

三波长紫外分光光度法测定鹰嘴豆籽粒总异黄酮含量的研究

吴敏^{1,2}, 袁建³, 俞阆², 李燕², 王红玲¹, 张巨松², 麻浩¹

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏南京 210095;

2. 新疆农业大学农学院, 新疆乌鲁木齐 830052; 3. 南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏南京 210003)

摘要:通过对鹰嘴豆籽粒中的异黄酮提取和测定方法的优化, 拟建立一套适用于测定鹰嘴豆总异黄酮的三波长紫外分光光度法。结果表明: 鹰嘴豆总异黄酮最佳提取条件为: 0.30 g 不脱脂豆粉溶于 25 ml 浓度 70% 的乙醇溶液中, 在 60℃ 水浴温度下提取 3 h; 一次提取效率为 86.5%, 两次合并提取效率可达 97.0%; 建立的测定方法精密度变异系数(CV)为 1.14%, 平均加标样回收率为 99.0%, 变异系数(CV)为 3.2%。采用三波长测定可有效消除干扰物质对测定的影响, 该方法具有操作简便、重现性好、精密度高等特点, 适于大批量样品测定以及产品生产的质量控制及监测。

关键词: 鹰嘴豆; 总异黄酮; 三波长定量测定

中图分类号: S529 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2007)06-0096-06

鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)因种子形如鹰头、鸡头或山状突起而得名, 其籽粒富含蛋白质(20%)、脂肪(4.6%~6.1%)、淀粉(44.89%~52.80%)、矿物质(2.36%~4.67%)和粗纤维(2.4%~10%)。此外, 尚含胆碱、肌醇、维生素、异黄酮、低聚糖和皂甙等活性成分。鹰嘴豆起源于亚洲西部和近东地区, 主要分布在世界上温暖而又比较干旱的地区, 全世界栽培面积约 100 万 hm^2 , 其中印度和巴基斯坦两国的种植面积占全世界的 80% 以上。我国 20 世纪 50 年代从前苏联引种鹰嘴豆, 目前栽培种植主要分布在新疆、青海、甘肃、云南等地^[1]。

实验证明, 豆类作物中异黄酮具有防癌抗癌(抗肿瘤)、抗氧化、强心、降血脂等作用, 在医学上一直以來被用来预防和治疗心血管系统疾病^[2~4]。豆科作物异黄酮含量检测技术目前主要有高效液相色谱法^[3~12]、紫外分光光度法^[13~16]、薄板层析法^[13]、利用酸法水解异黄酮再测定^[17]等方法。高效液相色谱法可精确测定异黄酮各组分的含量, 但仪器设备昂贵、操作较繁琐、成本相对较高^[4~10]; 采用薄层色谱法可以进行大豆异黄酮的定性分析和半定量分析, 不适用于提取条件的研究^[21]; 利用酸解法也能获得大豆异黄酮苷元, 但是人们对酸解条件下得到

的大豆异黄酮苷元的稳定性表示怀疑^[22]。紫外分光光度法测定总异黄酮含量精度较高, 样品处理相对简单^[16], 检测速度较快, 费用较低, 适用于大批量样品的分析。

目前对鹰嘴豆籽粒中异黄酮的研究报道较少。因此, 本研究在参考大豆等豆科作物中总异黄酮含量紫外分光光度测定方法的基础上, 通过对提取和测定方法的优化, 探索一套适宜于鹰嘴豆籽粒总异黄酮含量的测定方法, 从而为高异黄酮含量的鹰嘴豆种质筛选和新品种选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2005 年在新疆农业大学试验农场种植收获的鹰嘴豆光粒品种, 经高速万能粉碎机磨成细粉, 过 80 目筛, -4℃ 冷藏保存。

1.2 仪器和标样

日本岛津 UV-VIS2401PC 紫外分光光度计; 鹰嘴豆芽素 A(Biochanin A)标样购自美国 sigma 公司(纯度(97%))。

1.3 标准储备液及标准系列溶液的制备

准确称取鹰嘴豆芽素 A 10.0 mg 用 70% 的乙

收稿日期: 2006-12-21

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点项目(XJEDU2004117); 新疆高校科研基金项目(XJEDU2004G007); 长江学者和创新团队发展计划

作者简介: 吴敏(1982-), 女, 甘肃兰州人, 在读硕士研究生, 主要从事植物品质改良研究与应用。

* 通讯作者: 张巨松, E-mail: xjndzjs@xj.cninfo.net; 麻浩, E-mail: Lqncsi@njau.edu.cn。

醇溶解,并定容至 100 ml,即为标准储备液。

移取标准储备液分别配制成浓度为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 7 个标准溶液。

1.4 测定方法的研究

1.4.1 标准曲线的制备 分别对 7 个浓度(2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的标准溶液进行紫外扫描,扫描的紫外区域为 200~350 nm,测定 243、263、283 nm 三波长处吸光值。分别计算 7 个浓度的标准溶液的校正吸光值 A ,计算方法^[21]为: $A = A_{263} - (A_{243} + A_{283})/2$ 。以校正吸光值 A 为纵坐标,各标准液浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.4.2 样品提取的优化 称取鹰嘴豆粉 0.30 g 置于 25 ml 的带塞试管中,加入乙醇水浴提取,过滤,取滤液用乙醇定容至 25 ml,取该提取液进行紫外扫描,测定 243、263、283 nm 三波长处吸光值 A_{243} 、 A_{263} 、 A_{283} ,计算校正吸光值 A ,并进而计算异黄酮含量。

1) 脱脂对异黄酮含量的影响。取一定量的鹰嘴豆粉置于滤纸包中并放入索氏提取装置用石油醚脱脂 20 h。取脱脂鹰嘴豆粉与未脱脂豆粉各 0.30 g 分别溶于 25 ml 70%乙醇中,水浴提取后过滤,取滤液用乙醇定容至 25 ml,取该提取液进行紫外扫描,测定 243、263、283 nm 三波长处吸光值 A_{243} 、 A_{263} 、 A_{283} ,计算校正吸光值 A ,并进而计算异黄酮含量。

2) 最佳料液比的确定。参考董怀海^[20]的大豆异黄酮最佳料液比来设计鹰嘴豆异黄酮微量提取最佳料液比。称取鹰嘴豆粉 0.20、0.30、0.40、0.50 g,分别溶于 25 ml 乙醇中,采用三波长测定吸光值,并计算异黄酮含量,以确定最佳料液比。

3) 提取液浓度试验。称取 10 份各 0.30 g 的鹰嘴豆粉,分别采用浓度为 50%、60%、70%、80%、90%的乙醇在 60℃水浴提取 3 h,取提取液进行紫外扫描,采用三波长测定吸光值,并计算异黄酮含量,以确定最适提取浓度。

4) 提取温度试验。称取 10 份各 0.30 g 的鹰嘴豆粉,加 70%乙醇 25 ml,分别在 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃水浴提取各 3 h 后取提取液进行紫外扫描,采用三波长测定吸光值,并计算异黄酮含量,以确定最适提取温度。

5) 提取时间试验。称取 10 份各 0.30 g 的鹰嘴豆粉,加 70%乙醇 25 ml,在 60℃水中分别水浴 1、2、3、4、5 h,提取后进行紫外扫描,采用三波长测定吸光值,并计算异黄酮含量,以确定最适提取时间。

6) 提取效率试验。取鹰嘴豆粉 0.30 g 共 3 份,

分别移入带塞试管,加 70%乙醇 25 ml,60℃水浴 3 h,过滤,测定吸光值,并计算异黄酮含量。以 3 份样品异黄酮含量的平均值作为第一次提取的异黄酮实测值;滤渣仔细回收,按上述方法再提取 2 次,并分别计算第二次和第三次提取的异黄酮平均实测量;将 3 次提取的异黄酮实测量相加,计算第一次、第二次和第三次提取效率。

1.4.3 精密度测验 准确称取鹰嘴豆粉 0.30 g 共 8 份,分别置于 25 ml 带塞试管中,按前述 1.4.2 优化的结果进行提取,最后采用三波长测定其异黄酮的百分含量。

1.4.4 加标样回收率 取 10 个 25 ml 带塞试管,依次编为 1~10 号。准确称取鹰嘴豆粉 0.30 g 共 10 份,分别置入 1~10 号试管中。1~4 号不加鹰嘴豆芽素 A 标准储备液,5~6 号加鹰嘴豆芽素 A 标准储备液各 1 ml,7~8 号加 2 ml,9~10 号加 3 ml,最后用 70%的乙醇定容至 25 ml。按前述 1.4.2 优化的结果进行提取,采用三波长测定吸光值。以 1~4 号试管中实测异黄酮量的平均值为样品异黄酮含量,5~10 号试管中的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(%)。

1.5 鹰嘴豆样品中异黄酮含量的计算

将平均校正吸光值 A 代入标准曲线的回归方程中,计算后得 25 ml 的乙醇提取液中异黄酮的浓度。计算鹰嘴豆籽粒样品中异黄酮的质量比含量,计算公式为:

$$H = \frac{C \times 25\text{ml}}{0.3\text{g}}$$

式中, H 表示鹰嘴豆样品中异黄酮的含量($\mu\text{g}/\text{g}$); C 表示 25 ml 的乙醇提取液中异黄酮的浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)。

2 结果与分析

2.1 鹰嘴豆籽粒中总异黄酮最大吸收波长及分析波长的确定

7 个不同浓度的鹰嘴豆芽素标样均在 263 nm 处有最大吸收峰值(见图 2,图中仅示 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的吸收光谱),而鹰嘴豆籽粒总异黄酮在 263 nm 处也有最大吸收峰值,且波形相似(图 1)。这一结果与大豆籽粒总异黄酮最大吸收峰值一致^[5]。但豆油、色素等在 250~315 nm 间有较弱的紫外光谱,测定时采用三波长(243 nm,263 nm,283 nm)法,可以有效地消除杂质的干扰^[21]。因此,确定用三波长方法对鹰嘴豆异黄酮含量进行测定。

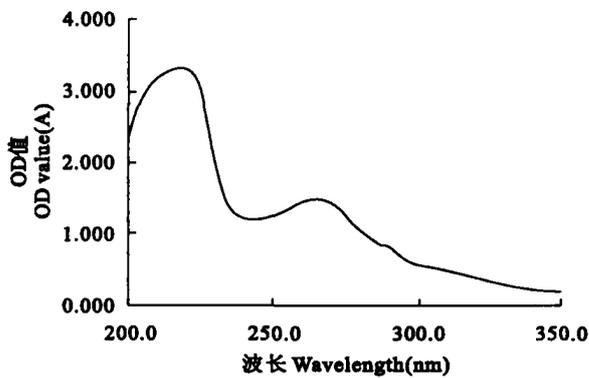


图 1 鹰嘴豆籽粒中总异黄酮紫外分光吸收光谱
Fig.1 The light spectrogram of the total isoflavones of chickpea seeds by UV-spectrophotometer

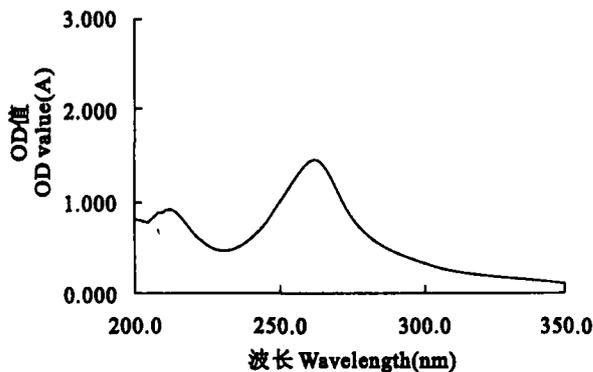


图 2 浓度为 12 μg/ml 的鹰嘴豆芽素 A 溶液的紫外分光吸收光谱
Fig.2 The light spectrogram of 12 μg/ml biochanin A by UV-spectrophotometer

2.2 标准曲线统计检验^[25]

按 1.4.1 方法所得标准曲线回归方程为:

$$y = 0.0782x - 0.0099 + \epsilon \quad \epsilon \sim N(0, \sigma^2)$$

式中, ϵ 是回归方程的误差项; ϵ 值符合正态分布; σ 是回归方程的估计标准误。测定水平 $n = 7$, 重复测定次数 $p = 3$ 。

$$F = \frac{(SP)^2 / SS_x}{Q / (n - 2)} = 2124.82 > F_{0.01}(1, 5) = 16.26$$

式中, SP 简称乘积和 (x 的离均差和 y 的离均差的乘积之和); SS_x 是 x 的离均差平方和; Q 是离回归平方和也称剩余平方和。

相关系数 $r = 0.9997$, 决定系数 $R^2 = 0.9996$, 估计标准误为: $\sigma = 0.001527$ 。

F 测验表明, 直线回归关系极显著, 说明异黄酮浓度与吸光值之间存在极显著的线性关系, 回归精度良好(图 3)。

2.3 样品提取与纯化条件的优化

2.3.1 脱脂对鹰嘴豆异黄酮含量的影响 分别对鹰嘴豆粉和鹰嘴豆脱脂豆粉测得的异黄酮含量进行

t 测验, 值未达到 0.05 显著水平。说明脱脂对于测定鹰嘴豆中异黄酮含量没有影响。

2.3.2 最佳物料比的确定 从图 4 可看出, 当 0.30 g 豆粉溶于 25 ml 乙醇中异黄酮提取率最高, 高于, 或低于该物料比, 异黄酮的提取率较低。因此确定最佳料液比为 0.30:25。

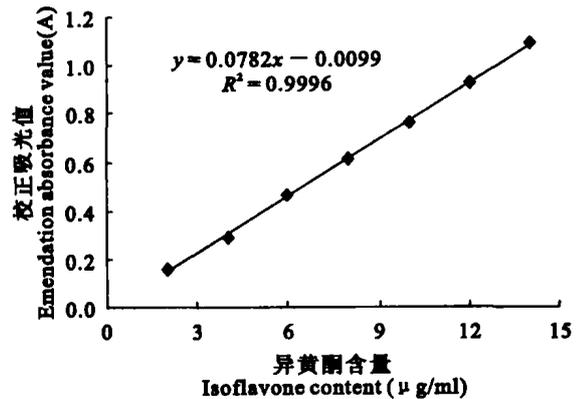


图 3 用鹰嘴豆芽素 A 所作标准曲线

Fig.3 The standard curve of chickpea Biochanin A

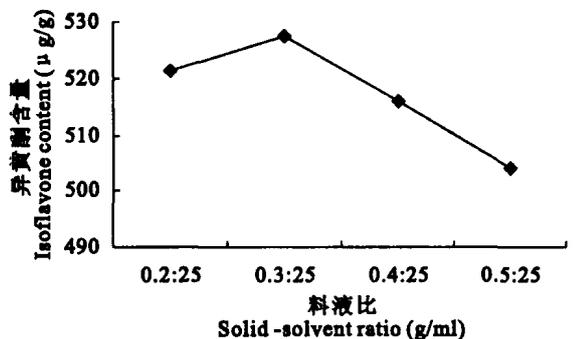


图 4 不同料液比对异黄酮提取的影响

Fig.4 The effect of different solid-solvent ratio on the extracting efficiency of chickpea isoflavones

2.3.3 最佳乙醇浓度的确定 提取液乙醇浓度在 50%~60% 时, 提取量基本一致; 70% 的乙醇浓度下异黄酮提取含量最高, 80%~90% 浓度时反而提取不完全(图 5)。所以最佳乙醇浓度为 70%。

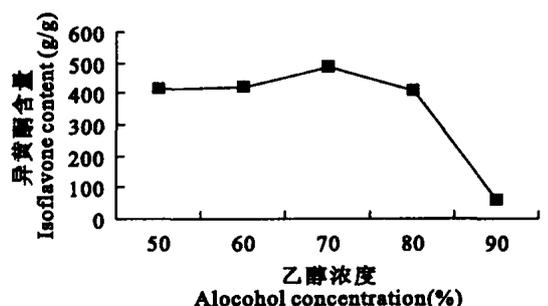


图 5 提取液浓度对异黄酮提取量的影响

Fig.5 The effect of the different alcohol concentrations on the extracting efficiency of chickpea isoflavones

2.3.4 最佳温度的确定 改变水浴温度对异黄酮提取量的影响实验表明:温度低于 60℃时,随温度增加提取量逐渐增加;在 60℃时提取量达到一个高值,60℃~70℃时,提取量有所下降;70℃~80℃时,随温度增加提取量虽有提高,但试管中的溶液易沸腾溢出,较难控制。所以,确定 60℃左右的水浴提取温度较为适宜(图 6)。这一温度与鞠兴荣等人研究大豆的实验结果基本一致^[21]。

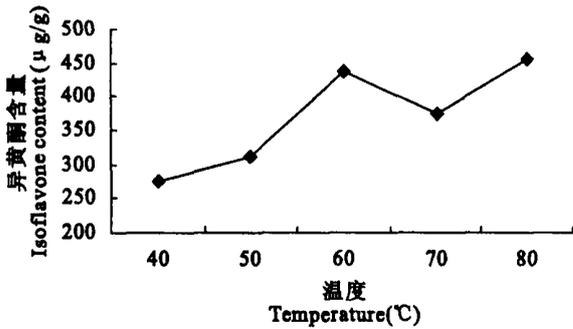


图 6 不同水浴温度对异黄酮提取的影响

Fig. 6 The effect of different water bath temperatures on the extracting efficiency of chickpea isoflavones

2.3.5 最佳提取时间的确定 从提取时间上考察,水浴时间小于 2 h 时,提取量随时间的增加而增加,在 2~3 h 时提取量较稳定;超过 3 h,提取量反而下降(图 7)。所以提取时间以 2~3 h 为宜。

2.3.6 提取效率的研究 实验表明:鹰嘴豆粉样品经过第一次提取测得鹰嘴豆异黄酮实测量占全部三

次提取量的 86.5%,第二次提取占全部三次提取量的 10.4%,两次合并提取效率为 97%,第三次提取占 3.1%。说明鹰嘴豆粉样品经过 2 次提取就能达到较好的提取量(97%)。

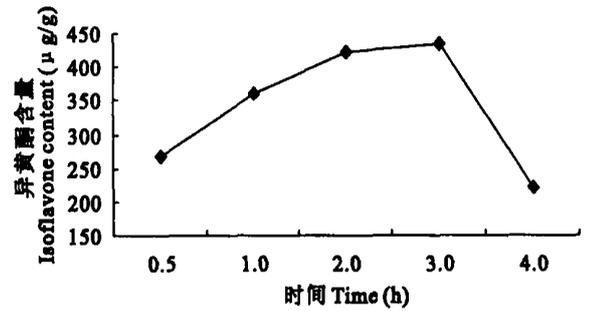


图 7 不同提取时间对异黄酮含量的影响

Fig. 7 The effect of different extracting duration on the extracting efficiency of chickpea isoflavones

2.4 精密度

8 次重复测定,计算出鹰嘴豆中异黄酮平均含量为 0.529 ± 0.00416 (mg/g), 变异系数 CV 为 1.14%, 95% 的置信区间为 0.525~0.533 (mg/g) (见表 1)。

2.5 加标样回收率

加标回收率数据见表 2。计算的平均加标样回收率为 99.0%, 变异系数 CV 为 3.2%, 表明本方法的可靠性较高。

表 1 精密度分析结果

Table 1 The result of the accuracy experiment

平均校正吸光值(A) Average amendation absorbance value	0.350	0.352	0.351	0.357	0.358	0.360	0.359	0.359
样品异黄酮含量(mg/g) Content of chickpea isoflavones	0.521	0.523	0.522	0.530	0.533	0.535	0.534	0.534

表 2 加标样回收率试验结果

Table 2 The result of the average recovery rate

样品编号 Sample NO.	平均校正吸光值 Average emendation absorbance value(A)	加标质量 Recovery quality (mg)	实测异黄酮质量 Isoflavone quality (mg)	加标回收率 Recovery rate (%)	平均加标回收率 Average recovery rate(%)	CV (%)
1	0.358	0.000	6.397			
2	0.354	0.000	6.318			
3	0.354	0.000	6.321			
4	0.342	0.000	6.107			
5	0.406	1.000	7.245	95.9		
6	0.408	1.000	7.278	99.2	99.0	3.2
7	0.476	2.000	8.493	104.8		
8	0.469	2.000	8.369	98.6		
9	0.524	3.000	9.348	98.4		
10	0.516	3.000	9.205	97.3		

3 讨论

采用三波长紫外分光光度法测定, 鹰嘴豆籽粒中异黄酮的含量通常比大豆籽粒异黄酮含量要低的多。基于这一点, 建立的鹰嘴豆异黄酮测定方法在配制标样浓度、制标准曲线以及确定料液比等方面与大豆异黄酮的测定方法有所不同。

本研究建立的鹰嘴豆异黄酮三波长紫外分光光度法, 可有效地消除干扰物质对测定的影响, 具有简便、快速、重现性好、精密度高等特点, 适于大批量样品测定以及产品生产的质量控制及监测。通过实验确定鹰嘴豆异黄酮的最佳提取工艺参数为: 料液比 0.3:25、乙醇浓度 70%、提取温度为 60℃、提取时间为 3 h、浸提 2 次; 鹰嘴豆异黄酮的 2 次提取回收率可达 97%, 精密度实验的变异系数 CV 为 1.14%, 平均加标样回收率为 99.0%, 变异系数 CV = 3.2%。

鹰嘴豆在许多国家都作为医疗保健食品而加以利用, 并且已逐渐成为医疗保健食品和药品开发的热点。但国内外对鹰嘴豆中异黄酮等活性物质的研究和开发较少, 因此对鹰嘴豆活性成份进行深入系统的研究, 具有重要的经济和社会效益。

参考文献:

[1] 边生金, 冯孝良. 鹰嘴豆及利用价值[J]. 现代农业, 2001, (1): 18-19.

[2] 杨镇洲. 大豆异黄酮的抗癌效应研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2001, 8(4): 107-108.

[3] 皮雄娥, 费笛波, 王龙英, 等. 大豆黄酮及其生理功能的研究进展[J]. 饲料工业, 2005, 26(4): 11-14.

[4] 江和源, 吕飞杰, 邵建祥, 等. 高效液相色谱法测定大豆中异黄酮的含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(4): 7-9.

[5] 鞠兴荣, 袁建, 汪海峰. 高效液相色谱法测定大豆提取物中大豆异黄酮的含量[J]. 食品科学, 2000, 15(4): 26-27.

[6] 孙君明, 丁安林, 常汝镇, 等. 中国大豆异黄酮含量的初步研究[J]. 中国粮油学报, 1995, 10(4): 51-54.

[7] 鞠兴荣, 袁建, 汪海峰. 大豆异黄酮提取工艺的优化[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(6): 17-19.

[8] 杨晓文. 大豆异黄酮测定方法的研究概况[J]. 中国油脂, 2006, 31(1): 60-62.

[9] 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.

[10] 常凤启, 秦振顺, 韩会新, 等. 大豆异黄酮的测定方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(2): 131-134.

[11] 孙梅君, 骆炼, 史长颖, 等. 中国大豆制品中异黄酮含量测定和分析研究[J]. 食品与发酵工业, 1997, 26(5): 14-18.

[12] 马强, 周玉新, 雷海民, 等. HPLC 测定红车轴草中大豆苷元、染料木素、芒柄花素和鹰嘴豆芽素 A 的含量[J]. 中成药, 2005, 27(10): 1193-1195.

[13] 王哲, 白志明, 田娟娟, 等. 紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量[J]. 中国油脂, 2005, 30(1): 52-54.

[14] 张玉梅, 孙学斌, 高旭年, 等. 紫外分光光度法测定大豆总异黄酮的含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(4): 7-9.

[15] 常凤启, 秦振顺, 韩会新, 等. 保健食品中大豆异黄酮的测定方法[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(4): 430-431.

[16] 李巧玲, 原现瑞, 刘景艳. 紫外-可见分光光度法在食品分析中的应用进展[J]. 食品工程, 2006, (1): 49-51.

[17] 何继春, 卫巍. 大豆异黄酮检测及四标样快速测定法研究[J]. 粮食与油脂, 2001, (7): 46-47.

[18] 谢明杰, 徐春华, 高爽, 等. 酸法水解大豆异黄酮的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2004, 35(1): 36-38.

[19] 徐颖, 董文宾, 张建华. 聚酰胺薄层色谱法分离鉴定异黄酮[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(5): 127-129.

[20] 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, 2003, 27(4): 75-77.

[21] 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.

[22] Liggins J, Bluck L J C, Coward W A. Extraction and Quantification of Daidzein and Genistein in food[J]. Analytical Biochemistry, 1998, 264: 1-7.

[23] 宁海龙, 金双义, 王继安, 等. 大豆子粒中异黄酮含量的快速测定[J]. 大豆科学, 2004, 23(1): 45-49.

[24] 刘兴余, 乔攀. 豆粕中异黄酮、皂甙的工业化提取工艺初探[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(6): 76-78.

[25] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 157-169.

Determination of the total isoflavone content of chickpea seeds by three-wavelength UV spectrophotometry

WU Min^{1,2}, YUAN Jian³, YU Tian², LI Yan², WANG Hong-ling¹, ZHANG Ju-song², MA Hao¹

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China; 2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumchi, Xinjiang 830052, China;

3. College of Food Science and Engineering, Nanjing Finance and Economics University, Nanjing, Jiangsu 210003, China)

Abstract: The extraction and determination were optimized to build a determining method of the total isoflavone content of chickpea seeds by Three-wavelength UV spectrophotometry. The optimum extraction condition was: 0.3 g chickpea flour was extracted with 25 ml 70% alcohol density for 3 hours. The extracting temperature was 60°C. The isoflavone extracting rate was 86.5% at one time, while the total extraction rate of two times was 97.0%. The coefficient of variation (CV) of the accuracy experiment was 1.14%. The average recovery rate was 99.0% with CV=3.2%. The newly developed determining method is reliable, simple and accurate, and could avoid or eliminate the influence of the interfering components and the peak floating, and is suitable for the quality control of chickpea products.

Keywords: *Cicer Arietinum* L.; total isoflavones content; three-wavelength; determination

(上接第 88 页)

Effect of different factors on magnesium content in cucumber leaf under soil-less cultivation

XIE Xiao-yu^{1,2}, ZOU Zhi-rong¹, JIANG Xue-fei¹

(1. College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China;

2. College of Agronomy and Bio-technology, Southwest University, Beibei, Chongqing 400715, China)

Abstract: By means of universal rotational combinational design with three-factors (ground temperature as well as K^+ concentration and Mg^{2+} concentration in nutrient solution) and five-levels, the corresponding mathematic regression models were set up. The results showed: ① under the condition of this experiment, the sequence of different factors influencing Mg content in leaves of cucumber was: Mg^{2+} concentration > ground temperature > K^+ concentration. ② There were interactions among different factors, i.e., ground temperature was positively related to Mg^{2+} concentration and K^+ concentration, while Mg^{2+} concentration was negatively related to K^+ concentration. ③ In order to have an optimal Mg content, the ground temperature, Mg^{2+} concentration and K^+ concentration in nutrient solution should be 29.13°C, 4 mmol/L and 4.43 mmol/L, respectively. The experiment proved that the model is accurate and reliable.

Keywords: cucumber; soil-less culture; magnesium; mathematic model