

东北地区栽培大豆品种籽粒异黄酮含量分析及不同测定方法优化比较

张海军,王 英,苏连泰,李 琳,翟 莹,李景文,张鑫生,王庆钰

(吉林大学 植物科学学院,吉林 长春 130062)

摘要:利用超声波技术,以大豆异黄酮主要组分染料木素为对照,根据单因素试验和正交试验结果建立三波长比色法和紫外分光光度法,确定大豆异黄酮最佳提取工艺:乙醇浓度 70%,料液比 1:25,提取温度 50℃,提取时间 5 h,提取 2 次。比较新建立方法与之前建立 HPLC 法的精密度和准确度,结果依次为:高效液相色谱法>三波长比色法>紫外分光光度法,其中 HPLC 法灵敏度高,适于大豆及其制品中异黄酮含量的精确测定,三波长比色法和紫外分光光度法适于异黄酮含量批量、快速测定。采用 HPLC 法测得东北地区品种异黄酮含量分布范围为 1.0404~4.4344 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$,平均值 2.9174 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$,不同地区大豆品种异黄酮总量分布规律为:黑龙江>吉林>其它地区(主要是辽宁省和内蒙古东部地区),筛选得到大于 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 高异黄酮品种 12 份,小于 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 的低异黄酮品种 3 份。

关键词:大豆异黄酮;高效液相色谱法;三波长比色法;紫外分光光度法

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)06-0979-08

Analysis of Isoflavone Content in Cultivated Soybeans[*Glycine max*(L.) Merr.] in Northeast China and Comparison of Different Determination Methods

ZHANG Hai-jun, WANG Ying, SU Lian-tai, LI Lin, ZHAI Ying, LI Jing-wen, ZHANG Xin-sheng, WANG Qing-yu

(College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China)

Abstract: Two different soybean isoflavone determination methods including three-wave length UV spectrophotometry (TL-UV) and ultraviolet spectrophotometry (UV) were established. The two methods and high-performance liquid chromatographic method (HPLC) established before were optimized and used to measure 128 soybean varieties from northeast China. Single factor experiment and orthogonal experiment were designed to optimize extracted method of soybean isoflavone as determination by TL-UV and UV using ultrasonic wave. The most suitable condition was extracting soybeans with 70% edible ethanol under the 1:25 ratio of defatted soybean meal to solvent at 50℃ for 5 h, extracting 2 times. Accuracy and precision of the three methods in a descending order was HPLC, TL-UV, UV. HPLC had high analytic sensitivity and accuracy, and was suitable for determination of isoflavone in soybean and other cereal products. The other two methods were suitable for rapid determination and accurate analysis of isoflavones. The isoflavone content of 128 soybean varieties ranged from 1.0404 to 4.4344 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, and the average content was 2.9174 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. The order of soybean isoflavone content among regions was Heilongjiang>Jilin>other region. Twelve varieties with high-soybean isoflavone exceeded 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ and 3 varieties with low-soybean isoflavone being inferior to 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ were screened.

Key words: Soybean isoflavones; HPLC; Three-wave length UV spectrophotometry; Ultraviolet spectrophotometry

大豆异黄酮(Soybean isoflavones,简称 ISO)具有预防各种癌症、抗肿瘤、治疗妇女更年期综合症等功效^[1-3],开发利用大豆异黄酮作为保健食品或美容用品基料和添加剂前景广阔^[4]。近几年针对大豆异黄酮提取纯化、检测分析、功能评价等的研究取得了一定进展^[5-6]。大豆异黄酮的测定包

括提取纯化和检测两部分,不同提纯方法效果差异较大,根据大豆异黄酮的分子结构,可用特征显色及荧光反应对其定性、定量检测,目前主要的检测方法有:紫外分光光度法(UV)、三波长法(TL-UV)、高效液相色谱法(HPLC)、高效液相色谱-质谱法、气相色谱法、气相色谱-质谱法、毛细管电泳

收稿日期:2011-08-29

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08004-003);国家自然科学基金面上项目(30971808);高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20090061120002);吉林省科技发展计划重点资助项目(20080204);长春市科技局国际科技合作项目(08GH10);“211”三期建设项目资助。

第一作者简介:张海军(1986-),男,在读硕士,研究方向为大豆分子育种。E-mail: zhanghaijun_234@163.com。

通讯作者:王庆钰(1963-),女,教授,博士,研究方向为基因工程在育种上的应用与植物杂种优势的理论与其应用。

E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn。

法、四标样快速测定法、薄层扫描色谱法、双向纸层析色谱法、分辨荧光免疫分析法和酶联免疫吸附法等^[7-8]。高效适用的检测方法是大豆异黄酮研发利用的基础,高效液相色谱法(HPLC)主要用于大豆异黄酮各组分的检测,因其高效精密性得到广泛应用,但不适宜批量快速检测;三波长比色法和紫外分光光度法主要用于总异黄酮的检测,三波长比色法可有效消除随浓度不同发生的本底漂移,油脂等干扰物质以及吸收峰不对称给定量分析造成的不良影响,准确性优于紫外分光光度法;紫外分光光度法简便适于异黄酮趋势快速检测^[9-11]。目前这3种方法都用于大豆异黄酮的检测,但不同方法间比较分析的相关报道较少。

该试验建立了2种大豆异黄酮测定方法,并在准确性、方便性、适用范围等方面与以前建立的HPLC法进行对比,以寻求最优大豆异黄酮的测定工艺参数,为大豆异黄酮测定方法的选择,大豆及其副产品(如豆豉、豆芽、黄浆水等)的加工和在线测定,相关保健品的研发利用以及产品质量监测等提供技术选择参考。同时,结合3种方法分别对东北地区128份栽培大豆品种进行异黄酮含量测定和分析,为深入研究大豆异黄酮含量区域分布以及大豆品质育种和豆制品的综合利用开发提供理论依据,并为大豆加工产业提供优异种质资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为吉林大学植物科学学院提供的东北地区栽培大豆品种128份,其中,吉林省50份,黑龙江省60份,其它地区(主要是辽宁省、内蒙古东部地区)18份。

1.2 供试仪器与试剂

高效液相色谱仪(LC-20A型):日本岛津;UV-2550紫外可见分光光度计:日本岛津;近红外谷物分析仪(Infratec 1241型):瑞典FOSS公司;KQ3200DE型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;RJM/STSXT-06型索氏提取器:北京日捷

仪器仪表设备有限公司;高速粉碎机:北京中兴伟业仪器有限公司;HWS24型电热恒温水浴锅:上海一恒科技有限公司;FA2004A型分析天平。

甲醇(HPLC级):美国Fisher公司;甲醇(分析纯):山东禹王试剂;乙醇(分析纯):北京化工厂;大豆异黄酮标准品:染料木素(Genistein),染料木苷(Genistin),大豆苷元(Daidein),大豆苷(Daidzin),黄豆黄苷(Glycitin)纯度 $\geq 98\%$,购自美国Sigma公司。

1.3 试验方法

1.3.1 田间试验 试验于2008年在吉林大学植物科学学院教学实习基地进行,完全随机试验设计,采用穴播,穴距0.05 m,行长5 m,行距0.65 m,每品种种植6行,3次重复。4月27日种植,幼苗期(两片对生单叶平展、有复叶出现)间苗至每穴3株,常规田间管理,各材料均在完熟期收获。

1.3.2 豆粉的制备 由于重复试验之间田间表现相对一致,随机混合选取同一品种50粒种子,用高速粉碎机粉碎后过40目筛,用石油醚65℃脱脂2.5 h备用。

1.3.3 高效液相色谱法 参照张海军等^[9]建立的HPLC方法(其中流动相改为甲醇:0.4%磷酸=30:70)。

1.3.4 三波长比色法 标准曲线的绘制:精密称取干燥至恒重的染料木素(Genistein)标准品2.0 mg用70%乙醇定容到10 mL制成0.20 mg·mL⁻¹的标准品母液。精密吸取0.025、0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 mL标准品母液用70%乙醇定容到10 mL容量瓶,以70%乙醇为空白对照分别测标准品在243、263和283 nm处吸光度,重复测定3次求平均值,计算 ΔA ,计算方法为: $\Delta A = A_{263} - (A_{243} + A_{283})/2$ 。以 ΔA 为纵坐标,标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线。

提取工艺试验:选取对大豆异黄酮的提取影响最大的4个因素进行单因素试验,分别考察乙醇浓度(40%、50%、60%、70%、80%、90%)、料液比(1:5、1:10、1:20、1:25、1:30)、提取温度(30、40、

50、60、70、80℃)、提取时间(0.5、1、2、4、6、8 h)对大豆提取率的影响。单因素试验中其它因素对应为乙醇浓度 70%,料液比 1:25,提取温度 50℃,提取时间 6 h。考虑到影响异黄酮提取的各因素之间的交互,该试验根据单因素试验结果设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,每个处理 3 次重复,以确定最优提取工艺条件。

异黄酮含量的测定:称取 2.00 g 高异黄酮品种吉林 32 的全豆粉,加入 70% 的乙醇定容至 8.0 mL,50℃ 水浴温度下先超声处理 30 min,然后水浴提取 5 h,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,抽取上清液后再加入 8.0 mL 70% 的乙醇,重复水浴提取 1 次,合并 2 次上清液,经 0.45 μm 膜过滤得供试液。

精密吸取 2 mL 染料木素标准品母液(0.20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)用 70% 乙醇定容至 5 mL,分装成 5 管,分别测定 3 个波长(243、263、283 nm)处的吸光度,计算方法为: $\Delta A = A_{263} - (A_{243} + A_{283})/2$,求得 ΔA 值,计算异黄酮浓度。

重现性试验:对同一供试样品,均分 5 份,分别测定 3 个波长处的吸光度,根据 $\Delta A = A_{263} - (A_{243} + A_{283})/2$ 求得 ΔA 值,计算异黄酮浓度。样品测定后,密封 4℃ 保存,对一定浓度的样品每隔 4 h 测定 3 个波长处的吸光度,连续测定 72 h,根据 $\Delta A = A_{263} - (A_{243} + A_{283})/2$ 求得 ΔA 值,计算异黄酮浓度,考察测定样品的异黄酮含量稳定性。

加样回收率试验:分别精密吸取染料木素标准品母液(2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)1.0、2.0、3.0 mL(3 次重复,分别记为处理 1、2、3)至已知本底浓度的供试液中,混匀后测定 3 个波长下的吸光度,根据 $\Delta A = A_{263} - (A_{243} + A_{283})/2$ 求得 ΔA 值,计算实际浓度(测得浓度),求加样回收率。

加样回收率(%) = (测得浓度 - 本底浓度)/染料木素标准品浓度 $\times 100$

1.3.5 紫外分光光度法 样品的制备、提取条件的优化、测定方法以及加样回收率试验同 1.3.4。

以 70% 乙醇为空白对照测标准品在 263 nm 处吸光度,重复测定 3 次求平均值,以吸光度为纵坐标,标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,根据标准曲线计算异黄酮含量。

1.4 数据分析

采用 Excel 2003 和 DPS v 7.05 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 测定方法的优化与比较

2.1.1 检测波长的确定 根据连续扫描图谱可以看出,图 1A 标准品染料木素和样品均在紫外区有很强的吸收带,在 263 nm 处有最大吸收峰且周围干扰较小,因此确定 263 nm 为紫外分光光度法和三波长比色法的检测波长。大豆异黄酮的母核结构均是 3-苯基色原酮,在 260 nm 左右有最大吸收峰,大豆苷元的最大吸收波长为 251 nm,在 310 nm 处有一个很小的肩峰,把紫外吸收作为评价指标可靠,综合考虑图 1B 中 5 种大豆异黄酮组分的吸收峰值,决定采用 254 nm 为 HPLC 法的检测波长。

2.1.2 HPLC 法的优化 大豆异黄酮的 HPLC 法检测采用以各组分保留时间定性,色谱峰面积定量的方法。大豆异黄酮 5 种标准品(大豆苷、大豆苷元、染料木素、染料木苷和黄豆黄苷)HPLC 色谱见图 2A,上述 5 种标准品均能直接购得,对于乙酰基和丙二酰基型异黄酮,因其存在的不稳定性及标准品价格昂贵,对其定性定量较困难,因此采用温和水解法^[16]将糖苷转化为相应的苷元进行检测。方法经略微调整,色谱结果如图 2A 所示,大豆苷和染料木苷占待检测异黄酮的 90% 以上,黄豆黄苷含量较少,其它组分均不能检出,说明其含量甚微,在文中均不予讨论。

2.1.3 三波长比色法 如表 1 所示,三波长比色法染料木素标准品线性范围:0.255 ~ 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,回归方程: $y = 0.0647x + 0.006$,相关系数:0.9992。

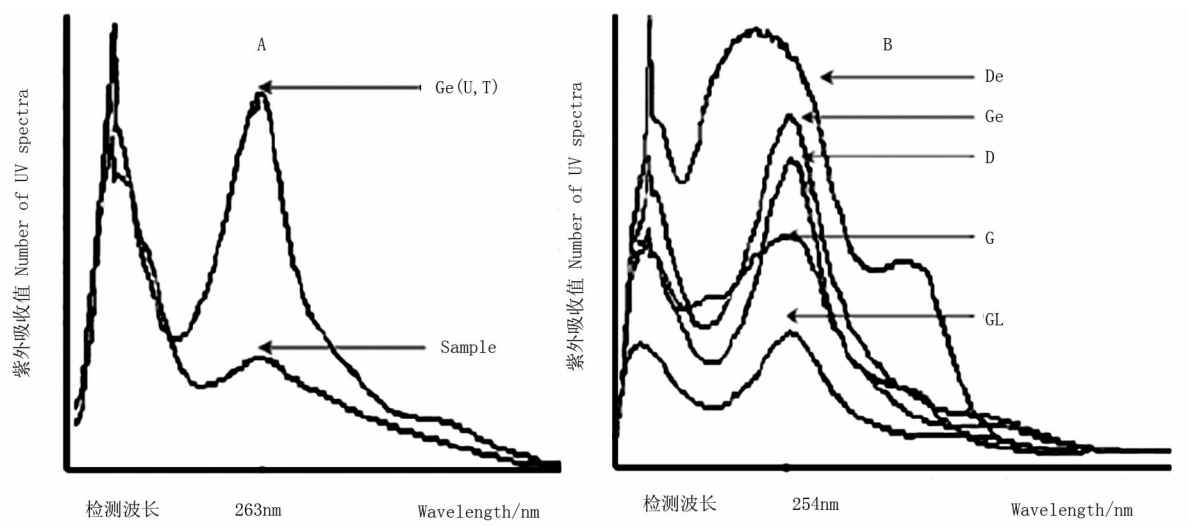
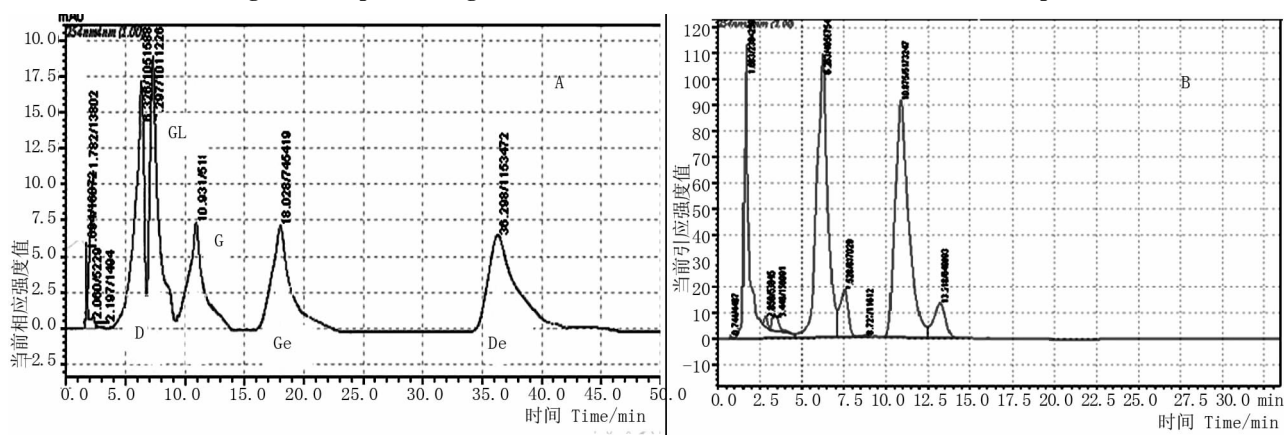


图 1 标准品和样品在 190 ~400 nm 紫外扫描图谱

Fig. 1 UV spectra range from 190 to 400 nm of reference substances and sample



大豆苷:D 峰,6.326 min;黄豆黄苷:GL 峰,7.297 min;染料木苷:G 峰,10.931 min;染料木素:Ge 峰,18.028 min;大豆苷元:

De 峰,36.298 min

Daidzin: peak D,6.326 min;Glycitin: peak GL,7.297 min;Genistin: peak G,10.931 min;Genistein: peak Ge,18.028 min;Daidein: peak

De,36.298 min

图 2 大豆异黄酮标准品(A)和样品(B)图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference substances(A) and sample(B)

表 1 大豆异黄酮组分线性关系

Table 1 Linear relation of soybean isoflavones

检测方法	组分	线性范围	回归方程	相关系数
Detection method	Component	Linear range / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Regression equation	Related coefficient
紫外分光光度法 UV	染料木素 Genistein	0.255 ~ 16	$y = 0.1176x + 0.0071$	0.9997
三波长比色法 TL-UV	染料木素 Genistein	0.255 ~ 16	$y = 0.0647x + 0.006$	0.9992

如图 3 所示,单因素试验中各因素对异黄酮提取效率最优条件分别为:乙醇浓度 70%,料液比 1:25,提取温度 50℃,提取时间 6 h。

由表 2 中各因素极差值大小可知,影响大豆异黄酮提取率顺序: B > D > A > C, 提取最佳条件为

$\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_2\text{D}_1$, 即乙醇浓度 70%, 料液比 1:25, 提取温度 50℃, 提取时间 5 h, 提取次数为 2 次。采取预先超声水浴处理 30 min, 可以加速异黄酮的溶解从而增加有效成分的提取率^[8]。

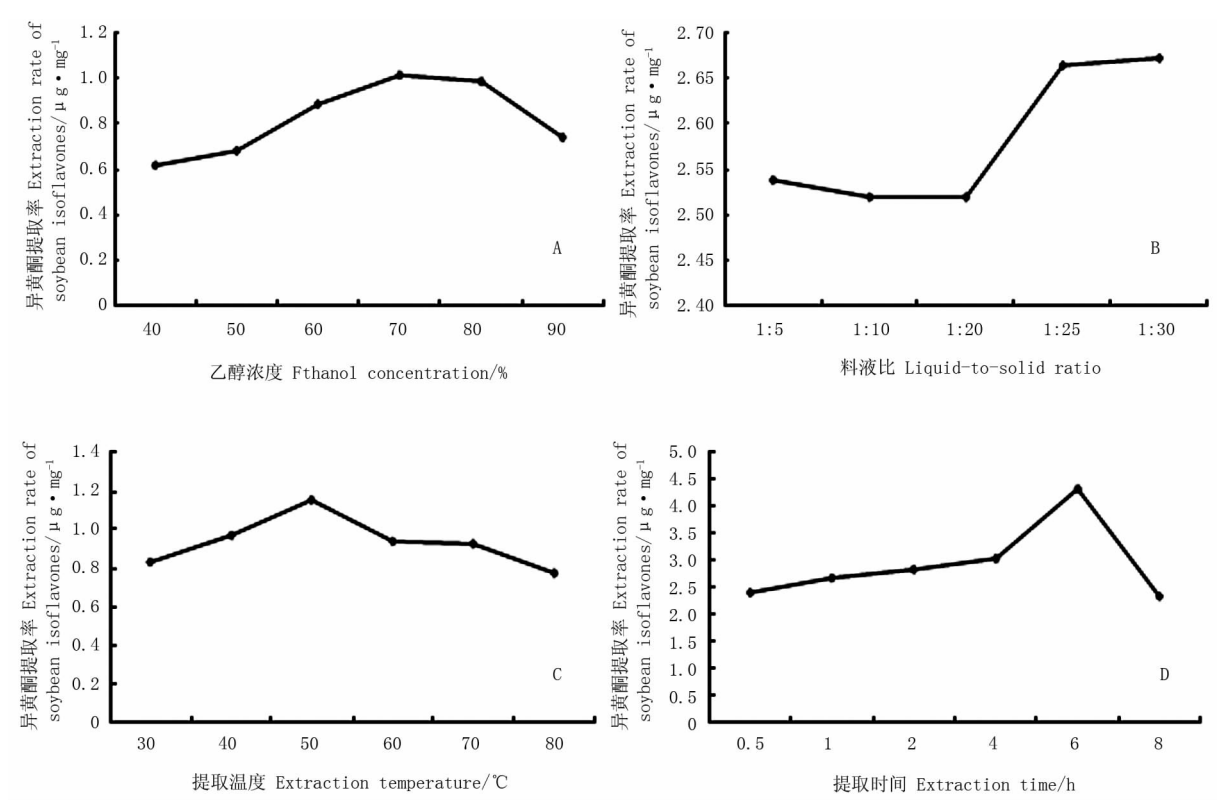


图 3 各因素对异黄酮提取效率的影响

Fig. 3 Effects of extraction factors on extraction rate of soybean isoflavones

表 2 正交试验因素与水平及数据表

Table 2 Factors, levels and results of orthogonal test						
项目 Item	编号 No.	A	B	C	D	异黄酮含量 Isoflavones content /μg·mg ⁻¹
		乙醇浓度 Ethanol concentration /%	料液比 Liquid-to-solid ratio	提取温度 Extraction temperature /°C	提取时间 Extraction time /h	
正交试验组合 Orthogonal experiment combination	1	60	1:20	40	5	0.97
	2	60	1:25	50	6	0.96
	3	60	1:30	60	7	0.63
	4	70	1:20	50	7	0.99
	5	70	1:25	60	5	1.19
	6	70	1:30	40	6	0.92
	7	80	1:20	60	6	0.94
	8	80	1:25	40	7	0.95
	9	80	1:30	50	5	0.93
提取率 Extraction efficiency/μg·mg ⁻¹	K1	2.57	2.91	2.85	3.09	
	K2	3.10	3.10	2.88	2.83	
	K3	2.82	2.48	2.76	2.50	
极差 Range	R	0.54	0.62	0.12	0.60	
平均提取率 Average extraction efficiency /μg·mg ⁻¹	k1	0.86	0.97	0.95	1.03	
	k2	1.03	1.03	0.96	0.94	
	k3	0.94	0.83	0.92	0.83	

2.1.4 紫外分光光度法 如表 1 所示,紫外分光光度法染料木素标准品线性范围:0.255 ~ 16 μg·mL⁻¹, 回归方程: $y=0.1176x+0.0071$, 相关系数:0.9997。

2.1.5 三种测定方法的比较 由表 3 可以看出,对于标准品染料木素 (Genistein), HPLC 法、紫外分光光度法和三波长比色法的加样回收率分别为 99.89%、100.77% 和 100.13%, 其相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.83%、1.87% 和 1.86%, 精密度

RSD 分别为 1.84%、1.96% 和 1.85%, 可知 HPLC 法的精密度和加样回收率 RSD 值均较小, 三波长比色法次之; 对于日内稳定性 RSD(0.78%)、日间稳定性 RSD(1.12%) 及重现性 RSD(0.51%) 也是

HPLC 法最小, 进一步印证了 HPLC 是较精密准确的检测方法, 综合考虑各项验证试验指标, HPLC 法最优, 三波长比色法次之, 紫外分光光度法最差。

表 3 测定方法的加标回收率和验证试验

Table 3 Recovery and robustness and demonstration test of the determination procedure

标准品 Reference substances	加样回收率试验 Recovery test						平均回收率 Mean Recovery/%		日内稳定性 Intra-day robustness		日间稳定性 Inter-day robustness		精密度 Precision		重现性 Reproductivity	
	第 1 次 First	第 2 次 Second	第 3 次 Third				Mean	RSD/%	Mean	RSD/%	Mean	RSD/%	Mean	RSD/%	Mean	RSD/%
Daidzin	10	26.05	20	36.27	30	56.89	99.81	1.88	16.26	0.81	16.11	1.88	16.22	0.89	16.27	0.56
Glycitin	10	16.96	20	27.38	30	47.89	100.76	1.74	7.08	0.52	7.16	1.72	7.31	1.04	7.14	0.58
Genistin	10	34.97	20	45.69	30	65.49	100.49	2.25	25.17	0.31	25.39	2.4	25.21	1.11	25.25	0.47
Genistein	10	20.94	20	30.87	30	51.69	99.89	1.83	11.15	0.78	10.98	1.12	11.18	1.84	11.09	0.51
Daidein	10	14.35	20	24.36	30	43.87	99.67	0.73	4.34	0.86	4.23	1.56	4.36	2.05	4.31	0.63
Genistein(UV)	16	65	32	81.43	48	97.33	100.77	1.87	49.14	0.94	49.19	1.22	49.18	1.96	49.27	0.67
Genistein(TL-UV)	16	44.88	32	61.06	48	77.64	100.13	1.86	28.97	1.04	29.14	1.35	28.99	1.85	29.09	0.78

加样回收率试验中第一列数值表示加标量, 第二列数值表示测定值($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

The first column value in recovery test indicates added amount, and the second column value represents measured value($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

2.2 东北地区栽培品种异黄酮含量分析

由表 4 可知, HPLC 法测定的东北地区大豆籽粒中总异黄酮含量范围 0.9135~6.2486 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$, 平均值 2.9174 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$, 异黄酮各组分大小关系为: 染料木苷 > 大豆苷 > 黄豆黄苷, 其中染料木苷和大豆苷是大豆籽粒中最主要的单体组分。异黄酮含量所占比例在各品种间差异较大, 其中大豆异黄酮含量较高($\text{TISF} \geq 4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)的品种 12 份, 包括吉林 21、吉林 38、绥农 10、绥农 11、

吉育 71、吉育 88、黑农 88-2469、吉林 32、黑农 54、长农 13、绥小粒豆和垦农 35; 含量较低($\text{TISF} \leq 1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)的品种 3 份, 包括东农 434、东农 42 和垦农 5, 其中异黄酮含量较高的品种可加以推广种植, 作为生产上提取大豆异黄酮的原料。异黄酮总量分布规律: 黑龙江省 > 吉林省 > 其它地区; 大豆苷含量分布规律: 吉林省 > 黑龙江省 > 其它地区; 染料木苷和黄豆黄苷含量分布规律: 黑龙江省 > 吉林省 > 其它地区。

表 4 不同栽培型品种大豆异黄酮含量比较

Table 4 Comprision of isoflavones in different varieties of soybean($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)

地区 Region	检测项目 Test item	HPLC				TL-UV	UV
		总异黄酮 Total isoflavones	大豆苷 Daidzin	黄豆黄苷 Glycitin	染料木苷 Genistin	总异黄酮 Total isoflavones	总异黄酮 Total isoflavones
吉林省 Jilin province	Min-Max	1.2097-4.9524	0.4157-2.2313	0.0928-0.4995	0.6963-2.4132	0.4302-6.4129	2.3933-6.2241
	Mean/% \pm SD	2.9387 \pm 0.8041	1.2928 \pm 0.4066	0.2489 \pm 0.0896	1.3970 \pm 0.3603	2.6362 \pm 1.2966	4.0418 \pm 0.7981
	CV/%	0.3145	0.3600	0.3603	0.2736	0.4918	0.1975
黑龙江省 Heilongjiang province	Min-Max	0.9135-6.2486	3.5502-0.0593	0.0453-0.9141	0.4562-2.4174	0.4997-5.9029	2.4698-6.5217
	Mean/% \pm SD	2.9582 \pm 1.0344	1.2730 \pm 0.5517	0.2719 \pm 0.1324	1.4132 \pm 0.4359	2.5660 \pm 1.0833	3.8855 \pm 0.7790
	CV/%	0.3497	0.4333	0.4871	0.3085	0.4222	0.2005
其它地区 Other region	Min-Max	1.0404-4.4344	0.3837-2.0389	0.0954-0.5376	0.3791-1.9509	0.6775-5.1739	2.7164-5.7677
	Mean/% \pm SD	2.7434 \pm 1.0179	1.2201 \pm 0.4973	0.2696 \pm 0.1230	1.2537 \pm 0.4666	2.3783 \pm 1.1785	4.0599 \pm 0.8083
	CV/%	0.3678	0.4076	0.4564	0.3722	0.4955	0.1991
东北地区 Northeast China	Min-Max	0.9135-6.2486	0.0593-3.5502	0.0453-0.9141	0.3791-2.4174	0.4302-6.4129	2.3933-6.5217
	Mean/% \pm SD	2.9174 \pm 0.4900	1.2722 \pm 0.1162	0.2629 \pm 0.4148	1.3822 \pm 0.9457	2.5691 \pm 1.1777	3.9744 \pm 0.7906
	CV/%	0.3852	0.4420	0.3001	0.3242	0.4584	0.1989

将测定的 128 份品种异黄酮含量从高到低分别按 3 种方法作趋势图(图 4), 可以看出 3 种测定方法异黄酮含量变化趋势基本一致, 相关性分析结果表明紫外分光光度法、三波长比色法与 HPLC 法

的相关系数分别为 0.99** 和 0.98**, 前二者之间的相关系数达 0.99**, 全部呈极显著正相关, 印证了 3 种方法的可靠性。检测结果紫外分光光度法结果最高, 可能与本底漂移、油脂等干扰物质以及

吸收峰不对称有关;三波长比色法检测结果比 HPLC 法略低但变化趋势基本一致,在精密度要求不高的批量测定中可以考虑作为 HPLC 法的替代方法使用。

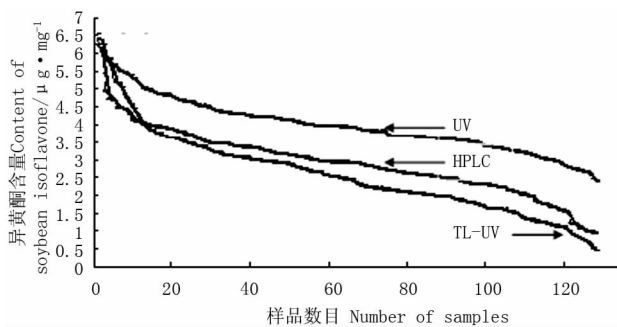


图4 不同检测方法大豆异黄酮含量趋势变化图

Fig. 4 Soybean isoflavone content under different detection methods

3 讨论

大豆异黄酮含量的测定目前主要采用 HPLC 法,且已颁布相关行业标准^[12-13],该文采用的 HPLC 法具有良好的分离度和线性关系,参照有关文献^[3,14-15],笔者认为保留时间 12.948 min 的物质可能是乙酰基大豆苷(6'-O-Acetyldaidzin),由于没有乙酰基大豆苷标准品,有待进一步研究验证。同时检测分析 100 份大豆材料 HPLC 法耗时约为三波长比色法的 4 倍,说明 HPLC 法适用于小批量样品的定量分析,不宜工业化。当分析样品数量较大时,需要寻求一种适合育种材料筛选的简单易行、快速准确的大豆异黄酮测定方法,采用建立的三波长比色法测定东北地区 128 份大豆品种籽粒异黄酮含量,与 HPLC 法测定结果变化趋势一致且呈极显著正相关,表明三波长比色法的测定结果具有比较意义。对精确性要求一般、较关注异黄酮含量变化趋势、样品较多、测定时间紧迫时,三波长比色法可作为 HPLC 替代方法使用,实际操作中三波长比色法和 HPLC 法配合使用,可达更理想的测定结果。

大豆异黄酮含量受基因型、年份、地点、品种、环境(光照、温度、水分等)及其互作的影响^[10-11,16-19],探索大豆异黄酮地区分布规律是科研工作者需要解决的问题之一。大豆异黄酮含量在

不同品种间差异显著,籽粒中异黄酮含量范围 0.4162 ~ 6.8082 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ^[10,16-18],该研究测定的东北地区 128 份普通栽培大豆品种异黄酮含量范围 0.9135 ~ 6.2486 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$,总体范围基本一致,平均值为 2.9174 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$,显著高于中国育成品种异黄酮含量(2.7050 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)^[10],其中吉林省异黄酮含量平均值 2.9387 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$,与宋志峰等^[16]的测定结果(2.9600 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)基本一致;黑龙江省异黄酮含量平均值 2.9582 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$,略高于李辉等^[20]的测定结果(2.7000 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$),证实东北地区属于高异黄酮产区,有着丰富的大豆资源;异黄酮含量变化幅度较大,遗传潜力大,具有较大的选择空间。从异黄酮地区趋势变化(表 4)可见黑龙江省和吉林省是高异黄酮品种主产区,异黄酮含量表现南低北高的趋势,与张大勇等^[17]、孙君明等^[18-19]的研究结果一致,异黄酮含量变化趋势与脂肪含量的变化趋势相同^[21]。

国内外学者已筛选出一批异黄酮含量差异幅度较大的种质资源,并用于 QTL 定位亲本材料的选择和特异品种的筛选等工作^[10,14,21],该研究筛选出的不同异黄酮含量的大豆品种亦可提供优异的遗传改良资源。中国大豆主产区不同地区间生态条件差异较大,不同生态区域缺乏统一性^[18,18],该研究采用同一地点对不同来源大豆材料进行研究,有效消除了环境误差,可通过扩大样本的方法优选异黄酮含量更高或者更低的专用品种。另外,东北地区大豆种质资源丰富,考虑异黄酮各组分间的协调关系和含量的相对稳定性,可为大豆异黄酮育种和生产服务。在大豆遗传改良过程中,关注农艺性状与品质形状的结合,充分利用性状间的相关性可提高选择效率^[22]。大豆主要育种目标包括产量性状和品质性状,品质性状主要包括脂肪、蛋白质及异黄酮含量,不同性状间有着密切的遗传关系和不同程度的相关性^[23],明确异黄酮含量和产量性状、蛋白质、脂肪含量之间的相关关系^[24],对培育高产、优质、高异黄酮大豆新品种,有针对性进行品种创新改良具有指导意义。

参考文献

- [1] Wang H J, Murphy P A. Isoflavone composition of American and

- Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year and location [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42 (8): 1674-1677.
- [2] Lo F H, Mak N K, Leung K N. Studies on the anti-tumor activities of the soyisoflavone daidzein on murine neuroblastoma cells [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2007, 61 (9): 591-595.
- [3] Howes L G, Howes J B, Knight D C. Isoflavone therapy for menopausal flushes: a systematic review and meta-analysis [J]. Maturitas, 2006, 55 (3): 203-211.
- [4] Watanabe S, Uesugi S, Kikuchi Y. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2002, 56 (6): 302-312.
- [5] Gardner C D, Chatterjee L M, Franke A A. Effects of isoflavone supplements vs soy foods on blood concentrations of genistein and daidzein in adults [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2009, 20 (3): 227-234.
- [6] 王春娥, 赵团结, 盖钧镒. 大豆异黄酮组分 HPLC 快速分析技术及其在豆腐加工中的应用 [J]. 作物学报, 2010, 36 (12): 2062-2072. (Wang C E, Zhao T J, Gai J Y. Establishment of a rapid HPLC method for quantifying isoflavone components and its application in tofu processing [J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36 (12): 2062-2072.)
- [7] McCue P, Shetty K. Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004, 44 (5): 361-367.
- [8] 张海军, 王英, 王庆钰. 大豆异黄酮检测方法研究概述 [J]. 粮食与油脂, 2011 (3): 39-42. (Zhang H J, Wang Y, Wang Q Y. Survey on the methods of detection for soybean isoflavone [J]. Cereals Oil, 2011 (3): 39-42.)
- [9] 张海军, 苏连泰, 李琳, 等. 高效液相色谱法 (HPLC) 测定大豆异黄酮含量的研究 [J]. 大豆科学, 2011, 30 (4): 672-675. (Zhang H J, Su L T, Li L, et al. Determination of soybean isoflavones content by high performance liquid chromatographic [J]. Soybean Science, 2011, 30 (4): 672-675.)
- [10] 王春娥, 赵团结, 盖钧镒. 中国大豆资源异黄酮含量及其组分的遗传变异和演化特征 [J]. 中国农业科学, 2010, 43 (19): 3919-3932. (Wang C E, Zhao T J, Gai J Y. Genetic variability and evolutionary peculiarity of isoflavone content and its components in soybean germplasm from China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43 (19): 3919-3932.)
- [11] 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. (Sun J M, Ding A L, Dong H R. High performance liquid chromatographic determination of isoflavone content in soybean test sample [J]. Soybean Science, 2000, 19 (1): 15-20.)
- [12] NY/T 1252-2006 大豆异黄酮 [S]. (NY/T 1252-2006 Soybean isoflavone [S].)
- [13] GB/T 23788-2009 保健食品中大豆异黄酮的检测方法 [S]. (GB/T 23788-2009 Detection of soybean isoflavone in health-care food—High-performance liquid chromatography [S].)
- [14] Kudou S, Fleury Y, Welt D. Malony isoflavone glucosides in soybean seeds (*Glycine max.* Merri) [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55 (9): 2227-2233.
- [15] Aedin C, Bryn H, Rosa M. Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80: 1044-1047.
- [16] 宋志峰, 王丽, 孟凡钢, 等. 吉林省普通大豆品种 (系) 异黄酮含量分析 [J]. 大豆科学, 2009, 28 (6): 1076-1080. (Song Z F, Wang L, Meng F G, et al. Analyse of isoflavones content in normal soybean varieties (lines) in Jilin province [J]. Soybean Science, 2009, 28 (6): 1076-1080.)
- [17] 张大勇, 李文滨, 卢翠华. 黑龙江省大豆籽粒异黄酮含量生态差异 [J]. 作物学报, 2009, 35 (4): 711-717. (Zhang D Y, Li W B, Lu C H. Ecologic different of isoflavones content in soybean seeds in Heilongjiang province [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35 (4): 711-717.)
- [18] 孙君明, 丁安林, 常汝镇, 等. 中国大豆异黄酮含量的初步分析 [J]. 中国粮油学报, 1995, 10 (4): 51-54. (Sun J M, Ding A L, Chang R Z, et al. Primary analyse of isoflavones contents in Chinese soybean cultivars [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 1995, 10 (4): 51-54.)
- [19] 孙君明, 丁安林. 地理环境对大豆异黄酮积累的影响趋势 [J]. 大豆科学, 1997, 16 (4): 298-303. (Sun J M, Ding A L. Effects of geographical conditions on the accumulation of isoflavones in soybean seeds [J]. Soybean Science, 1997, 16 (4): 298-303.)
- [20] 李辉, 戴常军, 兰静, 等. 黑龙江省栽培大豆异黄酮含量初步分析 [J]. 中国粮油学报, 2007, 22 (1): 38-40. (Li H, Dai C J, Lan J, et al. Primary analyse of isoflavones contents in Heilongjiang province soybean cultivars [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2007, 22 (1): 38-40.)
- [21] 张海军, 王英, 张艳, 等. 东北地区大豆种质资源脂肪和蛋白质含量分析 [J]. 大豆科学, 2011, 30 (2): 215-218. (Zhang H J, Wang Y, Zhang Y, et al. Analysis of oil and protein content of soybean germplasm grown in northeast China [J]. Soybean Science, 2011, 30 (2): 215-218.)
- [22] 梁慧珍, 李卫东, 曹颖妮, 等. 大豆籽粒异黄酮含量的遗传效应研究 [J]. 作物学报, 2009, 35 (4): 711-717. (Liang H Z, Li W D, Cao Y N, et al. Genetic effects analysis of isoflavone content in soybean seed [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35 (4): 711-717.)
- [23] 刘广阳, 齐宁, 林红, 等. 大豆异黄酮含量与品质性状相关性分析 [J]. 大豆科学, 2008, 27 (4): 701-707. (Liu G Y, Qi N, Lin H, et al. Analysis of correlation between isoflavones and quality of soybean [J]. Soybean Science, 2008, 27 (4): 701-707.)
- [24] 曾国良, 王继安, 韩英鹏, 等. 大豆异黄酮含量与主要农艺性状相关性分析 [J]. 大豆科学, 2007, 26 (1): 25-29. (Zeng G L, Wang J A, Han Y P. Correlation of isoflavones with the major agronomic characters in soybean [J]. Soybean Science, 2007, 26 (1): 25-29.)