

大豆异黄酮提取-测定优化体系的建立

张 艳, 李晓薇, 张海军, 张庆林, 翟 莹, 钱丹丹, 晏晓峰, 王庆钰, 李景文

(吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062)

摘 要: 利用超声波法提取大豆异黄酮, 结合三波长紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量, 对大豆异黄酮提取方法进行优化。结果获得的最优提取条件为: 料液比 1:20、乙醇浓度 50%、提取时间 30 min, 提取 2 次; 并用三波长法测定 24 个大豆品种异黄酮含量, 发现品种间异黄酮含量有显著差异, 其中吉林 32 和吉林 35 含量最高, 分别达到了 0.292% 和 0.259%。

关键词: 大豆异黄酮; 超声波; 三波长; 优化体系

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)01-0141-03

Establishment of an Optimized System about Extraction-Determination of Soybean Isoflavone

ZHANG Yan, LI Xiao-wei, ZHANG Hai-jun, ZHANG Qing-lin, ZHAI Ying, QIAN Dan-dan, YAN Xiao-feng, WANG Qing-yu, LI Jing-wen

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

Abstract: The method to extract soybean isoflavone by ultrasonic wave was optimized, the content of which was determined by three-wave length UV spectrophotometry, in order to develop a high performance extraction-determination method of isoflavones in soybean. Results showed that the optimized condition were as follows: the ratio of material to solvent was 1:20, concentration of ethanol was 50%, extraction time was 30 min, with 2 replicates. Twenty-four soybean varieties was measured, their contents varied significantly. The content of soybean isoflavones was highest in Jilin 32 and Jilin 35, 0.292% and 0.259%, respectively.

Key words: Soybean isoflavones; Ultrasonic wave; Three-wave length UV spectrophotometry; Optimized system

大豆异黄酮是苯丙烷类代谢途径的一种次生代谢产物, 被称为“健康促进剂”^[1], 因为适当的摄入大豆异黄酮能减少患乳腺癌、结肠癌、冠心病等的发病几率^[2]; 且其具有类雌激素作用以及抗激素等药理作用, 在医药上运用十分广泛^[3]。但是大豆异黄酮在自然界中分布狭窄, 只存在于少数的被子植物, 其中蝶形花亚科的大豆中含量最为丰富。因此, 提高大豆异黄酮的提取率, 增加测定方法的准确率, 能为大豆异黄酮的进一步研究提供基础。近年来, 超声波法解决了浸提法提取时间长的问题, 而且能够提高提取率^[4]; 而鞠兴荣等^[5]发现利用三波长紫外分光光度法测定异黄酮含量具有消除杂质干扰、提高准确率的优点, 而将这 2 种方法结合应用于大豆异黄酮研究还未见系统报道。现利用大豆异黄酮含量最多的染料木苷 (genistin) 作为标准品^[6], 利用超声破碎结合三波长紫外分光光度法

测定了大豆异黄酮含量^[9], 旨在为大豆异黄酮的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 大豆粉; 无水乙醇 (分析纯); 蒸馏水; 大豆异黄酮标准品, 染料木苷 (G, genistin, 纯度 98%, sigma 公司出品)。

1.1.2 仪器 MV-2550 紫外可见分光光度计: MNICO 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司; 超声波细胞粉碎机: 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的绘制 取 2 mg 染料木苷标准品, 用 80% 的乙醇溶解定容至 10 mL, 得到 0.2 mg · mL⁻¹ 标准品溶液。用移液管精密量取 0.1、

收稿日期: 2010-11-06

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项子课题 (2008ZX08004-003); 国家自然科学基金面上项目 (30971808); 吉林省科技发展计划重点项目 (20080204)。

第一作者简介: 张艳 (1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆分子育种。E-mail: bio_zy@163.com。

通讯作者: 王庆钰 (1963-), 女, 教授, 博士, 主要从事作物遗传育种与分子生物学研究。E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn。

0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 80% 乙醇定容至 10 mL,得到浓度梯度为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液。测定这 6 个浓度的标准溶液在 240 nm、260 nm、280 nm 3 个波长处吸光值。分别计算 ΔA ,计算方法为: $\Delta A = A_{260} - (A_{240} + A_{280})/2$ 。以 ΔA 为纵坐标,各标准液浓度为横坐标,绘制标准曲线,以测得的光密度值与纯品量所作的标准工作曲线见图 1。

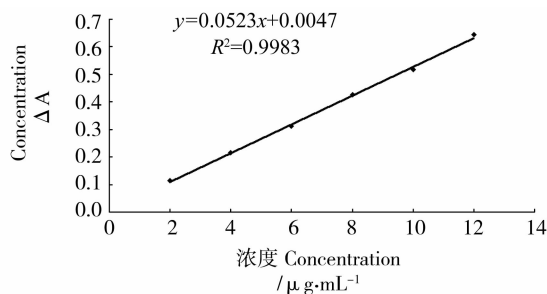


图 1 染料木苷标准品的标准曲线

Fig.1 Standard curve of standard genistin

1.2.2 大豆异黄酮含量测定 准确称取大豆全豆粉于三角瓶中,加入 60 mL 一定浓度的乙醇,一定功率超声提取一段时间;取上清液用 0.45 μm 的膜过滤;提取 2 次,合并滤液,滤液用一定浓度乙醇稀释到适当倍数,用 MV-2550 分光光度计测定 240、260 和 280 nm 3 个波长处的吸光值,根据标准曲线的回归方程计算 ΔA 值,依标准曲线计算样品的异黄酮含量。

含量 (%) = 提取液中大豆异黄酮总量/所用豆粉总量 $\times 100\%$

1.2.3 提取方法的正交试验设计 以大豆异黄酮提取量为考察指标,根据预试验选取乙醇溶液浓度,提取时间,料液比和超声波功率 4 个因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,做 3 次重复,确定三波长紫外分光光度法提取大豆异黄酮的最佳提取条件。

1.2.4 精密度试验 精密吸取 4 mL 标准液母液以 80% 乙醇稀释至 10 mL,分装为 5 管,分别测定三波长处的吸光值,计算 ΔA 值,并根据标准曲线计算溶液浓度。

1.2.5 加样回收率 精密吸取 5 mL $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准液母液,加入 6 管装有 5 mL 样品提取液的试管中,定容至 10 mL。分别测定三波长处的吸光值,计算 ΔA 值,并根据标准曲线计算溶液浓度。以实测异黄酮含量减去样品异黄酮含量再除以加标量即为加标样回收率 (%)。

1.2.6 不同大豆品种异黄酮含量测定 测定实验室拥有的 24 份吉林省大豆品种,磨成豆粉按 1.2.2 方法测定异黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 标准曲线回归方程

以染料木苷为对照品的标准曲线的回归方程为: $y = 0.0523x + 0.0047$ ($r = 0.9992$, 在 $2 \sim 12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈线性关系)。

2.2 超声波提取法的优化

正交试验因素和水平见表 1,试验结果见表 2。由试验结果可知,以异黄酮得率为评价标准各个因素对异黄酮提取量的影响主次分别为: $A > B > C > D$ 。分析得知最优水平组合为 $A_1B_2C_3D_1$,即乙醇浓度为 50%,料液比为 1:20,提取时间 30 min,超声功率 100 W。从表 2 可以看出,不同的乙醇浓度、提取时间和料液比的显著性明显,具有统计学意义。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

Table1 $L_9(3^4)$ Orthogonal design

水平 Levels	因素 Factors			
	乙醇浓度 (A) Concentration of ethanol (%, V/V)	提取时间 (B) Extraction time /min	料液比 (C) Ratio of material to solvent (m/V)	超声功率 (D) Ultrasonic power (w)
1	50	20	1:6	100
2	70	30	1:50	160
3	80	60	1:20	200

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果分析表

Table 2 The result of orthogonal design

试验号 No.	(A) 乙醇浓度 Concentration of ethanol	(B) 提取时间 Extraction time	(C) 料液比 Ratio of material to solvent	(D) 超声功率 Ultrasonic power	大豆异黄 酮提取量 Extraction ratio of soybean /mg \cdot g ⁻¹
1	1	1	1	1	1.5455
2	1	2	2	2	1.8969
3	1	3	3	3	1.5324
4	2	1	2	3	1.6274
5	2	2	3	1	2.0120
6	2	3	1	2	1.1063
7	3	1	3	2	1.2016
8	3	2	1	3	1.0121
9	3	3	2	1	1.0753
K1	1.6583	1.4582	1.2213	1.5443	
K2	1.5819	1.6404	1.5332	1.4017	
K3	1.0964	1.238	1.582	1.3907	
R	0.5619	0.4024	0.3607	0.1536	

2.3 精密度试验

精密度试验测定数据见表 3。由表可知,平均

浓度为 8.099% ,相对标准偏差 (RSD) 为 1.7% ,表明三波长紫外分光光度法测定大豆异黄酮具有很好的准确度。

表 3 精密度试验测定结果

Table 3 The result of the accuracy experiment				
编号 Number	Δ A	对应浓度 Corresponding concentration / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	平均浓度 Average concentration /%	相对标准偏差 (RSD) Relative standard deviation/%
1	0.423	7.993		
2	0.431	8.145		
3	0.419	7.916	8.099	1.700
4	0.434	8.202		
5	0.436	8.240		

2.4 加样回收试验

加样回收试验结果见表 4, 平均回收率为 94.19% ,变异系数为 4.00% 。

表 4 加样回收试验

Table 4 The result of the average recovery rate					
编号 Number	加标量 Quantity of standard / μg	测得总量 Total quality / μg	平均加标 回收率 Recovery rate of standard /%		
			Recovery rate of standard /%	Average recovery rate of standard /%	相对标 准偏差 Relative standard deviation /%
1	20	40.29	91.00		
2	20	41.91	93.74		
3	20	44.29	99.59	95.00	4.00
4	20	43.41	97.40		
5	20	42.01	93.89		
6	20	40.83	90.95		

2.5 不同大豆品种异黄酮含量测定

利用三波长紫外分光光度法测定了部分大豆品种的异黄酮含量,结果见表 5。

表 5 不同大豆品种大豆异黄酮的含量

品种含量		品种含量		品种含量		品种含量	
Varieties	Content/%	Varieties	Content/%	Varieties	Content/%	Varieties	Content/%
吉林 32 Jilin 32	0.292	吉林 38 Jilin 38	0.205	平安 8 Pinan 8	0.181	吉林 28 Jilin 28	0.122
吉林 35 Jilin 35	0.259	吉育 47 Jiyu 47	0.200	铁荚四粒黄 Tiejiaxilihuang	0.178	东农 42 Dongnong 42	0.128
吉育 71 Jiyu 71	0.267	中国扁茎 Zhongguobianjing	0.199	吉林 16 Jilin 16	0.170	东农 163 Dongnong 163	0.111
吉大豆 2 号 Jidadou 2	0.257	吉林 21 Jilin 21	0.198	吉林 31 Jilin 31	0.147	吉育 88 Jiyu 88	0.226
吉豆 2 Jidou 2	0.239	吉大豆 1 号 Jidadou 1	0.193	合丰 52 Hefeng 52	0.141	吉林 3 Jilin 3	0.188
长农 13 Changnong 13	0.229	九农 23 Jiunong 23	0.192	合丰 43 Hefeng 43	0.132	垦丰 12 Kengfeng 12	0.129

3 结论

利用超声波提取大豆异黄酮并利用三波长紫外分光光度法进行测定,结合超声波法省时、节能、提取率以及三波长法仪器操作简单、准确率高的特点,适于没有高效液相色谱的实验室大批量样品测定。试验确定的最优的提取参数为:料液比 1:20、乙醇浓度 50%、提取时间 30 min,提取 2 次;精密度的变异系数 CV 为 1.72% ,平均加标样回收率为 94.19% ,变异系数 CV 为 4.0% 。

测定 24 个大豆品种,其异黄酮含量在 0.111% ~0.292% 之间幅动。结果表明大豆异黄酮含量在品种间有显著差异,其中吉林 32 和吉林 35 含量最高,分别达到了 0.292% 和 0.259% 。

参考文献

[1] Zhang J,Yu O. Metabolic engineering of isoavone biosynthesis in

seeds[M]. American: American Society of Agronomy, 2008: 151-177.

[2] Adlercreutz H, Höckerstedt K, Bannwart C, et al. Effects of dietary components including lignans and phytoestrogens on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin[J]. Journal of Steroid Biochemistry, 1987, 27: 1135-1141.

[3] 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.)

[4] 田琳,尉震,石军,等. 超声波法在大豆异黄酮提取中的应用[J]. 科技创新导报,2009(12):111. (Tian L,Wei Z,Shi J,et al. Application of ultrosonic wave to extraction of soybean isoflavone [J]. Science and Technology Innovation Herald, 2009 (12):111.)

[5] 鞠兴荣,袁建,汪海峰. 三波长紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量的研究[J]. 食品科学,2001,22(5):46-48. (Ju X Y, Yuan J, Wang H F. Determination of soybean isoflavone content by three-wavelengths UV spectrophotometry[J]. Food Science,22 (5):46-48.) (下转第 146 页)

异黄酮提取量的影响,结果如图 4 所示。

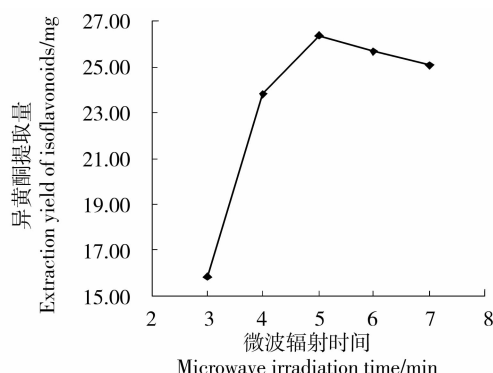


图 4 微波辐射时间对异黄酮提取量的影响

Fig. 4 The effect of microwave irradiation time on extraction yield of isoflavonoids

由图 4 可知,当萃取液在微波辐射作用下,萃取液的升温速率较快,异黄酮很容易从异黄酮中被萃取出来,辐射时间从 3 min 增大到 5 min 的过程中,异黄酮提取量增长较快,这可能是因为微波在短时间内对细胞壁的破裂作用比较大,异黄酮从大豆中析出较多,提取量增大。当辐射时间超过 5 min 后,提取量反而有所下降,这是因为萃取剂乙醇在高温下更易挥发,已经被萃取出的异黄酮部分也随着乙醇蒸气被带出。因此微波辐射时间选择 5 min 为宜。

3 结论

通过考察微波功率、乙醇的体积分数、料液比、微波辐射时间 4 个工艺单因素对异黄酮提取效果

的影响,得到了异黄酮的最佳提取工艺:微波功率为 400 W、乙醇的体积分数为 50%、料液比为 1:4、微波辐射时间为 5 min。在最佳工艺条件下,异黄酮的提取量为 $1.3205 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

参考文献

- [1] 汪玉秀. 大豆异黄酮的研究及应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(增): 113-116. (Wang Y X. Study and application on soybean isoflavone[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2003, 31(s): 113-116.)
- [2] 丁芳林. 大豆异黄酮提取工艺研究[J]. 湖南农业科学, 2006(6): 104-105. (Ding F L. Extraction of isoflavones from soybean. Hunan Agricultural Sciences, 2006(6): 104-105.)
- [3] 罗跃中, 李忠英. 大豆异黄酮的研究概况[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(12): 6506-6508. (Luo Y Z, Li Z Y. Research summary of soybean isoflavone[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(12): 6506-6508.)
- [4] 李玉珍, 肖怀秋, 兰立新, 等. 乙醇法萃取豆粕中总异黄酮的工艺研究[J]. 中国酿造, 2008(19): 50-52. (Li Y H, Xiao H Q, Lan L X, et al. Study on extraction technology of total isoflavones from soybean residue using alcohol[J]. China Brewing, 2008(19): 50-52.)
- [5] Rostago M A, Araljo J M A, Sandi D, et al. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour[J]. Food Chemistry, 2002, 78(1): 111-117.
- [6] 王莹, 翟登攀, 马冬云, 等. 超声波及微波提取豆粕中总黄酮的工艺优化[J]. 佳木斯大学学报(自然科学版), 2009, 27(3): 469-472. (Wang Y, Zhai D P, Ma D Y, et al. Optimization of the extraction of isoflavones from soybean meal by ultrasonic-wave and microwave[J]. Journal of Jiamusi University (Natural Science Edition), 2009, 27(3): 469-472.)

(上接第 143 页)

- [6] 张永忠, 李文滨. 对国内大豆异黄酮研究性论文中“术语混乱的、含量及研究方法错误的”等方面的探讨[J]. 大豆科学, 2005, 24(1): 78-80. (Zhang Y Z, Li W B. Study of complicated technical terms, incorret investigation method in research paper about soybean isoflavone[J]. Soybean Science, 2005, 24(1): 78-80.)
- [7] 董怀海, 谷文英. 三波长比色法测定大豆异黄酮的研究[J]. 中国油脂, 2002, 27(4): 75-77. (Dong H H, Gu W Y. Study on determination of soybean isoflavones by three wavelength colorimetry[J]. China Oil and Fats, 2002, 27(4): 75-77.)

- [8] 孙玲, 魏振承, 张名位. 分光光度法校正测定大豆异黄酮总含量[J]. 食品科学, 2005, 26(3): 209-211. (Sun L, Wei Z Z, Zhang M W. Determining isoflavones by the emendation method in ultraviolet Spectrophotometry[J]. Food Science, 2005, 26(3): 209-211.)
- [9] 孙军明, 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. The survey of content of soybean isoflavone in China[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 1995, 10(4): 51-54.)