

大豆子粒中异黄酮含量的快速测定^{*}

宁海龙¹ 金双义² 王继安¹ 孙德生¹ 李文滨^{1*} 洛育¹
李修平¹ 鲁振明³ 朱秀清³ 孙树坤³

(1. 东北农业大学大豆研究所, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省庆安县农业科学研究所, 庆安 152400;
3. 国家大豆工程中心, 哈尔滨 150050)

摘要 建立了一个快速测定大豆异黄酮含量的方法, 并用该法测定了来自东北三省的 50 份大豆材料子粒中的异黄酮含量。该体系的最佳提取条件为: 不脱脂, 80% 的乙醇浓度, 不小于 20: 1 的物料比(溶剂: 原料), 浸提 1 小时, 浸提温度不超过 50℃。东北三省的 50 份大豆材料异黄酮含量的平均数为 0.285%, 品种间变异幅度为 0.194%—0.408%, 主要分布于 0.235% 到 0.295% 之间, 其品种数占全部品种数的 56%。

关键词 大豆; 异黄酮含量; 测定; 种质资源

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2004)01-0045-05

大豆异黄酮(soybean isflavones)是大豆体内特别是种子中积累的一类次生代谢产物, 已报道有 12 种组分, 分为游离的甙元(aglycon)和结合型的糖甙(glucoside)两类, 主要活性成分为两种含量较高的甙元成分: 金雀异黄素(genisten)和大豆素(daidzein)。早期发现它是引起大豆食品苦涩味的主要因子之一, 但近几年证实它又具有特殊的生物效能, 如: 能有效的限制病原微生物的生长, 抑制人和动物肿瘤细胞的繁殖, 诱导大豆结瘤等重要的活性, 其广泛的应用前景受到人们的普遍关注^[16]。

有关大豆异黄酮含量的测定方法已有较多研究^[9,18], 所用提取和检测方法各不相同, 测定效果都不同, 并且工序复杂, 不适合育种工作中大量材料的筛选。

本文目的是探求一种适合育种材料筛选的简单易行、快速准确的测定大豆异黄酮的方法, 并应用该法进行种质资源的筛选。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂

生产)、UV-2120 PC 型紫外分光光度计(上海 UNICO 公司生产)、5ml 离心管、移液器。

1.2 试剂

金雀异黄素标准品, 含量 99.999%, Sigma 公司; 无水乙醇(分析醇, 哈尔滨市新春化工厂)、蒸馏水。

1.3 标准品溶液的配制

称取金雀异黄素标准品 5.0mg, 置于 25ml 容量瓶中, 以 80% 乙醇溶解, 并定容至刻度, 摇匀。

1.4 异黄酮的提取及测定

取一份(0.1g)脱脂或未脱脂豆粉, 置于 5ml 离心管中, 加入一定体积(ml)浓度为 20%—100% 的乙醇溶液, 30—70℃ 下提取一小时后离心 10 分钟, 倒出上清液, 再用同体积乙醇溶液浸提, 合并两次滤液。上机比色, 记录吸光值。

1.5 标准品及试样紫外吸收峰的扫描比较

将标准品及试样溶液在 UNICO 光谱仪上扫描 200—400nm 处的吸收情况, 结果发现标准品及试样的最大吸收峰都在 260nm, 且最大吸收峰周围干扰较少。

1.6 标准曲线制作

精确吸取 0.05、0.10、0.15、0.20、0.30、0.40ml

* 收稿日期: 2003-07-02

项目来源: 国家“十五”科技攻关项目(2000BA501A02)。

** 通讯作者

作者简介: 宁海龙(1975—), 男, 讲师, 主要从事大豆遗传育种及生理生态教学研究。

金雀异黄酮标准品溶液至于 10ml 容量瓶中, 用 80%乙醇定容至刻度, 摇匀。以 80%乙醇作为空白对照, 在 260nm 处测得吸光度, 以测得的吸光度与

纯品量得出校正直线回归方程为 $y = 0.0557 + 8.0177x$, $R^2 = 0.9970$ (图 1)。

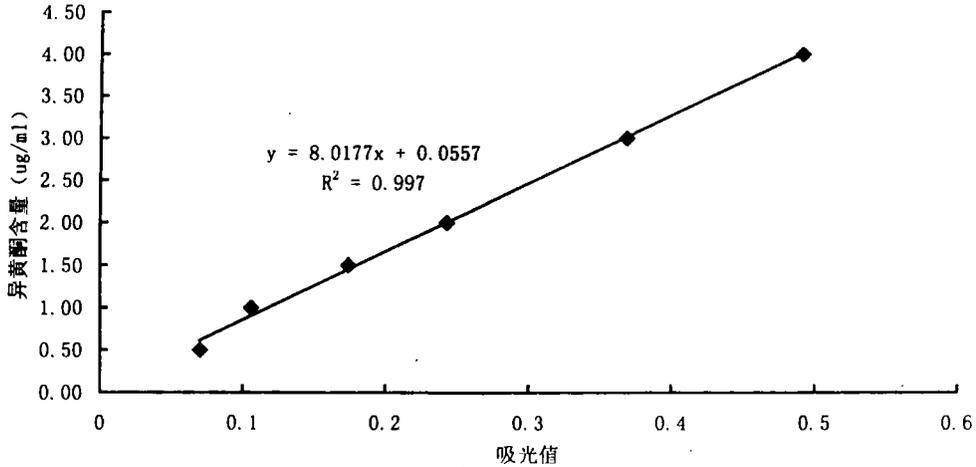


图 1 异黄酮含量与吸光度的关系

Fig. 1 Relationship between absorbency with isoflavone content

1.7 材料

从东北农业大学大豆研究所种质资源材料中随机选取成熟度完好的 50 个品种(系), 测定异黄酮含量, 每样品测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 异黄酮测定条件的确定

2.1.1 脱脂对大豆异黄酮含量的影响

取一定量的豆粉, 加到滤纸包中, 放入索氏提取器, 用石油醚脱脂 2.5h, 65℃。取 0.1g 脱脂豆粉, 加入 80%的乙醇, 物料比(溶剂: 原料)为 20: 1, 在 50℃下提取 1h 后离心, 倒出浸提液, 再用相同体积的溶剂浸提滤饼, 合并两次浸提液, 上机比色, 测定异黄酮含量。

取 0.1g 未脱脂豆粉, 加入 80%的乙醇, 物料比(溶剂: 原料)为 20: 1, 在 50℃下提取 1h 后离心, 倒出浸提液, 再用相同体积的溶剂浸提滤饼, 合并两次浸提液, 上机比色, 测定异黄酮含量。

对两种方法测定的异黄酮含量进行 t 测验, t 值未达到 0.05 显著水平, 即说明脱脂与否对异黄酮提取量无明显影响。在以下的实验中均使用未脱脂的豆粉。

2.1.2 最佳乙醇浓度的确定

每 0.1g 豆粉分别加入 20%、30%、40%、60%、80%、100%的乙醇, 物料比为 20: 1, 在 50℃下提取 1h 后离心, 倒出浸提液, 再用相同体积的溶剂浸提滤饼, 合并两次浸提液, 上机比色测定异黄酮含量(图 2)。

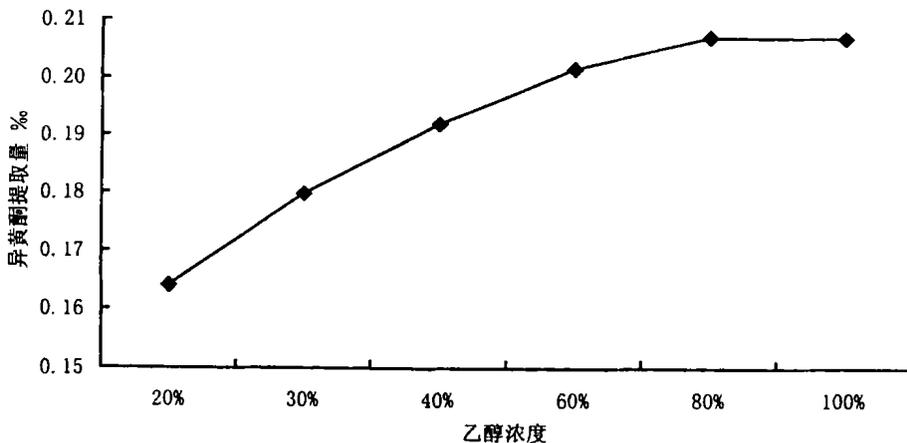


图 2 不同乙醇浓度下的异黄酮提取量

Fig. 2 Abstracting content from soybean by different alcohol consistences

从图 2 可以看出异黄酮提取量随着乙醇浓度的升高提取效率提高, 但当乙醇浓度达到 80% 时的提取效率最高, 其后随着乙醇浓度的提高反而稍有降低。从而得出以 80% 浓度的乙醇为最佳。

2.1.3 最佳物料比的确定

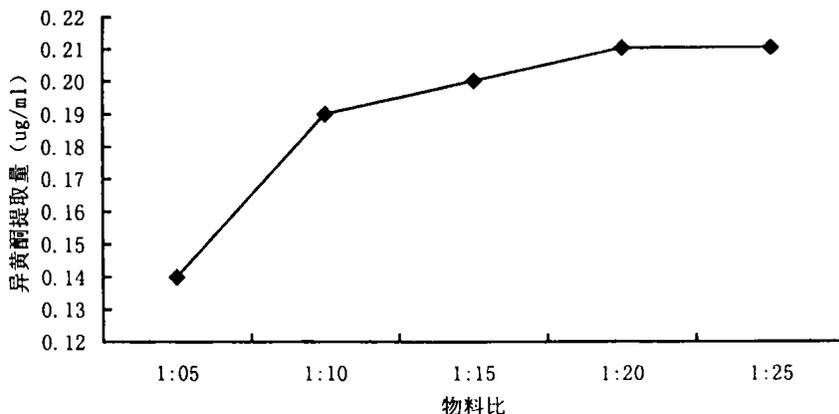


图 3 不同物料比下的异黄酮提取量

Fig. 3 Abstracting content from soybean by different ratio of solute to impregnant

如图 3 可以看出, 随着溶剂用量的增加, 异黄酮的得率增加, 但当物料比增加到 20:1 后, 得率曲线上升的趋势变缓趋于水平, 可见此时原料中含有的异黄酮基本全部被提取出来, 所以物料比以 20:1 为宜。

每 0.1g 豆粉分别以物料比为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 加入 80% 的乙醇, 在 50℃ 下提取 1h 后, 离心, 倒出浸提液, 再用相同体积的溶剂浸提, 合并两次浸提液, 测定异黄酮含量。

2.1.4 最佳温度的确定

每 0.1g 豆粉, 加入 80% 的乙醇, 物料比为 20:1, 分别在 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 下提取 1 小时, 离心, 倒出浸提液, 再用相同体积的溶剂浸提, 合并两次浸提液, 测定异黄酮含量(图 4)。

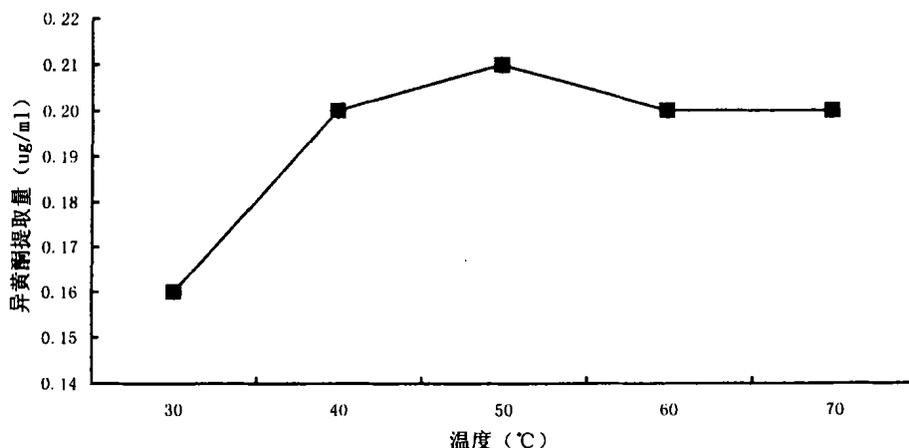


图 4 不同提取温度时的异黄酮提取量

Fig. 4 Abstracting content from soybean under different temperature

从图 4 中可以看出, 随温度升高, 异黄酮提取量增大, 当温度达 50℃ 时提取量最大, 以后随温度的升高, 提取量有所降低, 可知最佳温度为 50℃。

2.1.5 最佳提取时间的确定

每 0.1g 豆粉加入 80% 乙醇, 物料比 20:1 温度 50℃, 时间分别为 0.5 小时、1 小时、1.5 小时、2 小时, 再用相同体积的溶剂浸提, 合并两次浸提液, 测

定异黄酮含量(图 5)。

从图中可以看出, 1 小时时异黄酮得率最高, 提取时间不足 1 小时, 不能将原料中含有的异黄酮全部提取出来; 超过 1 小时, 异黄酮得率也降低。原因可能是不稳定, 随时间的延长而逐步降解。所以提取的时间不能太长, 就本实验来说, 以 1 小时为宜。

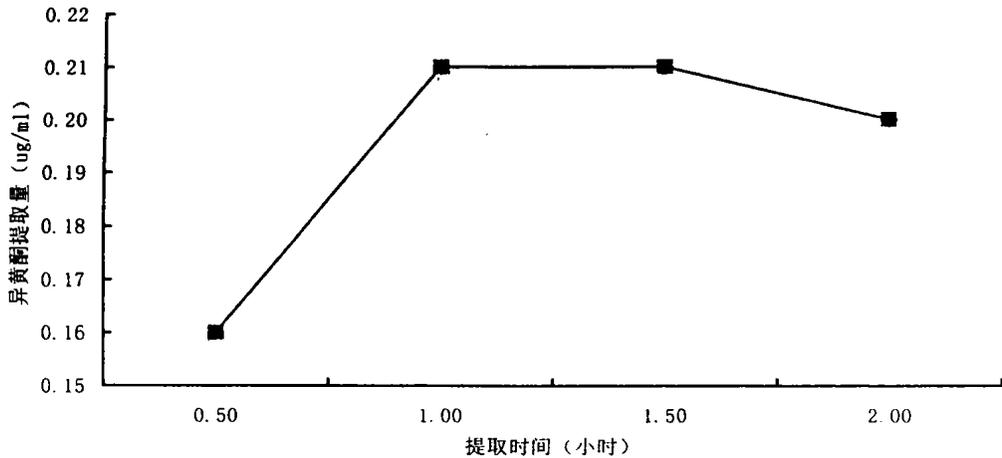


图5 不同提取时间下的异黄酮提取量

Fig. 5 Abstracting content from soybean under different time

2.2 大豆种质资源异黄酮含量的分析

采用以上提取方法分析来自东北三省的50份大豆材料,异黄酮含量的平均数为0.285%,品种间

变异幅度为0.194%~0.408%。通过频数分析(图6),可看出异黄酮含量主要介于0.235到0.295之间,其品种数占全部品种数的56%。

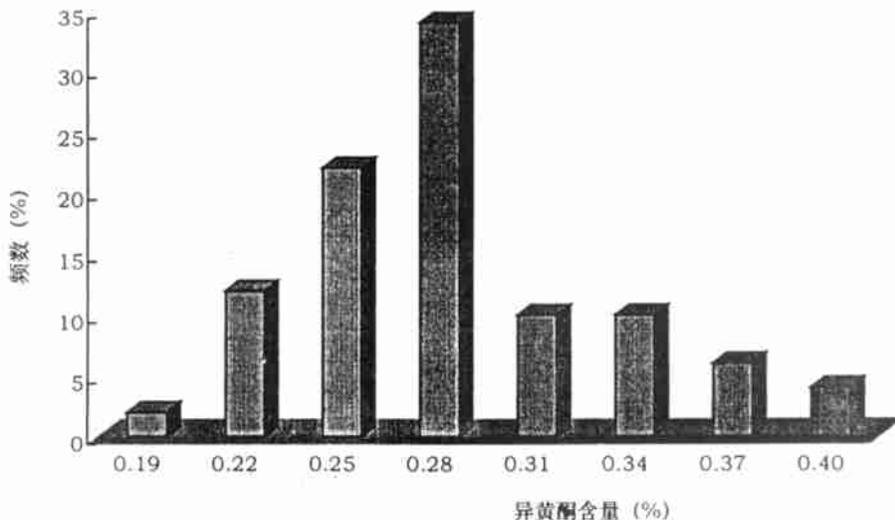


图6 50份大豆品种异黄酮含量的频数分布

Fig. 6 Frequency distribution of isoflavone content of 50 soybean varieties

3 讨论

大豆异黄酮测定包括两部分内容,即提取和检测。不同测定方法的提取工艺和检测方法各不相同,提取主要是通过乙醇-水或甲醇-水体系提取,不同研究者报道的提取条件不同,提取效果不同。检测技术目前采用高效液相色谱技术测定的较多^[9-18],也有采用紫外分光光度法、薄板层析法测定也有报道^[7,18]。高效液相色谱法检测精度高,还可将异黄酮的各组分分开,但样品处理复杂,检测速度慢,仪器费用高;紫外分光光度法测定精度较高,样品处理相对简单,检测速度较快,仪器费用较低。

薄板层析法检测精度低。本实验根据育种材料选择的需要,建立一种快速的测定方法。该方法测定速度较快,适合大批量样品的检测,成本较低。

在12种异黄酮组分中,金雀异黄素是主要组分,其占大豆异黄酮总含量的比例是恒定的,约2%~3%^[8]。在本实验中,以金雀异黄素作为标准品,其测定结果虽然比实际大豆异黄酮总含量低,但按其比例计算,仍能够算出总异黄酮含量。通过此法进行品种资源筛选,其结果仍具有可比较的意义。

参 考 文 献

- 1 蔡秋声. 大豆异黄酮生理功能及其开发利用[J]. 粮食与油脂, 1999, 2: 31-35.

- 2 刘志胜, 李里特, 辰巳英三. 大豆异黄酮及其生理功能研究进展 [J]. 食品工业科技, 2000, 21(1): 78-80.
- 3 毛峻琴, 宓鹤鸣. 大豆异黄酮的研究进展 [J]. 中草药, 2000, 31(1): 61-64.
- 4 彭向雷, 王蕊, 王悦. 大豆异黄酮研究进展 (综述) [J]. 中国食品卫生杂志, 1998, 10(3): 38-41.
- 5 孙君明, 丁安林, 张艳. 大豆异黄酮的研究概况 [J]. 大豆科学, 1995, 14(2): 160-166.
- 6 王春娥, 刘叔义. 大豆异黄酮的成分、含量及特性 [J]. 食品科学, 1998, 19(4): 39-43.
- 7 何继春, 卫巍. 大豆异黄酮检测及四标样快速测定法研究 [J]. 粮食与油脂, 2001, (7): 46-47.
- 8 崔洪斌. 大豆中具生理活性物质的研究与开发 [J]. 大豆通报, 1998, (6): 19-26.
- 9 黄宏南, 陈宏靖. 大豆发酵液中大豆异黄酮甙元高效液相色谱测定方法 [J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(2): 25-26.
- 10 江和源, 吕飞杰, 郇建祥等. 高效液相色谱法测定大豆中异黄酮的含量 [J]. 食品科学, 2000, 21(4): 56-58.
- 11 鞠兴荣, 袁建, 汪海峰. 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.
- 12 孙君明, 丁安林, 常汝镇等. 中国大豆异黄酮含量的初步研究 [J]. 中国粮油学报, 1995, 10(4): 51-54.
- 13 孙君明, 丁安林. 大豆种子发育过程中异黄酮的积累 [J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(1): 10-13.
- 14 孙君明, 丁安林. 地理环境对大豆种子中异黄酮积累的影响趋势 [J]. 大豆科学, 1997, 16(4): 288-303.
- 15 孙君明, 丁安林, 东惠茹. 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(1): 15-20.
- 16 孙君明, 丁安林, 沈黎明. 光照对大豆幼苗组织中异黄酮含量和分布的影响 [J]. 植物学报, 1998, 40(11): 1015-1021.
- 17 孙梅君, 骆炼, 史长颖等. 中国大豆制品中异黄酮含量测定和分析研究 [J]. 食品与发酵工业, 1997, 26(5): 14-18.
- 18 张玉梅, 孙学斌, 高旭年等. 紫外分光光度法测定大豆总异黄酮的含量 [J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(4): 7-9.

A FAST METHOD FOR DETERMINING ISOFLAVONE CONTENT IN SOYBEAN SEED

Ning Hailong¹ Wang Jian¹ Sun Desheng¹ Li Wenbin¹ Jin Shuangyi² Luo Yu¹
Li Xiuping¹ Lu Zhenming³ Zhu Xiuqing³ Sun Shukun³

(1. Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Qing-an Agronomy Science Research Institute, Qing-an 152400; 3. National Soybean Engineering Center, Harbin 150050)

Abstract A fast method for determining isoflavone content in soybean seed was established and 50 soybean varieties from northeast China were measured by the new method. The optimum condition of the system include 80% of alcohol density, no less than 20:1 ratio of solute to impregnant, 1hr of time, no more than 50 °C. By analysis of the isoflavone content of 50 varieties the average of the isoflavone content was 0.285%, the variance range from 0.194% to 0.408%, 56% of all varieties distributed from 0.235% to 0.295%.

Key words Soybean; Isoflavone content; Determination; Varieties source