ ^[16]。

丙二酰糖苷热不稳定，以极性溶剂热浸时（高于 80 $^{\circ}\text{C}$ ）迅速脱去丙二酰基得到

相应的糖苷^[18]；丙二酰基糖苷干热处理时发生脱羧反应得到天然大豆中不存在的乙酰化糖苷^[19]。大豆异黄酮中的丙二酰化糖苷在加热和碱性条件下可以水解去掉丙二酰基和乙酰基而转化成相应的葡萄糖苷。碱水解条件 pH 值为 8~13，水解程度随 pH 值及温度的升高而加大。各种异黄酮葡萄糖苷在发酵过程中可被 α -葡萄糖苷酶水解为游离的苷元，苷元的结构也可能被分解或改变。大豆异黄酮中的葡萄糖苷在强酸或酶存在时可水解去掉葡萄糖基而转化为异黄酮苷元。异黄酮苷元在加热和酸水解过程中非常稳定，100℃加热 3 h 和 4 M HCl 中 100℃水解 3 h，仅损失 1~2%^[20]。

1.2.3 大豆异黄酮的生理功能

大豆异黄酮能与雌激素受体结合，并产生弱的雌激素效应，这种弱的雌激素作用在一定浓度下会表现出抗雌激素活性，这种生物效应主要体现在与激素相关的疾病上。药理学研究表明^[21]：大豆异黄酮可作为雌性激素治疗药物的替代品，可改善妇女更年期综合症，并具有降低血液胆固醇、防止骨质疏松及抑制癌细胞生长的作用。国外流行病因学证明^[22]，东方人的乳腺癌、结肠癌和大肠癌的发病率远低于西方人，其重要原因是东方人的食物（主要是大豆中）含有大量的植物雌激素，经考证大豆异黄酮成分是引起癌症患病率下降的主要因素之一。

研究表明^[23]，大豆苷元（Daidzein）具有降低血液胆固醇、抑制血小板凝聚、阻止平滑肌细胞增值的作用，使用异黄酮还能有效地防止头发损失、保护头发组织的完整性，并已开发出产品，作为头发外用药水，其中含有半纯化的大豆提取物（含 20~50% 的异黄酮）。

Michael Naim 等^[24]人研究了大豆异黄酮对真菌生长的影响，发现浓度为 0.005% 的游离异黄酮显示出了重要的抗菌活性。

1.3 大豆异黄酮的提取分离方法

1.3.1 有机溶剂提取法

有机溶剂提取法是国内外提取异黄酮使用最广泛的方法，常用的有机溶剂主要有：乙醇、甲醇、乙酸乙酯、丙酮等^[25]。异黄酮糖苷的特殊分子结构，决定了其较大的分子极性，根据相似相溶的原理，异黄酮可以被这些极性溶剂溶出，进入溶液相，为下一步的纯化处理提供了条件。

有机溶剂提取方法存在溶剂消耗量大、生产成本低、异黄酮得率和含量低、杂质多及溶剂残留等问题,所以,其它提取技术的研究受到愈来愈多的关注。

1.3.2 超临界流体萃取技术(SFE)

超临界流体萃取是上世纪80年代发展起来的一项新提取分离技术,该技术是以超临界流体为提取剂,从液体或固体中提取出待测组分。

超临界流体(Supercritical fluid, SCF)是物质介于气体和液体之间的一种特殊的聚集状态,在超临界状态下,流体具有气体和液体的双重特性,即具有气体的高扩散性和高渗透性、低粘度的特点,又兼有与液体相近的密度和溶解度。正是这种双重特性使得超临界流体对物料有良好的渗透性和较强的溶解能力。超临界流体萃取技术是利用临界或超临界状态的流体及被萃取的物质在不同的蒸汽压力下所具有的不同化学亲和力和溶解能力进行分离纯化的操作。利用流体在临界点附近,体系温度和压力的微小变化,使物质溶解度发生几个数量级的突变特性来实现其对物质的提取分离。通过改变压力或温度来改变超临界流体的性质,达到选择性地提取各种类型化合物的目的^[26,27]。

能用于超临界流体的物质很多,如 CO_2 、 H_2O 、 C_2H_4 、 C_3H_8 、 CH_3OH 、 NO_2 等,其中 CO_2 气体在超临界萃取工业的应用最为广泛^[26]。 CO_2 价廉、易得,且不易燃、不易爆是一种安全性较高的气体。其临界条件易达到($T_c=394.1\text{K}$, $P_c=7.347\text{MPa}$),可在常温下操作,有效地防止热敏性和化学不稳定性成分的高温破坏和氧化,不影响萃取物的生理活性;无色无味无毒,萃取物无溶剂残留,对环境没有污染,是一种环境友好的可持续发展的绿色环保技术;从提取到分离一步完成,操作费用低;选择性好,通过调节温度和压力,可有针对性地提取出有效成分等特点^[27]。故超临界 CO_2 萃取技术在天然产物有效成分的提取中应用广泛,特别是对一些含量低、附加值高的产品极为适用。随着超临界 CO_2 萃取技术的不断进步,全氟聚醚碳酸铵(PEPE)的应用,把超临界 CO_2 萃取扩展到水溶液体系范围,使得难以提取的强极性化合物如蛋白质等的超临界 CO_2 提取已成为可能^[28]。

1.3.3 酶工程技术(EE)

酶工程技术是指在异黄酮提取过程中,通过加入恰当的酶发生转糖反应和酶解反应而使产品中异黄酮得率和含量大大提高的新兴技术^[29]。若只用水(或醇水)提取,只能提取以糖苷为主要成分的水溶性异黄酮糖苷,油溶性的异黄酮苷元就很难提取出,致使传统提取方法中异黄酮苷元得率和含量过低。此时如果加入恰当的酶,不仅可以将油溶性

的异黄酮转化为易溶于水的糖苷而有利于提取；而且还可通过酶反应将植物组织分解，使提取传质阻力减小，加速异黄酮的释放，提高提取效率；另外也可使提取液中的淀粉、蛋白质、果胶等分解，从而简化后续分离纯化工序。因此在传统异黄酮提取工艺占主导的工业化生产中具有良好的工业可行性，并具有提取条件温和有利于异黄酮活性护、成本低、安全等优点。另外，该技术对于干燥或浸湿的原料皆适用。

1.3.4 物理场辅助提取技术(SE/ME)

物理场辅助提取技术，是指通过引入恰当的物理场辅助异黄酮提取而使异黄酮得率和含量大大提高的新兴技术。一般又分为超声场辅助提取技术和微波场辅助提取技术。

超声场辅助提取技术主要是利用超声波产生的强烈振动、高加速度、空化效应、搅拌作用等，从整体上能提高提取过程的传质速率和效果，可加速植物材料中的有效成分进入溶剂，从而增加有效成分的提取率，缩短提取时间，并且还可避免高温对提取成分的影响^[30]。超声法提取异黄酮活性成分具有省时、节能、提取率和产品纯度高的优点。谢明杰等^[31]利用超声波从脱脂豆粕中提取大豆异黄酮一次，提取时间30 min，所得大豆异黄酮的提取率比加热回流提取120 min提取率高约46%，与加热回流提取两次，240 min的提取率一致。贺云等^[32]采用超声法从野葛根中提取葛根异黄酮，再将提取物水解，经分离纯化得到大豆苷元，得率为0.5%，纯度为98.2%。

微波场对异黄酮提取的辅助作用主要来源于微波对细胞膜的生物效应^[33]，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，异黄酮从细胞中释放出来，传递转移到溶剂周围，其热量传递和质量传递的方向是一致的，这有助于异黄酮的快速溶出。微波场辅助提取技术同样具有选择性高、提取时间短、溶剂用量少、后处理方便、能耗较低等优点。张永忠等^[34]利用微波对原料低温脱脂豆粕进行前处理，提高了大豆异黄酮的溶出率，并提高操作的选择性。贾建波等^[35]将大豆胚芽进行微波前处理，经450 W微波处理30 min，异黄酮提取率从1.2%提高到1.74%，比溶剂法的提取率提高了43%。

1.3.5 超滤技术(UF)

超滤技术是指常温下以一定压力和流量，利用不对称微孔结构和半透膜分离介质，以错流方式进行过滤，使溶剂及小分子物质通过，高分子物质和微粒子如蛋白质、水溶性聚合物、细菌等被滤膜阻留，从而达到分离、纯化、浓缩的新型膜分离技术^[36]。该技术用于异黄酮的分离纯化时，与传统的分离方法相比，具有分离效率高、分离速度快、

分离过程无相变、不易形成表面极化现象、无污染、无须加热且超滤膜可反复使用的特点。冯建光, 谷文英^[37], 选用孔径为1.2 μm 的无机膜, 操作压力为0.125 MPa, 料液操作温度为80 $^{\circ}\text{C}$, 澄清过程中用3倍体积的水分批对浓缩液进行稀释, 大豆异黄酮的保留率最佳。

1.3.6 高速逆流色谱提取技术(HSCCC)

高速逆流色谱技术是一种不用于任何载体或支撑体的液液分配色谱技术, 由美国医学院YiochiroIto博士于20世纪60年代末首创, 该技术建立在单向胜流体动力平衡体系之上, 利用相对移动的互不混溶的两相溶剂, 在处于动态平衡的两相中将具有不同分配比的样品组分分离^[38]。目前, 已成功地开发出分析型和制备型高速逆流色谱仪。HSCCC既可用于异黄酮的制备分离, 又可定量, 进样量可从毫克级到克级。该技术用于异黄酮的分离纯化时, 具有分辨率高、分离速度快、分离纯化同步完成、产品纯度高、不存在载体对异黄酮的吸附和污染、制备量大和溶剂消耗量少等特点。江和源等^[39]采用高速逆流色谱法分离纯化大豆异黄酮中的大豆苷和染料木苷, 溶剂系统为乙酸乙酯-醋酸-水, 体积比为5:1:10, 上相为固定相, 下相为流动相, 逆流色谱仪转速为800 r/min, 流速为1.5 mL/min所得大豆苷、染料木苷经高效液相色谱分析测定, 纯度分别达到98.2%和99.2%。

1.3.7 高速离心分离技术(HSC)

高速离心分离技术是以离心机为主要设备, 通过离心机的高速运转, 增加沉降速度, 使溶液中的杂质加速沉淀的一种方法^[40]。目前使用的离心机有: 沉降式离心机、蝶片式离心机、过滤式离心机, 其中沉降式离心机因具有操作方便、维修简单、沉淀量多少不限等特点应用最为广泛。该技术用于异黄酮的分离纯化时, 与传统的醇沉法相比具有省时省力、工艺流程短、成本低廉、容易实现工业化等特点, 且由于是物理分离纯化, 不会引起提取液中异黄酮发生变化或损失, 最大限度地保存了异黄酮的活性成分。

1.3.8 超高压提取技术(UHPE)

超高压提取又称超高压静压提取, 它是在常温下用100~1000 MPa的液体静压力作用于药液上, 使提取溶剂渗透到药物细胞内, 在预定压力下保持一段时间使有效成分达到溶解平衡后迅速卸压, 由于细胞内外渗透压力差突然增大, 细胞内的有效成分转移

到细胞外的提取。与传统的煎煮、回流提取等方法相比，超高压提取在缩短提取时间、降低能耗、减少杂质成分溶出的同时，提高了有效成分的收率。超高压提取是在常温下进行的，因此避免了因热效应引起的有效成分结构变化、损失以及生理活性降低，同时由于超高压提取是在密闭环境下进行的，没有溶剂挥发，不会对环境造成污染，因此该技术更加符合“绿色”环保的要求^[41]。超高压生物加工技术在食品灭菌、病毒灭活、疫苗制取、蛋白质改性、生化制药等多方面都有很好的应用。

1.4 大豆异黄酮糖苷的水解方法

1.4.1 大豆异黄酮糖苷的酸水解

异黄酮糖苷能被酸催化水解，多采用较浓的盐酸或硫酸(1~3 mol/L)，较高的温度(80~100 ℃)。糖苷键首先发生质子化，然后糖苷键断裂生成苷元和碳水化合物。

1.4.2 大豆异黄酮糖苷的 Smith 降解

该法是一种氧化开裂法，比酸水解温和，能完整地保持苷元的结构。第一步用 NaIO_4 将糖的二羟基氧化开裂为二元醛结构，第二步用 NaBH_4 将二元醛结构还原成二元醇结构，第三步在室温条件下与酸作用使其水解。

1.4.3 大豆异黄酮糖苷的酶水解

酶水解条件温和，多采用弱酸性的缓冲溶液，大豆异黄酮苷元不易变性，是工业上制备富含大豆异黄酮苷元保健食品的很有前途的途径。酶的专一性很强，目前研究较多的大豆异黄酮糖苷水解酶就是 β -葡萄糖苷酶，大豆自身含有的内源 β -葡萄糖苷酶水解活性不强，水解效率只有22%~29%。添加足量的高活性酶（如乳酸菌中提取的 β -葡萄糖苷酶）可使水解达到80%以上。能够水解大豆异黄酮糖苷的酶还有葡萄糖酸酶、 α -半乳糖苷酶、生物乳糖酶、真菌乳糖酶和乳糖酶F等，它们都有很强的水解大豆异黄酮糖苷的能力^[42]。

1.5 大豆异黄酮含量的测定

大豆异黄酮含量测定的方法非常多,文献报道较多的主要有紫外分光光度法和色谱法。其中紫外分光光度法^[43]是基于大豆异黄酮在紫外区有特征吸收,且各个苷元和糖苷的最大吸收波长相差不大而进行测定的,该法简便易行,稳定可靠,应用较广,但是特异性差,不适用于严格定量计算,适用于快速分析及一般中小企业采用。Jianto He 等^[44]采用大孔树脂法吸附纯化样品,测定大豆异黄酮含量,其中总异黄酮含量以染料木素计算为 38.7%,平均加样回收率为 99.86%,相对标准偏差为 2.6%。

色谱法有高效液相色谱法、气相色谱-质谱(GC-MS)法、液相色谱-质谱(HPLC-MS)法,其中高效液相色谱是应用范围最为广泛的分离和定量测定异黄酮的方法,具有分离效率高,分辨率好,灵敏度高,测定结果准确等特点,适合用于某具体黄酮类化合物的测定。

徐健英,邹颖秀^[45]采用色谱柱 C₁₈ 反相柱(3.9 mm×150 mm Waters 公司)、流动相为乙腈/0.003 M Na₂HPO₄(17:83),进样量 10 μL,流速 1.0 mL/min,柱温 35 °C,检测波长 260 nm,结果表明,异黄酮的平均回收率为 98.15%,精密度为 0.544%。

鞠兴荣等^[46]将样品水解后,采用 Nova-Pak C₁₈ 反相色谱柱(3.9 mm×150 mm),在进样量为 4 μm,流动相为 MeOH/ 0.4% H₃PO₄(47:53 V/V),流速 0.7 mL/min,检测波长 260 nm,柱温 25 °C 的色谱条件下测定苷元含量,重现性好,回收率达 99%,变异系数小于 3%。

孙君明等^[47]将样品用离心机离心后,采用 HICHRON 316A- LOK(UK) C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.0 mm),流动相含 5% (v/v) 的甲醇水溶液,流量为 1 mL/min,检测波长 254 nm,柱温 50 °C,进样量 10 μL,分析时间 20~40 min/样品。

气相色谱法具有低检测限、高效能、高选择性等突出优点,但是由于在测定黄豆苷和染料木苷时需要制备衍生物,制备步骤较多,耗时长,难以推广。Joannou GE 等^[48]采用毛细管气相色谱法和气质联用分离测定了尿样中的黄豆黄素和染料木苷。Mazur W 等^[49]采用同位素稀释气质联用法对食品中的黄豆苷和染料木苷进行了测定。系统采用离子火焰检测器,以氮气为载气。

高效液相色谱-质谱法测定大豆异黄酮含量的方法文献报道的不多。董怀海等^[50]采用高效液相色谱-质谱法同时测定大豆异黄酮 6 种组分,高效液相为 Waters 2690,色谱条件:色谱柱 Symmetry C₈ (2.1 mm×150 mm),柱温 35 °C,流动相为质量分数为 1%的醋酸甲醇和质量分数为 1%的醋酸,梯度洗脱。质谱为 ZMD 4000,正离子质谱条件:毛细管电压 4100 V,一级锥孔电压 80 V,离子源温度 120 °C,脱溶温度 200 °C。

负离子质谱条件:毛细管电压 4100 V,一级锥孔电压 100 V,离子源温度 120 ℃,脱溶温度 200 ℃。

龚凌霄等^[51]将大豆胚芽、大豆粕等原料用 60%乙醇水溶液提取,采用 Novapak C₁₈ 柱 (3.9 mm×150 mm, 4 μm),流动相为 0.1%乙酸/水和 0.1%乙酸/乙腈,梯度洗脱,柱温 40 ℃,检测波长为 254 nm,外标法定量,检测时间 23 min,分析大豆中 8 种异黄酮成分,质谱条件:ESI(+),扫描范围(m/z)为 50~600,毛细管电压为 3500 V,干燥温度为 350 ℃,干燥气流速为 9.0 L/min,喷雾器压力为 241.32 kPa。根据色谱峰的质谱特征,鉴定出各种异黄酮,测定 4 种异黄酮(大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木苷元)的相对标准偏差(RSD)为 0.5%~1.2%,回收率 99.0%~103.0%。

另外,还有电化学检测,放射免疫性鉴定,核磁共振检测,荧光检测等。毛细管电泳法具有快速高效,选择性高,不需对产品进行预处理,检测范围达到 10⁻⁶~10⁻⁹ 级。

Wang 等^[52]用毛细管电泳成功地分离了葛根中的 5 种成分,包括染料木素、大豆苷及大豆苷元等。于阿娟^[53]在研究大豆异黄酮的分离时,确定了其最佳电泳分离条件:25 mmol/L 硼酸盐缓冲溶液(pH 为 10),运行电压为 21.0 KV,检测波长 259 nm,进样压差 16 cm 进样,毛细管有效长度为 27 cm,进样 20 s,在 6 min 内完成测定。

罗维等^[54]利用包括氢检测异核多量子相干谱(HMQC)核和氢检测远程异核多量子相干谱等多种二维核磁共振技术对大豆异黄酮的 ¹³CNMR 和 ¹HNMR 谱峰进行了全归属。

免疫检测法多应用于医学方面。Wanh J 等^[55]通过免疫检测法测定了人尿样中的包括黄豆黄素和染料木苷在内的植物雌性激素,结果与同位素稀释的 GC-MS 法的相关系数很高,可达到 0.95~0.99。

1.6 大豆异黄酮产品的开发及应用前景

1.6.1 国外情况

在国际上,大豆异黄酮作为健康食品的热门课题已被列入全球十大最佳投资项目之一^[56]。1998 年美国 ADM 公司率先建成全球第一家大豆异黄酮生产线,销售额达 19 亿美元。随后日本和澳大利亚等国也陆续开始不同含量大豆异黄酮的分离、提纯。随着 FDA 批准将大豆异黄酮作为健康食品上市,接下来不过几年时间便迅速形成了一个大豆异黄酮产业,2000 年在德国法兰克福举办了第一届国际健康食品配料展,其中大豆异黄酮是最热门的话题。德、美、英、法、荷、比、日、以色列、西班牙等国的 28 家

企业展示了大量涉及大豆异黄酮的产品和资料，并向观众展示了异黄酮的四大功能，即妇女保健、心脏保健、降低血脂、改善骨质疏松。有资料显示^[57]，目前美国市场上已有 300 多种大豆异黄酮功能食品，年销售额近 20 亿美元。

当前，发达国家市场上已有大豆异黄酮的各种制剂，如片剂、口服液、粉剂等。高纯度的大豆异黄酮已应用于医药产品的开发。美国、欧洲、日本及澳大利亚等一些发达国家已开发出富含异黄酮的大豆分离蛋白、大豆浓缩蛋白、酱油、饮料、茶、豆粉、奶粉、酸奶、面包、黄油、巧克力、冰淇淋等多种保健食品，成为市场上的畅销食品。日本一家公司已开发出水溶性高、苦涩味较少的制品，称之为“富士黄酮”，可应用于饮料、甜点心之类的健康食品；日本丰年公司还开发了“丰年大豆异黄酮”制品，纯度高达 80%以上^[58]。

1.6.2 国内情况

我国对大豆异黄酮的研究大约开始于1985年，目前在研究开发、产品质量、市场销售等领域比欧美发达国家还存在一定的差距，但是我国政府对发展农产品深加工领域也极为重视，实施了“国家大豆行动计划”。2003年初，国家四部委联合下发了《关于进一步扶持我国大豆产业发展有关措施的通知》，其中明确提出要以大豆磷脂、皂苷、异黄酮、食用纤维等功能性食品为主要研究方向，加快研究高质量、高附加值、高效益的具有特殊营养功能的大豆新产品^[58]。

目前全国从事大豆异黄酮提取的正规企业有百余家。现在国内市场大豆异黄酮的年生产能力约为250吨，而能达到上吨位产量的也仅30余家。其产品主要用于出口。我国已能够生产含10%~90%不同规格的大豆异黄酮产品，市场上纯度在40%的大豆异黄酮价格约为1100 元/kg；纯度为60~80%的大豆异黄酮价格达到每2000~3000 元/kg^[59,60]。

国内消费者对大豆异黄酮的认识正处于不断深化的阶段，市场具有极大的发展空间。市场上的异黄酮类保健品越来越多，已上市的产品有十余种，我国市场上的大豆异黄酮类保健品详见表1-3^[61]。

表 1-3 我国市场上的大豆异黄酮类保健品

公司名称	产品名称	主要原料	作用
北京化工大学裕华创新 科技有限公司	青春态大豆异黄酮 营养片	大豆异黄酮等	祛斑养颜、延缓衰老
太原市元太生物化工 有限公司	“格丽斯婷”大豆异黄 酮软胶囊	大豆异黄酮、植物油	雌激素缺乏等
华北制药集团有限 责任公司	欣靓胶囊	大豆异黄酮、碳酸钙、 维生素 D、淀粉	预防骨质疏松
广州绿色盈康生物工程 有限公司	健姿源大豆异黄酮 三层片	大豆异黄酮等	改善皮肤质量、美容等
新疆持丰药业股份 有限公司	菲玫尔大豆异黄酮 营养片	大豆异黄酮、碳酸钙、 维生素等	延缓衰老、推迟更年期的 到来
吉林修正药业集团股份 有限公司	“伊更美”	大豆异黄酮等	提高性生活质量等
上海金医保生物 工程公司	金医保牌异黄酮片	大豆异黄酮等	治疗妇女更年期综合症
上海百嘉营养保健品 有限公司	“凤英子”	大豆异黄酮等	预防心血管疾病等
武汉健民药业集团股份 有限公司	“康馨素”	大豆异黄酮等	延缓衰老、推迟更年期的 到来

随着生活水平的提高，人们越来越重视身体的保健。专家们预计，21 世纪将成为大豆食品的世纪，人们服用大豆异黄酮产品就像 20 世纪服用维生素那样普遍，大豆异黄酮的开发与应用具有广阔的前景。因此，提取高纯度的大豆异黄酮(尤其是异黄酮苷元)产品，是具有十分重要的意义的研究课题。

1.7 课题设想

目前,提取大豆异黄酮的主要方法是以豆粕、大豆胚芽等为原料,以乙醇、丙酮等有机溶剂提取工艺为主,该提取工艺要消耗大量的有机溶剂,不仅生产过程中存在一定的火灾等安全隐患,而且导致生产成本偏高。大豆异黄酮的母体结构是多羟基酚,具有弱酸性,在 $\text{pH} > 10$ 的条件下以离子形式存在,如果能成功利用碱性水溶液为溶剂在室温条件下提取大豆异黄酮,必然为大豆异黄酮的提取与分离探索出一条新的工艺路线。本课题第一部分内容就是研究碱性水溶液提取脱脂豆粕中的大豆异黄酮的工艺路线,并优化工艺参数。为获得提取成本较低的异黄酮工艺奠定基础。

分离蛋白乳清废液(SPI milk serum)是植物蛋白生产过程中的主要排放物,其中含有相当丰富的异黄酮、皂甙、低聚糖等生物活性成分。目前生产企业一般是直接排放,乳清废水中的 COD、BOD 远远高于国家规定的排放标准。如果能从分离蛋白废液中提取其中的高附加值成分,不但可以增加企业的经济效益,而且有利于降低废水对环境的污染,为众多大豆蛋白厂家解决废水排放问题,具有良好的社会效益。课题的第二部分内容就是以分离蛋白乳清废液为原料,选择不同的催化剂进行水解工艺,为提取其中的大豆异黄酮苷元奠定基础。

超临界 CO_2 萃取技术是一种环境友好的可持续发展的绿色化工技术,在天然产物有效成分的提取中应用广泛。近年来异黄酮苷元的提取,已成为大豆产品深加工行业中的研究热点。课题的第三部分就是采用超临界 CO_2 萃取技术提取异黄酮苷元等有价值的成分,确定超临界 CO_2 萃取工艺的参数。以 HPLC 为手段,对超临界 CO_2 萃取得到的粗品进行分离、纯化,得到高纯度异黄酮苷元产品,并对异黄酮苷元的单体进行结构表征,为研究其在医药、食品等行业中的应用奠定基础。

第二章 碱性水溶液为溶剂从豆粕中提取异黄酮糖苷的研究

2.1 概述

大豆异黄酮糖苷是大豆异黄酮在大豆中的主要的存在形式，分子极性较强，易溶于丙酮、甲醇、乙醇等极性溶剂。乙醇浸提法是提取异黄酮糖苷的常用方法，该方法利用异黄酮糖苷在一定浓度的乙醇中具有较高的溶解度而将其萃取出来。此方法存在溶剂消耗量大、生产成本低、提取的异黄酮纯度低等问题。

大豆异黄酮是酚类物质，具有弱酸性，在碱性水溶液中能离子化而易溶于水，可根据其化学特性，采用碱性水溶液提取大豆异黄酮。此方法与乙醇提取法相比具有有机溶剂的消耗量小、生产成本低等特点。本工作采用碱性水溶液提取法从低温脱脂豆粕中提取大豆异黄酮糖苷，通过单因素试验和正交试验对工艺进行优化。

超临界二氧化碳流体萃取(SFE-CO₂)技术是一种提取、分离的新方法，多用于油脂、香精等低极性物质的萃取。本工作初步研究了 SFE-CO₂ 技术在大豆异黄酮糖苷提取工艺中的应用。

2.2 试验原料与试剂

低温脱脂豆粕，购买于安阳升华蛋白有限公司；

齐墩果酸标准品，购买于中国药品生物制品检定所；

葡萄糖、氢氧化钠、盐酸、香草醛、冰醋酸、高氯酸、无水乙醇、95%乙醇、乙酸等均为分析纯；

大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素的标样，够买于 Sigma 公司；

色谱甲醇、CO₂ 瓶装气(食品级，纯度99.9%)。

2.3 主要试验仪器

202-0 台式干燥箱	中国北京光明医疗仪器厂
FS-100 小型电动粉碎机	上海微型电机厂
TDL-5 离心机	湖南星科科学仪器有限公司
RE-52A 旋转蒸发器	上海亚荣生化仪器厂
DEG-4 真空干燥箱	天津天宇机有限公司
pHS-25 型 pH 计	上海精科雷磁仪器厂
HC.TPII.10 普通药物天平	上海医疗器械八厂
玻璃仪器烘干箱	河南巩义市英峪予华仪器厂
JB50-D 增力电动提取机	上海标本模型厂
SHZ-D(III)循环水式真空泵	巩义市英峪予华仪器厂
电子天平	上海精密科学仪器有限公司
数显恒温水浴	常州国华电气有限公司
TP-1800PC 紫外可见分光光度计	北京普析通用仪器有限责任公司
722 型分光光度计	上海精密科技仪器有限公司
凯氏定氮仪	天津玻璃仪器厂
RJM-28-10 马福炉	沈阳市电炉厂
SFX-220 分析与半制备超临界系统	美国 ISCO 公司
1100 分析型高效液相	美国 Agilent 公司

2.4 试验方法

2.4.1 低温脱脂豆粕成分的测定

2.4.1.1 低温脱脂豆粕水分、灰分、粗脂肪、粗蛋白、NSI 值的测定

按 GB/T5009.3-2003 减压干燥法测定水分含量;

按 GB/T5009.4-2003 灼烧称重法测定灰分含量;

按 GB/T5009.5-2003 索氏抽提法测定粗脂肪含量;

按 GB/T5009.6-2003 凯氏定氮法测定粗蛋白含量;

按 GB5511-85 附录 A 测定 NSI 值。

2.4.1.2 大豆皂苷的测定

大豆皂苷的定量测定方法以齐墩果酸作为标准品、用香草醛—高氯酸显色体系，比色法测定大豆皂苷含量^[62]。

标准曲线的绘制：

准确称取齐墩果酸标准品 15.0123 mg，置于 50 mL 容量瓶中，以 95%乙醇溶解，并定容至刻度，摇匀。吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 标准品溶液，于 10 mL 具塞试管中 70 ℃水浴上蒸干，在试管中加入新配制的 5%香草醛—冰醋酸溶液 0.2 mL、高氯酸 0.8 mL，置 60 ℃水浴上加热 15 分钟、流水冷却，加冰醋酸 5 mL，摇匀。以分光光度计在 550 nm 波长处测定吸光度值。以吸光度为横坐标，齐墩果酸浓度为纵坐标作图。齐墩果酸溶液标准曲线如图 2-1 所示，标准曲线方程为 $C=130.52A+9.7323$ ， $R^2=0.9954$ ，式中 A 为吸光度， C 为齐墩果酸浓度($\mu\text{g/mL}$)。

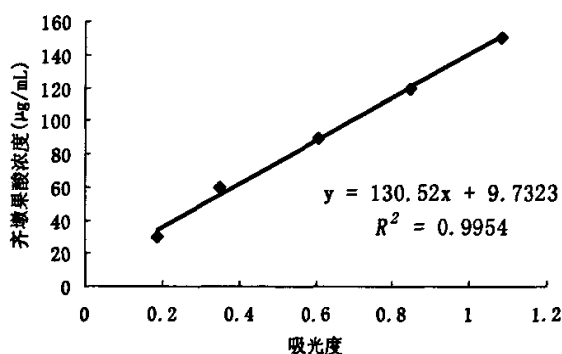


图 2-1 齐墩果酸标准曲线

称取豆粕粉 2.0 g，加入 60%的乙醇水溶液 40 mL，在 60 ℃下搅拌提取 2 h。然后在 15000 r/min 下离心 15 min，将上清液转入 100 mL 容量瓶中，用 60%乙醇水溶液定容至刻度，吸取 1 mL 于 10 mL 具塞试管中 70 ℃水浴上蒸干。在试管中加入新配制的 5%香草醛—冰醋酸溶液 0.2 mL、高氯酸 0.8 mL，置 60 ℃水浴上加热 15 分钟、流水冷却，加冰醋酸 5 mL、摇匀。在 550 nm 处测吸光度，根据标准曲线计算提取液中皂苷含量。

2.4.1.3 大豆还原糖、总糖的测定

大豆还原糖、总糖的测定以葡萄糖作为标准品采用 DNS 比色法进行测定^[63]。按表 2-1 制备 6 个试管样品。

表 2-1 标准葡萄糖曲线浓度

管号	葡萄糖液(mL)	水(mL)	最终浓度(mg/mL)
1	0	0.5	0
2	0.05	0.45	0.1
3	0.1	0.4	0.2
4	0.15	0.35	0.3
5	0.2	0.3	0.4
6	0.25	0.25	0.5

向 6 支试管样品中分别加入 DNS 试剂 0.5 mL, 充分混合。将装有样品的 9 支试管放入沸水浴中加热 5 min 后, 放入盛有冷水的烧杯中冷却, 向每个试管中分别加入 4 mL 蒸馏水, 充分混合。以空白管(1 号试管)做对照, 于 540 nm 波长下, 分别测定各管的吸光值。以吸光度为横坐标, 每支试管所含的葡萄糖浓度为纵坐标作图, 即可得到一条直线。葡萄糖溶液标准曲线如图 2-2 所示, 标准曲线方程为 $C=0.0765A$, $R^2=0.9975$, 式中 A 为吸光度, C 为葡萄糖浓度(mg/mL)。

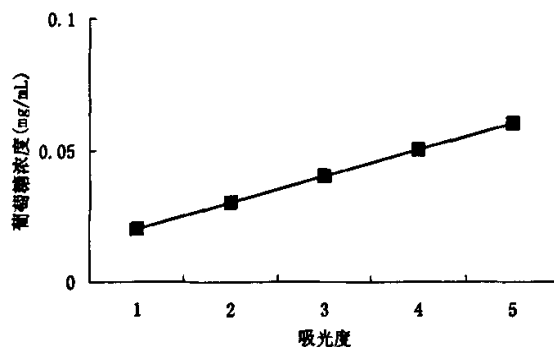


图 2-2 葡萄糖标准曲线

①低温脱脂豆粕中还原糖的测定

称取 2.0 g 低温脱脂豆粕粉, 放入 100 mL 的烧杯中, 加入 50~60 mL 蒸馏水, 搅拌均匀, 将烧杯放置在 50 °C 水浴中保温 30 min 后, 将烧杯内含物转入 100 mL 的容量瓶中, 加水至刻度线。充分混合后过滤, 滤液在 540 nm 处测吸光度, 根据葡萄糖标准曲线计算提取液中还原糖的含量。

②低温脱脂豆粕中总糖的测定

称取 1.0 g 低温脱脂豆粕粉, 放入 100 mL 的烧杯中。加入 15 mL 水和 10 mL 6 mol/L 的盐酸, 搅拌均匀, 将烧杯放入沸水浴中加热煮沸 30 min 后冷却, 用 6 mol/L 的 NaOH 中和至中性, 之后将溶液转入 100 mL 的容量瓶中, 加水到刻度线, 充分混合后过滤, 滤液在 540 nm 处测吸光度, 根据葡萄糖标准曲线计算提取液中总糖的含量。

2.4.1.4 大豆异黄酮的测定

采用紫外分光光度法测定大豆异黄酮^[43]。对自制的异黄酮标准品先用 HPLC 定量, 然后将其配成不同浓度的溶液, 在紫外光谱 200~400 nm 下进行扫描, 确定在 259 nm 处绘制标准曲线。该方法测定大豆异黄酮的含量具有快速、准确、简便的特点。

①标准品的制备

将异黄酮粗提物与柱层析硅胶按质量比 1:1 混匀, 再取该混匀物 2 g 用干法上样于内径为 20 mm, 填料高度为 150 mm 的硅胶柱中, 用 150 mL 丙酮进行洗脱, 收集 40~140 mL 的洗脱液, 蒸干后以 70% 的甲醇溶解, 定容至 500 mL 容量瓶中, 使用 HPLC 定量。

标样(染料木苷、大豆苷、染料木素、大豆苷元)的 HPLC 图谱如图 2-3 所示, 自制标准品 HPLC 图谱如图 2-4 所示。

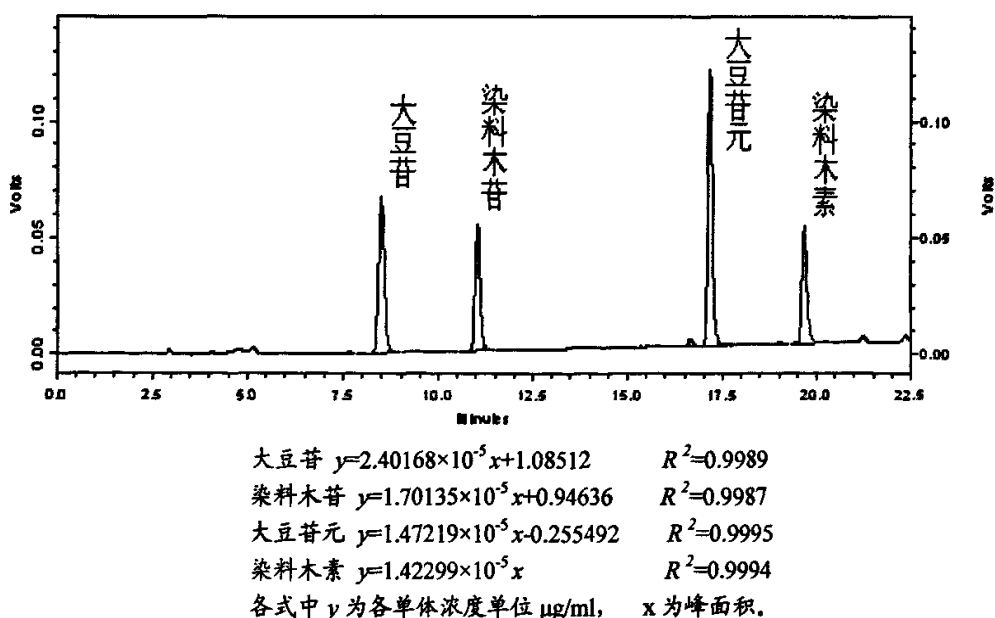


图 2-3 标样的 HPLC 图谱

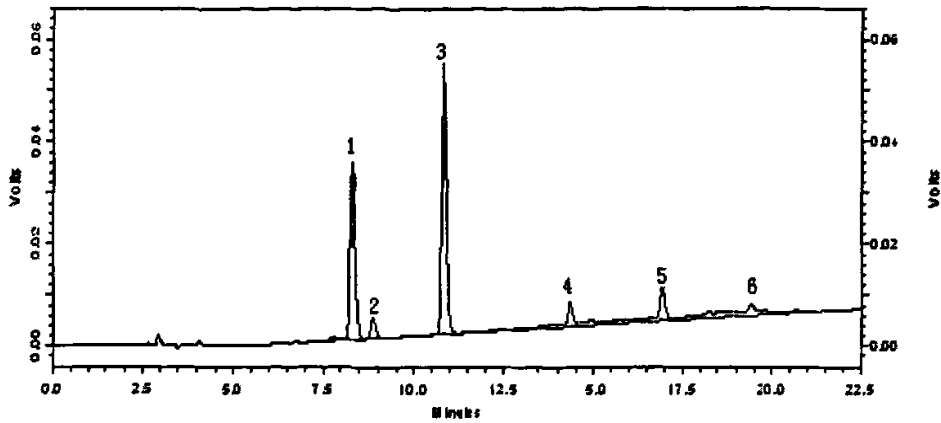


图 2-4 自制标准品的 HPLC 谱图

图 2-4 中的 1、3、5 和 6 分别与图 2-3 中的四个峰对应，保留时间一致。根据文献的研究^[64]，2 号峰和 4 号峰分别为黄豆黄苷和乙酰基大豆苷。通过液相标准曲线，计算得到自制标准溶液中总异黄酮的浓度为： $20.18\mu\text{g/mL}$ 。

将此样品与混合标样分别在 200~400 nm 进行紫外扫描，确定最大吸收波长。紫外扫描曲线如图 2-5 所示。从图中可以看出两种样品均在 259 nm 处有最大吸收，因此选择 259 nm 作为测定波长。

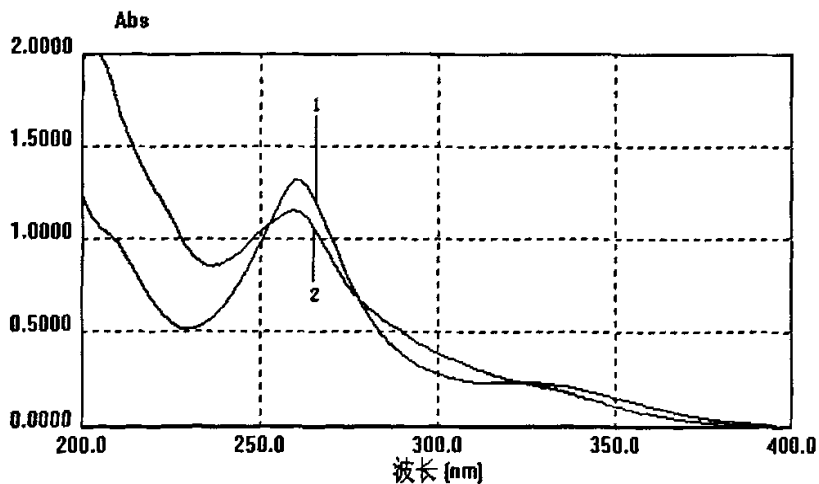


图 2-5 自制标准品与混合标样的紫外扫描曲线

注：曲线 1 为混合标样的紫外扫描图谱，曲线 2 为自制标准品的紫外扫描图谱

②标准曲线的绘制

分别吸取标准溶液 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 0.6 mL 各置于 10 mL 的容量瓶中, 用 70%甲醇溶液稀释至刻度、摇匀。用紫外分光光度计在 259 nm 处测其吸光度 (测三次取平均值), 结果见表 2-2。以吸光度为横坐标, 溶液浓度为纵坐标绘制标准曲线, 见图 2-6, 标准曲线方程: $y=11.895x+0.091$, $R^2=0.9999$, 式中 x 为吸光度, y 为自制标准品浓度($\mu\text{g/mL}$)。

表 2-2 标准曲线试验数据

标准溶液 (mL)	吸光度	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
0.2	0.334	4.037
0.3	0.501	6.055
0.4	0.668	8.074
0.5	0.840	10.092
0.6	1.013	12.111

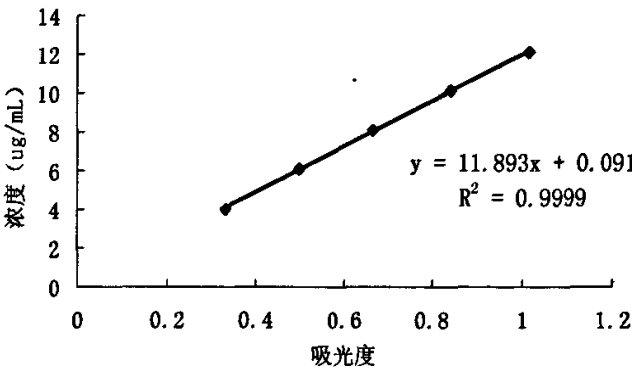


图 2-6 大豆异黄酮标准曲线

2.4.1.5 原料的成分分析结果

低温脱脂豆粕经粉碎后过 40 目筛进行成分测定, 分析结果见表 2-3。

表 2-3 原料的成分分析

水分	灰分	粗脂肪	蛋白质	异黄酮	皂苷	总糖	粗纤维
(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
9.37	5.46	1.44	44.86	0.32	1.28	15.57	22.00

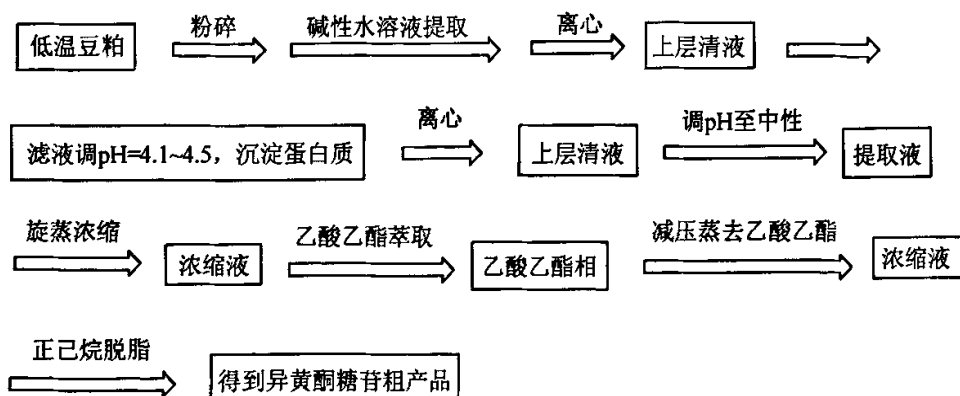
2.4.2 碱性水溶液提取大豆异黄酮糖苷

异黄酮的结构是以色原酮为母体的酚，是一类弱酸性化合物，在碱性水溶液中是以离子状态存在的，所以在碱性条件下其具有极好的水溶性，以此为出发点，试验采用碱性水溶液为溶剂的提取异黄酮糖苷。

称取一定量粉碎后的脱脂豆粕于三口烧瓶中，加碱性水溶液提取 2 h 后，用 6 mol/L 的盐酸调 pH 值为 4.1~4.5 沉淀蛋白质，离心，上层清液用 10% 的 NaOH 调至中性，浓缩，浓缩液用等体积的乙酸乙酯萃取两次，合并乙酸乙酯相，减压蒸去乙酸乙酯溶剂，得到黄色油状物，最后加适量正己烷溶解油脂，过滤后得到淡黄色异黄酮糖苷粗产品。将异黄酮粗产品用 95% 乙醇溶解，定容于 25 mL 容量瓶中，过滤后用紫外分光光度法测定异黄酮含量，并根据式 2-1 计算异黄酮的提取率。

$$\text{大豆异黄酮提取率(\%)} = \frac{\text{提取液中异黄酮总量}}{\text{脱脂豆粕中异黄酮总量}} \times 100\% \quad \text{式(2-1)}$$

工艺路线：



2.4.3 乙醇溶剂法提取大豆异黄酮糖苷

按参考文献操作：称取一定量的低温脱脂豆粕，用乙醇溶剂提取大豆异黄酮，提取条件为：温度 70 ℃，乙醇浓度 70%，提取料液比 1:10，提取时间 3.5 h，提取 2 次^[62]。将得到的异黄酮粗产品用 95% 乙醇溶解，定容于 25 mL 容量瓶中，过滤后用紫外分光光度法测定异黄酮含量，并根据式 2-1 计算异黄酮的提取率。

2.4.4 超临界 CO₂ 萃取法提取大豆异黄酮糖苷

按参考文献操作：精密称取一定量的低温脱脂豆粕，超临界 CO₂ 流体萃取大豆异黄酮，萃取条件为：以乙醇为夹带剂，温度 55 ℃、压力 30 MPa、时间 3 h^[65]。将得到的异黄酮粗产品用 95%乙醇溶解，定容于 25 mL 容量瓶中，过滤后用紫外分光光度法测定异黄酮含量，并根据式 2-1 计算异黄酮的提取率。

2.5 结果与讨论

2.5.1 碱性水溶液提取大豆异黄酮糖苷最佳工艺条件的确定

选取提取时间、料液比、pH 值和温度这 4 个因素进行单因素试验。根据单因素试验结果，采用 L₉ (3⁴) 正交表做四因素三水平正交试验，确定最佳提取工艺条件。

2.5.1.1 提取时间对提取异黄酮的影响

固定其它三个因素不变，即料液比 1:10，温度 25 ℃，pH 值 11，选择不同的提取时间提取异黄酮糖苷，异黄酮糖苷的提取率随时间的变化如图 2-7 所示。

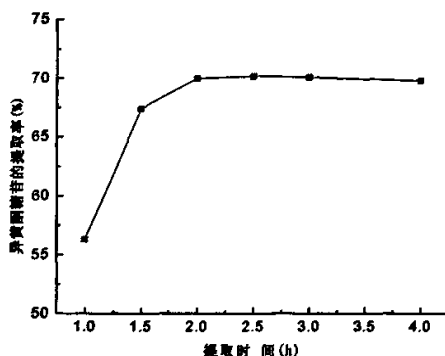


图 2-7 时间对提取异黄酮糖苷的影响

由图 2-7 可知，随着提取时间的延长原料中的异黄酮逐渐被提取出来，提取率逐渐增加，2 h 时异黄酮提取率最高，之后异黄酮提取率趋于平衡。所以提取时间 2 h 为宜。

2.5.1.2 料液比对提取异黄酮的影响

固定其它三个因素不变，即提取时间 2 h，温度 25 ℃，pH 值 11，选择不同的料液

比提取异黄酮糖苷，异黄酮糖苷的提取率随料液比的变化如图 2-8 所示。

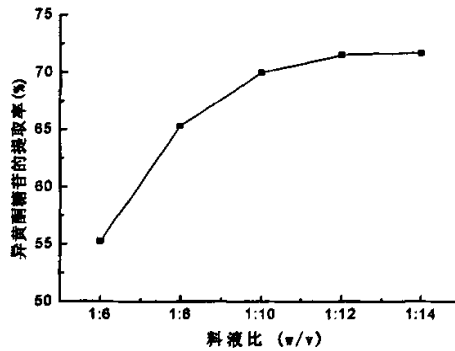


图 2-8 料液比对提取异黄酮糖苷的影响

由图 2-8 可以看出，随着料液比的增大异黄酮的提取率也随之增大，在料液比达到 1:10 后，提取率曲线上升的趋势变缓，选择料液比为 1:10。

2.5.1.3 pH 值对提取异黄酮糖苷的影响

固定其它三个因素不变，即提取时间 2 h，温度 25 °C，料液比 1:10，选择不同的 pH 值提取异黄酮糖苷，异黄酮糖苷的提取率随 pH 值的变化如图 2-9 所示。

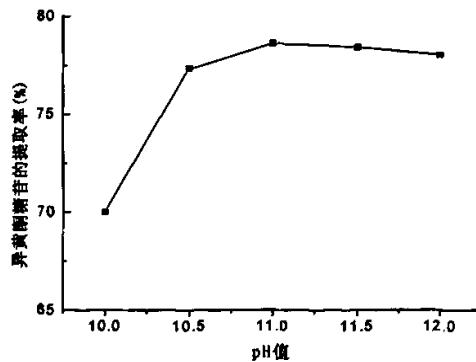


图 2-9 pH 值对提取异黄酮糖苷的影响

由图 2-9 可以看出，随着 pH 值的增大提取率明显上升，当 pH 值达到 11 后，提取率的趋于平衡。这是由于在 pH 值为 11 时，异黄酮可以最大程度上离子化，因此选取 pH 值 11。

2.5.1.4 温度对提取异黄酮的影响

固定其它三个因素不变，即提取时间 2 h，料液比 1:10，pH 值 11，选择不同的提取温度提取异黄酮糖苷，异黄酮糖苷的提取率随 pH 值的变化如图 2-10 所示。

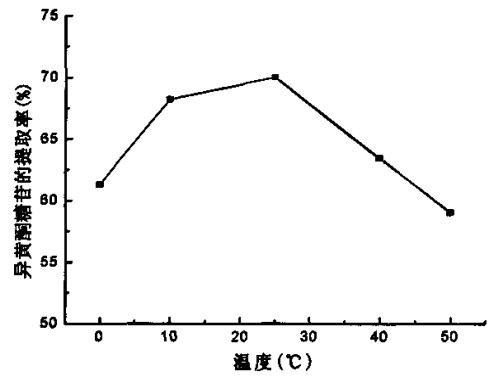


图 2-10 温度对提取异黄酮糖苷的影响

由图 2-10 可知，25 ℃时异黄酮的提取率最大，升高温度提取率明显下降。这是因为温度越高，对异黄酮结构的破坏程度越大，提取效果反而越差，因此选择提取温度为 25 ℃。

2.5.1.5 碱提法提取法最佳提取工艺条件的确定

在单因素试验的基础上，选取提取时间、料液比、pH 值、温度为影响因素，进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。试验因素水平见表 2-4，试验结果和极差分析见表 2-5 和表 2-6。

表 2-4 因素水平表

水平	A	B	C	D
	提取温度(°C)	时间(h)	料液比(w/v)	pH 值
1	0	1.5	1:8	10
2	25	2.0	1:10	11
3	50	2.5	1:12	12

表 2-5 试验结果:

试验号	A	B	C	D	提取率(%)
1	0	2	1:12	11	65.6
2	0	1.5	1:10	12	64.7
3	0	2.5	1:8	10	73.0
4	25	2	1:10	10	70.0
5	25	1.5	1:8	11	77.6
6	25	2.5	1:12	12	64.7
7	50	2	1:8	12	71.1
8	50	1.5	1:12	10	66.2
9	50	2.5	1:10	11	66.1

表 2-6 极差分析表

	A	B	C	D
k_1	67.777	68.887	65.497	69.760
k_2	70.780	69.510	66.933	66.860
k_3	67.783	67.943	73.910	69.720
R	3.003	1.567	8.413	2.900

由表 2-5 和表 2-6 可以看出 $R_C > R_A > R_D > R_B$, 说明料液比对异黄酮糖苷的提取影响显著, 其次是温度的影响, 碱性水溶液进行提取的最佳工艺条件确定为: $A_2B_2C_3D_1$, 即提取温度为 25℃, 提取时间为 1.5h, 料液比为 1:8, pH 值为 11。通过试验验证 (三次试验取平均值), 在该条件下, 异黄酮的提取率为 77.6%。

2.5.2 不同提取方法的比较

分别用碱性水溶液提取法、乙醇溶液提取法和超临界 CO_2 萃取法提取豆粕中异黄酮糖苷, 提取效果如图 2-11 所示。

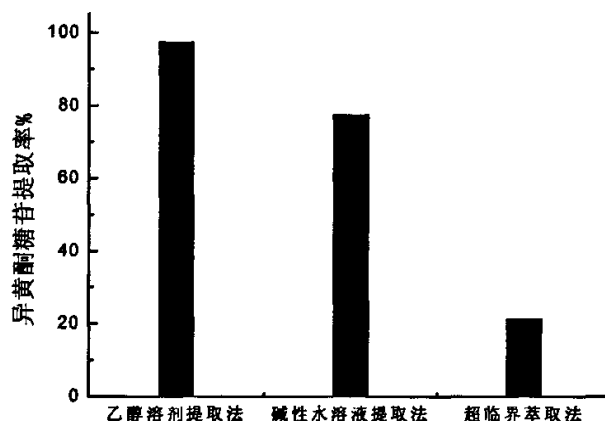


图 2-11 不同提取方法的异黄酮提取率

由图2-11可知, 70%乙醇对异黄酮溶解能力较好, 提取率达到了95%以上, 而且70%乙醇使蛋白及多糖的变性沉淀的作用强, 便于试验操作, 是目前国内外提取异黄酮工业上常用的方法。

碱性水溶液提取法对异黄酮的提取率稍低, 分析原因有以下两个方面: 一方面, 以弱碱性水溶液提取异黄酮时, 豆粕中大量水溶性蛋白一起溶出, 为除去蛋白必须进行等电点(pH 4.1~4.5)沉淀, 相当部分的异黄酮在等电点沉淀蛋白时被蛋白夹带掉; 另一方面, 等电点沉淀法仅能除去提取液中约90%的蛋白质, 不能去除多糖等杂质, 也会影响碱水溶液提取法对异黄酮的提取率。

超临界CO₂萃取法在提取异黄酮糖苷时选择性最差, 虽然加入一定夹带剂, 但提取效果并不理想, 这是因为异黄酮糖苷的分子结构中有糖配体, 其结构上有4个羟基, 这种结构使异黄酮糖苷具有极强的亲水性, 致使其在醇、水等溶剂中具有很好的溶解性, 而在CO₂等非极性溶剂中的溶解度较小。在超临界CO₂萃取过程中, 虽然我们可以通过添加极性夹带剂来增大超临界萃取剂的极性, 从而提高异黄酮糖苷的溶解性能, 但是, 夹带剂的添加比例越高, 流体的临界温度和临界压力也随之升高, 过于苛刻的萃取条件可能会导致异黄酮结构的破坏, 所以我们把夹带剂的比例控制在10%以内。总的来说, 如果是提取异黄酮糖苷, 因其结构的特殊性, 超临界CO₂萃取技术无法发挥其优势, 只有将异黄酮糖苷上的糖配体水解掉, 超临界CO₂萃取技术的优势才能显现出来。

2.6 小结

本工作以低温脱脂豆粕为原料，以碱性水溶液为溶剂提取大豆异黄酮糖苷，通过单因素和正交试验，得出最佳提取条件为：料液比 1:8，提取时间 1.5 h，提取温度 25 ℃，pH 值 11。此条件下，异黄酮糖苷的提取率为 77.6%。

对碱性水溶液提取法、乙醇溶剂提取法和超临界 CO₂ 萃取法进行比较，由结果可知：乙醇溶剂提取法对异黄酮糖苷的提取效果最好，提取率达到 95%以上；以碱性水溶液为溶剂的提取法，异黄酮糖苷的提取率稍低，提取率为 77.6%；超临界 CO₂ 萃取法对异黄酮糖苷这种有一定极性物质的提取效果并不理想，提取率仅为 21.2%。

第三章 分离蛋白乳清废液中异黄酮糖苷的水解研究

3.1 概述

植物蛋白的生产方法有两种：分别是醇法制备浓缩蛋白的工艺和碱提酸沉法制备分离蛋白的工艺。在分离蛋白的生产过程中，会产生大量的分离蛋白乳清液，目前，这些乳清液仅是经过简单处理后直接排放到环境中去，这样不但增加了环境污染，同时也损失了相当部分异黄酮^[66]，本工作以大豆分离蛋白乳清废液为原料，提取其中的异黄酮，不仅可以增加大豆产品的附加值，而且对污水的治理有一定的作用，可以产生较好的经济效益和社会效益。

据研究表明^[67]，大豆异黄酮苷元可在人体小肠直接吸收，而大豆异黄酮糖苷则需通过结肠中的细菌、微生物的水解作用，生成苷元后才被结肠壁吸收。个体将异黄酮糖苷转化为苷元的能力高低不同，有些人群需要直接摄入异黄酮苷元含量高的食品或药物。而自然界中异黄酮极少以游离型苷元存在，常规的大豆加工工艺（豆腐、豆奶）和溶剂法提取大豆异黄酮工艺，并不能得到富含大豆异黄酮苷元的产品。因此，大豆异黄酮糖苷的水解研究具有十分重要的意义。

本工作以大豆分离蛋白乳清废液为原料，以 α -淀粉酶、732 型阳离子交换树脂、盐酸和硫酸为催化剂进行水解，对水解工艺进行优化。其中，硫酸作为催化剂时，分别采用超声技术和微波技术为水解条件进行比较。

3.2 试验原料与试剂

分离蛋白乳清废液，由某分离蛋白厂提供；

95%乙醇、盐酸、硫酸、氢氧化钠等均为分析纯； α -淀粉酶为生化级；

732 型阳离子交换树脂，购买于天津市科密欧化学试剂开发中心；

大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素的标样，够买于 Sigma 公司。

3.3 主要试验仪器

RE-52A 旋转蒸发器	上海亚荣生化仪器厂
722 型分光光度计	上海精密科技仪器有限公司
数显恒温水浴	常州国华电气有限公司
JB50-D 增力电动提取机	上海标本模型厂
Agilent1100 分析型高效液相	美国 Agilent 公司
SHZ-D(III)循环水式真空泵	巩义市英峪予华仪器厂
pHS-25 型 pH 计	上海精科雷磁仪器厂
MA110 电子天平	上海精密科学仪器有限公司
JY292 型超声波发生器	宁波新芝生物技术研究
XH-100A 型微波萃取仪	北京祥鸽科技发展有限公司

3.4 试验方法

3.4.1 分离蛋白乳清废液成分的测定

大豆分离蛋白乳清废液中主要成分蛋白质、还原糖、总糖、大豆异黄酮和皂苷的测定方法同第二章 2.4.1 节，结果见表 3-1。

表 3-1 废水成分分析

固形物(%)	蛋白含量 (mg/mL)	还原糖含量 (mg/mL)	总糖含量 (mg/mL)	异黄酮含量 (mg/mL)	皂苷含量 (mg/mL)
3.23%	7.05	2.06	6.53	0.55	0.52

3.4.2 高效液相(HPLC)法检测大豆异黄酮糖苷水解程度

水解过程中大豆异黄酮主要组分是染料木苷、大豆苷及其对应的染料木素、大豆苷元，根据它们的化学性质不同，通过色谱柱分离后经紫外检测器检测，其保留时间不同，与标准品进行比较后，能比较准确地定性、定量分析。根据峰面积计算异黄酮糖苷生成苷元的相对转化率。

$$\text{异黄酮苷元相对转化率(\%)} = \frac{\text{总苷元的峰面积}}{\text{总糖苷和苷元的峰面积}} \times 100\% \quad \text{式(3-1)}$$

HPLC 色谱柱: Venusil MP-C₁₈ 4.6×250 mm; 流动相是甲醇溶液(A 溶液)和水(B 溶液), 膜过滤后超声脱气; 检验波长为 254 nm; 柱温为 25 ℃。

3.4.3 酸水解异黄酮糖苷

量取分离蛋白乳清液 50 mL 于 100 mL 三口圆底烧瓶中, 加入硫酸催化剂, 选取水解温度、水解时间和硫酸浓度 3 个因素进行单因素试验和正交试验, 确定硫酸水解的最佳工艺条件。选用硫酸和盐酸在最佳水解条件下进行对比试验。

3.4.4 α-淀粉酶水解异黄酮糖苷

量取分离蛋白乳清液 50 mL 于 100 mL 三口圆底烧瓶中, 加入α-淀粉酶水解。α-淀粉酶的活力单位为不小于 4000, 活性条件是: 温度为 50 ℃~70 ℃; pH 值为 5.5~7。因此, 选取 α-淀粉酶的水解温度为 60 ℃, pH 值为 6.0, 在此条件下, 改变α-淀粉酶的添加量和水解时间进行水解, 确定最佳水解条件。

3.4.5 732 型阳离子交换树脂水解异黄酮糖苷

732型强酸性离子交换树脂作为催化剂^[68,69], 水解异黄酮糖苷可以解决液体酸催化剂对设备的腐蚀和回收催化剂的问题, 而且对环境没有污染。

市售的离子交换树脂是Na型, 且含有一定量的杂质, 因此在使用前需进行预处理^[70], 过程如下: 称取一定量的催化剂, 在离子交换柱内装入强酸性树脂, 用蒸馏水从上到下淋洗至流出液为无色。水洗后从上部注入 $m(\text{HCl}) = 5\%$ 的盐酸水溶液, 以1 mL/min 的速度进行淋洗, 交换转型, 直至下部流出液 $m(\text{HCl}) = 5\%$ 为止。浸泡树脂一段时间后, 放出酸液, 用蒸馏水淋洗树脂至洗脱液pH> 6, 停止淋洗, 过滤, 在105 ℃烘箱中烘干后, 存于干燥皿中备用。为防止催化剂的酸性中心被溶液中的氢氧根离子所毒害, 反应前用稀盐酸将分离蛋白乳清液滴至中性。

量取分离蛋白乳清液50 mL于100 mL三口圆底烧瓶中, 加入预处理后的732型强酸性离子交换树脂, 在温度为80 ℃的条件下, 改变水解时间确定732型强酸性离子交换树脂最佳水解条件。

3.4.6 超声、微波水解异黄酮糖苷

量取分离蛋白乳清液 50 mL，加入硫酸水解试剂，在硫酸浓度为 2 mol/L，水解时间为 45 min 的条件下，进行超声水解和微波水解。超声水解的功率为 400 W，微波水解的功率为 450 W^[71,72]。

3.5 结果与讨论

3.5.1 硫酸、盐酸、 α -淀粉酶和 732 型阳离子交换树脂水解效果的比较

在不同催化剂条件下进行水解，试验结果见图 3-1。

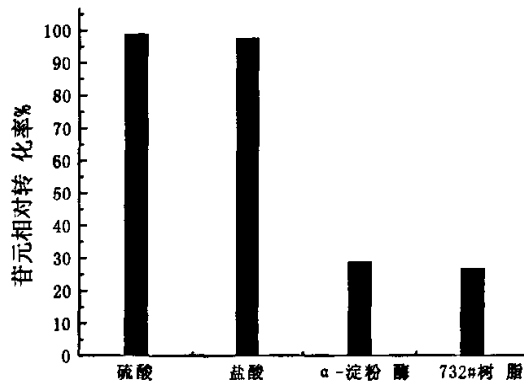


图 3-1 不同催化剂水解效果

由图 3-1 可以看出，酸水解效果明显比 α -淀粉酶和 732 型阳离子交换树脂好；在条件相同的条件下，硫酸与盐酸的水解能力相差不大。

α -淀粉酶水解效果较差，异黄酮苷元的相对转化率仅为 26.6%，说明异黄酮糖苷的结构中糖配体与色原酮的结合键并主要是 β -葡萄糖苷键，采用 β -淀粉酶水解，结果应该更理想。

732 型阳离子交换树脂水解效果也不好，因为分离蛋白乳清废液是一种乳浊液，其中不溶的固体小颗粒可能填充了树脂表面的空隙，致使树脂的比表面积相对下降，使其功能基团无法充分发挥催化作用。解决这一问题的方法应该是：测定分离蛋白乳清废液的固体小颗粒的粒径分布数据，根据其粒径分布，选择大孔型强酸性树脂，使固体颗粒的“填充现象”不至于严重降低树脂的比表面积，从而影响其催化效果。

3.5.2 硫酸水解最佳工艺条件的确定

3.5.2.1 单因素试验

选取水解温度、硫酸的浓度和水解时间这 3 个因素进行单因素试验。

①水解温度的选择：在硫酸浓度为 2 mol/L，水解时间为 2 h 的条件下，选取不同的水解温度进行水解，异黄酮苷元相对转化率随温度的变化见图 3-2。

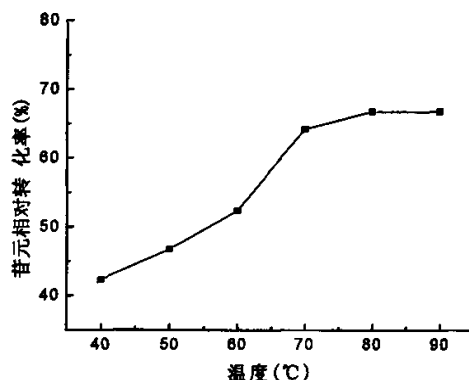


图 3-2 水解温度的影响

由图 3-2 可知，异黄酮苷元相对转化率随水解温度的升高而增加；温度低于 60 °C 时，苷元相对转化率不到 55%，斜率增长缓慢；在 60 °C~70 °C 之间，苷元相对转化率明显增加；当温度高于 80 °C 时，苷元相对转化率的增长趋于平衡。温度越高，异黄酮苷元结构受破坏的程度越大，因此，选择温度为 70 °C 较为合适。

②硫酸浓度的选择：在水解温度为 70 °C，水解时间为 2 h 的条件下，选取不同浓度的硫酸进行水解。有研究报道^[73]，水解时酸的浓度过高可能会导致异黄酮的破坏。因此，选择硫酸的浓度在 3 mol/L 以内，研究其水解情况。异黄酮苷元相对转化率随硫酸浓度的变化见图 3-3。

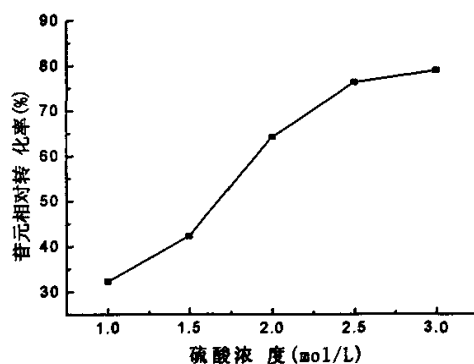


图 3-3 硫酸浓度的影响

从图 3-3 中可以看出,异黄酮糖苷的水解程度与硫酸浓度成正比,硫酸浓度 2.5 mol/L 时,苷元相对转化率达到 76.3%,其后趋于平衡。因此选择硫酸浓度为 2.5 mol/L。

③水解时间的选择:在水解温度为 70 °C,硫酸浓度为 2.5 mol/L 的条件下,选取不同的水解时间进行水解,异黄酮苷元相对转化率随时间的变化见图 3-4。

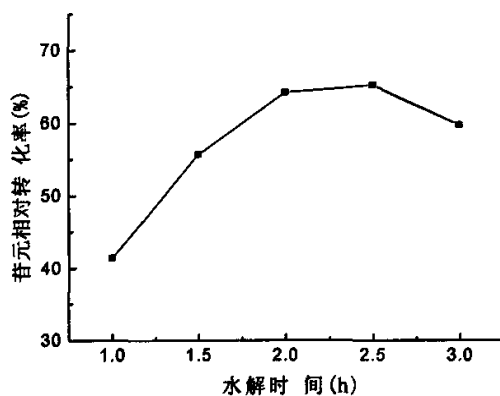


图 3-4 水解时间的影响

由图 3-4 可知,异黄酮苷元的相对转化率随时间的延长有所增加,2 h 时异黄酮糖苷的水解基本平衡,到 3 h 时苷元的相对转化率略有下降,可能是由异黄酮在强酸性溶液中结构被破坏引起的。

3.5.2.2 正交试验

根据单因素试验结果,选取水解温度(℃)、水解时间(h)、浓硫酸浓度(mol/L)为影响因素,设计 $L_9(3^3)$ 正交试验,试验因素水平表见表 3-2,试验结果及极差分析见表 3-3 和表 3-4。

表 3-2 因素水平表

水平	A	B	C
	提取温度(℃)	时间(h)	硫酸浓度(mol/L)
1	60	1.5	1.5
2	70	2	2
3	80	2.5	2.5

表 3-3 正交试验结果

试验号	A	B	C	转化率(%)
1	60	1.5	1.5	36.5
2	60	2	2	79.9
3	60	2.5	2.5	78.8
4	70	1.5	2	64.3
5	70	2	2.5	98.8
6	70	2.5	1.5	47.9
7	80	1.5	2.5	98.4
8	80	2	1.5	62.5
9	80	2.5	2	97.6

表 3-4 极差分析表

	A	B	C
k_1	64.100	66.432	49.007
k_2	70.367	79.437	79.613
k_3	86.180	74.787	92.027
R	22.080	13.014	43.020

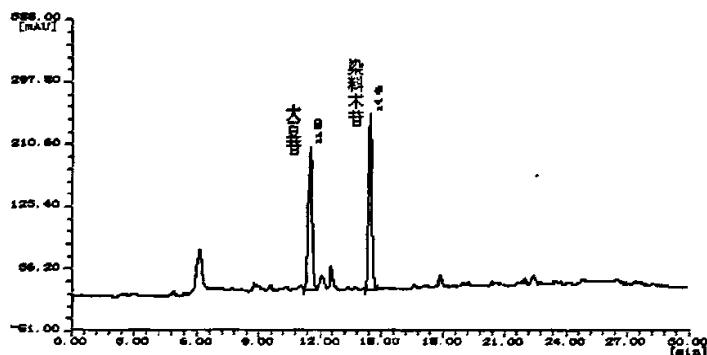
由表 3-3 和表 3-4 可知, $R_C > R_A > R_B$, 说明硫酸浓度对水解影响显著, 其次是温度的影响, 最优条件是 $A_3B_2C_3$, 即硫酸浓度为 2.5 mol/L, 水解时间为 2 h, 水解温度为 80 ℃,

按照最佳条件对结果进行验证(三次试验取平均值):异黄酮苷元的相对转化率为 98.7%。

在此条件下用盐酸进行水解,异黄酮苷元的相对转化率为 97.5%,可见硫酸和盐酸的水解能力相差不大。

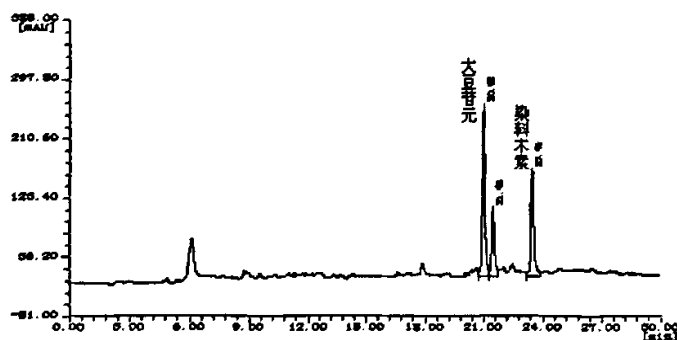
3.5.2.3 水解前后样品的 HPLC 图谱

分离蛋白乳清废液水解前的 HPLC 图谱如图 3-5 所示,样品经过硫酸水解后,通过 HPLC 检测,其 HPLC 图谱如图 3-6 所示。



HPLC 色谱条件:色谱柱 Venusil MP-C₁₈ 4.6×250 mm; 流动相是甲醇溶液(A 溶液)和水(B 溶液),膜过滤后超声脱气;在 30 min 内梯度洗脱, A 溶液浓度从 30%线性增至 70%,之后继续以 70%浓度洗脱 10 min; 检验波长为 254 nm; 流速为 1 mL/min; 柱温为 25 ℃。

图 3-5 水解前样品的 HPLC 图谱



HPLC 色谱条件:色谱柱 Venusil MP-C₁₈ 4.6×250 mm; 流动相是甲醇溶液(A 溶液)和水(B 溶液),膜过滤后超声脱气;在 30 min 内梯度洗脱, A 溶液浓度从 30%线性增至 70%,之后继续以 70%浓度洗脱 10 min; 检验波长为 254 nm; 流速为 1 mL/min; 柱温为 25 ℃。

图 3-6 水解后样品 HPLC 图谱

从图 3-5 中可以看出, 水解前样品中异黄酮主要成分是大豆苷和染料木苷, 异黄酮苷元含量极低, HPLC 几乎检测不到。从图 3-6 中可以看出, 样品经过硫酸水解后, 异黄酮糖苷转化为其相应的苷元, 大豆苷元和染料木素, 说明水解彻底。

3.5.3 α -淀粉酶水解最佳工艺条件的确定

3.5.3.1 α -淀粉酶添加量的影响

在水解温度为 60 $^{\circ}\text{C}$, pH 值为 6.0 的条件下, 异黄酮苷元的相对转化率随 α -淀粉酶添加量的变化如图 3-7 所示。

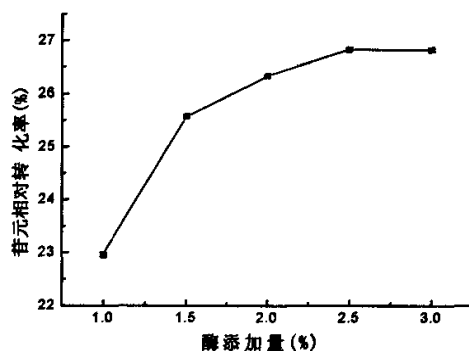


图 3-7 α -淀粉酶添加量的影响

从图 3-7 中可以看出, 异黄酮苷元相对转化率随 α -淀粉酶添加量的增加而增大, 但是增加幅度不大, 仅从 22.8%增大到 26.6%, 这是由 α -淀粉酶专一性决定, 其异黄酮糖苷的水解能力有限。所以, α -淀粉酶添加量为 2.0%。

3.5.3.2 α -淀粉酶水解时间的影响

在水解温度为 60 $^{\circ}\text{C}$, pH 值为 6.0 的条件下, 异黄酮苷元的相对转化率随水解时间的变化如图 3-8 所示。

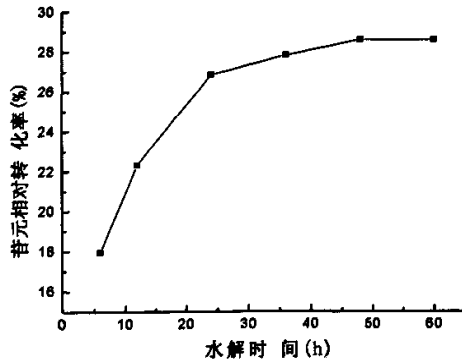


图 3-8 酶水解时间的影响

由图 3-8 可知, 异黄酮苷元相对转化率随时间的延长而逐步增加, 30 h 后趋于平衡。从能源消耗来考虑, 选择酶水解条件为 30 h。

3.5.4 732 型阳离子交换树脂最佳工艺条件的确定

3.5.4.1 732 型阳离子交换树脂添加量的影响

在水解温度为 80 ℃, 水解时间为 12 h 的条件下进行水解, 异黄酮苷元的相对转化率随树脂添加量的变化如图 3-9 所示。

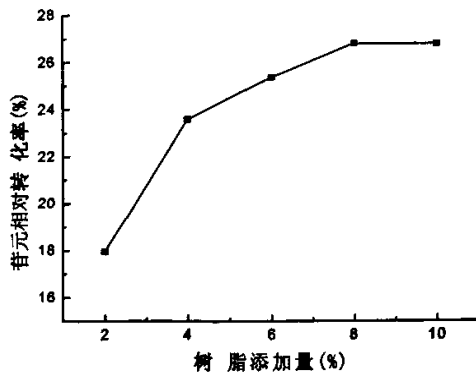


图 3-9 树脂添加量的影响

由图 3-9 可知, 苷元的相对转化率随树脂添加量的增加而增大。但是增加幅度不大, 仅从 18% 增大到 27%。因此, 选取树脂用量为 8%。

3.5.4.2 732 型阳离子交换树脂水解时间的影响

水解温度为 80 ℃，异黄酮苷元的相对转化率随水解时间的变化如图 3-10 所示。

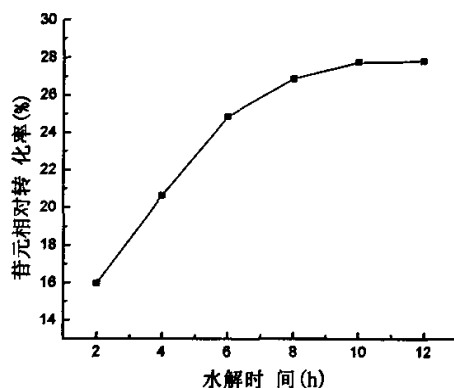


图 3-10 树脂水解时间的影响

由图 3-10 可知，苷元的相对转化率随树脂水解时间的延长而逐步增加，8 h 后趋于平衡。但是总的转化率并未达到 28%。因此，选取树脂水解时间为 8 h。

3.5.5 硫酸常压水解、超声水解和微波水解的比较

在以硫酸作为催化剂的条件下，分别采用常压水解、超声水解和微波水解三种方式，试验结果见图 3-11。

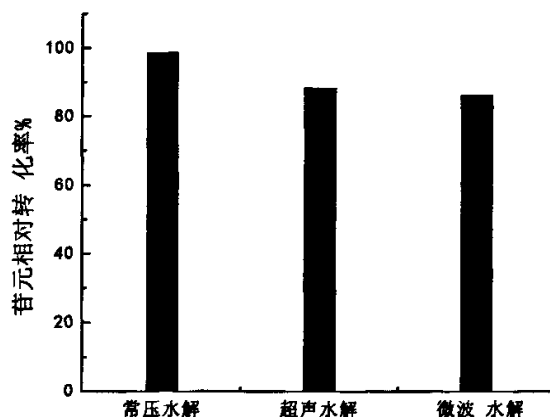


图 3-11 不同方式的硫酸水解效果

由图 3-11 可知, 硫酸在常压条件、超声条件和微波条件下水解异黄酮糖苷的能力都很强, 苷元的相对转化率均可达到 80%以上; 将超声法和微波法应用于异黄酮糖苷的水解反应, 水解反应时间由原来加热回流的 2 h 缩短到 45 min, 具有省时、节能等特点, 而且得到的产品颜色较浅。

3.6 小结

本工作以大豆分离蛋白乳清废液为原料, 进行水解试验的研究。比较 α -淀粉酶、732 型阳离子交换树脂、盐酸和硫酸的水解效果: 在条件相同的条件下, 硫酸与盐酸的水解能力相差不大, 异黄酮苷元的相对转化率均达到 95%以上; α -淀粉酶、732 型阳离子交换树脂的水解效果较差, 异黄酮苷元相对转化率不到 30%。

通过单因素试验和正交试验得出硫酸水解的最佳工艺条件为: 硫酸浓度为 2.5 mol/L, 水解时间为 2 h, 水解温度为 80 °C, 按照最佳条件对结果进行验证, 苷元的相对转化率为 98.7%。

硫酸在超声条件下和微波条件下水解异黄酮糖苷的能力都很强, 苷元的相对转化率均可达到 80%以上; 并且水解反应时间由常压下加热回流的 2 h 缩短为 45 min。

由于时间和试验条件的限制, 对异黄酮糖苷的酶水解和强酸性离子交换树脂的水解, 无法做进一步的研究验证。目前可得出的结论为以无机酸为催化剂, 异黄酮糖苷的水解情况最为理想, 但不排除选择其它的酶或树脂会得到更理想的结果。

第四章 超临界 CO₂ 萃取技术提取异黄酮苷元

4.1 概述

超临界 CO₂ 流体萃取是利用超临界状态下流体具有特殊的溶解能力来进行分离提取的一种新技术,提取效果受多种因素的影响,其中夹带剂、萃取压力、萃取温度和萃取时间的影响显著。

异黄酮苷元是异黄酮糖苷经过水解,脱除葡萄糖基后的产物,分子极性较弱,易溶解于乙醚等非极性溶剂中。超临界 CO₂ 流体适合提取弱极性的物质,采用超临界 CO₂ 萃取技术提取异黄酮苷元,可以达到较好的萃取效果。

大豆异黄酮糖苷水解后,虽然极性大大降低,但其仍然有一定极性,为了增加异黄酮苷元在超临界 CO₂ 流体中的溶解度,在超临界 CO₂ 流体萃取过程中加入适量夹带剂进行提取。

4.2 试验原料与试剂

分离蛋白乳清废液,由某分离蛋白厂提供;

色谱甲醇;CO₂ 瓶装气(食品级,纯度 99.9%);

95%乙醇、硫酸、氢氧化钠等均为分析纯。

4.3 试验仪器

B-290 喷雾干燥器

瑞士 BUCHI 公司

722 型分光光度计

上海精密科技仪器有限公司

SFX220 型超临界 CO₂ 萃取装置

美国 ISCO 公司

MA110 电子天平

上海精密科学仪器有限公司

4.4 试验方法

4.4.1 异黄酮苷元的检测方法

采用紫外分光光度法测定异黄酮苷元的提取率，具体方法见第二章 2.4.2 节。异黄酮的标准曲线方程： $y=11.895x+0.091$ ， $R^2=0.9999$ ，式中 x 为吸光度， y 为自制标准品浓度($\mu\text{g/mL}$)。

4.4.2 超临界 CO_2 萃取技术提取异黄酮苷元

将分离蛋白乳清废液加入的硫酸水解试剂进行水解，冷却后，加碱中和至中性，喷雾干燥，得到粉状样品。

称取喷雾干燥后干粉 1 g，放入萃取釜中，密封后开启超临界萃取装置，加入乙醇夹带剂，当萃取釜的压力和温度达到设定值后，开始萃取。含有异黄酮苷元的乙醇溶液降压后由试管收集，得到的萃取液过滤后作为待测液备用。

根据超临界 CO_2 流体的特点，选取夹带剂、萃取压力、萃取温度和萃取时间这四个影响因素进行试验，从而确定超临界 CO_2 萃取异黄酮苷元的最佳条件。

4.5 结果与讨论

4.5.1 夹带剂对异黄酮苷元提取率的影响

4.5.1.1 夹带剂的作用机理

CO_2 是非极性化合物，对极性弱、相对分子质量较小的化合物表现出优良的溶解性，但对极性物质和高分子物质的溶解度很低，而许多有活性的天然产物是多羟基酚类结构，有一定的极性。为了扩大SFE- CO_2 技术的应用范围，目前常用的方法是使用夹带剂。其作用是大大增加被分离组分在流体相中的溶解度；可使溶质的选择性(分离因子)大大提高；增加溶质的溶解度对温度、压力的敏感程度^[74-76]。

夹带剂可从三个方面影响溶质在超临界流体中的溶解度和选择性，流体的密度；溶质与夹带剂分子间的相互作用；夹带剂分子与基质的相互作用^[77]。一般来说，少量夹带剂的加入对流体的密度影响不大，而影响溶解度与选择性的决定因素是夹带剂与溶质分子间的范德华作用力或夹带剂与溶质有特定的分子间作用，如形成氢键或其它的分子间

弱相互作用等^[78]。另外，在流体的临界点附近，溶质溶解度对温度、压力的变化最为敏感。加入夹带剂后，混合流体临界点相应改变，如能接近萃取温度，则可增加溶解度对温度、压力的敏感程度。

夹带剂的选择主要从以下几方面考虑^[75]：夹带剂与被提取物之间不能发生化学反应；夹带剂要有较高的纯度和稳定性；夹带剂与溶质之间可能产生氢键或其它特殊分子间力；夹带剂易与产物分离；还应考虑夹带剂与超临界流体、基质之间的相互作用及其对超临界流体性质，如临界温度、临界压力等的影响；在食品、医药工业应用中，还应考虑夹带剂毒性的问题。异黄酮是一种生物活性物质，综合考虑选用乙醇-水作夹带剂，能满足上述要求。

4.5.1.2 夹带剂(95%乙醇)添加比例的选择

CO₂ 流体中夹带剂(95%乙醇)的加入，增强了流体的极性，也改善了流体的选择性和溶解性，有利于提取。而流体中乙醇的比例过大，可能会提取出其它的极性杂质，影响了产品质量；另外，还可能改变提取的性质，即整个提取过程以液态乙醇-水为主，原有的萃取压力和萃取温度不能保证提取过程仍在超临界状态下进行，而过于苛刻的萃取条件可能会破坏异黄酮苷元的分子结构，不利于提取^[79-81]。夹带剂(95%乙醇)添加量对异黄酮苷元提取率的影响见图 4-1。

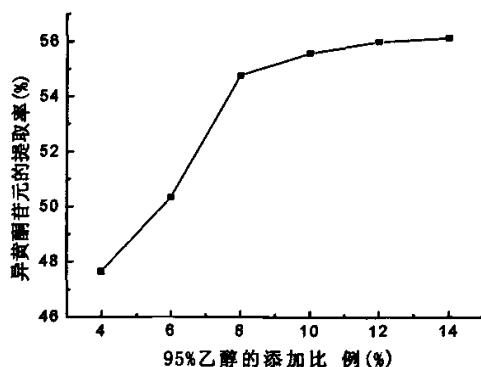


图 4-1 95%乙醇添加量的影响

从图4-1可以看出，随着CO₂流体中夹带剂添加比例的增加，异黄酮苷元的提取率明显增加，达到8%的比例时，曲线上升变得缓慢而趋于平衡。为了确保提取过程是在超临界状态下进行，夹带剂的添加比例在保证提取率的情况下，应尽可能的低，因此，8%的比例较为合适。

4.5.1.3 夹带剂(乙醇)浓度的选择

夹带剂(乙醇)浓度对异黄酮苷元提取率的影响见图 4-2。

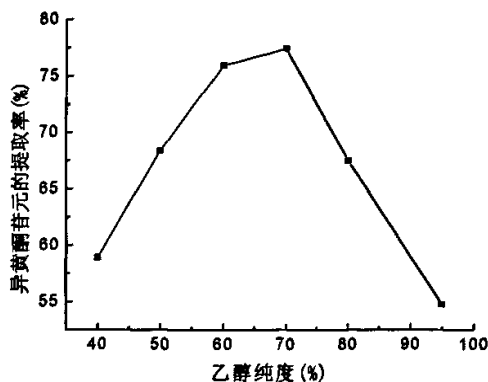


图 4-2 乙醇浓度的影响

由图4-2可以看出,随着加入CO₂流体的夹带剂中乙醇浓度的增加,异黄酮提取率也随之增加,并且在70%浓度时出现一个峰值。这是由于夹带剂中,乙醇和水不同作用机制的综合结果。

乙醇与超临界CO₂能形成混溶体,增强了流体的极性,水的适量存在也有利于改善流体的选择性和溶解性,使得基质内部发生膨胀而疏松,起到了促进传质的效果^[79-81]。然而,乙醇浓度过高,可能会造成流体析相,超临界流体出现分层现象^[82],使得提取效率降低;过量水的存在,会使得超临界条件变得更加苛刻,使临界温度和临界压力升高,这样异黄酮苷元分子结构受破坏的可能性增加,且水不易与超临界二氧化碳混溶,难以有效改善流体的选择性和溶解性^[83],同时,过量的水还可使高压下的物料迅速结块,影响萃取效率,还可能使得CO₂气体在冷却时发生结冰现象而导致管路“冻堵”,致使提取不能继续进行,降低了设备的使用寿命^[84]。因此,综合上述原因乙醇浓度为70%比较合适。

4.5.2 萃取压力对异黄酮苷元提取率的影响

萃取压力是超临界萃取过程中最活跃、最重要的一个操作参数。超临界流体的压力是影响被萃取物在流体中溶解度的主要因素,它直接影响到萃取效率。

理论上,溶质在超临界流体相与固体基质相存在一个分配(溶解)平衡,萃取压力对超临界提取过程的影响主要从两个方面考虑:萃取压力对提取过程热力学的影响,主要

是通过压力的改变而调节流体密度,从而改变流体对溶质的溶解能力;萃取压力对提取过程动力学的影响,主要是通过压力的改变而调节溶质从固体基质上的解离以及与流体间的扩散传质速率^[86]。萃取压力对异黄酮苷元提取率的影响见图4-3。

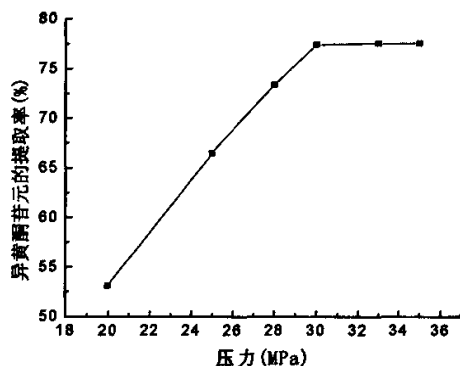


图 4-3 萃取压力的影响

由图4-3可知,在一定温度及组成下的超临界流体(溶剂)的密度随着压力的增大而增大,流体的溶解性能增加,有利于萃取效率的提高。萃取压力从20 MPa升至30 MPa时异黄酮提取率增加明显,即从53.1%增至77.4%;随着萃取压力进一步的增加,异黄酮提取率上升变的缓慢而趋于平衡。

这是由于,当压力较低时,流体密度对压力的变化较为敏感,压力稍有增加,流体密度就有显著增大,而流体密度的增加能引起异黄酮苷元溶解度的增大,所以,在低压时,萃取得率随压力的升高增长很快,曲线相对较陡;而当压力升高到一定程度后,流体密度对压力已不甚敏感,增长幅度减小,曲线变得相对平缓^[85]。

一般溶质在溶剂中的扩散系数正比于溶剂的密度,反比于溶剂的粘度。随着压力增加,流体密度增加,溶解能力增加,而达到一定的压力以后,溶剂密度达到一定值,压力对密度的影响变得不再明显,萃取率的增加也变得平缓。

压力的增加会使得流体分子间平均自由程和传质阻力减小,溶质与溶剂间的亲和性增强,增强了流体的扩散与渗透能力,从而提高了异黄酮苷元与流体之间的传质效率,有利于异黄酮苷元的提取^[86]。而超临界流体也随压力的增大而变的稠密,其扩散系数与压力成反比,尤其是在较高压力下时,流体的可压缩性已较小,增加压力对溶质的溶解度影响已很小,但使得流体的扩散系数减小而不利于提取^[86]。随着压力的增大,流体流量也随之升高,减少了流体与样品的接触时间,不利于提取^[87]。

另外,如果操作压力相对高时,对设备的耐压力 and 密封性的要求更高,增加了萃取成本。而且提取物的颜色加深,对产品的品质有一定影响。因此,当萃取压力满足一定提取率后,便不在以增加压力的方法提高萃取率,考虑到生产的实用性,萃取压力应选择30 MPa。

4.5.3 萃取温度对异黄酮苷元提取率的影响

萃取温度是超临界萃取过程中另一个非常重要而活跃的参数,它对萃取效果的影响非常显著。萃取温度的影响从下述两方面来考虑^[88]:一是萃取温度对提取过程热力学的影响,主要是通过温度的改变而调节流体密度,从而改变流体对溶质的溶解能力;二是萃取温度对提取过程动力学的影响,主要是通过温度的改变而调节溶质从固体基质上的解离以及与流体间的扩散传质速率。萃取温度对异黄酮苷元提取率的影响见图4-4。

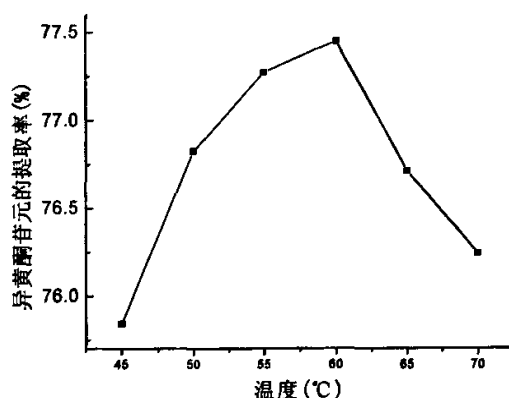


图 4-4 萃取温度的影响

由图4-4可知,随着萃取温度的上升,异黄酮的提取率也随之增加,在60 °C时出现一个峰值。

在峰值点前,随着温度的升高,流体中分子热运动加快,分子间相互碰撞几率增加,单位时间内达到缔合能以上的分子数增加,从而使得流体溶解能力增大^[89]。而且,温度的上升还会使异黄酮苷元的蒸汽压增大,挥发性增强。加速了异黄酮苷元从固体基质上解离。温度上升,也使得流体的粘度下降,扩散系数增大,传质系数增加,异黄酮苷元提取率增加。

在峰值点后,随着温度的升高,流体分子间距增大,分子间作用力减小,从而使得

一定压力及组成下的流体密度降低,其溶解性能相应降低,不利于提取。而且,由于流体与溶质的缔合是一个放热过程,过高的温度会导致平衡向逆反应方向移动,使得流体溶解力降低,降低了提取效率。过高的温度还会使目标产物的热敏性活性成分受热降解,影响产品质量。因此萃取温度选择 60 ℃。

4.5.4 萃取时间对异黄酮苷元提取率的影响

提取过程可分为三个不同的阶段:游离溶质的快速提取阶段、表面和内部扩散的过渡阶段和内部扩散为主的缓慢提取阶段^[90]。萃取时间对异黄酮苷元提取率的影响见图 4-5。

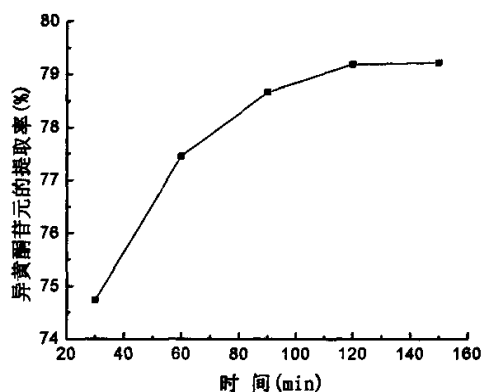


图 4-5 萃取时间的影响

从图 4-5 可以看出,120 min 内随着萃取时间的增加,异黄酮提取率逐步提高,随着时间的进一步延长,曲线斜率越来越小,异黄酮提取率上升变的缓慢而趋于平衡。

这是由于在萃取刚开始时,由于流体与样品未达到良好接触,使提取得率增加缓慢;随着萃取时间的延长,传质达到良好状态后,提取率增加非常显著;当萃取时间超过一定时间后,由于样品中异黄酮含量的减少而使提取得率增加幅度大大降低,曲线斜率已近乎为零,如果继续延长萃取时间,可能使其它杂质被提取出来,降低产品质量,增加操作成本。综合考虑多方面的因素,萃取时间选取120 min为宜。

4.6 小结

通过单因素试验，得出超临界 CO₂ 萃取异黄酮苷元的条件是：70%乙醇为夹带剂；夹带剂添加比例为 8%；萃取压力 30 MPa；萃取温度 60 ℃；萃取时间 120 min；在此条件下异黄酮的萃取率为 79.2%。

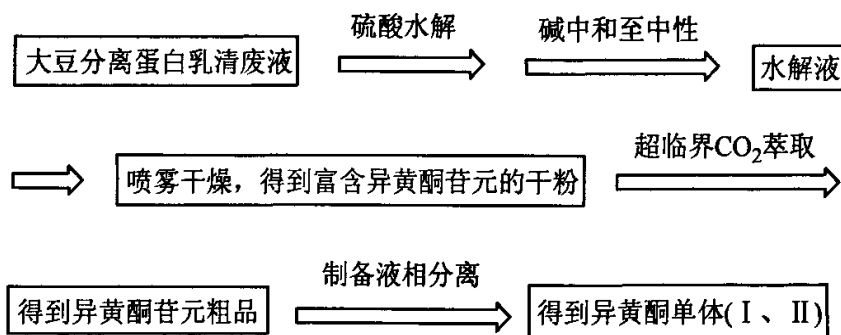
第五章 大豆异黄酮苷元的纯化及结构表征

5.1 概述

从天然植物中提取分离出纯化合物, 并进行结构的分析鉴定是天然产物研究中一个最重要的方面。其意义在于: ①发现药用植物中的有效作用成分, 发现其它的有潜在生理活性的天然化合物; ②有助于阐明天然药物的构效关系, 可以为药物的分子设计和改造提供原材料; ③为植物分类、植物生理功能研究提供证据和方向^[91]。

本工作将分离蛋白乳清液(废水)水解、超临界 CO₂ 萃取后的样品, 经膜过滤, 用高效液相(HPLC)进行分离制备, 得到高纯度的异黄酮乃至其单体, 并对部分单体进行结构表征。

5.2 样品纯化



5.3 分析检测方法

5.3.1 紫外(UV)光谱测定

紫外分光光度计: TP-1800 PC 型紫外可见扫描仪。

5.3.2 红外(IR)光谱测定

红外光谱仪：岛津 IR-440 型红外光谱仪，KBr 压片法测定，扫描 $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 。

5.3.3 高效液相(HPLC)色谱分析

HPLC 条件^[93]：分离单元为 SCL10-AVP 高效液相色谱仪（日本岛津仪器有限公司）。色谱柱是 Shim-Pack ODS C₁₈ 柱（250×4.6 mm;5 μm），紫外检测波长为 254 nm，数据采集与分析软件为 Masslynx data system。

5.3.4 电喷雾/质谱(ESI/MS)分析

异黄酮的电喷雾质谱（ESI/MS）测定^[94]：

Micromass 电喷雾质谱仪（Micromass Limited,UK），负离子质谱（ESI⁻/MS）条件：毛细管电压 4100 V，一级锥孔电压 100 V，离子源温度 120 °C，脱溶温度 200 °C。数据采集与分析软件为 Masslynx data system(version 3.1,Micromass Limited,UK)。

5.4 结果与讨论

5.4.1 异黄酮单体 I 的结构鉴定

UV 图谱见图 5-2；

IR 图谱结果： 3412 cm^{-1} 很强的尖峰（ $\nu_{\text{O-H}}$ ）， 3107 cm^{-1} （ $\nu_{\text{C-H}}$ ）， 1653 cm^{-1} （ $\nu_{\text{C=O}}$ ）表明存在较大的共轭体系， 1615 cm^{-1} 、 1569 cm^{-1} 、 1518 cm^{-1} 、 1504 cm^{-1} （苯环），见图 5-3；

HPLC 结果见图 5-4；

ESI⁻/MS：m/z =269.1，表明异黄酮 I 的分子量为 270，见图 5-5；

以上特征均与染料木素(Genistein)的报道相符^[95]，故异黄酮 I 确定为染料木素(Genistein,M=270)，其分子结构如图 5-1 所示。

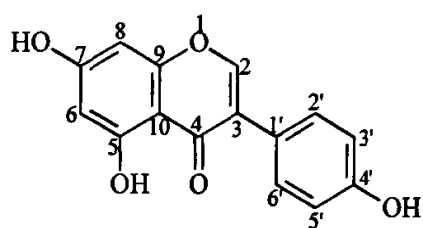


图 5-1 异黄酮 I 的结构式

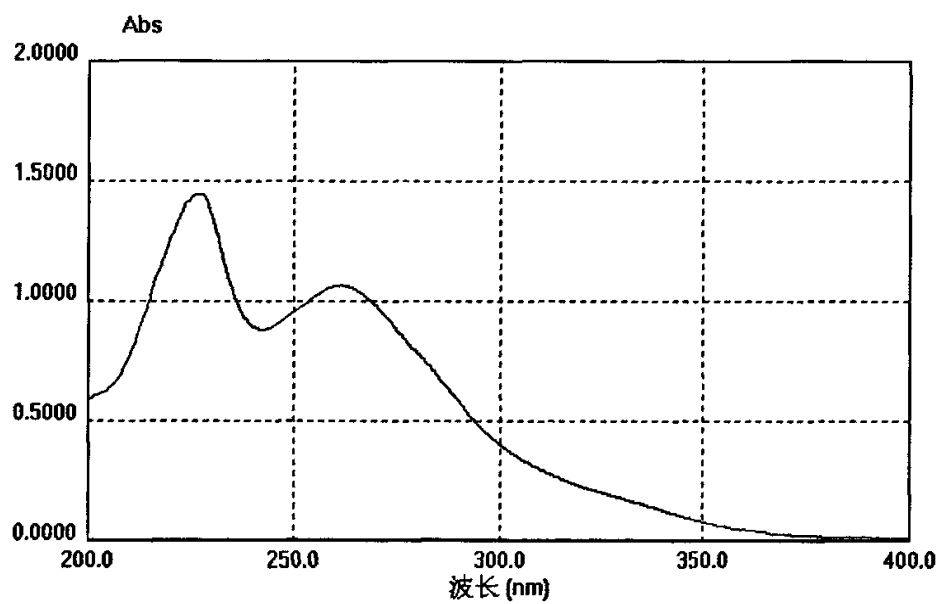


图 5-2 异黄酮 I 的紫外扫描图谱

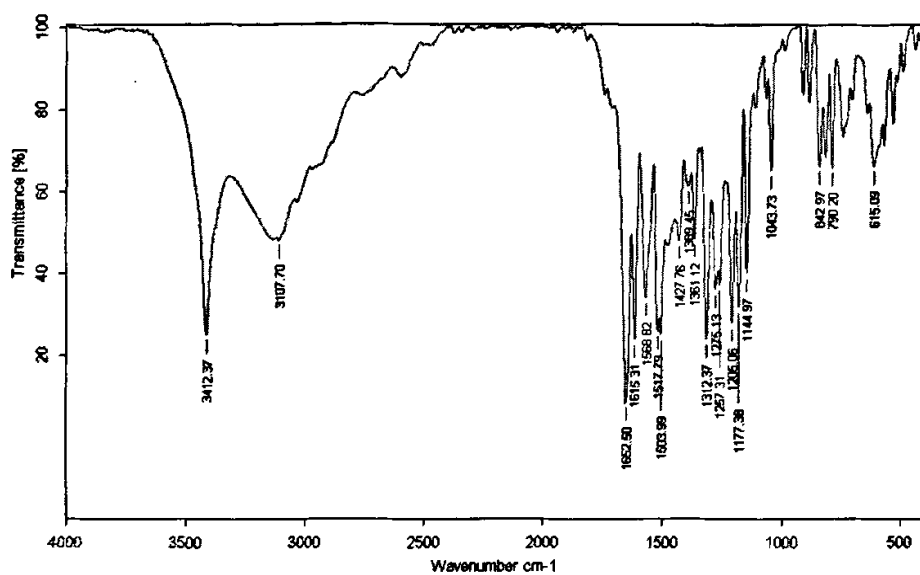
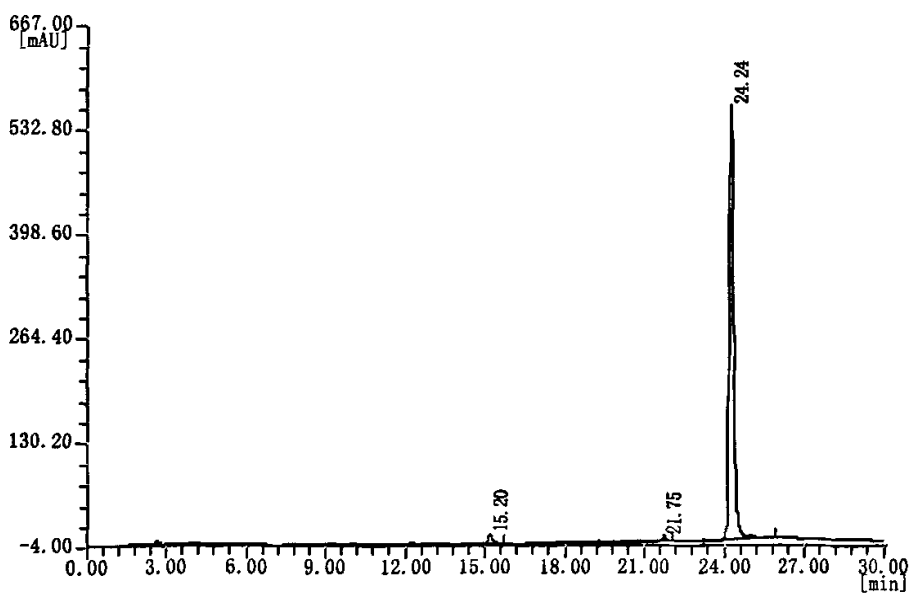
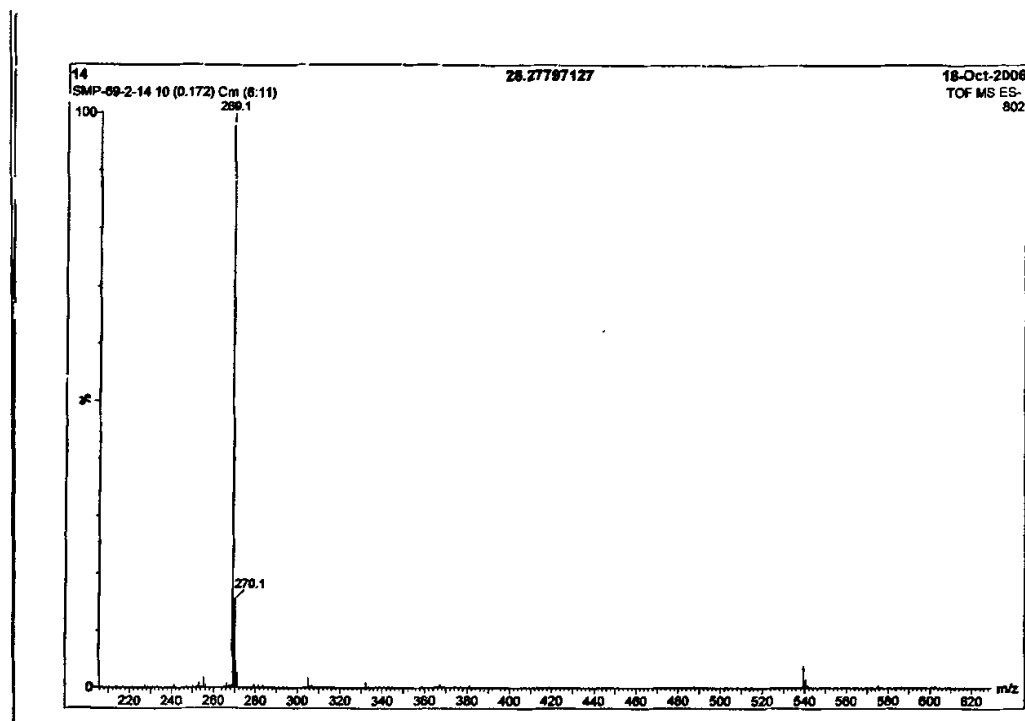


图 5-3 异黄酮 I 的红外扫描图谱



HPLC 条件: 流动相为甲醇 0.5% 的乙酸水溶液, 25 min 内组成从 30:70 线性变化到 70:30, 进样量 5 μL , 流速为 1 mL/min, 柱温为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。

图 5-4 异黄酮 I 的 HPLC 谱图



负离子质谱 (ESI⁻/MS) 条件: 毛细管电压 4100 V, 一级锥孔电压 100 V, 离子源温度为 120 ℃, 脱溶温度为 200 ℃。

图 5-5 异黄酮 I 的质谱图

5.4.2 异黄酮单体 II 的结构鉴定

UV 图谱见图 5-7;

IR 图谱结果: 3250-3400 cm^{-1} 宽峰 ($\nu_{\text{O-H}}$), 1632 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) 表明存在较大的共轭体系, 1608 cm^{-1} 、1570 cm^{-1} 、1515 cm^{-1} 、1448 cm^{-1} (苯环); 1233 cm^{-1} 、1060 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 其红外图谱见 5-8;

HPLC 结果见图 5-9;

ESI⁻/MS : $m/z=253.1$, 表明异黄酮 II 的分子量为 254, 见图 5-10;

以上特征均与大豆苷元(Daidzein)报道相符^[95], 故异黄酮 II 确定为大豆苷元(Daidzein, $M=254$), 其分子结构如图 5-6 所示。

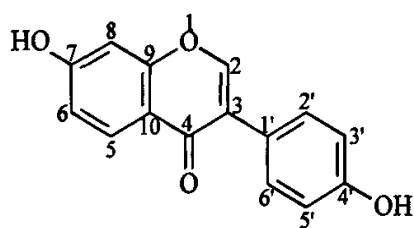


图 5-6 异黄酮 II 的结构式

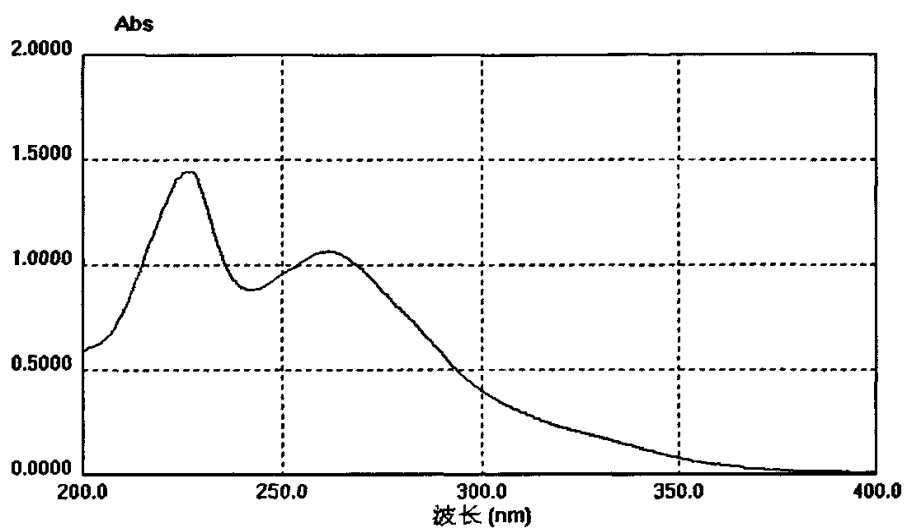


图 5-7 异黄酮 II 的紫外扫描图谱

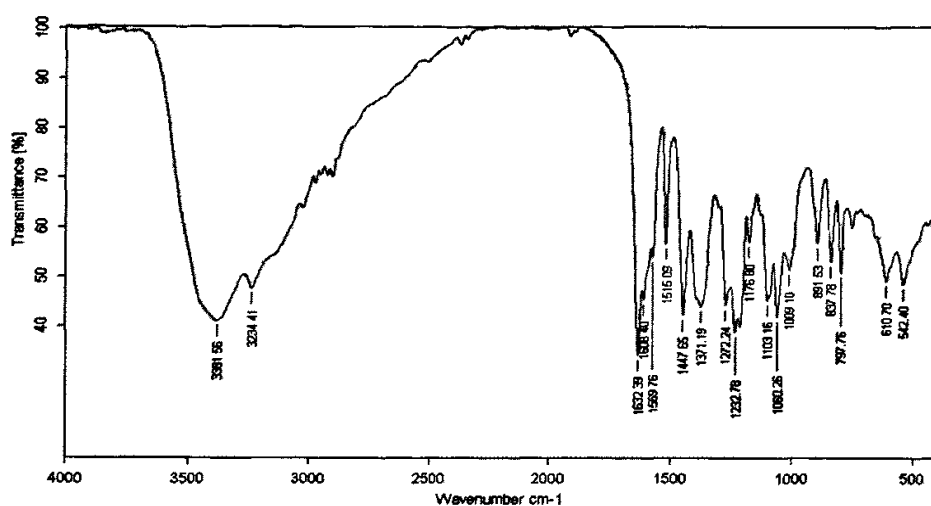
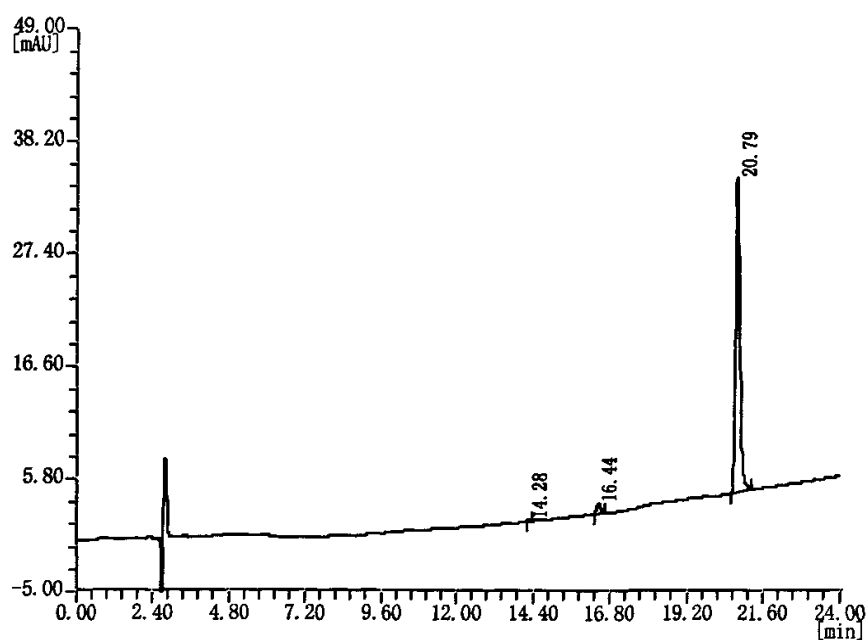
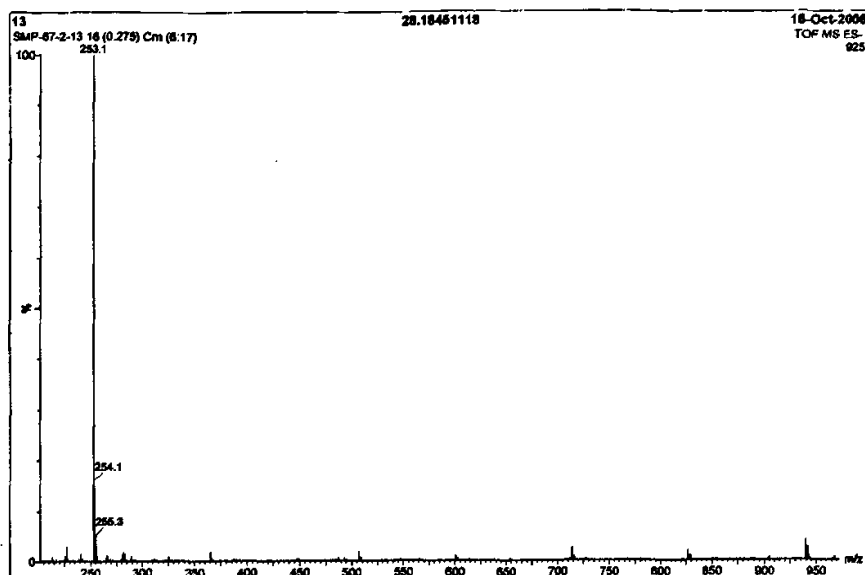


图 5-8 异黄酮II 的红外光谱图



HPLC 条件: 流动相为甲醇 0.5%的乙酸水溶液, 25 min 内组成从 30:70 线性变化到 70:30, 进样量 5 μ L, 流速为 1 mL/min, 柱温为 50 $^{\circ}$ C。

图 5-9 异黄酮II 的 HPLC 谱图



负离子质谱 (ESI-/MS) 条件: 毛细管电压 4100 V, 一级锥孔电压 100 V, 离子源温度 120 ℃, 脱溶温度 200 ℃。

图 5-10 异黄酮II的质谱图

第六章 结 论

本结论是在以上实验结果的基础上得出的。

1. 以低温脱脂豆粕为原料, 以碱性水溶液为溶剂提取大豆异黄酮糖苷, 通过单因素试验和正交试验, 得出最佳工艺条件为: 料液比 1:8, 提取时间 1.5 h, 提取温度 25 °C, pH 值 11。该条件下大豆异黄酮糖苷的提取率为 77.6%。

2. 对三种不同的提取大豆异黄酮糖苷的方法进行比较。碱性水溶液提取法的提取率稍低于乙醇溶剂提取法, 但提取成本更低, 提取条件更温和(室温提取)。超临界 CO₂ 萃取法的提取率为 21.2%, 明显低于碱性水溶液提取法和乙醇溶剂提取法, 这可能与大豆异黄酮糖苷结构中的极性糖配体有关, 虽然在超临界萃取过程中加入一定量的乙醇-水作为夹带剂, 但受到临界温度和临界压力的限制, 夹带剂的比例不能无限制地增大, 致使超临界 CO₂ 萃取技术在提取异黄酮糖苷的过程中无法发挥其技术优势。

3. 以大豆分离蛋白乳清废液为原料, 分别以 α -淀粉酶、732 型阳离子交换树脂、硫酸和盐酸为催化剂, 进行异黄酮糖苷的水解研究, 实验结果表明: 无机酸水解效果最好; α -淀粉酶水解效果较差, 这与酶的专一性有关, 因为异黄酮糖苷结构中糖配体是以 β -糖苷键和苷元相连的; 732 型阳离子交换树脂的水解效果也不好, 可能因为分离蛋白乳清废液中固体小颗粒可能填充了树脂表面的空隙, 致使树脂的比表面积相对下降, 其功能基团无法充分发挥催化作用。

4. 以大豆分离蛋白乳清废液为原料, 进行硫酸水解试验的研究。通过单因素试验和正交试验, 得出硫酸水解最佳工艺条件为: 硫酸浓度 2.5 mol/L, 水解时间 2 h, 水解温度 80 °C, 验证实验表明: 异黄酮苷元的相对转化率可达 98.7%。

5. 硫酸在超声条件下和微波条件下水解异黄酮糖苷的能力都很强, 苷元的相对转化率均可达到 80%以上; 但水解反应时间明显缩短, 由常压下加热回流的 2 h 缩短为 45 min。

6. 大豆分离蛋白乳清废液水解过后, 可以采用超临界 CO₂ 萃取技术提取异黄酮苷元, 效果良好。单因素试验的结果表明: 70%乙醇为夹带剂; 夹带剂添加比例 8%; 萃取压力 30 MPa; 萃取温度 60 °C; 萃取时间 120 min; 在此条件下, 异黄酮苷元的萃取率为 79.2%。

7. 用制备液相纯化异黄酮苷元粗产品, 分离出 2 种主要的异黄酮苷元, 通过 UV、IR、HPLC 和 ESI/MS 对其结构进行表征, 确定这两种单体是染料木素(Genistein)和大豆苷元(Daidzein)。

8. 目前试验仅对分离蛋白乳清废液中的异黄酮苷元进行了提取与分离进行研究, 对其它有效成分如皂甙、低聚糖等提取与纯化研究尚未展开, 如果能够同时提取多种高附加值成分, 不但可以提高植物蛋白生产企业的经济效益, 而且可以降低这些企业排放废水形成的水体富营养化程度, 具有重要经济价值和社会效益。

9. 由于时间和实验条件的限制, 对异黄酮糖苷酶水解和强酸性离子交换树脂水解无法做进一步的研究验证, 但不排除选择其它的酶或树脂可能得到更理想的结果。

10. 对异黄酮的纯化除了 HPLC 外, 还可以采用大孔树脂吸附、超滤、毛细管电泳等技术, 可以实现高纯度异黄酮产品的工业化生产。

参考文献

- [1] 李疆.大豆生物活性物质的综合开发[J].粮食与食品工业,2006,13(1):34-38
- [2] J. B. Harborne *et al* The flavonoids. Chapman and Hall.Ltd, 1988 ,125-204
- [3] Adrian A.Franke.,Jean H.Hankin.,Mimi C.Yu.,*et al*. Isoflavone levels in soy foods consumed by multiethnic populations in Singapore and Hawaii.J.Agric.Food Chem., 1999,47:977-986
- [4] Adrian A.Franke, Jean H.Hankin, Mimi C.Yu ,*et al*. Isoflavone levels in soy foods consumed by multiethnic populations in Singapore and Hawaii.J.Agric.Food Chem., 1999,47:977-986
- [5] Wang H.J.,Rosazza P.A.Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa:effects of variey,crop year and location.J.Agric.Food Chem .,1994,42:1674-1677
- [6] Witold M.M.,Duke J.A.,wahala K.,Adlercretz H.Isofiavonoids and liganas in legumes: nutritional and health aspects in humans.J.Nutri.Biochem.,1998,9:193-200
- [7] Murphy P.A.,Song T.T.,Buseman G.,*et al*. Isoflavones in retail and institutional soy foods.J.Agric.Food Chem.,1999,47:2697-2704
- [8] Wang H.J.,Murphy P.A.Isoflavone content of commercial soybean foods.J. Agric.Food Chem.,1994,42:1666-1673
- [9] 郑建仙.功能性食品[M].北京:中国轻工业出版社,1995:429-440
- [10] 大久保一良,吉城由美子,吉越吕树,等.大豆配糖体(サボニン, イソフラノイド)の種類,构造,分布,遗传性をよび生理活性(日)[J].新食品工业,1994,36:17-27
- [11] 大久保一良,古林祐三,高桥胜美.豆乳の配糖体にもとづいた成份呈味性について(日)[J].食品开发,1984,18(6):17-21
- [12] Fred B. Soya is isoflavones: a new and Promising ingredient for the health foods sector.J.Food Research International,2002,35:187-193
- [13] Naim M.,Gestetner B.,Kirson I.,*et al*.A new isoflavone from soybeans.J. Phytochemistry., 1973,12:169-170
- [14] Hosny M.H.,Rosazza P.N. Novel isoflavone, cinnamic acid and triterpenoid glycosides in soybean molasses.J.Nutr.Prod.,1999,62:853-858
- [15] 孙君明,丁安林.大豆异黄酮含量及影响因素的评价[J].中国粮油学报,1998,13(2):10-13
- [16] 王霞.大豆异黄酮最新研究进展[M].河北:河北工业大学出版社,2002:74-77
- [17] 崔洪斌.大豆生物活性物质的开发与利用[M].北京:中国轻工业出版社,2001
- [18] Kudou S., Fleury Y., Weltl D., *et al*. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (Glycine max Merrill). J.Agric. Biol. Chem.,1991,55:2227-2233

- [19] Coward L.,Smith M.,Kirk M.,*et al.*Chemical modification of isoflavone in soyfoods during cooking and processing .J. Am. J. Clin. Nutri., 1998, 68(suppl):1486-1491
- [20] Witold Mazar., Fotsis T.,Herman Adlercreutz. Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids,coumestrol and lignans in food samples.J.Analytical Chemistry.,1996,233:169-180
- [21] Song T.,T.Gendrich S.,Murphy P.A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. J. Agric. Food Chem.,1999,47:1607-1610
- [22] Herman C.,Adlereretz T.,Goldin B.R.,*et al.* Soybean phytoestrogen intake and cancer risks.J.Nutri.,1995,125:777-183
- [23] 王兆梅,李琳.大豆异黄酮结构及其活性分析[J].天然产物研究与开发,2005,14(3): 72
- [24] Michael.Naim.,Benjamin.Gestetner.,*et al.*Soyisoflavones Characterization determination and antifungal activity. J.Agric.Food Chem.,1974,22,(5):806-81
- [25] 析耀年.大豆异黄酮的功用和制备工艺[J].中国油脂,2003,28(10):60-62
- [26] 陈维纽.超临界流体萃取的原理和应用[M].北京:化学工业出版社,1998
- [27] 朱自强.超临界流体技术—原理和应用[M].北京:化学工业出版社,2000
- [28] 钱丽丽,左锋等.大豆异黄酮提取方法的研究进展[J].2006,18(5):64-67
- [29] 汪海波,刘大川等.酸水解法提取大豆异黄酮甙元工艺研究[J].食品科学,2003,24(4): 98-100
- [30] Molteni A.,Brizio-molteni L.,Persky V. Invitrohormonal effects of soybean isoflavones.J. Nutri.,1995,152,751s-756s
- [31] 谢明杰,宋明等.超声波提取大豆异黄酮.大豆科学, 2004,23(1):75-76
- [32] 兰昌云,周崇松,范必威等.超声波法提取槐花中黄酮的最佳工艺研究[J].天然产物研究与开发, 2005,17(1):55-57
- [33] Pare J R Jet al. Microwave Assited Natural Products Extraction[P]. US 5002784, 1991
- [34] 张永忠,石冬冬.微波法预处理提取大豆异黄酮的研究[J].粮油食品科技, 2003,3(11):8-10
- [35] 贾建波,李东.大豆胚芽中提纯皂甙和异黄酮的研究[J].粮油食品科技,2005,13 (1):40-41
- [36] 袁建,鞠兴荣.大豆异黄酮分离与精制工艺研究[J].食品科学,2002,123(8):120.
- [37] 冯建光,谷文英等.无机膜在大豆异黄酮制取工艺中的应用[J].广州食品工业科技, 2003,19 (4):78-80
- [38] Ito Y Critical. Reviews in Analytical Chemistry, 1986, 17: 65
- [39] 江和源,台建祥等.高速逆流色谱法分离制备大豆异黄酮中的大豆苷和染料木苷[J].食品科学,2004, 25(1):85-87
- [40] 潘廖明.离心法纯化大豆异黄酮的研究[J].四川大学学报(工程科学),2004,36(1): 74-76

- [41] 陈瑞战,张守勤等.超高压提取西洋参皂苷的工艺研究[J].农业工程学报,2005,21(5): 150
- [42] 韩锋,翟桂香.大豆异黄酮及其水解研究进展[J].粮油食品科技,2004,12(5): 36-37
- [43] 鞠兴荣等.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
- [44] Jiantao He.,*et al.*Analysis of Isoflavone daidzein in puerariae radix with micellemediated extraction and preconcentration.J. Journal of Agriculture and food Chemistry.,2005,53: 518-523
- [45] 徐健英,邹颖秀.高效液相色谱法分析检测食品中大豆异黄酮含量[J].牡丹江医学院学报,2003,28-11
- [46] 鞠兴荣等.高效液相色谱法测定大豆提取物中大豆异黄酮的含量[J].中国粮油学报,2000,15(4):26-29
- [47] 孙君明,丁安林等.高效液相色谱(HPLC)技术检测大豆异黄酮含量[J].大豆科学,2000,19:15-20
- [48] Joannou GE.,Kelly GE.,Reeder A Y.,*et al.*A urinary profile study of dietary phytoes trogens,the identification and mode of metabolism of new isoflavonoids.J.Steroid. Biochem.Mol.Biol.,1995,54(3,4):167-184
- [49] Mazur W.,Fotsis T.,Wanhala K.,*et al.*Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids,coumestrol and lignans in food samples.J.Anal Biochem.,1996,233(2):169-180
- [50] 董怀海,谷文英.高效液相色谱-质谱法在大豆异黄酮测定中的应用[J].粮食与饲料工业,2002,5:48-500
- [51] 龚凌霄,苏宝根,魏作君等.高效液相色谱-质谱法快速测定大豆异黄酮含量[J].中国油脂,2006,31(2):50-52
- [52] Wang C.,Huang H.,Kuo K.,*et al.*Analysis of Puerariae radix and its medicinal preparation by capillary electrophoresis.J.Chromatogr.A.,1998,802:225-231
- [53] 于阿娟.郑州:郑州大学硕士研究生毕业论文,2004
- [54] 罗维,张美英,曹珍年.大豆异黄酮的核磁共振研究[J].九江师专学报,2004,5:28-31
- [55] Wanh J.,Lapcik O.,Hampl R.,*et al.*Time resolved-fluoroimmunoassy of plasma daidzein and genistein.J. Steroids.,2000,65(6):229-348
- [56] 唐传核,彭志英.大豆异黄酮的开发现状及应用前景[J].西部粮油科技,2000,25(4): 35-39
- [57] 刘福兴.美国一则消息震动国内激素市场[N].中国经营报,2002,07,20
- [58] 唐传核.植物功能性食品[M].北京: 化学工业出版社,2004.279-282
- [59] 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
- [60] 田红.大豆异黄酮的市场开发前景广阔[J].天津药学,2004,6(4):74

- [61] 刘葵,张恩娟.大豆异黄酮的开发及市场前景[J].中国药房,2006,17,(2):93
- [62] 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.中国油脂,2002,27(6):41-44
- [63] 王文岭,黄雪松.DNS法测定木糖含量时最佳测定波长的选择[J].食品科学,2006,27,(4):196-198
- [64] 石荣,王少云.大豆异黄酮指纹图谱中保留时间漂移的校正研究[J].色谱,2006,24(1):65-68
- [65] 陈俊英,曹文豪等.不同夹带剂条件下超临界萃取薯蓣皂素的研究[J].河南工业大学学报(自然科学版)2006,27(1):61-63
- [66] 赵冬梅等.豆制品生产中高浓度废水的检测与分析[J].食品与发酵工程,2006,32(1):217
- [67] 崔洪斌,大豆异黄酮活性研究与应用[M].北京:科学出版社,2004
- [68] YOW C J.,LIEW K Y.Hydrolysis of palm oil catalyzed by macroporous cation-exchanged resin.J.AOCS.,1999,76 (4):529-533.
- [69] YOW C J.,LIEW K Y.Hydrolysis of palm oil catalyzed by solid heteropolyacids.J.AOCS.,2002,79(4):357-361
- [70] 张雷,赵俊廷.强酸性离子交换树脂催化水解油脂制备脂肪酸研究[J].郑州大学学报(工学版),2005,26(2):7
- [71] 贺云,贺武卫.超声提取和超声水解法从野葛根中提取纯化葛根素和大豆苷元[J].天然产物研究与开发,2005,17(3):328-330
- [72] 李嵘,金美芳.微波法提取银杏黄酮甙的新工艺[J].食品科学,2000,21 (2):39-41
- [73] 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,2003,24(4):98-100.
- [74] 袁其朋,张怀,钱忠明.超临界CO₂抗溶剂法纯化大豆异黄酮的研究.大豆科学,2002,21(3):179-181
- [75] 曾琦华.广州:华南理工大学硕士研究生毕业论文.2002
- [76] Dobbs J M .,Wong J M., Lahiere R J.Modification of supercritical fluid phase behavior using polar cosolvents.J. Ind Eng Chem Res, 1987, 26:56-65
- [77] 张建君,朱美文,于思平.在超临界流体中夹带剂作用的研究[J].北京化工学院学报,1993,20(2):1-7
- [78] 徐海军,邓碧玉,蔡云开.夹带剂在超临界萃取中的应用[J].化学工程,1991,19(2):58-63
- [79] 段先志,夏红英,罗平.夹带剂性质对超临界二氧化碳萃取的影响[J].化工技术与开发,2003,32(6):23-26
- [80] M.D.Luque de Castro et al.Trends in Anal Chem, 1996, 15(1):32-37

- [81] Sihia R.Sargenti et al.J Chromatogr Sci, 1998, 36(4):169-174
- [82] 余华.提携剂在中草药超临界CO₂萃取中的应用[J].中国药学杂志,2003,38(5):331-333
- [83] 张镜澄.超临界流体萃取[M].北京:化工出版社.2000
- [84] 江伟强,柯于家.超临界CO₂萃取装置的消化创新与开发[J].食品与机械,1999, (6): 37-39
- [85] 银建中,孙献文.超临界流体萃取沙棘油试验研究[J].化学工程.2002,30(4):13-15
- [86] 杨柏崇,李元端.猕猴桃籽油的超临界二氧化碳萃取研究[J].食品科学.2003,24(7):104 -108
- [87] 瞿万云,余爱农,叶锐.超临界CO₂萃取月季花挥发油的工艺研究[J].中药材.2006,29(5): 488-490
- [88] 李先碧,童明伟.超临界CO₂萃取装置运行不稳定的机理分析及改进措施[J].应用化工,2006,35 (12): 981-986
- [89] Chrastil J.Solubility of solids and liquids in supercritical gases.J. Phys.Chem. 1982, 86: 3016-3021
- [90] Puiggene J., *et al.* Free liquid-to-supercritical fluid mass transfer in packed beds .J. Chem Eng Sci.,1997, 52(2):195-212
- [91] 刘苏华.广州:华南理工大学硕士毕业生论文.1997
- [92] Junel Kinojo.,Fumiko Kishida.,Kazutala Watanale.,*et al.*Five new triterpene glycosides from Russell Lupine.J.Chem.Pharm.Bull.,1994,42:1874-1878
- [93] C Lee Holder.,Mona I.Churchwell., Daniel R.Doerge.Quantification of Soy Isoflavones Genistein and Daidzein and Conjugates in Rat Blood Using LC-MS.J.Agric.food Chem.,1999,47:3764-3770
- [94] 李晓霞,雷继鹏,谷克仁.大豆异黄酮大豆皂苷纯化工艺研究[J].粮食与油脂, 2003,3:3-6
- [95] Kudou S.,Tonomura M.,Tsukamoto C.,*et al.* Isolation and structural elucidation of the major genuine soybean saponins.J. Biosci. Biotech. Biochem., 1992,56(1):142-143

致谢

衷心感谢我的导师毛璞老师，感谢他帮助我选择研究课题和对我的悉心指导，为我提供了优越的工作环境和学习条件。毛璞老师对事业执著追求、不断进取的精神永远是我学习的榜样！

感谢河南省科技攻关项目资金的支持，项目名称：超临界 CO₂ 萃取法从豆粕中提取与分离大豆异黄酮的研究（324010011）。

感谢谷克仁老师、江秀明老师、张玉军老师、王宏雁老师、肖咏梅老师、谢文磊老师、何丽君老师、戴红丽老师等对我的指导和帮助！感谢老师们在试验过程中提出的宝贵的意见和建议！

感谢曹莹、茹湘波、王美美、史慧贤、杨振强等同学在生活中和工作中给予我各方面的支持和帮助！

感谢我的家人对我无微不至的关爱！

作者：孟 冬

2007.5

个人简历

姓 名：孟 冬

性 别：女

民 族：汉

籍 贯：河南新乡

出生日期：1982.01.27

学习和工作简历

2000.9—2004.6 河南工业大学 化学工程与工艺专业 工学学士

2004.9—2007.5 河南工业大学 应用化学专业
天然产物的提取与分离方向 工学硕士

攻读硕士研究生学位期间已（待）发表的与课题相关的论文

1. 孟冬,毛璞,曹莹.碱提酸沉法提取大豆异黄酮工艺研究.中国粮油学会油脂专业分会第六次会员代表大会暨第十五届学术年会论文选集, 2006.9
2. 孟冬,毛璞等.SFE-CO₂ 技术在萃取分离蛋白乳清废液中异黄酮苷元的应用[J].（已投稿）
3. 孟冬,毛璞等.分离蛋白乳清中异黄酮酸水解工艺的研究[J].（已投稿）