

# 大豆荚壳中类黄酮提取工艺及其抑杀线虫活性的研究

赵卫星<sup>1</sup>, 孙治强<sup>1</sup>, 高玉红<sup>2</sup>, 张楠<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学林学院园艺学院, 郑州 450002; 2. 郑州职业技术学院, 郑州 450121)

**摘要** 阐述从大豆荚壳中提取类黄酮的工艺及其抑杀根结线虫的应用效果。通过正交设计, 确定了大豆类黄酮的最佳提取工艺条件为乙醇浓度 80%, 提取温度 70℃, 乙醇与大豆荚壳 1:10, 回流提取 24 h, 提取率可达 8.58%, 显著高于次佳工艺。对根结线虫抑杀效果的测定表明: 类黄酮粗提取物对南方根结线虫 J2 有很强的毒杀效果, 且随使用浓度增大而增强,  $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  类黄酮提取物处理, 线虫的校正死亡率可达 50% 以上; 对虫卵孵化有一定的抑制作用, 但孵化抑制率都在 50% 以下。

**关键词** 大豆荚壳; 类黄酮; 提取工艺; 杀线虫活性

**中图分类号** S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)03-0373-04

## STUDIES ON THE EXTRACTION TECHNOLOGICAL CONDITIONS OF TOTAL FLAVONOIDS IN SOYBEAN HULL AND ITS NEMATICIDAL ACTIVITY

ZHAO Wei-xing<sup>1</sup>, SUN Zhi-qiang<sup>1</sup>, GAO Yu-hong<sup>2</sup>, ZHANG Nan<sup>1</sup>

(1. College of Forestry and Horticulture, Henan Agriculture University; Zhengzhou 450002; 2. Zhengzhou Vocational and Technological College, Zhengzhou 450121)

**Abstract** The optimal extracting technological conditions of flavonoids from soybean hull by orthogonal plan method and its nematicidal activity were studied. The result indicated that the conditions of 70℃, 10:1 of 80% ethanol to soybean hull, heating and refluxing for 24 h were optimum, the extractive ratio could be up to 8.58% and was higher than Hypo-optimal conditions significantly; The total flavonoids of the extractive solution had high nematicidal activity against the second juvenile (J2), and with the increasing of concentration, the nematicidal activity was improved, more than 50% of J2 could be killed with the treatment of  $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  total flavonoids extraction. In addition, it also had inhibition on eggs hatch to some extent, but inhibition rate of eggs hatch was below 50%.

**Key words** Soybean hull; Total flavonoids; Extracting technological conditions; Nematicidal activity

类黄酮 (flavonoids) 是植物光合作用产生的一类重要的天然有机化合物, 广泛分布于植物界<sup>[1]</sup>。具有多种多样的生物活性和药理作用, 许多流行病学、免疫学、动物体内外实验等研究表明, 类黄酮具

收稿日期: 2006-11-14

基金项目: 河南省重大科技攻关项目 (0322010900)

作者简介: 赵卫星 (1978-), 在读博士, 研究方向设施园艺及蔬菜无公害生产。

通讯作者: 孙治强教授, 博士生导师。E-mail: sunzq@public.zz.ha.cn

有弱雌性激素活性、抗氧化活性、抗菌消炎抗病毒等<sup>[2,3]</sup>。具有新的生物活性天然产物的发现激励着人们探索和开发高效、低毒的植物源农药,用以病虫害的防治,类黄酮作为杀线虫活性的物质已被广泛研究和利用<sup>[4,5]</sup>。

目前诸多报道大豆类黄酮的获得主要从大豆粒中提取,对大豆荚壳的利用报道较少。大豆荚壳是大豆子实脱壳后的副产品,资源丰富,本文以大豆荚壳为类黄酮的提取材料,采用正交设计法,确定了类黄酮的最佳工艺条件,并对其杀线虫活性进行了测

定。为大豆类黄酮的研究开发及其防治根结线虫提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

豆皮荚壳:采自“地神 22”大豆品种,从农户获得;芦丁标准品:Fluka 进口分装;乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为 AR 级。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 类黄酮化合物的提取

##### 1.2.1.1 芦丁浓度—吸光值工作曲线的测定

表1 标准芦丁浓度——吸光度值

Table 1 Standard Rutin concentration——absorbance value						
标样编号 Sample number	1	2	3	4	5	6
芦丁浓度 $Y/g \cdot /L^{-1}$ Rutin concentration	0	0.012448	0.024896	0.049792	0.074688	0.099584
吸光度 $A$ Absorbance	0	0.116	0.243	0.484	0.736	1.18

按照文献<sup>[6]</sup>的方法,称取芦丁 0.1556 g 溶于一定量的质量分数为 70% 乙醇中,微热促溶,定容至 500 mL,混合均匀,得芦丁标准溶液。分别取上述芦丁标准溶液 0、1、2、4、6、8 mL 于 6 只 25 mL 容量瓶中,用质量分数为 30% 乙醇补充至 12.5 mL,加入 0.7 mL 亚硝酸钠(1: 20),摇匀放置 5 min 后,加入 0.7 mL 硝酸铝(1: 10),6 min 后,再加入 5 mL 1 mol/L 氢氧化钠混合均匀,用质量分数为 30% 乙醇稀释至刻度,10 min 后于波长 500 nm 处比色测定,以含芦丁标准液 0 mL 的试液为空白参比。其结果见表 1。

用 Mirosoft Excel 做最小二乘法的线性回归得芦丁浓度 Y 与吸光值 A 的工作曲线为:  $Y = 0.0911A$ ,相关系数  $r = 0.9776$

1.2.1.2 大豆荚壳类黄酮提取工艺 称取 10 g 大豆荚壳粗粉 9 份,按正交试验表所列条件,采用乙醇回流提取,石油醚脱脂,以提取温度、乙醇浓度、液料比、提取时间为 4 个考察因素,分别设立 3 个水平,以类黄酮的提取率为试验指标,选取  $L_9(3^4)$  正交表的实验法(如表 2)进行提取工艺的优选。与芦丁标准溶液同法显色、测吸光度值。按照以下公式计算大豆荚壳类黄酮提取率( $P\%$ )。

$P\% = (0.0911A \times 25 \times 100/1000 M) \times 100\%$   
式中, $A$  为吸光值; $M$  为大豆荚壳粉的质量。

表2 各因素水平表

Table 2    Level values of each factor				
水   平 Level	因素 Factors			
	A 提取温度/℃	B 乙醇浓度/%	C 液料比	D 提取时间/h
	Temperature	Ethanol	Ratio	Time
	concentration			
1	30	99.5	1: 10	6
2	50	80	1: 20	12
3	70	60	1: 30	24

准确称取干燥大豆荚壳 500 g,在最佳提取条件下提取,验证提取率,并把提取物浓缩,喷雾干燥成粉末。将获得的干粉用自来水配制成  $50 \mu g \cdot mg^{-1}$ 、 $100 \mu g \cdot mg^{-1}$ 、 $150 \mu g \cdot mg^{-1}$ 、 $200 \mu g \cdot mg^{-1}$  的溶液,备用。

1.2.2 南方根结线虫二龄幼虫及虫卵悬浮液的配制 挑取人工接种南方根结线虫的番茄根,用组织捣碎机打碎,依次过 200 目、325 目、500 目线虫标准筛,用无菌水冲洗 500 目筛上的虫卵,配制成卵悬浮液(100 个卵/mL)。另置部分卵于无菌水中孵化,取第 2 d 孵化出的活幼虫(2 龄幼虫,简称 J2)供测试。

1.2.3 抑杀线虫效果的测定

1.2.3.1 对 J2 毒杀效果的测定 准确量取 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、150  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  的类黄酮溶液 1 mL,用 J2 悬浮液(100 头线虫/mL)稀释 2.5 倍,分别于 24 h、48 h 后观察 J2 的存活情况,统计线虫的存活数、死亡数,计算校正死亡率,建立线虫校正死亡率对数与类黄酮剂量之间的回归方程。以清水为对照,每个处理 3 次重复,线虫死亡记数标准参照文献<sup>[7]</sup>,即线虫僵直不动的为死虫,呈弯曲蠕动状态为活虫。杀线虫活性的评价标准按 Chandravadana 等的方法进行<sup>[8]</sup>。

线虫校正死亡率(%) = (处理死亡线虫数 - 对照死亡线虫数) / (1 - 对照死亡线虫数) × 100

1.2.3.2 对线虫卵孵化的影响 准确量取 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、150  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  的类黄酮溶液 1 mL,用悬浮液(100 个卵/mL)稀释 2.5 倍,在相对湿度 80% ~ 90%,温度 24 ~ 26  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养,以清水为对照,每个处理 3 次重复。处理后每 3 d 调查一次,记录线虫孵化数,计算线虫孵化抑制率<sup>[9]</sup>。

线虫孵化抑制率(%) = (1 - 处理线虫孵化数量 / 对照线虫孵化数量) × 100

2 结果分析

2.1 大豆类黄酮提取工艺试验

乙醇回流提取大豆荚壳类黄酮化合物的直观分析见表 3,可以看出,影响提取率的因素顺序为:A >

表 3 大豆荚壳类黄酮提取正交实验直观分析表

Table 3 Analyse on results of flavonoids extracting from soybean hull by orthogonal plan					
实验号 Number	A	B	C	D	提取率/% extractive ratio
1	1	1	1	1	6.10
2	1	2	2	2	7.14
3	1	3	3	3	7.56
4	2	1	2	3	3.61
5	2	2	3	1	4.12
6	2	3	1	2	4.84
7	3	1	3	2	7.63
8	3	2	1	3	8.92
9	3	3	2	1	6.17
I	6.93	5.77	6.62	5.47	
II	4.18	6.73	5.64	6.54	
III	7.57	6.18	6.43	6.69	
极差 R	3.39	1.96	0.98	1.22	

B > D > C(提取温度 > 乙醇浓度 > 提取时间 > 液料比),最佳提取工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,即 70 $^{\circ}\text{C}$  条件下,10 倍量 80% 乙醇回流提取 24 h;最佳提取工艺的验证结果见表 4,提取率可达为 8.58%,显著高于次佳工艺的提取率。

表 4 最佳工艺的验证结果

Table 4 Validating results of the optimal extracting technological conditions			
	验证样品 Sample number	类黄酮提取率/% extractive ratio	均值/% Mean
最佳工艺 Optimal conditions	1	9.05	8.58 a
	2	8.52	
	3	8.15	
次佳工艺 Hypo-optimal conditions	1	6.89	7.21 b
	2	7.30	
	3	7.44	

2.2 大豆类黄酮提取物对南方根结线虫抑杀效果

2.2.1 对南方根结线虫 J2 的毒杀效果 不同浓度大豆荚壳类黄酮提取物的溶液用 J2 悬浮液稀释 2.5 倍后,对南方根结线虫 J2 毒杀效果及活性评价结果见表 5,处理 24 h、48 h 内,随试验浓度的增加,杀线虫效果逐渐增加;试验浓度 1.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  处理 24 h、48 h,线虫的校正死亡率为 57.5%、62.8%,杀虫活性评价结果为“+++”;试验浓度 2.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  处理 24h、48h,线虫的校正死亡率为 87.7%、89.2%,杀虫活性评价结果为“++++”。表明大豆荚壳类黄酮提取物对南方根结线虫 J2 有很强的毒杀效果。

表 5 大豆荚壳类黄酮提取物对南方根结线虫 J2 毒杀效果

Table 5 Nematicidal effect of soybean isoflavone on J2 of <i>M. incognita</i> %			
试验浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) Concentration	处理时间/h Duration		
	24	48	
0.5	9.15 -	15.12 +	
1.0	35.0 ++	37.8 ++	
1.5	57.5 +++	62.8 +++	
2.0	87.7 +++++	89.2 +++++	

2.2.2 对南方根结线虫虫卵孵化的影响 不同浓度大豆荚壳类黄酮提取物的溶液用 J2 悬浮液稀释 2.5 倍后,对南方根结线虫虫卵孵化的影响(表 6)。各个处理时间内,随试验浓度的增加,对线虫虫卵的孵化的抑制率逐渐增加;试验浓度 2.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,处理 3、6、9 d 对虫卵孵化抑制率分别为

42.2%、43.9%、48.5%,抑制率小于50%,表明大豆荚壳类黄酮提取物对南方根结线虫虫卵的孵化有一定的抑制作用。

表6 大豆荚壳类黄酮提取物对南方根结线虫虫卵孵化的影响

Table 6 Effect of soybean isoflavone on hatch of <i>M. incognita</i> eggs%			
试验浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) Concentration	处理时间/d Duration		
	3	6	9
0.5	11.4	13.6	15.6
1.0	12.3	13.5	47.3
1.5	26.7	38.7	44.6
2.0	42.2	43.9	48.5

### 3 结论与讨论

3.1 经正交设计和极差分析,确定了大豆类黄酮的最佳提取工艺条件为乙醇浓度80%,提取温度70℃,乙醇与大豆荚壳10:1,回流提取24h,提取率可达8.58%,显著高于次佳工艺的提取率。

3.2 大豆荚壳类黄酮提取物对南方根结线虫J2有很强的毒杀效果,随试验浓度的增加,杀虫效果逐渐增强,1.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 类黄酮提取物处理,线虫的校正死亡率可达50%以上;对虫卵孵化有一定的抑制作用,随试验浓度的增加,对线虫虫卵孵化抑制效

果逐渐增强,但孵化抑制率都在50%以下。

3.3 大豆荚壳类黄酮粗提物含有大豆异黄酮和黄酮等化合物,进一步的分离提取,进行杀线虫活性的测定,筛选出高纯度杀线虫活性的类黄酮化合物,开发和合成新型的植物源杀线剂还有待深入研究。

### 参 考 文 献

[1] 欧阳平,张高勇,康保安. 类黄酮提取的基本原理、影响因素和传统方法[J]. 中国食品添加剂,2003,54-57.

[2] 蒋柳云,刘玉明. 黄酮类化合物抗肿瘤活性的构效关系研究[J]. 计算机与应用化学,2005,22(4):265-268.

[3] 刘成伦,唐德容. 黄酮类化合物抗氧化性质的研究进展[J]. 食品研究与开发,2006,27(5):158-160.

[4] 文艳华. 三尖杉对植物寄生线虫作用的研究[D]. 华南农业大学博士论文,2001.

[5] Birch A.,NicholasE.,Robertson W M. Plant products to control plant parasitic nematodes [J]. Pestic Science, 1993, 39: 141-145.

[6] 刘本国,朱永义. 苦荞中生物类黄酮提取工艺的研究[J]. 粮食与饲料工业,2004,4:23-25.

[7] 蔡秋锦,罗婉珍,陈长雄,等. 植物性杀线剂的提取与毒杀效果[J]. 福建林业学报,1998,18(4):291-293.

[8] Chandravadana M V,Eugene S,Nidiry J,et al,Nematicidal activity of some plant extract[J]. India J Nematol,1996,26(2):148-151.

[9] 安玉兴. 植物杀线虫活性及作用机理研究[D]. 华南农业大学博士论文,2003.

(上接372页)

[7] 郭世俭,宋会鸣,朱丹华,等. 烯效唑对大豆农艺性状的影响[J]. 植物保护,1996,1:39-41.

[8] 滕康开,蔡世舫,王五洲. 大豆喷施烯效唑的生物学效应及增产作用[J]. 安徽农业科学,2002,30(5):694-696.

[9] 杨文钰,于振文,余松烈,等. 烯效唑干拌种对小麦的增产作用[J]. 作物学报,2004,30(5):502-506.

[10] 董钻. 大豆产量生理[M]. 北京:中国农业出版社,2000:25-26.

[11] 熊庆蛾. 植物生理实验教程[M]. 成都:四川科技出版社,2003:81-83.

[12] 杨文钰,樊高琼,任万军,等. 烯效唑干拌种对小麦根叶生理功能的影响[J]. 中国农业科学,2005,38(7):1339-1345.

[13] 孙治安,郭保民,裴桂英. 夏大豆化控时间和剂量研究初报[J]. 大豆通报,2002,4:6-7.

[14] 苗以农,朱长甫,石连旋,等. 从大豆株型结构和生理生化特点看选育超高产品种的趋势[J]. 大豆科学,1997,16(4):334-338.

[15] 游明安,盖钧镹,吴晓春,等. 大豆产量空间分布特性的初步研究[J]. 大豆科学,1993,12(1):64-69.

[16] 苗以农,朱长甫,石连旋,等. 从大豆产量形成生理特点探索特异高产株型的创新[J]. 大豆科学,1999,18(4):342-346.