

大豆异黄酮检测技术的研究^{*}

李 辉

(黑龙江省农科院谷物品质研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要: 在介绍了大豆异黄酮成分结构的基础上, 分析了几种主要测定方法的特点及应用范围, 并完善了 HPLC 测定大豆异黄酮的方法。采用适宜的水解溶液和条件, 将大豆中的染料木甙和大豆黄酮甙分解为染料木素和大豆黄酮, 以染料木素和大豆黄酮为标准物质, 利用高效液相色谱定性定量检测水解液中的染料木素和大豆黄酮, 从而得出大豆异黄酮的含量。以 2 mol/L 的盐酸乙醇溶液为水解液, 水解时间 2 h。该方法快速、灵敏、重现性好, 回收率达 96% 以上, RSD 小于 3%。

关键词: 大豆异黄酮; 高效液相色谱法; 大豆黄酮; 染料木素

中图分类号: S 565. 1 文献标识码: A 文章编号: 1002—2767(2005)05—0006—03

Determination of Daidzein and Genistein in Soybean by RP—HPLC

LI Hui

(Cereal Quality Research Centre of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: All kinds of assay of soybean isoflavone are reported and the assay conditions were listed and compared in this paper. On the basis of collecting and analyzing relating literatures at home and abroad, a method determination of daidzein and genistein in soybean by HPLC was described. This method is rapid, sensitive, reproducible and provides a recovery of more than 96% with RSD less than 3%.

Key words: soybean isoflavone; HPLC; daidzein; genistein

大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 是我国和世界许多国家和地区的主要食用品种之一。作为一种功能性食品, 公元前 2838 年《神农本草经》首次记载了大豆及其药用价值。近年来有关学者发现大豆和豆制品具有广泛的生物功效, 如具有防癌、防骨质疏松、降低血脂、改善妇女更年期障碍、防止心血管疾病等生理功能, 这些均与大豆的功能因子大豆异黄酮密切相关^[1]。从大豆中提取大豆异黄酮并开发其系列保健品, 已引起国内外营养专家和医药学专家的高度重视。2000 年 11 月第一届国际性的健康食品配料展上, 大豆异黄酮成为最热门的话题。德、美、英、荷、比、日等国的 28 家企业展示了大量涉及大豆异黄酮的产品和资料。国内对大豆异黄酮的研究也逐渐重视起来, 已经出现了以大豆异黄酮为食品添加剂的保健食品^[2]。但是对于大豆异黄酮含量及纯度的检测工作尚未形成各方认可的统一标准, 这就从

一定程度上限制了大豆异黄酮的研究及开发利用。本文在介绍大豆异黄酮生理活性组分以及检测方法的基础上, 完善了利用高效液相色谱检测大豆异黄酮的快速、经济、简便的方法。

1 大豆异黄酮的成分结构及检测方法

大豆异黄酮是大豆生长过程中形成的一类与大豆的苦味和收敛性有关的次生代谢产物, 具有异黄酮类化合物的典型结构, 在大豆下胚轴中含量较高, 子叶中含量较少, 在种皮中含量最少。大豆异黄酮主要以游离形式和 β -葡萄糖苷的形式存在。在异黄酮葡萄糖苷中, 有一部分是葡萄糖上的 C-6 羟基被丙二酰基取代, 还有一部分是葡萄糖上的 C-6 羟基被乙酰基取代。目前的研究发现大豆异黄酮共有 12 种, 分别为 9 种异黄酮糖苷和 3 种相应的糖苷配

* 收稿日期: 2005—03—29

基金项目: 黑龙江省农科院课题, 获黑龙江省农科院科技进步二等奖

作者简介: 李辉 (1975—), 女, 黑龙江省延寿县, 助理研究员, 硕士, 主要从事谷物品质研究。

基,其中主要的活性成分为染料木素(genistein)和大豆黄酮(daidzein)及其相应的组分染料木甙(genistin)和大豆黄酮甙(daidzin)。研究表明,染料木甙和大豆黄酮甙在高温强酸或β-葡萄糖苷酶的作用下可以分解成游离的染料木素和大豆黄酮^[3]。

已有研究表明,染料木素和大豆黄酮是大豆异黄酮的主要活性成分,许多学者建立了基于不同系统分析大豆异黄酮含量的方法,如紫外分光光度法(UV)^[4]、薄层扫描法(TLCS)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法(CE)、高效液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、时间分辨荧光免疫分析法(TR-FIA)等。其中常用的方法有以下几种:

1.1 薄板层析法

将样品溶解于甲醇中,在硅胶薄层板上点取试样,以氯仿-甲醇-水为展开剂,在紫外灯 252 nm 处观察荧光,通过与标准品点样斑点的位置及大小(荧光深浅)对比,判断试样中是否含有大豆异黄酮。运用这种检测方法,样品的处理及检测过程简单,可用于大豆异黄酮的定性检测,但定量检测精度不高。

1.2 紫外分光光度法

以染料木素为标准样品,在其紫外最大吸收峰 260 nm 处测定试样的吸光值,与标准曲线比较并定量计算大豆异黄酮含量(以染料木素计)。此方法可以定量的计算大豆异黄酮的含量,但是此方法前处理复杂,需要对样品进行纯化,而且也无法消除干扰因子(如其他黄酮类化合物)的干扰。因此限制了紫外分光光度法在检测大豆异黄酮领域的应用。

1.3 高效液相色谱法

利用高效液相色谱测定大豆异黄酮的含量是目前比较常用的方法。由于所使用的标准物质、提取液、提取方法以及色谱条件的不同,使得高效液相色谱法的测定方法很难形成统一的方法。以染料木素、大豆黄酮、染料木甙、大豆黄酮甙为标准样品^[5],虽然前处理简单,但是需要四种标准,而且由于甙的标准样品不易提纯,价格昂贵,对于以筛选及测定不同含量异黄酮大豆品种为目的的实验室并不适用。以染料木素和大豆黄酮为标准样品的检测方法也很多^[6~9],但都因为其提取方法不同而有所差异。盐酸已腈溶液、乙醇溶液、甲醇溶液、盐酸甲醇溶液等均可以作为提取液,而且各种方法的计算结果的表示方法也有所不同,很难对所测定的结果作出比较。因此建立一种相对统一、简便适用、经济的检测方法是很有必要的。

2 高效液相色谱法双标样测定方法的完善

2.1 材料与方法

标准品染料木素(genistein)、大豆黄酮(daidzein)为 SIGMA 公司的产品,纯度为 98%以上。所用试剂甲醇、己腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

2.2 仪器及操作条件

岛津 10A 高效液相色谱仪,色谱柱: Shim-pack CLC-ODS (4.6×250 mm, 0.5 μm),岛津 10AVP 紫外检测器,检测波长 254 nm,流动相: 甲醇:水=30:70(含 0.5%的冰乙酸),流速: 1.5 mL/min,柱温: 20℃。

2.3 实验原理

染料木甙和大豆黄酮甙在高温强酸或β-葡萄糖苷酶的作用下可以分解成游离的染料木素和大豆黄酮。采用适宜的水解溶液和条件,将大豆中的染料木甙和大豆黄酮甙分解为染料木素和大豆黄酮,以染料木素和大豆黄酮为标准物质,利用高效液相色谱定性定量检测水解液中的染料木素和大豆黄酮,从而得出大豆异黄酮的含量。

2.4 条件筛选试验

2.4.1 水解条件的选择 具体内容见表 1。

2.4.2 水解酸的选择 分别用 2 mol/L 的盐酸甲醇溶液, 2 mol/L 的盐酸乙醇溶液, 2 mol/L 的盐酸乙腈溶液为水解溶剂水解并提取大豆异黄酮甙元,选择提取率高的最佳大豆异黄酮水解溶剂。

表 1 不同提取液提取大豆异黄酮的比较

水解溶剂	异黄酮含量 (μg/g)	水解酸浓度	异黄酮含量 (μg/g)
2mol/L 盐酸甲醇	1526.3	0.5mol/L 盐酸乙醇	415.2
2mol/L 盐酸乙醇	2461.6	1mol/L 盐酸乙醇	1856.8
2mol/L 盐酸乙腈	1826.5	2mol/L 盐酸乙醇	2461.6

表 2 不同水解时间和水解温度提取异黄酮的比较

水解时间 (h)	异黄酮含量 (μg/g)	水解温度 (℃)	异黄酮含量 (μg/g)
1	785.0	50	912.3
1.5	1665.2	60	987.6
2	2692.2	70	2145.3
2.5	2692.2	80	2692.2

2.4.3 水解时间的选择 控制水解时间从 0.5~4 h, 筛选最佳的水解时间。

2.4.4 水解温度的选择 控制水解温度 50~80℃, 确定最佳的水解温度。

3 方法验证试验

3.1 样品溶液制备

取大豆 100 g 磨成粉, 过 80 目筛。准确称取大豆粉样品 10 mg, 加 2 mol/L 盐酸乙醇溶液 10 mL, 于 80℃水浴 2 h, 冷却定容。过 0.45 μm 膜后供液相色谱分析测定, 计算大豆异黄酮的含量。

3.2 标准曲线及相关性分析

准确移取标准工作液 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mL, 并用 50%乙醇定容至 10 mL。取 10 μL 进样, 测定其峰面积, 以峰面积(y)和组分浓度(x)绘制标准曲线, 得到的回归方程分别为大豆黄酮 $y = 236890x - 152$, $r = 0.9998$; 染料木素 $y = 349405x - 95$, $r = 0.9996$ 。线性范围分别为 2.55 ~ 82.1 μg/mL, 2.28 ~ 80.2 μg/mL。

3.3 加标回收率实验

精密称取已知含量的大豆粉, 加入一定量的标样, 和测试样一起按照 3.1 的方法进行测定, 计算回收率, 结果为染料木素回收率 96.6%, 大豆黄酮回收率 97.8%。

表 3 加标回收率测定结果

组分名称	加入量 (ug)	测定值 (ug/g)	回收率			平均值 (%)
			1	2	3	
染料木素	100	96.3	96.3	97.2	96.3	96.6
	200	194.4				
	500	481.5				
大豆黄酮	100	97.5	97.5	97.2	98.6	97.8
	200	194.4				
	500	493.0				

3.4 精密度实验

将同一样品在一天内重复测定 5 次, 计算日内相对偏差。同时将同一样品连续测定 5 d, 计算日间相对偏差。结果表明日内及日间相对偏差均小于 3%。说明本法比较稳定, 重现性好。而且通过对比实验, 也可以证明这一点。

4 结语

4.1 本实验采用的流动相可使大豆异黄酮的各组分得到很好的分离, 所要检测的两种组分大豆黄酮和染料木素分离度很高。

4.2 HPLC 检测准确, 灵敏度高。本文检测大豆黄酮和染料木素其相关系数分别为 0.9996 和 0.9998, 说明有很好的线性。加标回收率在 96%以上说明该方法准确可靠。

4.3 本文完善了利用 HPLC 双标样(大豆黄酮和染料木素)测定大豆异黄酮含量的方法, 样品前处理快速(2 h)、简单(不需要其它提取设备)、操作容易, 不需要长时间水解。同时采用的标准物质费用较低(只需要 2 种标样), 节约了资金, 达到了定性、定量检测大豆异黄酮的要求, 可在以筛选高、低异黄酮材料为主的实验室普遍利用。

4.4 不同的检测方法具有不同的特点以及使用范围, 可根据不同的检测需要加以选择。

参考文献:

[1] 肖志艳, 陈迪华. 异黄酮类成份在植物界的分布药理作用研究概况[J]. 国外医学—植物药学分册, 1998, 13(4): 157-163.

[2] 毛峻琴, 宓鹤鸣. 大豆异黄酮的研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(1): 61-64.

[3] 王纯娥, 刘叔义. 大豆异黄酮的成分含量及特性[J]. 食品科学, 1998, 19(4): 39-43.

[4] 张玉梅, 孙学斌. 紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(4): 7-8.

[5] 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.

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

[7] Wang G. Kuan. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products [J]. Agric Food Chem, 1990, 38: 185-190.

[8] Adrian A. Frank, Laurie J. Custer, Camencia M., et al. Quantitation of Phytoestrogens in legumes by HPLC [J]. Agric Food chem., 1994, 42: 1905-1913.

[9] 鞠兴荣, 袁建, 汪海波, 等. 高效液相色谱法测定大豆提取物中大豆异黄酮的含量[J]. 中国粮油学报, 2000, 15(4): 26-29.

欢迎订阅 2006 年度各种农业科技期刊						
刊名	刊期	邮发刊号	期定价(元)	订阅办法	地址	E-mail
西南农业学报	双月	62—152	10.00	全国各地邮局	成都市静居寺路 20 号省农科院情报所 610061	jxuebao@sina.com
现代化农业	月	14—84	5.00	全国各地邮局	黑龙江省佳木斯市安庆街 382 号 154007	xdhny@hijnnkxy.com
果树实用技术与信息	月	8—220	1.90	全国各地邮局	辽宁省兴城市中国农业科学院果树研究所 125100	
大豆通报	双月	14—228	5.00	全国各地邮局	哈尔滨市道外区南通大街 23 号 150050	soyth@163.com
杂交水稻	双月	42—297	8.00	全国各地邮局	长沙市芙蓉区马坡岭 410125	jhybrice@public.cs.hn.cn