

# 大豆异黄酮微波干法辅助提取及其机理研究

彭游<sup>1,2,3\*</sup>, 邓泽元<sup>2</sup>, 叶志刚<sup>1</sup>, 喻国贞<sup>1</sup>

(1. 九江学院 化工学院, 江西 九江 332005; 2. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047; 3. 江西省鄱阳湖生态经济研究中心, 江西 九江 332005)

**摘要:** 考察大豆异黄酮的微波光波组合无溶剂提取方法, 发现微波光波提取干法仅用 9.4% 的 N,N-二甲基甲酰胺 DMF 作为能量传递介质, 功率 800 W (微波 55% 与光波 45%) 加热 6 min 后, 乙醇萃取得总黄酮。大豆苷元的提取率为 0.14%, 与相应的常规提取法接近, 该法有操作简单快速, 成本低, 环境污染小等优点。利用高倍荧光显微镜 FM, IR 对微波提取机理进行初步研究表明, 微波光波可能是从对植物组织结构的影响上来改善次生代谢产物的提取效率。

**关键词:** 大豆异黄酮; 微波光波; 提取机理; 干法

**中图分类号:** Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)02-0266-04

## Extraction of soybean isoflavone by microwave radiation without solvent and its mechanism

PENG You<sup>1,2,3\*</sup>, DENG Ze-Yuan<sup>2</sup>, YE Zhi-Gang<sup>1</sup>, YU Guo-Zhen<sup>1</sup>

(1. Department of chemistry and Engineering, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Jiangxi Poyang Lake Ecological Economy Research Center, Jiujiang 332005, China)

**Abstract:** Extraction of the soybean isoflavone was studied by combination method of microwave and light wave radiation without solvent. We discovered that only using 9.4% N,N-dimethyl formamide DMF as the energy transfer medium, heating the sample for 6min with power 800W (microwave 55% and light wave 45%), the total flavanone was extracted with ethyl alcohol. The extraction rate of daidzein that was 0.14%, closed with the corresponding conventional extraction process. This method had many merits, such as simplicity of operator, rapid, low cost, small environmental pollution and so on. Extraction mechanism was investigated preliminarily with high magnification fluorescence microscope FM, IR. It indicated that the improvement of extraction efficiency of secondary metabolite was possibly because the plant tissue structure was changed by microwave.

**Key words:** soybean isoflavones; microwave and light-wave; mechanism; dry

大豆异黄酮是大豆 (*Glycine max*, 大豆属 *Glycine*, 大豆科 *Fabaceae*) 植物中的一类次生代谢产物。近年来大量研究表明大豆异黄酮具有预防癌症 (Coward 等, 1993)、心血管疾病 (Ulchins 等, 2005)、减轻妇女更年期综合症 Aedin 等, 2008)、降

低血糖 (黄进等, 2004)、抗衰老 (王林山等, 2004) 等重要生理功能。大豆异黄酮作为许多药物与保健品的主要功能成分有重要的经济与社会价值, 它的提取方法研究是目前热点之一。目前最常见的异黄酮分离及纯化方法有: 有机溶剂萃取法 (闵嘉霖等,

收稿日期: 2010-08-12 修回日期: 2010-12-19

基金项目: 江西省自然科学基金 (2010GZN0106); 江西省教育厅科技项目 (GJJ08440, GJJ11626) [Supported by Natural Science Foundation of Jiangxi (2010GZN0106); the Science and Technology Item of Department of Education of Jiangxi Province (GJJ08440, GJJ11626)]

作者简介: 彭游 (1971-), 男, 重庆万州人, 博士, 副教授, 研究方向为食品化学与营养, (E-mail) trihydracid@126.com.

\* 通讯作者 (Author for correspondence)

2006)、超声波辅助法(谢明杰等,2004a)、水解法(谢明杰等,2004b)、酶解法(谢明杰等,2004c)、超临界萃取法(闵嘉霖等,2006)等。然而这些有一定改善的提取方法仍然耗时耗能,消耗大量溶剂,经济与环境成本较高等不足。采用微波光波组合对大豆异黄酮的提取还未见文献报道,特别是大豆异黄酮的微波光波无溶剂提取工艺及机理的研究在理论与应用上均有重要的意义。

微波提取技术是天然产物提取中一种非常有发展潜力的新技术。微波是一种频率在 300 MHz~300 GHz 之间的电磁波,具有波动性、高频性、热特性和非热特性四大基本特性。微波加热是靠穿透物质,使物体内部分子产生震动和摩擦,从而对物体加热,是由内向外的加热。在快速振动的微波电磁场中,被辐射的极性物质分子吸收电磁能,以每秒数十亿次的高速振动产生热能(樊兴君等,1998;李学坚等,2005)。自 Ganglier 等(1990)最早利用微波萃取法从羽扇豆中提取鹰爪豆生物碱后,该技术成为天然产物提取的有力工具。本文主要报道大豆异黄酮的微波光波干法提取工艺和机理分析的研究工作。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

大豆在市场上购得。大豆苷元标准品由中国药品生物检定所提供;其它试剂为分析纯。G8023 CSL-K3 型格兰仕光波/微波炉;AKTA 大分子纯化系统, HSCCC-TBE300A, 上海同田生化; Agilent HPLC1100Series, Diamonsil C18 柱(200X4.6 mm, LD, .5  $\mu$ m); Nicocet 5700 FT-IR 红外光谱仪(IR); Nikon Dxm1200c 高倍荧光显微镜(FM)。

### 1.2 大豆异黄酮微波光波组合干法辅助提取与分离

1.2.1 提取工艺 称取样品 100 g 粉碎至 0.022~0.056 mm, 加入 10 mL(9.4%)的 DMF 调匀, 置于光波炉中, 微波光波组合方式加热, 功率 800 W(微波 55%与光波 45%)加热 6 min 后, 用 200 mL 乙醇分两次萃取异黄酮, 滤液加入无水硫酸钠, 静置过夜, 过滤并旋干乙醇, 得粗黄酮。总黄酮用 5% HCl, 50  $^{\circ}$ C 水解 30 min, 乙酸乙酯萃取, 减压蒸去溶剂得总黄酮苷元 A, 柱层析初步纯化( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ , 10/1, v/v)得黄酮苷元混合物 B, 参考 Yang 等(2001)的方法纯化, 得到染料木素与大豆苷元纯品。

1.2.2 含量测定 用外标法测定黄酮苷元混合物 B

中大豆苷元的含量, 计算大豆苷元的提取率。色谱条件: 流动相为 50%  $\text{CH}_3\text{CN}/50\% \text{CH}_3\text{OH}$ , 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10  $\mu$ L。检测波长  $\lambda=248$  nm, 柱温 25  $^{\circ}$ C。大豆苷元的标准曲线:  $y=61.224x+15.367$ ,  $R^2=0.9999$ , 线性范围: 0.214~68.48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 1.3 黄酮的提取机理研究

对同一样品在微波前、微波后提取前、提取后的粉末研细后与 KBr 一起压片后经 IR 分别进行结构测定。对同一样品在微波前、微波后提取前、提取后的粉末压片后用高倍 FM 直接观察并拍照。

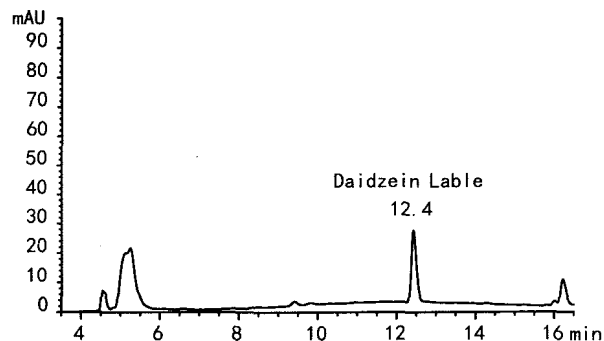


图 1 标准品大豆苷元的高效液相色谱图  
Fig.1 HPLC of daidzein lable

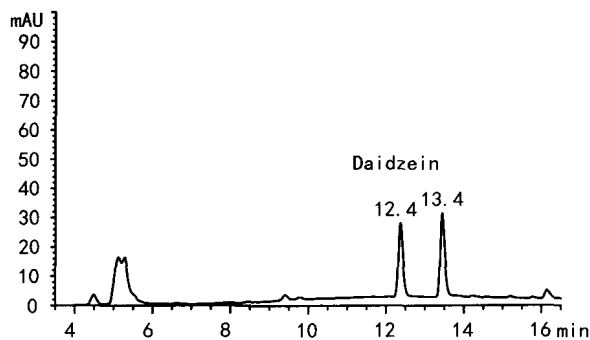


图 2 大豆黄酮苷元混合物 B 的高效液相色谱图  
Fig.2 HPLC of flavones B from soybean

## 2 结果

### 2.1 平行实验优选法优化微波提取工艺

以大豆苷元的提取率来考察大豆异黄酮的提取效果。大豆苷元标准品与提取物 B 的 HPLC 图分别见表 1 与表 2。提取率(%)为单体的质量与样品质量之比。

2.1.1 不同微波加热方式对黄酮提取的影响 分别

取 100 g 样品用不同的微波光波组合方式提取其中的黄酮,加热时间为 6 min,DMF 为 10 mL,微波为 100% 的火力(800 W)(表 1)。由表 1 可见:在总功率不变的情况下,仅用微波或光波提取效果均较差,而选用微波光波组合提取率明显上升。特别是 55% 微波和 45% 光波组合方式,提取效果最好,可能是光波的迅速致热比只用微波有更高的加热温度,有利于植物细胞壁的破裂,配合微波的内加热与分子搅拌功能,更有利于黄酮的分离。

表 1 不同微波加热方式对黄酮提取的影响

Table 1 Effects of microwave mode on flavonoid extraction

	微波	30%微波+ 70%光波	55%微波+ 45%光波	100% 光波
功率 Power (W)	800	240+560	440+360	800
提取率* Extraction rate (%)	0.073	0.110	0.140	0.092

\* 混合物 B 中大豆苷元的提取率。下同。\* Extraction rate of daidzein in B. The same below.

2.1.2 微波辐照时间对黄酮提取的影响 分别取 100 g 样品用同一微波光波组合方式(55%微波+45%光波),不同的辐照时间提取其中的黄酮,微波均为 100% 的火力(800 W)(表 2)。由表 2 可以看出:微波辐射 8 min 后,延长微波辐照时间对收率并没有明显提高;相反,在实验中,还带来了褐色的不溶于水,也不溶于乙醇等有机溶剂的油状物。

在优化条件时,微波光波组合方式(55%微波+45%光波),800 W 时,加热时间为 6 min,DMF 为 10 mL 时,大豆苷元的提取率为 0.14%,与相应的常规文献(谢明杰等,2004b)相比接近。但该法有操作简单快速,成本低,环境污染小等优点,值得进

表 2 微波辐照时间对黄酮提取的影响

Table 2 Effects of radiation time on flavonoid extraction

时间 Time (min)	4	6	8	10
提取率* Extraction rate (%)	0.033	0.140	0.100	0.032



图 3 三种大豆样品的 FM 相片

Fig. 3 FM pictures of three soybean samples

A. 原料; B. 微波后样品; C. 提取后样品。

A. raw material; B. sample radiated by microwave; C. sample extracted.

一步拓展研究。

## 2.2 黄酮的微波干法提取机理研究

2.2.1 大豆样品的 FM 拍照结果 用高倍 FM 对同一大豆样品在微波前,微波后提取前,提取后的结构观察并拍照(放大倍数为 400)(图 3)。

2.2.2 大豆样品的 IR 谱图 用 IR 对同一大豆样品在微波前、微波后提取前、提取后的结构测定(图 3~图 5)。在图 4 中为  $1746\text{ cm}^{-1}$ ,图 5 中为  $1745\text{ cm}^{-1}$ ,图 6 为中  $1742\text{ cm}^{-1}$ ,分别为黄酮的特征吸收峰,在图 4 中为  $1058\text{ cm}^{-1}$ ,图 5 中为  $1060\text{ cm}^{-1}$ ,图 6 中为  $1057\text{ cm}^{-1}$ ,分别为多糖的吸收(白雁等,2006)。多糖在乙醇中的溶解度极小,可以认为提取

前后含量不变,以  $\sim 1058\text{ cm}^{-1}$  的吸光度为标准,标定 C=O 的相对吸收强度(表 3)。

## 3 讨论

植物中黄酮红外吸收特征为区段  $1800\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ ,该区段主要包括 C=C 或芳环骨架振动的叠加峰及  $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$  处的羰基的伸缩振动峰,可认为是黄酮类的特征表现。下一区段( $1300\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ )内主要为  $\sim 1060\text{ cm}^{-1}$  附近的 C-O 伸缩振动峰,可表征多糖类成分的红外吸收(白雁等,2006)。该区段所对应的物质糖类在乙醇中的溶解度极小,

可以认为提取前后含量不变,其相对吸光度不变。

根据大豆样品的 IR 吸收图 4~6,可以看出:在 IR 区段  $1\ 800\sim 1\ 350\text{ cm}^{-1}$ ,微波前后 IR 光谱中, $\sim 1\ 745\text{ cm}^{-1}$ 代表 C=O 伸缩振动的波峰尖锐,吸光大,而提取后的 IR 图 6 在 $\sim 1\ 742\text{ cm}^{-1}$ 有较小的峰出现,表明大豆中黄酮基本提取完全。在微波前后 IR 光谱中,在  $1\ 200\sim 1\ 000\text{ cm}^{-1}$ 之间,出现 $\sim 1\ 158$ 和 $\sim 1\ 058\text{ cm}^{-1}$ 的双峰,而提取后在 $\sim 1\ 158\text{ cm}^{-1}$ 基本消失,说明黄酮主要是以植物中的原形黄酮糖苷的形式被提取。从标定 C=O 的相对吸收强度(表 3)可以看出,微波前后 C=O 的吸收相对于多糖的吸收接近大于 1,而提取后 C=O 的吸收相对于多糖的吸收为 0.648,远小于 1。红外光谱能正确反映大豆中黄酮的提取情况。

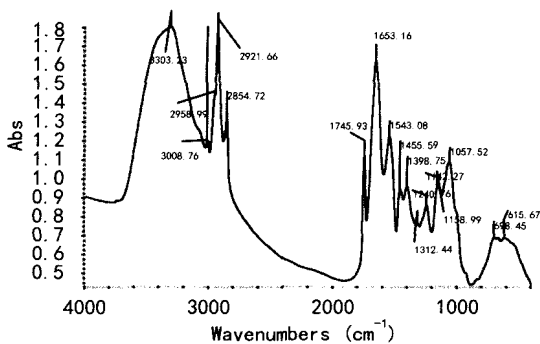


图 4 大豆样品微波前的 IR 谱图

Fig. 4 IR spectra of soybean without microwave

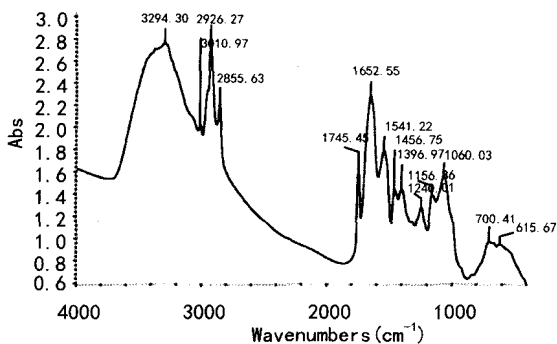


图 5 大豆样品微波后的 IR 谱图

Fig. 5 IR spectra of soybean radiated with microwave

## 4 结论

本实验建立了一种提取植物黄酮的清洁、高效、简便的微波/光波组合新方法,采用平行实验优选法优化微波提取工艺并对机理加以探讨。微波提取工

艺为:称取样品 100 g 粉碎至  $0.022\sim 0.056\text{ mm}$ ,加入 10 mL 的 DMF 调匀,置于光波炉中,微波光波组合方式加热,功率 800W(微波 55%与光波 45%)加热 6 min 后,用 200 mL 乙醇分两次萃取总黄酮,旋干回收乙醇,得总黄酮。

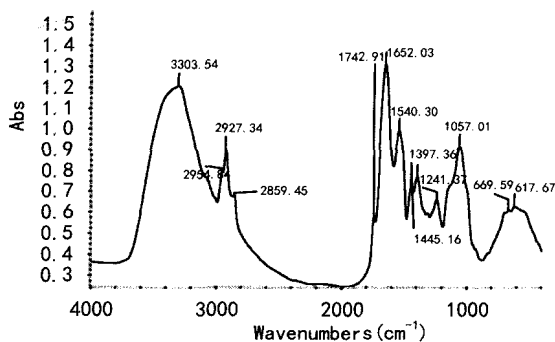


图 6 大豆样品提取后的 IR 谱图

Fig. 6 IR spectra of soybean after extraction

表 3 三种大豆样品羰基的红外相对吸收强度  
Table 3 Comparison of the position and intensity of infrared spectra of three soybean samples

样品	微波前	微波后	提取后			
峰位( $\text{cm}^{-1}$ )	1 058	1 746	1 060	1 745	1 057	1 743
峰强(吸光度 A)	1.075	1.127	1.550	1.690	0.888	0.575
相对峰强比 A/A <sub>0</sub>	1.000	1.048	1.000	1.090	1.000	0.648

运用现代结构测试手段进行微波提取机理研究,并从微波对植物结构的影响上阐明次生代谢产物的微波提取机理。研究表明:次生代谢产物如黄酮在植物细胞液泡中,微波辐照下,极性的黄酮分子高速旋转,破坏了黄酮分子与周围分子的分子间力平衡。液泡中介质沸腾冲破液泡,同时木质素细胞壁中的强极性分子糖类同样在微波下高速旋转,而破裂,从而有利于黄酮分子与组织的分离。

## 参考文献:

- Aedin C, Bryn H, Rosa M. 2000. Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health[J]. *J Sci Food Agric*, **80**:1 044-1 047
- Bai Y(白雁), Bao HJ(鲍红娟), Wang D(王东), et al. 2006. The analysis and identification of chrysanthemums from the different producing areas by IR spectroscopy(不同产地药用菊花红外光谱法的分析与鉴定)[J]. *Chin Trad Pat Med*(中成药), **28**(12):1 721-1 727
- Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, et al. 1993. Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glucoside conjugates, antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets[J]. *J Agric Food*
- (下转第 238 页 Continue on page 238)

- Ohnishi MR. 1991. Discovery of the wild ancestor of common buckwheat[J]. *Fagopyrum*, **11**:5-10
- Ohnishi O, Matsuoka Y. 1996. Search for the wild progenitor of buckwheat II. Taxonomy of *Fagopyrum* (Polygonaceae) species based on morphology, isozymes and cpDNA variability[J]. *Genes and Genetic Systems*, **71**:383-380
- Ohnishi O. 2007. Natural populations of wild ancestor of cultivated common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* ssp. *ancestrale* from the Dongyi river valley-their distribution and allozyme variations[J]. *Advances in Buckwheat Research*:13-18
- Tie J(铁军), Jin S(金山), Bai HY(白海艳), et al. 2005. The interspecific hybridization and identification of F1 hybrids by POD isozyme application in *Aloe*(芦荟属植物种间杂交及其 F1 代 POD 同工酶鉴定)[J]. *Guihaia*(广西植物), **25**(5):449-452
- Wang ZH(王转花), MA WL(马文丽). 1998. The analysis of isoenzyme polymorphism in buckwheat[J]. *J Shanxi Agric Sci* (山西农业科学), **26**(2):24-26
- Yang YJ(杨尧军), Li Y(李毅), Zhang SH(张生华), et al. 2006. Analysis of EST and PER isozyme of populus×jianhumao and its-parents(箭胡毛杨及其亲本酯酶和过氧化物酶的同工酶分析)[J]. *J Gansu Agric Univ*(甘肃农业大学学报), **41**(2):46-50
- Ye NG, Guo GQ. 1992. Classification, origin and evolution of genus *Fagopyrum* in China[J]. *Advances in Buckwheat Research*:19-28
- Zhao G(赵钢), Tang Y(唐宇). 1990. The study of peroxidase isozyme of buckwheat(荞麦过氧化物酶研究)[J]. *Fagopyrum* (荞麦动态), (2):10-15
- Zhang YZ(张以忠), Chen QF(陈庆富). 2008a. Study on peroxidase isozyme of buckwheat(几种荞麦的过氧化物酶同工酶研究)[J]. *Seed*(种子), **27**(1):17-19
- Zhang YZ(张以忠), Chen QF(陈庆富). 2008b. Peroxidase isozyme on sprouting seeds of genus *Fagopyrum*(荞麦属种质资源发芽种子过氧化物酶同工酶研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **28**(4):553-557
- Zhang YZ(张以忠), Chen QF(陈庆富). 2008c. Peroxidase isozyme of young leaves at three-leaf stage of genus *Fagopyrum* plants(荞麦属植物三叶期幼叶过氧化物酶同工酶研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **26**(2):213-217
- Zhang YZ(张以忠), Chen QF(陈庆富). 2008d. Study of glutamate oxaloacetate transaminase isozyme on resources of genus *Fagopyrum*(荞麦属种质资源的谷草转氨酶同工酶研究)[J]. *Seed*(种子), **27**(5):39-42, 46
- Zhang YZ(张以忠), Chen QF(陈庆富). 2008e. Esterase isozymes of young leaves at three-leaf stage of genus *Fagopyrum* plants(荞麦属植物三叶期幼叶酯酶同工酶研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **26**(4):428-432

(上接第 269 页 Continue from page 269)

- Chem*, **41**:1 961-1 967
- Fuan XJ(樊兴君), You JM(尤进茂), Tan GZ(谭干祖), et al. 1998. Progress in microwave organic reaction enhancement chemistry(微波促进有机化学反应研究进展)[J]. *Prog in Chem*(化学进展), **3**:285-295
- Ganglier K, Slag AA. 1990. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by microwave technique[J]. *J Chrom*, **520**:257-262
- Huang J(黄进), Luo Q(罗琼), Li XL(李晓莉), et al. 2004. Hyperglycemia lowering effect of soybean isoflavone(SI) on alloxan-induced diabetic mice(大豆异黄酮的降血糖作用研究)[J]. *Food sci*(食品科学), **25**(1):166-170
- Li XJ(李学坚), Huang HB(黄海滨). 2000. Extraction technology research of clove oil by microwave(微波浸提技术提取丁香油的研究)[J]. *Guangxi Trad Chin Med*(广西中医药), **5**(3):49-50
- Min JL(闵嘉霖), Zeng AW(曾爱武), Yuan XG(袁希钢), et al. 2006. Extraction of soybean isoflavone(大豆异黄酮提取)[J]. *Mach Cereals Oil Food Pro*(粮油加工与食品机械), **1**:47-52
- Ulchins AM, Mclver IE, Johnston CS, et al. 2005. Soy isoflavone and ascorbic acid supplement alone or in combination minimally affect plasma lipid peroxides in healthy postmenopausal women[J]. *J Am Diet Assoc*, **105**:1 134-1 137
- Wang LS(王林山), Chen YY(陈月英). 2004. Research progress of the soy isoflavone(大豆异黄酮的研究进展)[J]. *Food Res Dev*(食品研究与开发), **25**(5):14-17
- Xie MJ(谢明杰), Song M(宋明), Zou CX(邹翠霞), et al. 2004a. Extraction on soybean isoflavone by ultrasonic wave(超声波提取大豆异黄酮)[J]. *Soybean Sci*(大豆科学), **23**(1):74-76
- Xie MJ(谢明杰), Xu CH(徐春华), Gao S(高爽), et al. 2004b. Acid hydrolysis condition of soybean isoflavone glucoside(酸法水解大豆异黄酮的研究)[J]. *J Shenyang Agric Univ*(沈阳农业大学学报), **35**(1):36-41
- Xie MJ(谢明杰), Shi SS(石姗姗), Lu MC(卢明春), et al. 2004c. Enzymolysis condition of soybean isoflavone glucoside(酶法水解大豆异黄酮)[J]. *Food Ferm Ind*(食品与发酵工业), **30**(3):21-24
- Yang FQ, Ma Y, Ito Y. 2001. Separation and purification of isoflavones from a crude soybean extract by high-speed counter-current chromatography[J]. *J Chromatogr A*, **928**(2):163-170