

硝酸银诱导不同大豆品种中大豆抗毒素生成量的差异

冯东岳^{1,2}, 石波^{1,*}, 梁平¹

(1.中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081; 2.全国水产技术推广总站, 北京 100125)

摘要: 目的: 研究硝酸银对不同黄豆、青豆和黑豆诱导大豆抗毒素生成量的比较。方法: 以0.01 mol/L硝酸银为诱导剂, 采用分析型高效液相色谱法测定9种不同品种大豆产生大豆抗毒素的生成量。应用C₁₈反相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙酸水溶液(pH3)和乙腈为流动相, 进行梯度洗脱, 流速1 mL/min, 柱温40℃, 检测波长285 nm。结果: 在相同的提取和测定条件下, 硝酸银诱导大豆生成大豆抗毒素的生成量由高至低顺序为青豆、黑豆、黄豆。结论: 本研究结果可为合理选择不同种类的大豆进行大豆抗毒素的研究和应用提供依据。

关键词: 高效液相色谱法; 大豆抗毒素; 生成量; 大豆

Comparison of the Changes in Glyceollin Production in Different Types of Soybeans (*Glycine max*) Induced by Silver Nitrate

FENG Dong-yue^{1,2}, SHI Bo^{1,*}, LIANG Ping¹

(1. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. National Fisheries Technical Extension Center, Beijing 100125, China)

Abstract: Objective: To compare the changes in silver nitrate-induced glyceollin production in three types of soybeans: yellow, green and black, each of which consisted of three cultivars. Methods: Glyceollin production in soybeans was induced by 0.01 mol/L silver nitrate solution and determined by HPLC. The chromatographic separation was performed on a C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using a mobile phase consisting of acetic acid solution (pH 3) and acetonitrile at a flow rate of 1 mL/min through gradient elution. Glyceollin was detected at 285 nm. Column temperature was set at 40 °C. Results: Under the same extraction and determination conditions, silver nitrate-induced glyceollin production in soybeans decreased in the following order: green > black > yellow. Conclusion: The results obtained in this study can provide evidence for the selection of suitable soybean type for research and applications of glyceollins.

Key words: HPLC; glyceollin; quantification; *Glycine max*

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0016-04

随着大豆(*Glycine max*)与人类健康关系研究的深入, 科学家们发现亚洲女性在传统饮食结构中由于摄入低脂肪的豆类较多, 与欧洲女性相比较患乳腺癌的几率降低了4~6倍^[1]。这主要归因于豆类中含有的健康元素异黄酮, 包括染料木素、大豆苷元等, 它们也被称为植物抗毒素, 具有抑制微生物生长的作用。同时, 这些物质也是一种雌激素, 在抑制人类癌细胞增殖方面有重要作用^[2]。

随着研究的深入, 除了大豆本身所固有的异黄酮大豆苷元、染料木素具有类雌激素作用外, 当大豆受到外源物质(包括物理、化学和微生物等因素)刺激后, 发生自身防卫反应^[3-4], 诱导累积产生了一种异戊二烯化的异黄酮^[5], 称为大豆抗毒素(glyceollins)。它不仅具有植物抗毒

素作用, 同时也是一种类雌激素物质, 对乳腺癌、前列腺癌、心血管病和骨质疏松有一定的预防作用^[6], 受到越来越广泛的关注, 大豆抗毒素已经成为大豆中的又一健康元素^[7-9]。大豆抗毒素共有6个异构体, 其中3个异构体最常见, 分别是 Gly I、Gly II、Gly III, 如图1所示。结构式为: C₂₀H₁₈O₅, (M⁺)=338.1154, (M+H)=339.1232^[10-11]。

大豆抗毒素经常存在于遭受刺激的组织中, 而很少存在于未经处理的以及受伤的组织中。激发子是诱导大豆合成和积累抗毒素的主要因素, 分为生物激发子和非生物激发子^[12]。研究发现^[1], 在非生物激发子中, 与氯化铜、氯化汞、硝酸铅、硝酸镍、硫酸锌相比较, 硝酸银对大豆子叶诱导生成大豆抗毒素的能力最强。

收稿日期: 2012-06-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31171628)

作者简介: 冯东岳(1976—), 男, 工程师, 博士研究生, 研究方向为饲料添加剂。E-mail: fengdy76@sina.com

*通信作者: 石波(1964—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为饲料添加剂。E-mail: shibo@mail.caas.net.cn

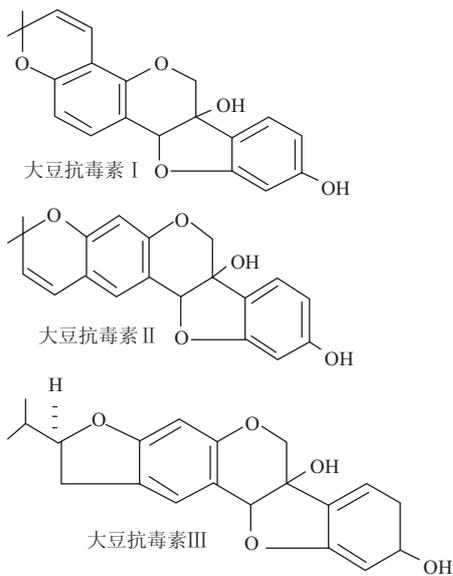


图1 大豆中植物抗毒素 I、II、III 的结构

Fig.1 Chemical structures of glyceollin I, II and III

此外, Keen等^[13]对与大豆关系较近的属进行了研究, 检测它们接种细菌后大豆抗毒素的累积情况。结果发现在被检测的27个种中, 除了钩豆属(*Teramnus*)的3个种可以产生大豆抗毒素外, 其余的均未检测到。因此大豆抗毒素的产生、累积与大豆品种具有较大关系^[14-16]。我国是大豆种植大国, 从南方到北方大豆资源丰富。本研究以硝酸银为诱导剂, 采用HPLC方法, 对黄豆、黑豆和青豆经硝酸银诱导产生大豆抗毒素的生成量进行比较分析, 以利于大豆资源的进一步研究应用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄豆(中黄30、中黄56、中品662)、黑豆(漳浦青仁乌、黑皮大豆、PEKING黑小豆)、青豆(大粒青、六月白、关青豆), 各种豆子水分含量在5%~10%之间, 由中国农业科学院作物科学研究所惠赠。大豆抗毒素标准品, 纯度为93.96%, 本实验室自制。

硝酸银、乙醇、冰醋酸 北京化工厂; 甲醇、乙腈(色谱纯) 美国Fisher公司。

1.2 仪器与设备

Waters 2695高效液相色谱(仪配Waters 2996紫外检测器)、超高压液相色谱及串联四极杆质谱联用仪(UPLC/MS-MS) XevoTQ、分析型超高压液相色谱柱Acquity UPLC[®]RBEH C₁₈ (2.1mm×100mm, 1.7μm) 美国Waters公司; 分析型高效液相色谱柱 C₁₈反相色谱柱(4.6mm×250mm, 5μm) 北京金欧亚科技发展有限公司; AR2140分析天平(0.0001g) 美国奥豪斯公司;

RTC basic加热磁力搅拌器 德国IKA公司; KQ5200DE数控超声波清洗器 江苏昆山市超声仪器有限公司; HC-2518高速离心机 科大创新股份有限公司中佳分公司; HTC-100恒温恒湿培养箱 上海三腾仪器有限公司; PB-20酸度计 德国Sartorius公司。

1.3 方法

1.3.1 硝酸银诱导生成大豆抗毒素

精选黄豆、青豆和黑豆用75%乙醇消毒处理, 浸泡3min, 再用无菌水清洗2~3次, 每次2min。室温条件下, 将灭菌清洗的大豆材料在无菌水中浸泡5h。挑选健康膨大的种子切成2片子叶, 在其表面挖约3mm×5mm的创口, 于创口内滴加60μL的0.01mol/L的硝酸银。处理后将子叶放入铺有灭菌滤纸的培养皿中(10枚子叶/皿), 滤纸用2mL的无菌水浸润。培养条件: 温度25℃、相对湿度50%, 黑暗培养3d备用。

1.3.2 大豆抗毒素制备

将上述培养3d的黄豆、青豆和黑豆称质量, 充分研磨, 加入80%的乙醇(每1.0g加入3.0mL), 而后在50℃条件下加热搅拌1h, 冷却至室温, 10000r/min离心10min, 提取上清液, 得到大豆抗毒素的粗提液, 保存于4℃冰箱待测。

1.3.3 大豆抗毒素检测

应用Waters 2695分析型高效液相色谱仪, 检测器为Waters-2996型紫外检测器, C₁₈反相色谱柱(4.6mm×250mm, 5μm)。采用二元流动相, 流动相A液: 乙酸水溶液(pH3.0), 流动相B液: 100%乙腈。采用梯度洗脱: 0~17min, 0%乙腈→45%乙腈; 17~27min, 45%乙腈→90%乙腈; 27~34min, 90%乙腈; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 40℃; 紫外检测波长: 285nm; 进样量: 10μL。

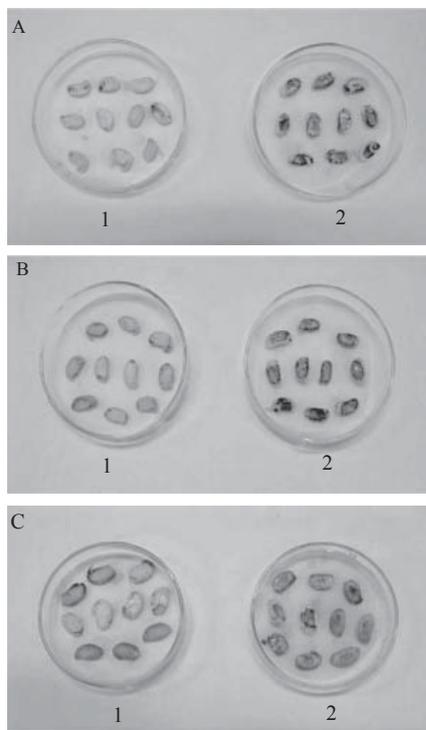
1.3.4 大豆抗毒素质谱鉴定

选择UPLC/MS-MS对得到的大豆抗毒素粗提液进行质谱鉴定。具体检测条件如下: UPLC条件为C₁₈反相色谱柱柱子(2.1mm×100mm, 1.7μm, Acquity UPLC[®]BEH); 二元流动相: A液为2%甲酸, B液为100%乙腈; 梯度洗脱: 0~2min, 10%乙腈→25%乙腈; 2~9min, 25%乙腈→50%乙腈; 9~12min, 50%乙腈; 12~22min, 50%乙腈→100%乙腈; 22~25min, 100%乙腈; 25~27min, 100%乙腈→90%乙腈; 27~30min, 90%乙腈; 流速: 0.3mL/min; 柱温: 25℃; 检测器: 电喷雾; 进样量: 5μL。

MS条件: 离子源为电喷雾, 正离子模式扫描。毛细管电压3.50kV, 锥孔电压60V。离子源和脱溶剂气温度分别为120℃和350℃。脱溶剂气流量和锥孔反吹气流量分别为800L/h和50L/h。质量分析器高低端分辨率均为0.75。碰撞室气体为氦气。数据采集和处理软件采用Mass LYNX (Version 1.4.0)。

2 结果与分析

2.1 大豆抗毒素的诱导



A. 中黄30(黄豆); B. 六月白(青豆); C. 青仁乌(黑豆); 1、2 分别为未处理的大豆子叶和应用硝酸银诱导的大豆子叶。

图2 应用硝酸银处理的大豆子叶与未处理的大豆子叶比较

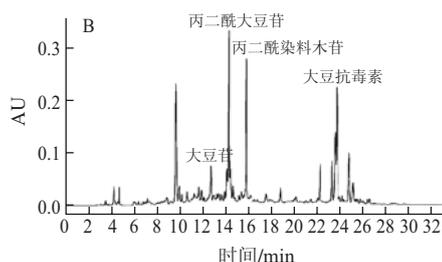
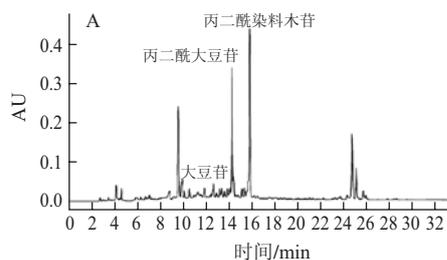
Fig.2 Comparison of soybean cotyledon with and without treatment of silver nitrate solution

由图2可知, 经过3d培养的大豆, 与对照样品相比较, 经过0.01mol/L硝酸银处理的黄豆、青豆和黑豆样品的外观具有明显的不同。处理组子叶表面出现黑色的坏死斑点, 这是子叶受到硝酸银处理后发生了自身防卫应激反应, 表面细胞死亡。

2.2 大豆抗毒素检测与鉴定

2.2.1 大豆抗毒素检测

应用HPLC进行检测, 以中黄30为例, 经过硝酸银诱导处理, 发现在保留时间23~24min时, 出现的峰所对应的紫外吸收图谱与Burow等^[7]报道的大豆抗毒素的紫外吸收图谱相近, 收集保留时间23~24min的组分, 进行UPLC/MS鉴定。



A. 未处理的大豆子叶; B. 硝酸银处理的大豆子叶。

图3 硝酸银处理的大豆子叶3d诱导生成大豆抗毒素HPLC图

Fig.3 HPLC of glyceollin in soybean cotyledon with and without treatment of silver nitrate solution

2.2.2 大豆抗毒素鉴定

为进一步鉴定大豆抗毒素, 以中黄30为例, 利用HPLC检测仪器, 收集保留时间23~24min的组分, 进行UPLC/MS检测。图4为该组分的ESI扫描图, 共有3个正离子峰。其中质荷比339为质子化的大豆抗毒素 $[M+H]^+=339$, 321为339失去一个水分子后的相对分子质量, 229为321再失去苯氧基团后的相对分子质量。

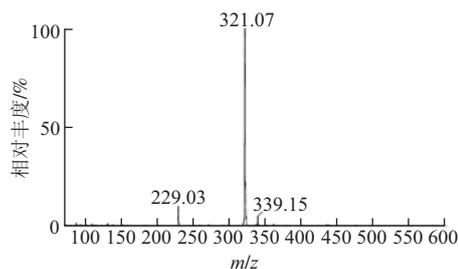


图4 硝酸银诱导中黄30生成大豆抗毒素的UPLC-MS的质谱图

Fig.4 UPLC-MS pattern of glyceollin in yellow soybean Zhonghuang 30 induced by silver nitrate solution

2.3 硝酸银诱导黄豆、黑豆和青豆产生大豆抗毒素生成量比较

表1 硝酸银对不同黄豆、黑豆和青豆诱导产生大豆抗毒素生成量比较

Table 1 Comparison of glyceollin production in different types of soybeans induced by silver nitrate solution

品种		对照	诱导处理	生成量	平均值
				mg/g	
黄豆	中品662	—	0.39	0.39	0.47
	中黄30	—	0.78	0.78	
	中黄56	0.17	0.41	0.24	
黑豆	漳浦青仁乌	—	1.36	1.36	0.75
	黑皮大豆	0.20	0.51	0.31	
	Peking黑小豆	0.21	0.80	0.59	
青豆	大粒青	—	1.03	1.03	0.98
	六月白	0.08	1.80	1.72	
	关青豆	—	0.18	0.18	

注: —. 未检测到大豆抗毒素。表中数据均是以干豆质量计。

将不同黄豆、青豆和黑豆品种在无菌水中浸泡5h、

诱导剂为0.01mol/L硝酸银, 培养温度25℃、相对湿度50%条件不变, 在黑暗条件下培养3d, 以研究大豆品种与大豆抗毒素生成量之间的关系。大豆抗毒素生成量按照标准曲线公式: $y=1.0 \times 10^7 x + 754.32 (R^2=0.9998)$ 进行计算。其中 y 为高效液相色谱峰面积吸收值, x 为大豆抗毒素的质量浓度(mg/mL), R 为相关系数。

从表1可以看出, 采用0.01mol/L硝酸银处理的黄豆、黑豆和青豆, 经过3d黑暗培养, 青豆诱导产生的大豆抗毒素生成量最多, 大粒青、六月白和关青豆3个品种生成量的平均值为0.98mg/g; 其次为黑豆, 漳浦青仁乌、黑皮大豆和Peking黑小豆3个品种生成量的平均值为0.75mg/g; 最后为黄豆, 中品662、中黄30和中黄563个品种生成量的平均值为0.47mg/g。

在青豆3个品种中, 经硝酸银诱导产生大豆抗毒素生成量由高至低分别是六月白、大粒青和关青豆, 生成量分别是1.72、1.03mg/g和0.18mg/g。其中, 大粒青和关青豆的对照组没有检测到大豆抗毒素, 而六月白对照组检测到大豆抗毒素为0.08mg/g。

在黑豆3个品种中, 经硝酸银诱导产生大豆抗毒素生成量由高至低分别是漳浦青仁乌、Peking黑小豆和黑皮大豆, 生成量分别是1.36、0.59mg/g和0.31mg/g。其中, 漳浦青仁乌的对照组没有检测到大豆抗毒素, 而Peking黑小豆和黑皮大豆检测到大豆抗毒素, 分别是0.21mg/g和0.20mg/g。

在黄豆3个品种中, 经硝酸银诱导产生大豆抗毒素生成量由高至低分别是中黄30、中品662、中黄56, 生成量分别是0.78、0.39mg/g和0.24mg/g。其中, 中黄30和中品662的对照组没有检测到大豆抗毒素, 而中黄56对照组检测到大豆抗毒素0.17mg/g。

3 结论

目前对大豆属中不同大豆品种经外源物质诱导生成大豆抗毒素的横向比较还没未见相关研究公开报道。本实验利用HPLC法初步对几种黄豆、黑豆和青豆经硝酸银诱导大豆抗毒素的生成量进行了比较。结果表明, 在相同的实验条件下, 经0.01mol/L硝酸银溶液诱导, 不同种类大豆中的大豆抗毒素生成量变化较大, 并且在同类大豆中, 不同品种中的大豆抗毒素生成量也有着显著的差异。对于不同种类的大豆而言, 大豆抗毒素生成量由高至低顺

序为青豆、黑豆、黄豆。本研究结果可为合理选择不同大豆品种, 进行大豆抗毒素研究和应用提供依据。

参考文献:

- [1] 乞永艳, 刘富海. 大豆中Glyceollins诱导和累积研究进展[J]. 大豆科学, 2007, 26(3): 400-406.
- [2] KRAUS G, SPITELLER G, MITHFER A, et al. Quantification of glyceollins in non-elicited seedlings of glycine max by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Phytochemistry, 1995, 40(3): 739-743.
- [3] REYMOND P, FARMER E E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1998, 1(5): 404-411.
- [4] PAXTON J D. Fungal elicitors of phytoalexins and their potential use in agriculture[J]. Biologically Active Products, 1988, 380(28): 109-119.
- [5] LINGHAM J L, KEEN N T, MULHEIRN L J, et al. Inducibly-formed isoflavonoids from leaves of soybean[J]. Phytochemistry, 1981, 20(4): 795-798.
- [6] SALVO V A, BOUÉ S M, FONSECA J P, et al. Antiestrogenic glyceollins suppress human breast and ovarian carcinoma tumorigenesis[J]. Clinical Cancer Research, 2006, 12(23): 7159-7164.
- [7] BUROW M E, BOUE S M, COLLINS BUROW B M, et al. Phytochemical glyceollins, isolated from soy, mediate antihormonal effects through estrogen receptor α and β [J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001, 86(4): 1750-1758.
- [8] DARVILL A G, ALBERSHEIM P. Phytoalexins and their elicitors: a defense against microbial infection in plants[J]. Review Plant Physiology, 1984, 35: 243-275.
- [9] 吴永宁, 赵云峰, 王绪卿. 大豆中植物雌激素对人体健康的潜在效应(综述)[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(1): 40-44.
- [10] 何怡. 激活的大豆中一新的抗雌激素植物抗毒素: 大豆抗毒素 I [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(3): 236-237.
- [11] KOMIVES T. Separation of glyceollin isomers I—III by thin-layer chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1983, 261(3): 423-424.
- [12] FISHER R F, LONG S R. Rhizobium-plant signal exchange[J]. Nature, 1992, 387: 655-660.
- [13] KEEN N T, LYNE R L, HYMOWITZ T. Phytoalexin production as chemosystematic parameter within the genus glycine[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1986, 14: 481-486.
- [14] BOUÉ S M, CARTER C H, EHRLICH K C, et al. Induction of the phytoalexin coumestrol and glyceollins by *Aspergillus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 2167-2172.
- [15] KEEN N T, LINGHAM J L, HYMOWITZ T, et al. The occurrence of glyceollins in plants related to *Glycine max*[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1989, 17(5): 395-398.
- [16] 乞永艳, BOVY A, VOS R D, 等. 外源茉莉酸对大豆中异戊烯黄酮 Glyceollins及其前体Glycinol累积的影响[J]. 大豆科学, 2005, 24(4): 269-271.