

紫外辐射对大豆异黄酮含量变化的影响

李先佳, 宋清焕, 任丽平

(漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

摘要:研究了 UV-B 强度增加对大豆异黄酮含量变化的影响, 建立高效液相色谱检测方法用于大豆异黄酮的检测。大豆植株经不同辐照度 UV-B 辐射后, 收获成熟籽粒, 超声波振荡法提取大豆异黄酮, 采用 BDS Hypersil C18 柱, 以含甲醇:0.4% 磷酸(30:70, v/v)洗脱, DAD254 nm 检测, 内标法定量。结果显示大豆在 $180 \text{ mw} \cdot \text{m}^{-2}$ UV-B 处理后出现了不同程度的伤害, 大豆异黄酮含量明显降低, 其中 Daidzin、Glycitin、Genistin 和 Daidzein 含量分别比对照降低 4.5%、8.6%、1.1% 和 11.4%, 且具有较好的相关性。

关键词:UV-B 辐射; 大豆异黄酮; 高效液相色谱法

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)02-0357-03

Enhanced Ultraviolet-B Radiation Reduced Isoflavones Contents in Soybean

LI Xian-jia, SONG Qing-huan, REN Li-ping

(Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan, China)

Abstract: The effect of enhanced ultraviolet radiation (UV-B) on soybean isoflavone content was investigated, a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of soybean isoflavones was presented. Soybean plants were treated with enhanced UV-B till mature. The harvested soybean seeds were extracted by ultrasonic assisting and then separated on BDS Hypersil C18 column and methanol-0.4% phosphoric acid solution (30:70, by volum). The elute was detected by a UV detector at 254 nm. Results showed the $180 \text{ mw} \cdot \text{m}^{-2}$ UV-B treatment significantly affects soybean isoflavones, Daidzin, Glycitin, Genistin and Daidzein decreased by 4.5%, 8.6%, 1.1% and 11.4%, respectively. The increase of UV-B treatment and the decrease of isoflavones content had good linearity.

Key words: UV-B radiation; Soybean isoflavones; HPLC

现代工业的迅速发展, 有害活性气体的大量排放, 严重地破坏了大气平流层中的臭氧, 过去 20 年中, 全球范围内的臭氧浓度减少了 2%~3%, 南极地区减少了 50%^[1], 据预测, 在今后 60 年内, 大气臭氧浓度将减少 2%~10%。太阳紫外光是波长在 200~380 nm 之间的太阳光线, 包括三部分: UV-A (320~390 nm), UV-B (280~320 nm) 及 UV-C (小于 280 nm), 近年来的研究发现, 其中的 UV-B 辐射增加对植物的生长发育、生理生化过程等能产生不同程度的影响^[2-4]。以大豆异黄酮含量变化来探讨 UV-B 增加对作物影响的机理, 并为臭氧层减薄对我国大田作物生产的影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 田间试验设计

大豆(豫豆 23 号)经消毒和催芽后于 2008 年 7

月 30 日在漯河农科院试验田条播种植, 土壤为黄绵土, 中上等水肥条件, 常规管理, 8 月初出苗, 间苗并保持豆苗间距均匀, 同时开始 UV-B 辐射, 每天 9:00~15:00 辐射 6 h, 直至成熟收获。模拟紫外辐射增加使用 30W UV-B 灯管(波长为 280~315 nm), 灯管悬于植株上方, 通过灯管数和高度调节辐照度(以植株上部计)。并用紫外辐射测定仪在 297 nm 处测定辐照度, 设 0(自然光)、30、60 和 $180 \text{ mw} \cdot \text{m}^{-2}$ 4 个处理, 相当于漯河地区紫外辐射的 0%、15% 和 20%, 3 次重复。

1.2 试剂和材料

甲醇、乙腈、三氟乙酸均为 HPLC 级(Meek 公司), 所有的溶剂使用前均使用 0.45 μm 滤膜过滤; 标准品: 7,4-二羟基异黄酮-7-葡萄糖苷(daidzin, $\geq 95\%$, Fluka 公司); 7,4-二羟基-6-甲氧基异黄酮-7-葡萄糖苷(glycitin, $\geq 97\%$, Fluka 公司); 5,7,4-三

收稿日期: 2008-12-15

作者简介: 李先佳, 男(1977-), 讲师, 硕士, 研究方向为生物活性成分的分离与鉴定。E-mail: nzl110@163.com。

羟基异黄酮-7-葡萄糖苷(genistin, $\geq 99\%$, Fluka 公司);7,4-二羟基异黄酮(daidzein, $\geq 98\%$, Fluka 公司)。

1.3 主要仪器

高效液相色谱仪(日本岛津 LC-6A);紫外扫描仪(日本岛津 UV-2550);十万分之一电子天平(德国 Sartorius BP211D);高速台式离心机(上海安亭仪器厂 TGL-16C);超纯水器(HUMAN Corporation HUMAN UP900);超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司 KQ-100B);色谱柱[BDS Hypersil C18 (250 \times 4.6 \times 5)];0.221 μm 级尼龙微孔滤膜(津腾公司)。

1.4 HPLC 条件确定及精确度和稳定性

用紫外扫描仪扫描标样,确定紫外检测范围,再通过优化流动相的配比、流速、柱温等检测条件,绘制标准曲线,并进行精确度和稳定性实验^[5]。

1.5 标准曲线的绘制

分别称取标准品 7,4'-二羟基异黄酮-7-葡萄糖苷、7,4'-二羟基-6-甲氧基异黄酮-7-葡萄糖苷、5,7,4'-三羟基异黄酮-7-葡萄糖苷和 7,4-二羟基异黄酮各 1 mg 用甲醇分别定容到 10 mL,制成标准贮备液,然后分别从各标准贮备液中吸取一定量,用甲醇稀释到一定浓度,进样分析,测定各组分的峰面积^[6]。以大豆异黄酮浓度($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对峰面积,进行线性回归,分别绘制上述 4 种标准品的标准曲线。

1.6 样品的提取及 HPLC 检测

称取 5 g 大豆磨碎过 60 目筛的粉末固体,加氯仿超声震荡,静止后过滤^[7]。超声波振荡法提取异黄酮,将样品的乙醇提取液离心处理,上清液经微孔滤膜过滤,进样,用 HPLC 检测。

2 结果与分析

2.1 HPLC 条件的建立

采用 254 nm 作为检测波长,30℃;流动相:甲醇:0.4% 磷酸 = 30:70 (v/v),流速定为 1.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.2 精确度和稳定性测验

按照 1.5 的配置方法配置标准溶液,并将标准品溶液连续进样 5 次,根据测定结果,7,4'-二羟基异黄酮-7-葡萄糖苷、7,4'-二羟基-6-甲氧基异黄酮-7-葡萄糖苷、5,7,4'-三羟基异黄酮-7-葡萄糖苷和 7,4'-二羟基异黄酮的相对标准偏差分别为

0.7%、0.6%、0.7% 和 0.3% ($n = 5$)。另将大豆标样放置 0、2、4、6、8、10 h,测定其含量,发现大豆异黄酮在 24 h 内所测结果的相对标准偏差在 5% 以下,说明 24 h 内测定结果稳定^[8]。

2.3 大豆异黄酮标准曲线

表 1 大豆异黄酮标准曲线

Table 1 Standard curves of soybean isoflavones

组分 Components	标准曲线 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient/ R^2
Daidzin	$Y = 75497.4x + 51035.7$	0.9896
Glycitin	$Y = 10718x + 102794$	0.9945
Genistin	$Y = 121075x + 151786$	0.9894
Daidzein	$Y = 81218x + 435495$	0.9873

表 1 显示,在 1 ~ 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,Daidzin、Glycitin、Genistin、Daidzein 的回归方程分别为 $Y = 75497.4x + 51035.7$ 、 $Y = 10718x + 102794$ 、 $Y = 121075x + 151786$ 、 $Y = 81218x + 435495$,相关系数 $r = 0.9896$ 、0.9945、0.9894、0.9873,回归方程比较合理。

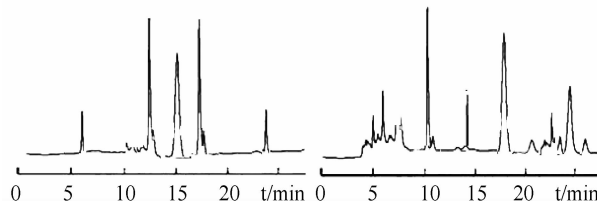


图 1 大豆异黄酮标准品和大豆异黄酮提取物色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard and extraction of soybean isoflavones

2.4 大豆异黄酮标准品和提取物的色谱图

图 1 为 Daidzin、Glycitin、Genistin、Daidzein 4 种标准品和提取物的色谱图,标准图谱在提取物色谱中基本体现出来,说明提取物中含有大豆异黄酮,含量和种类较多。同时提取物色谱中,还具有一些标准图谱所没有的峰,这可能是由于大豆异黄酮绝大多数是水溶性的,并且原料大豆中 97% ~ 98% 的异黄酮以糖苷形式存在^[9],更多的大豆异黄酮的成分被分离出来,但由于没有更多的标准品,没有加以鉴定。

2.5 样品中大豆异黄酮的含量

样品中大豆异黄酮含量如表 2 所示,UV-B 辐射后,大豆异黄酮含量变化明显,且具有较好的相关性,特别在 180 $\text{mw} \cdot \text{m}^{-2}$ UV-B 处理时,Daidzin、Gly-

citin、Genistin 和 Daidzein 含量分别比对照降低 4.5%、8.6%、1.1% 和 11.4%，说明紫外辐射明显影响大豆异黄酮的合成，大豆出现了不同程度的伤害^[10-11]。

表 2 UV-B 辐射对豫豆 23 号异黄酮含量的影响

Table 2 Effect of UV-B radiation on isoflavones of soybean Yudou 230/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

组分 Components	紫外辐射 UV-B radiation/ $\text{mw} \cdot \text{m}^{-2}$				相关系数(R^2)
	0	30	60	180	
Daidzin	639 **	631 **	627 *	610 **	0.9890
Glycitin	93 *	90 *	88 **	85 *	0.9657
Genistin	987 **	985 **	981 *	976 **	0.6600
Daidzein	35 *	32 **	33 *	31 *	0.9797

** 为 $P < 0.01$. 极显著水平; * 为 $0.01 < P < 0.05$, 显著水平

* and ** indicate significant at 0.05 and 0.01 probability level, respectively.

经紫外照射后,大豆异黄酮含量明显降低,分别从 $639 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $93 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $987 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降低为 $610 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $85 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $976 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $331 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,且相关系数较好,其中对 Glycitin 和 Daidzein 影响最大,分别下降了 8.6% 和 11.4%。

3 结论

以高效液相色谱法测定 UV-B 对大豆异黄酮含量的影响,结果表明:UV-B 辐射导致大豆异黄酮的含量明显下降,特别在 $180 \text{mw} \cdot \text{m}^{-2}$ UV-B 处理时,对 Glycitin 和 Daidzein 影响最大,分别下降了 8.6% 和 11.4%。研究结果为 UV-B 辐射对大豆籽粒品质的影响提供一定的依据。

参考文献

[1] 李元,王勋陵.紫外辐射增加对春小麦生理、产量和品质的影响[J].环境科学学报,1998,18(5):504-505. (Li Y, Wang X L. The effect of enhanced UV-B radiation on the physiological indicator, yield and quality of wheat[J]. Journal of Environmental Sciences, 1998, 18(5):504-505.)

[2] Anderson J G, Toohey D W, Brune W H. Free radicals with in the Antarctic ozone loss[J]. Science, 1991, 251:39-46.)

[3] 王小菁,潘瑞炽. UV-B 对高等植物生长和产量及某些生理代谢过程的影响[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(5):385-389. (Wang X J, Pan R C. Influence of UV-B on growth, yield and some metabolic processes in higher plants[J]. Plant Physiology Communication, 1995, 31(5):385-389.)

[4] 蔡锡安,夏汉平,彭少麟. 增强 UV-B 辐射对植物的影响[J]. 生态环境, 2007, 16(3):1044-1052. (Cai X A, Xia H P, Peng S L. Effects of enhanced UV-B radiation on plants[J]. Ecology and environment, 2007, 16(3):1044-1052.)

[5] Kudou S, Shimoyamada M, Imura T. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (Glycine max Merrill), glycitein 7-O-D-(6-O-acetyl)-glucopyranoside [J]. Agriculture Biological Chemistry, 1991, 55(3):859-860.)

[6] 荆海强,刘兆荣. 脱脂在异黄酮分析中的作用[J] 食品科学, 2003, 24(1):105-107. (Jin H Q, Liu Z R. Effects of degrease in the analysis of isoflavone [J]. Food Science, 2003, 24(1):105-107.)

[7] 宋冰,王丕武,张秀艳,等. 大豆异黄酮提取工艺的优化[J]. 大豆科学, 2008, 27(2):343-344. (Song B, Wang P W, Zhang X M. Optimization of the Extraction Technique of Soybean Isoflavones[J]. Soyben science, 2008, 27(2):343-344.)

[8] 殷丽君,李里特,李再贵. 采用 HPLC 技术快速检测发酵大豆制品中异黄酮的含量[J]. 食品科学, 2002, 23(2):100-103. (Yin L J, Li L T, Li Z G. Determination of isoflavone content in fermented soybean food by HPLC [J]. Food Science, 2002, 23(2):100-103.)

[9] Caldwell M M, Bornman J F, Ballare C L, et al. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interaction with other climatic change factors[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2003, 2:29-38.

[10] Wu Q L, Wang M F, Simon J E. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1016(2):195-209.

[11] March R E, Miao X S, Metcalfe C D, et al. A fragmentation study of an isoflavone glycoside, genistein-7-O-glucoside, using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2004, 232(1):171-183.