

DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-3142. 2013. 05. 021

杨正坤, 龙施华, 周菲菲, 等. 矮秆大豆突变体异黄酮含量变化的研究 [J]. 广西植物, 2013, 33 (5): 699–702

Yang ZK, Long SH, Zhou FF, *et al.* Isoflavone content change of Dwarf mutant soybean [J]. *Guihaia*, 2013, 33 (5): 699–702

矮秆大豆突变体异黄酮含量变化的研究

杨正坤, 龙施华, 周菲菲, 郝再彬, 王秀丽*

(桂林理工大学 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541006)

摘要: 以大豆品种东农 42 及其两个矮秆突变体 (HK8 和 HK11) 为原料, 采用 Luminol-K₃Fe (CN)₆ 化学发光体系的流动注射化学发光法对茎、叶和种子中的异黄酮进行检测, 同时与 HPLC 检测方法相比较。结果表明: 该方法能较简便快速地检测异黄酮含量, 相对标准偏差 (RSD) 为 0.69%~2.30%, 回收率为 95.5%~104.5%。该实验准确地检测出三种大豆材料中异黄酮含量; 异黄酮含量与株高成正比; 种子的异黄酮含量比茎、叶的均高。

关键词: 大豆异黄酮; 含量; 流动注射化学发光; 株高

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142 (2013) 05-0699-04

Isoflavone content change research of dwarf mutant soybean

YANG Zheng-Kun, LONG Shi-Hua, ZHOU Fei-Fei,
HAO Zai-Bin, WANG Xiu-Li*

(College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541006, China)

Abstract: The isoflavones of stems, leaves and seeds were detected by flow injection chemiluminescence method from the Dongnong 42 and two dwarf mutants (HK8 and HK11); at the same time, the flow injection chemiluminescence and HPLC were compared in this paper. The results of the study showed that the isoflavone content could be more simply and fleetly detected by flow injection chemiluminescence, the RSD was 0.69%–2.30%, and the recovery was 95.5%–104.5%. It can be concluded that the isoflavone can be accurately detected by flow injection chemiluminescence method in this experiment; the isoflavone is proportional to the plant height; the isoflavone content of seeds is higher than that of stems or leaves.

Key words: soybean isoflavone; content; flow injection chemiluminescence; plant height

大豆 (*Glycine max* 或 soybean), 中国古称菽, 豆科一年生草本, 双子叶植物, 含有丰富油脂和蛋白。大豆在我国四大作物 (玉米、水稻、小麦、大豆) 中单产最低, 其原因之一是高秆易倒伏, 而克服倒伏的一般方法就是培育矮秆或半矮秆大豆品种, 加之相配套的是结合窄行密植高产栽培技术, 达到提高产量的目的。

大豆异黄酮 (soybean isoflavone) 是大豆生长中

形成的一类重要的次级代谢产物, 其含量与植物株高相关 (Gardner *et al.*, 2009; Kudou *et al.*, 1991; 杨丹等, 2006; 姚开等, 2003)。异黄酮含量的测定方法有比色法、流动注射化学发光法、高效液相色谱法 (HPLC) 等 (Kritz-Silversteid *et al.*, 2002)。异黄酮与杂蛋白的紫外吸收峰较近, 若用比色法测定大豆异黄酮的含量, 背景吸收较大, 杂质将严重干扰异黄酮的测定; HPLC 的测定精确度虽

收稿日期: 2012-11-10 修回日期: 2013-01-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31060193)

作者简介: 杨正坤 (1983-), 男, 安徽宿州人, 硕士研究生, 应用生物技术专业, (E-mail) zhengkyang@163.com.

* 通讯作者: 王秀丽, 高级工程师, 硕士生导师, 研究方向为应用生物技术, (E-mail) wangxiuli1109@163.com.

然高,但成本高,操作繁琐(Sun *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010)。而流动注射化学发光法具有操作简便,灵敏度高,线性范围宽,成本低,且具有测定大批量异黄酮等优点(杨丹等, 2006)。

在碱性介质中, $K_3Fe(CN)_6$ 可以直接氧化大豆异黄酮产生较强的化学发光,从而克服了杂质的影响(杨丹等, 2006)。该文采用了流动注射化学发光法测定大豆异黄酮含量,从而比较矮秆大豆突变体和原品种中茎、叶、种子中异黄酮含量的差异性。该文通过对大豆茎叶种子中异黄酮含量的研究,为以后研究矮秆大豆中的其他物质的含量以及大豆的育种方面提供了一些理论性的依据。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

原品种:东农42;突变体:矮秆HK8和HK11(自有专利品种);此三种大豆均采用盆栽,且在众多盆中随机取30盆大豆茎叶(茎叶均取自生长到第八周的三种大豆苗,且施肥、浇水等管理均相同),而种子取自种植该批豆苗后的剩余籽粒饱满的种子(每个品种随机约取30粒)。

1.2 试验仪器及试剂

流动注射化学发光仪(西安瑞迈电子有限公司);旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);LC-20A高效液相色谱仪(日本岛津公司);芦丁(上海阿拉丁);大孔树脂(上海研拓生物科技有限公司),其余试剂均为国产分析纯。

1.3 异黄酮的提取

大豆茎、叶和种子材料经过80℃干燥24h,取出后粉碎过40目筛,粉末备用。用石油醚对一定量上述粉末进行脱脂,脱脂后自然晾干,室温至恒重。称取干燥后脱脂的粉末,加入60%的乙醇溶液(按料液比为1:20),在一定温度下回流提取一段时间,同法再提取一次,离心,合并两次上清液(张雪茹等, 2010等)。

1.4 异黄酮检测的前处理

将上述上清液过D-101C大孔树脂除去其中大部分色素、糖类等,然后将得到的溶液加到旋转蒸发仪中,旋转蒸发至溶液变为固体,然后将固体放在80℃烘箱中烘干24h,取出粉末,将粉末避光保存在干燥器中,待用(张博坤等, 2009)。

1.5 试验方法与步骤

1.5.1 试验方法 芦丁标准液的制备

称取芦丁标准品(纯度97%)10.00mg,先用少量0.1mol/L NaOH溶液溶解,再用去离子水定容至10mL,即得1mg/mL的芦丁标准液。

(1)流动注射化学发光体系配制:取一定量的铁氰化钾、鲁米诺固体分别配制0.05mol/L的铁氰化钾储备液、0.01mol/L鲁米诺储备液。试验测试前,将两种储备液分别稀释至 5×10^{-4} 、 1×10^{-5} mol/L,并作为工作液(杨丹等, 2006;张雪茹等, 2010)。

(2)HPLC测定大豆异黄酮的色谱条件:色谱柱Shim-pack VP-ODS C18柱(250mm \times 4.6mm, 5 μ m),柱温40℃,流动相为甲醇-乙酸溶液流动相为甲醇:1%乙酸=30:70,检测波长为254nm,流速10 μ L/min(王松等, 2005;张岩等, 2011)。

1.5.2 标准曲线的绘制 (1)准确吸取1mg/mL芦丁标准液0、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0mL分别置于6支10mL容量瓶中,去离子水定容至刻度,充分摇匀,静置10min。取上述溶液分别与 5×10^{-4} mol/L $K_3Fe(CN)_6$ 溶液、 1×10^{-5} mol/L鲁米诺(luminol)溶液在流动注射化学发光仪上测试。以浓度为横坐标,发光强度为纵坐标作图,绘制标准曲线(杨丹等, 2006;张海军等, 2011;等)。

(2)准确吸取1mg/mL芦丁标准液0、0.0625、0.125、0.50、1.00和2.00mL分别置于6支10mL容量瓶中,去离子水定容至刻度,充分摇匀,静置10min。在上述色谱条件下进行测定。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标作图,绘制标准曲线(胡晓娟等, 2008;张岩等, 2011)。

称取大豆异黄酮10.00mg于10mL的容量瓶中,少许无水乙醇溶解,再用去离子水定容至刻度,即为1mg/mL的样品待测溶液。同标准液测定方法相同,测定发光强度和峰面积,根据标准曲线计算出样品的异黄酮含量和回收率(杨丹等, 2005;杨张青等, 2011;等)。

1.5.3 回收率的测定 吸取一定量上述配制的芦丁标准品溶液,加入到样品待检测溶液中,用流动注射化学发光仪检测含量,并计算各个样品的回收率(徐文峰等, 2009;杨丹等, 2006;等)。

2 结果与分析

2.1 建立标准曲线回归方程

用流动注射化学发光仪,以去离子水作空白对照,测定芦丁标准溶液发光强度。芦丁浓度为横坐

标，发光强度的抑光值为纵坐标，绘制曲线，得其线性回归方程式 $Y=813.00X+21.64$ (浓度区间 $0.2\sim 1.0\text{ mg/mL}$)，相关系数 $r=0.9990$ 。通过使用 HPLC 法以芦丁浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，得其线性回归方程式 $Y=8.1\times 10^5 X+1.3\times 10^5$ (浓度区间 $0.0625\sim 2.0\text{ mg/mL}$)，相关系数 $r=0.9999$ 。

2.2 回收率的测定

为了验证试验的准确性，在样品中加入芦丁标准液进行回收试验，其结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 (n=30)

Table 1 Result of recovery rate experimentation

样品 Sample	初始量 Initial amount (mg)	加入量 Added dosage (mg)	测得量 Measured quantity (mg)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
东农 42 种子 Dongnong42 seeds	0.4	1	1.408	102.0	0.83
HK11 种子 HK11 seeds	0.4	1	1.382	95.5	1.70
HK8 种子 HK8 seeds	0.4	1	1.399	99.8	2.02
东农 42 叶 Dongnong 42 leaves	0.2	1	1.209	104.5	1.16
HK11 叶 HK11 leaves	0.2	1	1.198	99.0	1.91
HK8 叶 HK8 leaves	0.2	1	1.201	100.5	0.54
东农 42 茎 Dongnong 42 stems	0.1	1	1.097	97.8	0.97
HK11 茎 HK11 stems	0.1	1	1.095	95.6	0.39
HK8 茎 HK8 stems	0.1	1	1.097	97.0	1.03

表 2 HPLC 与 FI-CL 方法测定芦丁含量比较

Table 2 Contrast content determination of Rutin by HPLC and FI-CL

测定方法 Determination of method	百分含量 Percentage (%)	相对标准偏差 RSD (%)
芦丁标准品 Rutin standard	97.0	—
高效液相色谱法 HPLC	95.1	1.39
流动注射化学发光法 FI-CL	94.2	2.01

从表 2 可以看出，采用流动注射化学发光法测定大豆异黄酮含量，其回收率在 95.5%~104.5% 之间，相对标准偏差在 0.39%~2.02% 之间，结果理想，此方法可行。流动注射化学发光法与高效液相色谱法测定芦丁中的黄酮含量的结果相近，相对标准偏差为 2.01% 和 1.39%，在误差允许的范围内，两者的 RSD 较接近。但流动注射

化学发光法操作方便简单、成本低，溶液易配制，周期短等。

2.3 样品中大豆异黄酮含量的测定和株高的调查

表 3 和图 1 表明：东农 42 种子、HK8 种子、HK11 种子中异黄酮含量分别为 1.842、1.504、0.946 g；东农 42 茎、HK8 茎、HK11 茎中异黄酮含量分别为 0.162、0.153、0.143 g；东农 42 叶、HK8 叶、HK11 叶中异黄酮含量分别为 0.327、0.272、0.209 g。表 3 和图 2 表明，东农 42 株高最高，HK8 次之，HK11 最低。

表 3 大豆茎、叶、种子中异黄酮含量测定与株高调查 (n=30)

Table 3 Determination of isoflavone in soybeans stems and leaves and seeds and height survey

材料 Material	发光强度 Luminous intensity	含量 Content (mg/g)	相对标准偏差 RSD (%)	株高 Plant height (cm)
东农 42 Dongnong 42	种子 Seeds	1518.8	0.85	50±3
	茎 Stems	153.6	1.07	
	叶子 Leaves	287.4	1.96	
HK11	种子 Seeds	790.8	1.35	42±2
	茎 Stems	138.2	0.69	
	叶子 Leaves	243.0	2.11	
HK8	种子 Seeds	1245.2	2.30	46±2
	茎 Stems	146.0	1.33	
	叶子 Leaves	191.6	0.94	

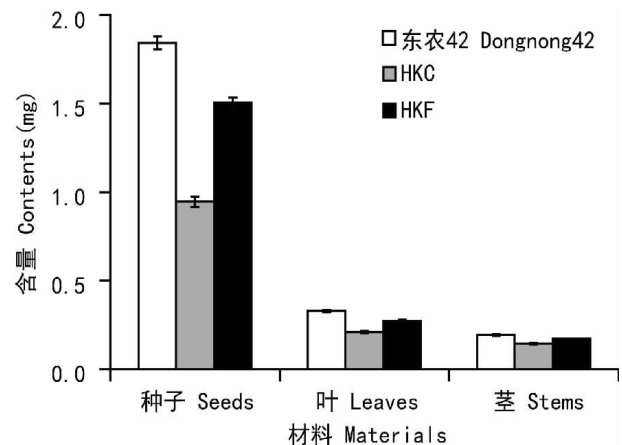


图 1 原品种和突变体的茎、叶、种子中异黄酮含量比较
Fig. 1 Comparison of isoflavone in soybeans stems, leaves and seeds

2.4 F 检验分析整体品系差异

本实验用 F 检验即方差分析的方法测验多个样本平均数差异是否显著。由表 4 可以看出 HK11 突变体与东农 42 和 HK8 整体差异极显著，说明这三种中大豆异黄酮含量相差很大。

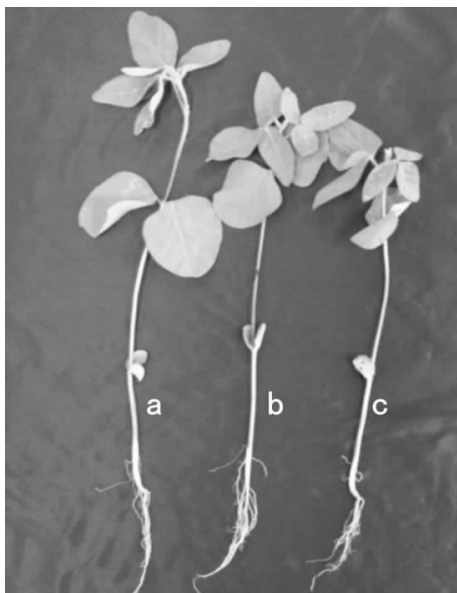


图 2 三种大豆材料的比较 a. 东农 42; b. HK8; c. HK11.

Fig. 2 Comparison of three kinds of soybeans
a. Dongnong 42; b. HK8; c. HK11.

表 4 不同大豆材料的异黄酮含量整体差异分析

Table 4 Analysis on different contents of isoflavone in different soybeans

变异因素 Factor of variation	自由度 DOF	平方和 Sum of squares	方差 Variance	F 值 F value	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
组内 Within the group	30	34.79	1.16	4.83	1.96	2.58
组间 Between groups	2	0.83	0.42			
误差 Error	60	14.41	0.24			

3 结论与讨论

大豆叶茎中的异黄酮的含量明显比种子中异黄酮含量低，且两突变体茎叶种子中的异黄酮均比东农 42 的含量低。

紫外分光光度法测定大豆异黄酮的含量，背景吸收较大，杂质将严重干扰异黄酮的测定；HPLC 操作较为复杂，试剂的配制和试验条件的要求较为严格，而流动注射化学发光法操作简单，试剂配制和试验条件等要求也较为简便，而 $K_3Fe(CN)_6$ 在碱性条件下可以直接氧化异黄酮产生发光，这说明该化学发光体系的发光体为异黄酮氧化的产物。氧化产物吸收了该反应所放出的化学能被激发，由激发态降到基态的这部分能量以光子的形式释放。由于大孔树脂除掉了一些色素和一些糖类杂质，而在碱性介质中， $K_3Fe(CN)_6$ 可以直接氧化大豆异

黄酮产生较强的化学发光，从而可以克服了色素、糖和醇溶性蛋白等杂质的影响（杨丹等，2005，2006；张雪茹等，2010）。以往的研究方法和内容方面较为单一，没有方法之间的比较，且没有对茎叶种子之间异黄酮含量的差异性及与株高之间关系的研究，因而说服力不是很强，而本文采用流动注射化学发光法与较为经典且准确的 HPLC 方法进行了比较，同时对矮秆大豆茎叶种子组内与组间的异黄酮含量进行了比较研究，得出含量的差异性及与矮秆大豆株高的关系。

从以上可知，本实验通过流动注射化学发光法较为准确的测定了三种大豆茎叶种子中异黄酮含量的差异性，且植株高的东农 42 的异黄酮含量比其两个突变体相应部位高；从本实验可知大豆异黄酮含量与大豆株高成正比，同时还可知相应的种子中异黄酮含量明显比茎、叶高。通过本实验的测定结果，为以后研究赤霉素和甜菊糖苷对大豆植株和茎叶种子中的其他物质含量的影响以及大豆的育种方面提供了一些理论性的根据。

参考文献：

- 姚开，潘廖明. 2003. 大豆异黄酮提取分离技术及检测方法研究 [D]. 成都四川大学
- Gardner CD, Chatterjee LM, Franke AA. 2009. Effects of isoflavone supplements vs soy foods on blood concentrations of genistein and daidzein in adults [J]. *J Nutr Biochem*, **20** (3): 227-234
- Guo R (郭睿), Yao ZJ (姚占静), Zhang CS (张春生), et al. 2008. Research of extracting isoflavone from soybean (大豆异黄酮提取工艺研究) [J]. *J Shaanxi Univ Sci & Technol: Nat Sci Edit* (陕西科技大学学报·自然科学版), **26** (1): 68-71
- Hu XJ (胡晓娟), Huang XS (黄晓书), Li WH (李卫华), et al. 2008. Determination of soybean isoflavones in health food by high performance liquid chromatography (高效液相色谱法测定保健食品中的大豆异黄酮) [J]. *Chin J Analy Lab* (分析实验室), **27** (1): 103-106
- Kudou S, Fleury Y, Welt D, et al. 1991. Malony isoflavone glucosides in soybean seeds (*Glycine max* Merri.) [J]. *Agric Biol Chem*, **55** (9): 2227-2233
- Mao HL (毛慧玲), Peng J (彭娟), Sun SF (孙少发), et al. 2007. Study on the technology of extracting soybean isoflavone (大豆异黄酮提取工艺条件的研究) [J]. *J Anhui Agric Univ* (安徽农业大学学报), **34** (2): 274-278
- Sun JM, Ding AL, Dong HR. 2000. High performance liquid chromatographic determination of isoflavone content in soybean test sample [J]. *Soyb Sci*, **19** (1): 15-20
- Wang CE, Zhao TJ, Gai JY. 2010. Establishment of a rapid HPLC method for quantifying isoflavone components and its application in tofu processing [J]. *Acta Agron Sin*, **36** (12): 2062-2072

(下转第 590 页 Continue on page 590)

(Proctor 1985).

The collections from Penang and Johor are of cultivation origin or represent wild populations should be investigated.

Selaginella siamensis Hieron. in Bot. Tidsskr. 24: 113. 1901; Alston in Lecomte, Fl. Gen. Indo-chine 7 (2):560, f. 65: 6-10. 1951; Tagawa et K. Iwats., Fl. Thailand 3 (1): 18. 1979; X. C. Zhang, Fl. Reipub. Popul. Sin. 6 (3): 147, pl. 38, f. 1-7. 2004. TYPE: Thailand (Siam), Koh-Chang Prov., Chantaburi, Nipple, Schmidt 650 (Danish Exped. to Siam 1899-1900), 2000 ft., on rocks in open jungle.

Selaginella reptans Ridl., J. Str. Br. Roy. As. Soc. 80:155. 1919, non Sodiro 1893; *Selaginella ridleyana* Kumm., Magyar Bot. Lapok 26:100. 1928. TYPE: Thailand (Siam), Pulan Rawei, Laukawi Isl., Riddley 15930.

Plants terrestrial, evergreen or seasonally green, brown when dry, creeping or suberect. Rhizophores up to middle part of main stem, emanating axillary from the abaxial side (lower surface) of the forking point of stem. Main stem 1.5-2 mm diam. in lower part, glabrous. Leafy branches glabrous, dorsiventrally flattened. Lateral leaves ovate-oblong, acute to mucronate with long aristae at apex, cordate at base, to 3 mm long, 1.5 mm broad; edges ciliate throughout with white setae of about 0.1 mm in length, texture softly

papyraceous, green, or sometimes reddish. Median leaves nearly the same as or smaller than lateral ones in size, asymmetrically oblong to suborbicular with long pale tails at apex, ciliate at margin. Strobili usually (5-8) mm × 1.2 mm; sporophylls uniform, ovate-subtriangular with long tail.

Representative specimen: Malaya Peninsula, Kedah, peak, 2500 ft, 4-VIII-1919, M. Haniff & M. Nor 4741 (SING).

Geographical Range: Thailand, Laos, Cambodia, Vietnam, China (Yunnan), Malaya Peninsular.

Ecology: Terrestrial on rather dry ground or on rocks in light shade or in open areas at 1 000-1 800 m alt.

Note: This species is distinct in its creeping stems, with dorsal and ventral leaves similar to each other.

Reference:

- Rosenburgh Van. 1915. Malayan Fern Allies. Batavia: Landsdr ukkerij
 Alston AHG. 1934. The genus *Selaginella* in the Malay Peninsula [J]. *Straits Gard Bull*, **8**:41-62
 Alston AHG. 1937. The Selaginellae of Malay Islands II [J]. *Su-matra Bull Jard Bot Buitenzorg*, **14**(3):175-186
 Wong KM. 1983. Critical observations on Peninsular Malaysian *Selaginella* [J]. *Garden's Bull*, **35**(2):107-135
 Wong KM. 2010. Selaginellaceae [M] // Flora of Peninsular Malaysia. Kuala Lumpur: Forest Research Institute Malaysia, **1**: 49-86

(上接第 702 页 Continue from page 702)

- Xu WF(徐文峰). 2009. Determination of total flavonoids in ginkgo leaves using flow-injection inhibitory chemiluminescence(流动注射-抑制化学发光法测定银杏叶中总黄酮含量) [J]. *Chin J Analy Lab*(分析试室), **28**(12):67-69
 Yang D(杨丹), Hao ZB(郝再彬). 2005. Determination of stevioside by flow injection chemiluminescence(流动注射化学发光法测定甜叶菊糖苷) [J]. *Chem Eng*(化学工程师), **4**:23,24,41
 Yang D(杨丹), Cang J(苍晶), Hao ZB(郝再彬), et al. 2006. Flow Injection-chemiluminescence determination of soybean isoflavone(流动注射化学发光法测定大豆异黄酮) [J]. *Chin J Analy Chem*(分析化学), **34**(8):1 113-1 115
 Yang ZQ(张青), Hu BN(胡小宁), Li GQ(李国全), et al. 2011. Determination of soybean isoflavones by static instantaneous steady injection chemiluminescence(静态瞬稳注射-化学发光法测定大豆异黄酮) [J]. *Phys Test Chem Analy Part B: Chem Analy*(理化检验·化学分册), **47**(6):739-740
 Zhang BK(张博坤), Wang WG(王文广), Yin GM(殷广明), et

- al. 2009. Research of new extracting isoflavone from soybean (大豆异黄酮提取新工艺的研究) [J]. *Soyb Sci & Technol* (大豆科技), **4**:61-64
 Zhang HJ(张海军), Wang Y(王英), Wang QY(王庆钰). 2011. Survey on methods of detection for soybean isoflavone(大豆异黄酮检测方法研究概述) [J]. *Cereals & Oils*(粮食与油脂), **3**:39-42
 Zhang XR(张雪茹), Zhou SW(周绍文). 2010. Determination of soybean isoflavones by static instantaneous steady injection chemiluminescence(静态瞬稳注射化学发光法检测大豆异黄酮) [J]. *Chin J Health Lab Technol* (中国卫生检验杂志), **20**(3):538-540
 Zhang Y(张岩), Wang LN(王莉娜). 2011. Determination of soybean isoflavones in Natto and Natto capsule by HPLC(高效液相色谱法测定纳豆及纳豆胶囊中的大豆异黄酮含量) [J]. *J Beijing Technol Busin Univ: Nat Sci Edit* (北京工商大学学报·自然科学版), **29**(1): 38-41