

# 高效液相色谱 (HPLC)技术检测 大豆异黄酮含量<sup>\*</sup>

孙君明<sup>1</sup> 丁安林<sup>1</sup> 东惠茹<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院作物育种栽培研究所, 北京, 100081

2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京, 100081)

**摘要** 利用高效液相色谱 (HPLC)技术分离并测定了大豆中异黄酮各组分含量,建立了快速、有效的分离、检测异黄酮含量的方法。结果显示,异黄酮的最适提取时间是 2- 3hr; 最适检测波长为 260nm; 在一定的浓度范围内,标准样品 Daidzin和 Genistin 作为异黄酮的检测标样是准确的;提取和检测温度对异黄酮组合含量有很大影响,在 80℃ 或更高的温度条件下,丙二酰基结合体可水解为相应的甙或甙元的形式。

**关键词** 大豆 (*Glycine max*); 高效液相色谱; 异黄酮

目前适用于分离和提纯类黄酮化合物的方法主要包括: 纸层析 (paper chromatography, PC)、薄层层析 (thin layer chromatography, TLC)和柱层层析 (column chromatography, CC)等,所使用的吸附剂为硅胶 (silica gel)、Sephadex LH20<sup>4</sup>、铝酸盐 (alumina) (Naim 等, 1974; Ohta 等, 1979)。另外,气相色谱 (gas chromatography)也用于各种检测,但其主要限于挥发性样品,而不能用于非挥发性稳定的酚类样品 (Preston 等, 1996)。

大豆异黄酮是大豆体内特别是种子中积累的一类次生代谢产物。早期发现它是引起大豆食品苦涩味的主要因子之一 (Huang 等, 1981),但近几年证实它又具有特殊的生物效能,如: 能有效的限制病原微生物的生长 (Naim 等, 1974; Morris 等, 1991),抑制人和动物肿瘤细胞的繁殖 (Coward 等, 1993),诱导大豆结瘤 (Kosslak 等, 1987)等重要的活性,其广泛的应用前景受到人们的普遍关注。过去虽然有人曾利用气相色谱 (gas- liquid chromatography, GLC)进行异黄酮含量检测,但高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC)是一个十分有效的分离技术,其应用包括样品的提纯、成分检测、化学物质的比较等 (Murphy 等, 1981)。本文报道了利用高效液相色谱技术分离、检测大豆体内的异黄酮组分含量。

## 1 材料和方法

### 1. 1 样品的制备

#### 1. 1. 1 混合样品

\* 收稿日期 1999- 05- 25

Received on May 25, 1999

每个样品随机抽取 50粒大豆种子均匀粉碎,准确称取 100mg粉样,加入 80% (v/v) 的乙醇提取液 4ml,室温下静置 2hr, 16000g 离心 15min,将上清液转入 HPLC专用小瓶中封口, 4℃保存.

1. 1. 2 单粒样品

将大豆籽粒在远离种胚的一侧磨取 15mg粉样,转入 1.5ml离心管中,加入 80% (v/v) 的乙醇提取液 1ml,室温下静置 2hr, 16000g 离心 15min,将上清液转入 HPLC专用小瓶中封口, 4℃保存.

1. 1. 3 新鲜组织样品

将冷冻大豆幼苗按子叶、叶片、根分开,迅速称取各组织鲜重,加入 80% (v/v) 的乙醇提取液(按 400 $\mu$ l/100mg鲜重比例)于研钵中匀浆,室温下静置 2hr,转入 1.5ml的离心管中, 16000g 离心 15min,将上清液转入 HPLC专用小瓶中封口, 4℃下保存.

1. 2 异黄酮含量测定

岛津高效液相色谱仪 (LC- 6A)系统定性定量测定样品中的异黄酮含量. 色谱系统包括: 溶剂输送泵 LC- 6A,流路选择阀 FCV- 2AH 色谱柱箱 CTO- 6A 紫外检测器 SPD- 6AV 自动进样器 SIL- 6A 中心控制器 SLC- 6A 数据处理装置 C- R3A

分析条件包括: 色谱柱: 15mm $\times$  4.0mm C<sub>18</sub> HICHROM 316A- LOK( UK);流动相: 含 5% (v/v)乙醇的 25% (v/v)的甲醇水溶液;流量: 1ml/min; 检测波长: 254nm;柱温: 50℃;进样量: 10 $\mu$ l分析时间 20- 40min 样品

2 结果与讨论

2. 1 提取时间对大豆异黄酮含量测定的影响

在一定的提取时间内,大豆异黄酮随提取时间的增加,其含量逐渐增加(图 1),在第 3hr时达到最大值,表明大豆异黄酮提取的最佳时间为 3hr,但在第 2hr时异黄酮的提取

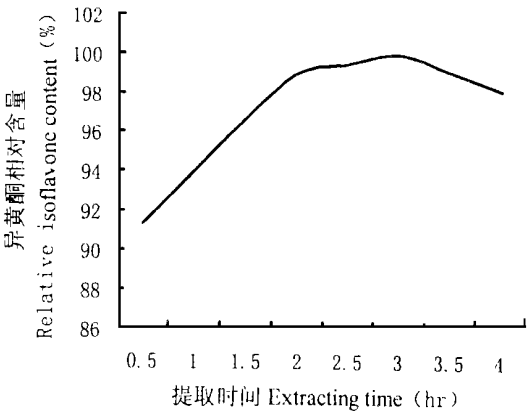


图 1 异黄酮提取时间与相对含量的变化关系

Fig. 1 The change relationship between extracting time and relative content of isoflavone  
量已达到 99.02%. 在起初的 0.5- 2hr时异黄酮提取量增加较快,而到达第 3hr时相比于

第 2hr 仅增加 0.08%, 所以最适宜的提取时间为 2-3hr, 第 4hr 时异黄酮相对含量 (98.18%) 有所降低, 这可能因检测误差所致

2.2 异黄酮标准样品与检测峰高的线性关系

大豆异黄酮的标样 (Daidzin 和 Genistin) 的浓度与检测峰基本上呈直线相关 (图 2), 且相关系数 ( $r$ ) 分别为 0.9998<sup>\*</sup> 和 1.0<sup>\*</sup>。由此表明, 这些标准样品可以作为检测异黄酮含量的标准

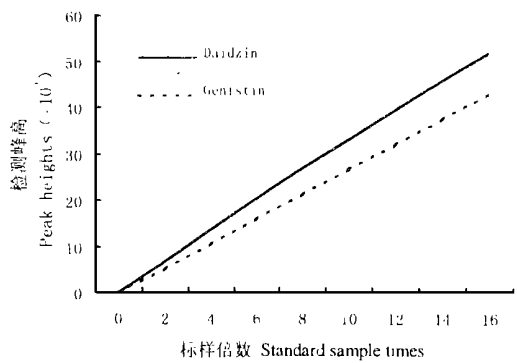


图 2 标准样品 (daidzin 和 genistin) 的倍数与检测峰高的相关关系

Fig. 2 The relationship of correlation between times of standard samples (daidzin and genistin) and peak heights

2.3 检测波长对异黄酮检测峰面积的影响

在测定相同样品条件下, 三种检测波长测定的异黄酮总峰面积不同, 以 260nm 条件下的检测总峰面积最高, 254nm 为次之, 266nm 条件下最低。不同异黄酮组分对各个波长的适应也各不相同, D MGD 和 MGL 的最高波长为 254nm; G GL 和 MGG 的最适波长为 260nm。在检测过程中考虑到 254nm 为标准波长, 因此选用 254nm 为检测波长

表 1 不同检测波长对样品异黄酮峰面积的影响

Table 1 Effect of different wavelengths on peak areas of samples

波长 (nm) 总峰面积		异黄酮组分的峰面积及与总峰面积的比值											
Wavelength	Total areas	Peak areas and ratios of isoflavone compounds											
		D	%	GL	%	G	%	MGD	%	MGL	%	MGG	%
254	99535	11839	11.9	1545	1.6	12086	12.7	35207	35.4	2952	3.0	35906	36.1
260	103066	11178	10.8	1800	1.7	13866	13.5	33738	32.7	2888	2.8	39596	38.4
266	87143	9883	11.3	1598	1.8	11330	13.0	28884	33.1	2598	3.0	32850	37.7

注: 所用大豆品种为张家口黑豆 Note The soybean variety is Zhangjiakou Hei dou

1. Daidzin, D 2. Glycitin, GL 3. Genistin, G 4. Malonyldaidzin, MGD 5. Malonylglycitin, MGL 6. Malonylgenistin, MGG

2.4 大豆不同组织中异黄酮含量的检测

图 3 显示了大豆幼苗子叶、叶片、根部三部分的异黄酮含量的差异, 根据标样分析可知, 此图谱有 6 个重要的异黄酮波峰和 1 个黄酮波峰, 其中 1-7 代表的组分分别为: 1. 黄

豆甾 (daidzin, D) 2. 甲氧基黄豆苷原 (glycitin, GL) 3. 染料木甾 (genistin, G) 4. 丙二酰基黄豆甾 (malonyldaidzin, MGD) 5. 丙二酰基黄豆苷原 (malonylglycitin, MGL) 6. 丙二酰基染料木甾 (malonylgenistin, MGG) 7. 芦丁 (rutin, Ru)。从异黄酮的峰形可以看出, 1 3 4和 6峰变化较大, 而 2和 5峰相对较稳定。大豆幼苗不同组织中异黄酮含量有显著差异, 子叶中异黄酮总含量最高, 叶片和根部异黄酮含量相对较少。就不同组分而言, 子叶中异黄酮组分含量丰富, 1- 6种组分均含有; 叶片中主要以 D和 G及其结合体为主; 根部仅含有 D及其结合体 MGD

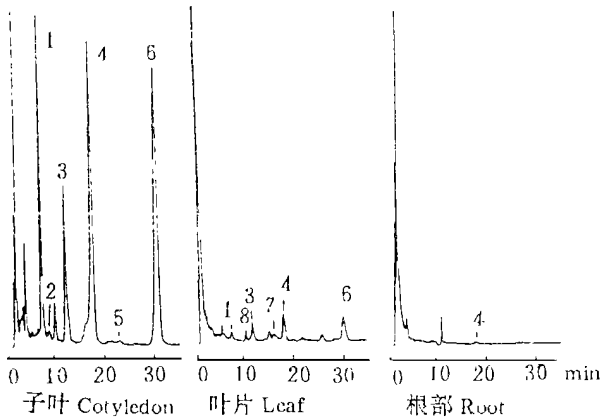


图 3 12日龄的大豆幼苗不同组织异黄酮含量的 HPLC图谱

Fig. 3 HPLC profiles of isoflavone contents from 12- d- old soybean seedlings tissues

1. 黄豆甾 (daidzin, D) 2. 甲氧基黄豆苷原 (glycitin, GL) 3. 染料木甾 (genistin, G)

4. 丙二酰基黄豆甾 (malonyldaidzin, MGD) 5. 丙二酰基黄豆苷原 (malonylglycitin, MGL)

6. 丙二酰基染料木甾 (malonylgenistin, MGG) 7. 芦丁 (rutin, Ru)

## 2.5 温度对异黄酮检测量的影响

异黄酮提取液在  $80^{\circ}\text{C}$  的水解条件下, 异黄酮总含量基本保持不变, 但各单一组分含量发生很大的变化 (图 4)。丙二酰基结合体 (MGD MGL MGG) 的含量迅速降低, 游离态 (D GL G) 的含量迅速升高, 且降低与升高的量基本相同, 表明丙二酰基异黄酮结合体在  $80^{\circ}\text{C}$  的水解条件下可分解为葡萄糖苷的形式。从异黄酮组分的升降程度看, D和 G及其丙二酰结合体升降速度较快, 而 GL及其结合体的变化较平缓。这可能因为 D和 G及其结合体是大豆种子中主要的异黄酮类型所致。从水解的时间看, 在第 8hr 以前, 异黄酮丙二酰基结合体水解速度较快, 到第 14hr 以后, 丙二酰基结合体基本水解完全。另外, 在未水解以前, 丙二酰基结合体 (MGD+ MGL+ MGG) 占总异黄酮含量的 79.1%, 水解 14hr 以后, 仅占总含量 0.03%, 游离态 (D+ GL+ G) 占总含量的 20%, 水解后占总含量的 99.7%。由此表明丙二酰基结合体在  $80^{\circ}\text{C}$  的条件下, 可完全水解为相应的甾或甾元的形式, 这与 Kudou (1991) 的研究结果基本一致。

经烘烤过的大豆籽粒与未烘烤的相比, 其异黄酮总含量显著降低, 降低 76.93%, 但各组分降低的程度不同 (图 5)。丙二酰基结合体 (MGD和 MGG) 的含量降低较大, 游离态 (D和 G) 的含量却有所升高。表明大豆异黄酮经高温处理后丙二酰基结合体部分可以分

解为游离态甙 (D、GL和 G) 的形式, 另一部分可能分解为甙元 (daidzein、glycitein 和 genistein) 的形式。

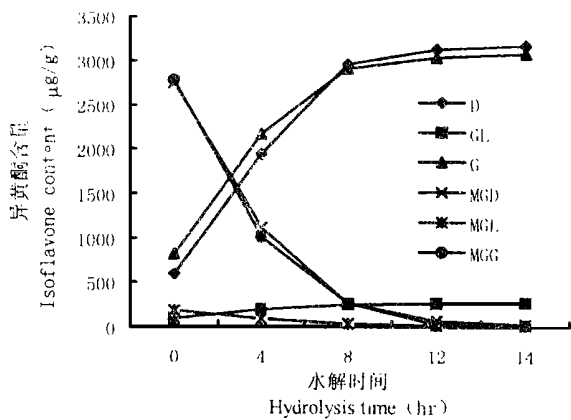


图 4 异黄酮提取液在 80℃ 的水解图

Fig. 4 The hydrolysis figure of isoflavone extract at 80℃

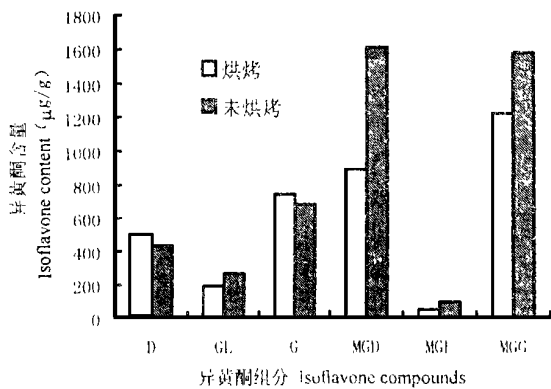


图 5 经烘烤的大豆籽粒的异黄酮含量变化

Fig. 5 The change of isoflavone content in the baked soybean seeds

## 参 考 文 献

- 1 Coward, L., Barnes, N. C., Setchell, K. D. R. et al., Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. J. Agric. Food Chem. 1993, 41: 1961–1967
- 2 Huang, A. S., Hsieh O. A. L. and Chang, S. S., Characterization of the nonvolatile minor constituents responsible for the objectionable taste of defatted soybean flour. J. of Food Sci. 1981, 47, 19–23
- 3 Kosslak, R. M., Bookland, R., Barkei, J. et al., Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common in nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84, 7428–7432
- 4 Kudou, S., Fleury, Y., Weltl, D. et al., Malonyl isoflavone glucosides in soybean seeds (*Glycine max* Merri) Agric. Biol. Chem. 1991, 55(9): 2227–2233
- 5 Morris, P. F., Savard, M. E., Ward, E. W. B. Identification and accumulation of isoflavonoids and isoflavone

- glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycines*. 1991, 39, 229– 244
- 6 Murphy, P. A. Separation of genistin, daidzin and their aglucones, and coumesterol by gradient high – performance liquid chromatography. J Chromatography. 1981, 21, 166– 169
- 7 Naim, M. , Gestetner B. , Zilkah S. et al. , Soybean isoflavones characterization, determination and antifungal activity. J. Agri. Food Chem 1974, 22(5): 806– 810
- 8 Ohta, N. , Kuwata, G. , Akahori, H et al. , Isoflavonoid constituents of soybeans and isolation of a new acetyl daidzin. Agric. Biol. Chem. 1979, 43( 7), 1415– 1419
- 9 Preston, T. S. A guide to the analysis of phenols by gas chromatography, Polyscience, Evanston, IL, 1966, 35– 40

## HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ISOFLAVONE CONTENT IN SOYBEAN TEST SAMPLES

Sun Junming<sup>1</sup> Ding Anlin<sup>1</sup> Dong Huiru<sup>2</sup>

(1. *Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Beijing, 100081*

2. *Institute of Vegetables and Flowers, CAAS, Beijing, 100081*)

**Abstract** Soybean isoflavone compounds were separated and determined with HPLC, and a simple sensitive and highly reproducible method was established. The result indicated the most suitable extracting time of isoflavine is 2– 3hr, the suitable absorbent wavelength is 260nm; It is accurate for the isoflavone standard sample with daidzin and genistin at the range of concentration; The isoflavone content is affected by extracting and examining temperatures. At 80℃ or higher temperature, isoflavone malonyl conjugates are hydrolyzed to glucosides and aglycones.

**Key words** Soybean ( *Glycine max* ); HPLC; Isoflavone