

大豆异黄酮的品种间差异分析

宋冰^{1,2}, 李鹏月², 王丕武¹, 付永平¹, 张宇¹

(¹吉林农业大学生物技术中心, 吉林 长春 130118; ²吉林市农业科学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:直接使用乙醇分离提取大豆异黄酮,并用高效液相色谱技术对 8 个大豆品种中大豆异黄酮含量进行了品种间差异分析,并对 5 种异黄酮组分(染料木素、黄豆黄甙、大豆甙、大豆甙元、染料木甙)进行了定量分析。发现品种间的大豆异黄酮和各组分的含量差异显著,黄皮豆的异黄酮含量明显高于其他品种,吉农 17 异黄酮含量最高,其含量可达 6.6‰。

关键词:大豆异黄酮;乙醇提取;高效液相色谱;含量差异分析;异黄酮组分

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2008)04-0675-04

Analysis of Soybean Isoflavones Content and Its Components in Different Soybeans

SONG Bing^{1,2}, LI Peng-yue², WANG Pi-wu¹, FU Yong-ping¹, ZHANG Yu¹

(¹Biotechnology Center of Jilin Agricultural University, Changchun 130118; ²Jilin City Academy of Agricultural Sciences, Jilin 132101, Jilin, China)

Abstract: This experimentation use the edible ethanol to extract, and use the high performance liquid chromatography to analyse the content of soybean isoflavones of 8 soybean cultivars. Five kind of isoflavone components including Daidzin, Genistin, Daidzein, Glycitin, and Genistein were detected and content of each component was determined. Results showed that content of soybean isoflavones and its components varied greatly with cultivars. Soybeans with yellow seed coat had higher isoflavones content and Jinong17 had the highest content of 6.6‰.

Key words: Soybean isoflavones; Extracted by ethanol; HPLC; Content difference; Isoflavone

大豆异黄酮(Soybean isoflavones, ISO)是一种具有异黄酮类化合物结构的主要活性成分,大豆中的异黄酮含量约为 0.1%~0.5%左右,大豆中天然存在的大豆异黄酮总共有 12 种,可以分为 3 类,即黄豆苷(daidzin)类、染料木苷(genistin)类、黄豆黄素苷(glycitin)类,以游离型、葡萄糖苷型、乙酰基葡萄糖苷型、丙二酰基葡萄糖苷型等 4 种形式存在^[1]。近年来大量的研究表明:大豆异黄酮具有预防癌症、心血管疾病和骨质疏松症、抗氧化和减轻妇女更年期综合症等重要生理功能^[2-6],因而引起了学术界的广泛关注,大豆异黄酮成为世界各国科学家研究的热点之一。

大豆不同部位的异黄酮含量差异较大。据日本津崎报道,大豆各部位异黄酮含量差异显著,其中胚轴异黄酮含量最高,达 1%,种皮含量最低,约为 0.03%左右。此外不同的大豆品种异黄酮含量也有

较大差异,如美国大豆品种比日本大豆品种异黄酮总量高^[7]。东北为我国大豆的主产区,而且黑龙江省的种植面积相对较大,对黑龙江省 46 个主栽品种进行了检测,其异黄酮含量最高的为黑农 37 为 $4\,875.8\,\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[8]。

试验采用食用乙醇进行高效提取,并用高效液相色谱技术对吉林省主要的 8 个大豆品种进行了检测,分析了不同类型品种间大豆异黄酮含量的差异,以及这些品种中 5 种异黄酮组分:染料木素,黄豆黄甙,大豆甙,大豆甙元,染料木甙的具体含量,为吉林省大豆的综合开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄皮大豆:吉农 17,吉林 30;黑皮大豆:黑豆 1313,吉黑 1 号;绿皮大豆:吉农 D4008,吉农

收稿日期:2007-10-24

作者简介:宋冰(1980-),男,硕士,现主要从事农产品的加工利用研究。E-mail:song19800123@126.com。

通讯作者:王丕武,教授,博士生导师。E-mail:peiwuw@yahoo.com.cn。

D4010; 高蛋白大豆: 通农 13, 吉农 D4103。

染料木素 (Genistein) $\geq 99\%$ 购于 Sigma 公司; 黄豆黄甙 (Glycitin) $\geq 99\%$, 大豆甙 (Daidzin) $\geq 99\%$, 大豆甙元 (Daidzein) $\geq 99\%$, 染料木甙 (Genistin) $\geq 99\%$, 均由日本国岩首大学馈赠。

石油醚 (沸程 $60^{\circ}\text{C} - 90^{\circ}\text{C}$), 正丁醇, 氯仿, 95% 食用乙醇, 丙酮, 色谱级甲醇, 乙腈色谱纯, 色谱级冰醋酸, 盐酸, 冰醋酸, 浓硫酸, 乙酸乙酯, 纯水。

1.2 仪器

万能粉碎机 (FW-135), 索式提取器, 冷却回流装置, 旋转蒸发器 (上海亚荣 RE-52A), BECKMEN-DU640 核酸蛋白分析仪, 高速冷冻离心机 (日立), 抽滤装置, 高效液相色谱系统 (Agilent 1100), 真空干燥箱 (上海博讯 6020B), 精密电子天平, 烘箱, 恒温水浴锅, 酸度计。

1.3 试验方法

1.3.1 原料的预处理 大豆用中药万能粉碎机粉碎后, 过 40 目筛, 用沸程为 $60 \sim 90^{\circ}\text{C}$ 的石油醚脱脂 18 h, 待石油醚挥发后备用^[9]。

1.3.2 大豆异黄酮样品的提取制备 取脱脂后的豆粉 5 g, 放入冷却回流装置内, 加入 15 倍体积的 80% 的乙醇 80°C 下提取 3 h, 提取 2 次, 合并两次的滤液。用旋转蒸发器挥去乙醇, 把剩余液体蒸干, 加 50 mL 色谱级甲醇回溶, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜备用。

1.3.3 标准品的配制 精密称取的染料木素, 黄豆黄甙, 大豆甙, 大豆甙元, 染料木甙标准品 1 mg, 以色谱级甲醇溶解, 定容至 10 mL, 精密吸取 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 mL 标准品溶液分别置于 10 mL 容量瓶中, 并各加色谱级甲醇定容至刻度, 摇匀。经 HPLC 测定不同浓度对应的峰面积, 得到 5 种标准品的回归方程。

1.3.4 高效液相色谱条件 安捷伦公司的 1100 色谱系统, 色谱条件为: 色谱柱为 Hypersil-ODS C_{18} 柱, 流动相为甲醇: 水: 乙酸 = 28: 71: 1, 甲醇由 $28\% \sim 70\%$, 时间为 30 min, 流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 260 nm, 柱温为 30°C , 进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$, 进样检测提取液大豆异黄酮的含量。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 标准曲线的获得 经 HPLC 测得不同标准品的峰面积, 得到相应的回归方程, Y 为标准品的浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), X 为标准品的峰面积。其各标准品

的回归方程如表 1。

表 1 大豆异黄酮各组分的回归方程

Table 1 The regression equation of isoflavone components		
组分 Components	回归方程 Regression equation	相关系数 r
Genistein	$Y = 0.0108956X + 0.25154854$	0.9993
Genistin	$Y = 0.03874731X + 0.15786826$	0.9993
Daidzein	$Y = 0.01876236X + 0.31807325$	0.9995
Daidzin	$Y = 0.02437703X + 0.49605384$	0.9992
Glycitin	$Y = 0.01901715X + 0.23783757$	0.9996

2.1.2 检测波长的选择 用 VWD 检测器分别对各标准品进行扫描, 结果表明, 各标准品的最大吸收波长均在 260 nm 附近, 所以检测波长选择使用 260 nm 进行检测分析。

2.1.3 流动相的选择 分别选取了 3 种流动相配比: (1) 甲醇: 水 = 45: 55, (2) A: 水: 乙酸 = 100: 1, B: 乙腈: 水: 乙酸 = 50: 50: 1, A 先为 30% ($0 \sim 5\text{ min}$), 再由 $30\% \sim 70\%$ ($5 \sim 35\text{ min}$)。 (3) 自己改进的流动相配比: 流动相为甲醇: 水: 乙酸 = 28: 71: 1, 甲醇 $28\% \sim 70\%$, 时间为 30 min。经过对比发现, 流动相 (3) 分离效果较好, 如图 1 所示。

2.2 不同品种大豆异黄酮含量的差异

经过高效色谱液相检测后, 利用各标品的回归方程计算不同大豆品种的大豆异黄酮的总含量, 表 2, 3, 4 为不同大豆品种的大豆异黄酮的具体含量分析。

从表 2, 表 3 可看出, 不同品种间的异黄酮含量差异显著性明显, 经检测的黄皮大豆的异黄酮平均含量约为 5.0% , 绿皮豆的异黄酮平均含量约为 3.7% , 黑豆中大豆异黄酮的平均含量约为 2.7% ,

表 2 不同大豆品种大豆异黄酮的含量

Table 2 The content of soybean isoflavones in different soybeans			
品种 Varieties	大豆异黄酮含量 Isoflavones content/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	显著性水平 Significance level	
		0.05	0.01
吉农 17 Jinong 17	6562.266	a	A
通农 13 Tongnong 13	4949.923	b	B
吉林 30 Jilin 30	3341.876	c	C
吉黑 1 号 Jihei 1	2957.769	d	D
黑豆 1313 Heidou 1313	2788.292	e	E
吉农 D4103 Jinong D4103	2545.721	f	F
吉农 D4010 Jinong D4010	2420.680	f	F
吉农 D4008 Jinong D4008	1333.549	g	G

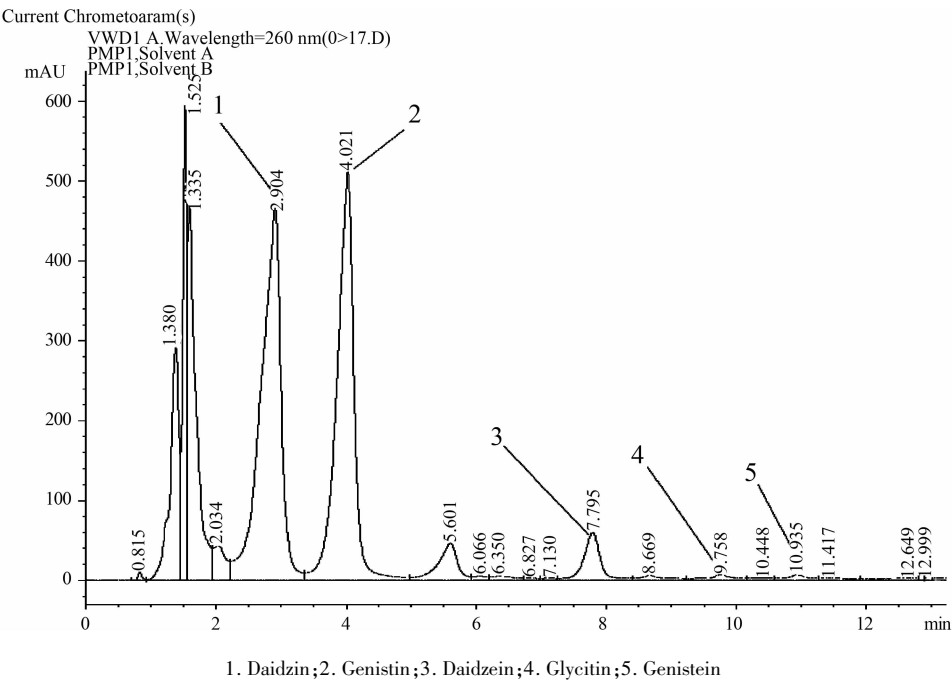


图 1 样品的色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of extracted sample

表 3 不同品种间大豆异黄酮的含量的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Variation source	SS	DF	MS	F value	P value
区组间 Blocks	22515.5184	3	5628.8796	1.2950	0.2959
品种间 Varities	91331270.6230	7	13047324.3747	3001.6700	0.0001
误差 Error	121707.2968	28	4346.6892		
总变异 Total	91475493.4383	39			

高蛋白大豆的异黄酮的平均含量为 2.1‰,其中吉农 17 大豆异黄酮含量最高,含量可高达大豆克重的 6.6‰,其次,绿皮豆吉农 D4008 明显高于其他常规品种。

2.3 不同品种中各异黄酮组分的具体含量
经过液相检测后,分别分析了各个品种中 5 种大豆异黄酮组分的具体含量。如表 4 所示。

表 4 不同大豆品种中各异黄酮组分的具体含量

品种 Varieties	Daidzin	Genistin	Daidzein	Glycitin	Genistein
吉农 17 Jinong 17	1527.817	4716.19	229.771	63.025	25.462
通农 13 Tongnong 13	869.029	1763.928	101.224	35.781	18.331
吉林 30 Jilin 30	988.533	2198.613	120.042	19.063	15.624
吉黑 1 号 Jihei 1	731.116	1580.509	80.437	12.717	15.902
黑豆 1313 Heidou 1313	964.505	1861.070	99.815	17.314	15.066
吉农 D4103 Jinong D4103	448.750	810.882	48.818	14.094	11.004
吉农 D4010 Jinong D4010	830.048	1583.129	99.137	18.557	13.399
吉农 D4008 Jinong D4008	1772.081	2975.707	159.858	24.568	17.710

由表 4 可以看出,吉农 17 不但异黄酮总体含量最高,而且各单体组分含量也较高。绿皮豆 D 4008 D4 变异株-4-9 的总体含量也较高,其中 Daidzin 含量在 8 个品种中最高,同时也可以看出,5 种异黄酮单体中 Daidzin,Genistin 含量最高,为异黄酮的主要单体组分,其它各组分含量比较微小。

3 结论与讨论

通过试验确定色谱检测条件为:色谱条件为色谱柱为 Hypersil- ODS C₁₈柱,流动相为甲醇:水:乙酸=28:71:1,甲醇 28%~70%,时间为 30 min,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 260 nm,柱温为 30℃,进样量

为 10 μL 。

通过液相色谱检测,精确的分析了不同类型的 8 个大豆品种的大豆异黄酮含量,以及各单体组分的具体含量。结果表明大豆异黄酮含量在品种间有显著差异,其中吉农 17 和绿皮豆吉农 D4008 含量较高,分别达到了 6.6‰和 4.9‰,其中吉农 17 比已报道的日本品种 Suzuyutaka (3.6‰) 和美国品种 Lee (4.9‰) 都要高许多^[10],结果为以后大豆的综合开发利用提供了有效的参考依据。

参考文献

- [1] Kudou S, Fleury Y, Welti D, et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill) [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55(9): 2227-2233.
 - [2] 史琳娜, 苏宜香. 大豆异黄酮类对去卵巢大鼠骨丢失的影响 [J]. *营养学报*, 2000, 22(2): 113-118. (Shi L N, Su Y X. The influence of soybean isoflavones on bone loss in ovariectomized female rats [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2000, 22(2): 113-118.)
 - [3] Coward L, Barnes N C, Setchell K D R. Genistein, daidzein and their β -glucosidase conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41: 1961-1967.
 - [4] Messins M, Barnes S. The role of soy products in reducing cancer risk [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1991, 83: 541-546.
 - [5] 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.
 - [6] Holder C L, Churchwell M I, Doerge D R. Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 47: 3764-3700.
 - [7] Zhuo X G, Melby M K, Watanabe S. Soy Isoflavone intake lowers serum LDL cholesterol: a meta-analysis of randomized controlled trials in humans [J]. *American Society for Nutritional Sciences*, 2004, 6: 2395-2400.
 - [8] 李辉, 戴常军, 兰静, 等. 黑龙江省栽培大豆异黄酮含量的初步分析 [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.)
 - [9] 刘延敏, 张援月. 大豆异黄酮提取方法的探讨 [J]. *中华实用中西医结合杂志*, 2004, 17: 2682-2683. (Liu Y M, Zhang Y Y. Discuss means of pick-up of soybean isoflavones [J]. *Chinese Journal of the Practical Chinese with Modern Medicine*, 2004, 17: 2682-2683.)
 - [10] 孙军明, 丁安利, 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): 51-53. (Sun J M, Ding A L, Chang R Z, et al. Elementary analysis on isoflavone content in China soybean [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 1995, 10(4): 51-53.)
-
- (上接第 674 页)
- [4] 牛丽颖, 刘娇, 崔力剑, 等. 淡豆豉对早期动脉粥样硬化大鼠血管内皮损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(5): 120-122. (Niu L Y, Liu J, Cui L J, et al. Effects and mechanisms of semen sojae preparatum extracts on rats injury at the early stage of atherosclerosis [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2007, 23(5): 120-122.)
 - [5] 葛喜珍, 林强, 霍清, 等. 淡豆豉煎剂对高脂血症大鼠主动脉晚期糖化终末产物的抑制作用 [J]. *中药药理与临床*, 2006, 22(3): 101-103. (Ge X Z, Lin Q, Huo Q, et al. Effects of sojae semen praeparatum on advanced glycosylation end products (AGEs) in aortae and serum levels of lipid peroxide in hyperlipemia rats [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2006, 22(3): 101-103.)
 - [6] 顾建明, 潘春云. 大豆异黄酮的测定方法及其评价 [J]. *上海大学学报 (自然科学版)*, 2007, 13(6): 65-67. (Gu J M, Pan C Y. Analytical approach of soybean isoflavones and its evaluation [J]. *Jorunal of Shanghai University (Natural Scienence Edition)*, 2007, 13(6): 65-67.)
 - [7] 毛跟年, 李彦军, 张俊涛, 等. 黑曲霉发酵法制备大豆异黄酮苷元工艺初探 [J]. *食品工业科技*, 2006, 26(11): 129-131. (Mao G N, Li Y J, Zhang J T, et al. Study on production soybean isoflavone aglycon through aspergillus niger fermentaation [J]. *Scinence and Technology of Food Industry*, 2006, 26(11): 129-131.)
 - [8] 张炳文, 宋永生, 郝征红, 等. 发酵处理对大豆制品中异黄酮含量与组分影响的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(7): 6-9. (Zhang B W, Song Y S, Hao Z H, et al. The effects of fermentation process on total content and type of isoflavones in soybean food [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2002, 28(7): 6-9.)
 - [9] 崔力剑, 黄芸, 詹文红, 等. 发酵处理对大豆中总异黄酮含量的影响 [J]. *大豆科学*, 2007, 26(4): 588-590, 596. (Cui L J, Huang Y, Zhan W H, et al. effect of ferment tation process on total content of isoflavones in soybean [J]. *Soybean Science*, 2007, 26(4): 588-590, 596.)
 - [10] 蔡琨, 冯华, 田维毅. 纯种发酵对淡豆豉主要有效成分的影响 [J]. *甘肃中医学院学报*, 2006, 18(5): 43-44. (Cai K, Feng H, Tian W Y. Effects of pure breed fermentation on major effective component in semen sojae praeparatum [J]. *Jorunal of Gansu College of Traditional Chinese Medicine*, 2006, 18(5): 43-44.)