

毛细管电泳法测定大豆籽粒中异黄酮含量

黎波涛,韩航如,麻浩,张占琴,张欣,王丽群

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室,农业部国家大豆改良中心,南京 210095)

摘要 大豆异黄酮是一种具有重要生理活性的物质。本研究采用未涂层熔融石英毛细管柱(50 cm × 75 μm,有效长度为42 cm),对电泳条件进行优化,拟建立快速检测大豆籽粒中异黄酮含量的毛细管电泳法。结果表明优化的最佳电泳条件为:以5%甲醇与95%硼砂(40 mmol/L, pH = 10.0)溶液为电泳缓冲液,压力进样20 s,温度25 °C,分离电压16.5 kV,检测波长为254 nm。在此条件下,大豆籽粒中6种异黄酮组分可在21 min内完全分离并具有良好的线性关系;6种异黄酮组分的峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD)分别在0.5% ~ 2.4%之间和1.8% ~ 3.8%之间,加样回收率在97.2% ~ 103.3%之间,以鹰嘴豆芽素A作为内标可提高电泳的重现性。表明建立的方法灵敏、准确、经济、重现性好,适用于大豆籽粒中异黄酮含量的测定。

关键词 毛细管电泳;大豆异黄酮;含量测定;条件优化

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0230-05

DETERMINATION OF ISOFLAVONES CONTENT IN SOYBEAN SEEDS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

LI Bo-tao, HAN Hang-ru, MA Hao, ZHANG Zhan-qin, ZHANG Xin, WANG Li-qun

(State key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement National Center for Soybean Improvement, Ministry of Agriculture Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095)

Abstract Isoflavones is an important biofunctional substance. Capillary electrophoresis with a uncoated fused-silica capillary tube (50 cm 75 μm. i. d, effective length 42 cm) was used to optimize soybean isoflavones analysis. The optimum electrophoresis conditions were as follows: 40 mmol/L sodium borate containing 5% methanol as the running buffer (pH = 10.0), electrophoretic voltage being 16.5 kV, temperature being 25 °C and detecting wavelength being 254 nm. Under the optimum conditions, 6 kinds of isoflavones could be clearly separated within 21 minutes. The corrected peak areas of isoflavones increased linearly with components of isoflavones. RSD of the peak area and holding time of 6 isoflavones were 0.5% ~ 2.4% and 1.8% ~ 3.8%, respectively, and the recoveries were ranged from 97.2% to 103.3%. The biochanin was used as an internal standard and could increase the recurrence of experiment. The newly-built method is sensitive, simple, economical and well recurrent, and can be used for the determination of isoflavones components in soybean seed.

收稿日期:2006-11-13

基金项目:江苏省“十五攻关”项目(Q200126);长江学者和创新团队发展计划

作者简介:黎波涛(1981-),男,硕士研究生,主要从事作物品质改良研究与应用

通讯作者:麻浩教授,博士生导师, Tel: 025-84395324, Email: Lq-ncsi@njau.edu.cn

Key words Capillary electrophoresis; Soybean isoflavones; Content determination; Optimization of electrophoretic conditions

大豆异黄酮(soybean isoflavones)是大豆生长过程中积累的一类次生代谢产物,共有 12 种,分 3 类,即大豆苷类(daidzin groups)、染料木苷类(genistin groups)和黄豆苷类(glycitin groups)。它们每类又分别以游离型、葡萄糖苷型、乙酰基葡萄糖苷型、丙二酰基葡萄糖苷型 4 种形式存在^[1,2]。在大豆籽粒中,90% 以上的异黄酮以糖苷形式存在,只有极少量以游离苷元形式存在。近年来国内外的许多研究表明,大豆异黄酮具有预防癌症、防止骨质疏松和心血管疾病、抗炎、抗菌、抗衰老、抗氧化以及防止酒精中毒等生理活性^[1,2]。因此,大豆异黄酮已成为当前研究的热点,愈来愈引起各国研究人员的广泛关注。

有关大豆异黄酮含量测定方法的报道主要有紫外分光光度法、气相色谱法和高效液相色谱法^[3~5]。紫外分光光度法简单、快捷,但灵敏度低、特异性差、定量不太准确;气相色谱法灵敏度高,特异性强,但样品前处理复杂,操作繁琐;高效液相色谱法是目前广泛采用的一种方法,该法分离效率高、重现性好、测定结果准确,但检测时间较长,流动相消耗多,色谱柱使用寿命短,成本相对较高。

大豆异黄酮的定量定性分析皆需标样。目前 12 种异黄酮标样只有 6 种游离型和葡萄糖苷型标样容易购得,而 6 种乙酰基和丙二酰基型标样很难买到,且价格十分昂贵。已有研究表明可通过将乙酰基型和丙二酰基型异黄酮糖苷水解为相应的糖苷和苷元,这样只需要 6 种游离型和葡萄糖苷型标样就可定量异黄酮总含量。而目前水解法主要有盐酸水解法、酶解法和温和水解法^[3]。

毛细管电泳(CE)是近年来发展最为迅速的一项分离分析新技术,具有高效、快速、微量、灵敏、经济等特点,已广泛用于黄酮类化合物的分离分析,并逐渐成为测定植物雌激素的常规方法之一^[6~11]。Aussenac^[7]等采用毛细管电泳法分析了大豆籽粒中 8 种异黄酮成分含量。吴同^[8]等采用毛细管电泳法在 8 min 内分离了大豆提取物中的 4 种异黄酮成分。Peng 等^[9,11]采用毛细管电泳法和电化学检测器,分别测定了大豆制品和红车轴草中大豆苷元和染料木素的含量。

由于毛细管电泳易受多种因素影响,重现性较

差妨碍了其广泛应用。本文在前人毛细管电泳测定异黄酮含量的基础上,采用温和水解法,以 6 种游离型和葡萄糖苷型为标样确定其总含量,并对实验条件进行优化,以内标法提高其重现性,以期优化出一种操作简单、重现性好、准确、经济的大豆异黄酮测定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

毛细管电泳仪器系统:Waters - Quanta 4000 型毛细管电泳仪(美国),正电源,电压 0 ~ 30 kv 可调,配有 254 nm 紫外检测器,Waters 800 色谱数据采集工作站。未涂层熔融石英毛细管柱(50 cm × 75 μm. i. d,有效长度为 42 cm,河北永年锐洋色谱器件有限公司);pHs - 3c 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);Milli - Q 纯水机。

异黄酮标样:染料木苷(Genistin)、染料木素(Genistein)、大豆苷(Daidzin)、大豆苷元(Daidzein),含量为 99%,购自上海同田生化有限公司;黄豆黄苷(Glycitin)、黄豆黄素(Glycitein)、鹰嘴豆芽素 A(Biochanin),含量均为 98%,购自 Sigma 公司(美国)。硼砂、硼酸、乙醇均为国产分析纯。所用水为 Milli - Q 超纯水。

1.2 标准物质和样品溶液的准备

精确称取染料木苷、染料木素、大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、黄豆黄素、鹰嘴豆芽素 A 标准品各 10 mg,用甲醇溶解,定容至 100 mL,摇匀,得到 7 种标准溶液,进而将鹰嘴豆芽素 A 标准溶液稀释为 20 μg/mL 作为内标物质备用。

样品提取采用温和水解法,参考王松等^[3]的提取方法并作适当改进。大豆籽粒粉碎后混匀,过 60 目筛。准确称取大豆粉 0.5 g,置于 10 mL 聚四氟乙烯离心管中,加 7 mL 80% 乙醇,60 °C 超声提取 1 h,然后 80 °C 水浴 6 h,4000/min 离心 10 min,倒出上清液,再加入 2 mL 80% 乙醇,震荡,4000 r/min 离心 10 min,倒出上清液合并滤液定容至 10 mL,吸取 1 mL 上清液于 14000 r/min 离心 10 min,吸取 500 μL 上清液到 1 mL 小离心管中,4 °C 保存。分析前吸取 200 μL 样品溶液和 50 μL 鹰嘴豆芽素 A 到 0.6 mL

的毛细管电泳专用小管中,混匀后进样检测。

1. 3 电泳条件

以含有体积分数为 5 % 甲醇的 40 mmol/L 硼砂溶液为电泳缓冲液,压力进样 20 s,在 25 ℃、16.5 kV 恒压下进行电泳分离,并在 254 nm 波长处检测。毛细管柱使用前用 0.5 mol/L 的 NaOH、水和电泳缓冲液分别冲洗 5 min、3 min 和 3 min。每两次样品运行之间,用电泳缓冲液冲洗毛细管柱 2 min,分析 10 个样品后更换电泳缓冲溶液。

2 结果与讨论

2. 1 电泳条件的优化

2. 1. 1 电泳缓冲液组成和浓度 电泳缓冲液的组成和浓度是影响大豆异黄酮毛细管电泳分离效果的主要因素之一^[9]。在强碱性条件下,糖苷形式的异黄酮能与四硼酸钠络合成阴离子,从而增加其解离度。参考吴同等的方法^[8],选择硼砂混合液

(pH = 10.6)作为缓冲液,在 5 ~ 45 mmol/L 浓度范围内考察了缓冲液浓度对大豆异黄酮保留时间的影响(图 1)。结果发现,以 40 mmol/L 硼砂溶液作为电泳缓冲液时,异黄酮各组分完全分离且保留时间较短,分离效果较好。所以选定 40 mmol/L 硼砂溶液作为电泳缓冲液。

2. 1. 2 电泳缓冲液 pH 值 电泳缓冲液的 pH 值也是影响分离成败的关键因素之一^[6]。它一方面影响各溶质组分的电离度,即影响电荷数的多少;另一方面 pH 也影响电渗流的大小。环境 pH 增高有利于硼酸复合物的形成,使异黄酮各组分向正极的迁移速率增加,分离度增大,但同时也会导致保留时间延长。本实验以 40 mmol/L 的硼砂溶液作为电泳缓冲液,调节硼砂缓冲液 pH 值分别为 7.2、8.2、9.2、10.2、11.2,以优化出分离大豆异黄酮适宜的 pH 范围。结果见图 2。结果表明,在 10.0 附近,保留时间较短,分离效果较好。最终选定硼砂缓冲液 pH 值为 10.0。

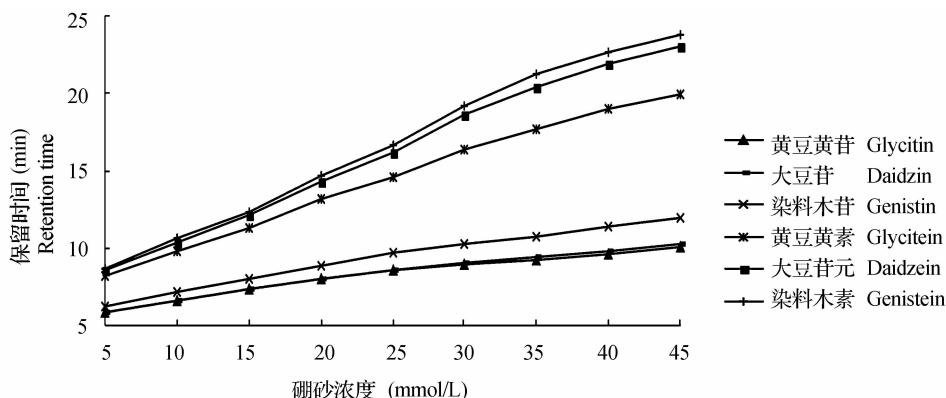


图 1 缓冲液浓度对电泳保留时间的影响

Fig. 1 Effects of concentration of running buffer on migration time

2. 1. 3 甲醇添加浓度和分离电压的选择 向电泳缓冲液中添加适量甲醇,可使电渗流(EOF)速度降低,防止其受极端 pH 环境的影响,从而增加分离度和提高重现性^[6]。本实验在 40 mmol/L 的硼砂缓冲溶液(pH 10.0)中,考察了添加体积分数分别为 5%、10% 和 15% 的甲醇对分离效果的影响。实验发现随着甲醇的添加,保留时间延长,分离度变化不大。综合考虑分离效果、保留时间和成本,本研究选择甲醇添加量为 5% 为宜。

电泳运行电压升高,大豆异黄酮的表观迁移速率提高,各组分的保留时间缩短,但分离度降低;电泳运行电流增加,电泳的重现性较低^[9]。实验中考察了 12 ~ 20 kV 运行电压下,大豆异黄酮各组分的分离度和出峰时间的变化。结果表明,当运行电压为 16.5 kV 时,保留时间较短,系统稳定,分离效果较好。图 3 为在优化条件下得到的大豆异黄酮混合标样与样品的电泳图。

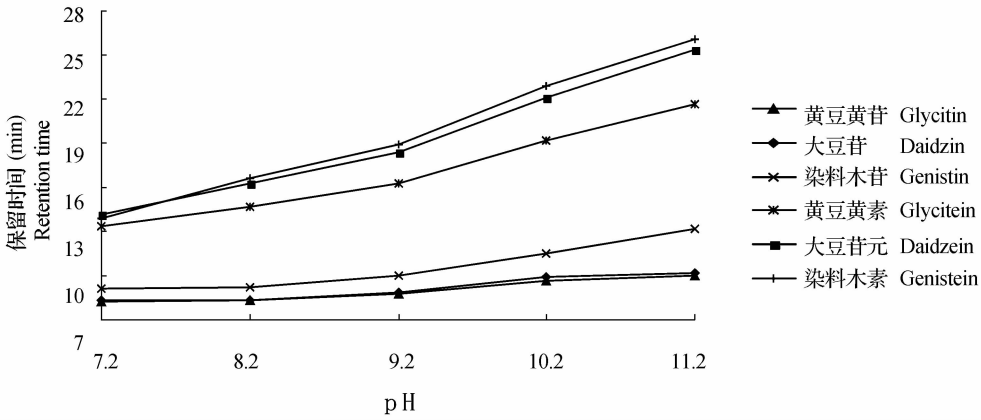
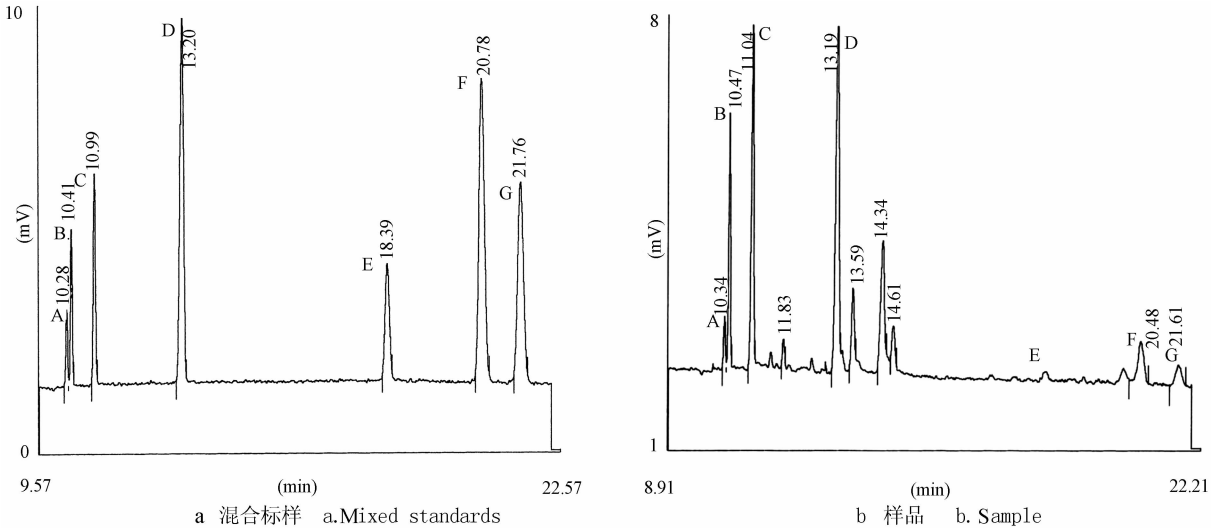


图 2 pH 变化对电泳保留时间的影响
Fig. 2 Effects of pH on migration time



A. 黄豆黄苷 Glycitin B. 大豆苷 Daidzin C. 染料木苷 Genistin D. 鹰嘴豆芽素 A biochanin
E. 黄豆黄素 Glycitein F. 大豆苷元 Daidzein G. 染料木素 Genistein

图 3 大豆异黄酮的毛细管电泳

Fig. 3 Electropherograms of soybean isoflavones

2. 2 线性范围

分别准确移取 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 mL 标准溶液至 10 mL 容量瓶中,用 80% 甲醇溶液定容至 10 mL,配成不同浓度的标准溶液,再采用毛细管电泳测定不同浓度所对应的峰面积。用标准溶液峰

面积与内标物峰面积的比值(x)与相应的标准溶液浓度(y)作线性回归,分别得到 6 种标样的标准曲线。用标准溶液逐步稀释法测得各种大豆异黄酮的最低检测限(S/N=3),结果见表 1。

表 1 大豆异黄酮标准曲线

Table 1 Calibration curves of the soybean isoflavones

组分 Component	标准曲线 Calibration curves	线性范围(μg/mL) Linear range	回归系数 r	检出限((g/mL) Detection limits
染料木苷 Genistin	$y = 30.651x + 1.1744$	1 ~ 50	0.9984	0.5
大豆苷 Daidzin	$y = 48.574x + 0.1417$	1 ~ 50	0.9997	0.5
黄豆黄苷 Glycitin	$y = 108.69x + 1.2847$	1 ~ 50	0.9991	0.5
染料木素 Genistein	$y = 11.119x + 1.9552$	1 ~ 50	0.9987	0.2
大豆苷元 Daidzein	$y = 7.8015x + 1.1178$	1 ~ 50	0.9992	0.2
黄豆黄素 Glycitein	$y = 11.838x + 0.9492$	1 ~ 50	0.9981	0.2

2. 3 重现性

本研究为提高电泳分析的重现性,以鹰嘴豆芽素 A 作为内标。在上述优化电泳条件下,将大豆异黄酮和鹰嘴豆芽素 A 的混合标准溶液连续进样 6 次,考察其峰面积与内标物面积比值以及保留时间的相对标准偏差(RSD)。由表 2 可以看出,在优化电泳条件下,6 种异黄酮组分与内标峰面积的比值和保留时间的相对标准偏差(RSD)分别在 0.5% ~ 2.4% 之间和 1.8% ~ 3.8% 之间,说明实验重现性好,方法可靠。

表 2 重现性分析		
Table 2 Assessment of recurrence		
组分	峰面积比值	保留时间
Component	RSD/%	RSD/%
	Peak area	Retention time
染料木苷 Genistin	2.4	1.8
大豆苷 Daidzin	0.8	2.0
黄豆黄苷 Icyitin	0.5	2.0
染料木素 Genistein	0.8	3.6
大豆苷元 Daidzein	1.3	3.8
黄豆黄素 Glycitein	0.9	2.7

2. 4 加样回收率

表 4 样品中的大豆异黄酮含量							
Table 4 The content of soybean isoflavones in samples							
品种名称	黄豆黄苷	大豆苷	染料木苷	黄豆黄素	大豆苷元	染料木素	含量 (mg/100 g)
Varieties	Glycitin	Daidzin	Genistein	Glycitin	Daidzein	Genistein	Content
柘城紫花糙 Zhechengzihuachao	28.6	223.6	224.3	4.2	21.0	17.7	519.3
桂阳紫金豆 Guiyangzijindou	38.8	121.7	270.8	5.7	9.3	11.8	458.2
万县泥巴豆 Wanxiannibadou	34.4	266.3	294.3	3.1	12.6	14.0	624.8
建阳秋大豆 Jianyangqiudadou	34.2	232.3	262.5	3.8	12.6	13.6	558.9
宁南黑豆 Ningnanheidou	32.9	99.8	128.7	4.5	6.5	9.4	281.8
筠连九转豆 Yunlianjiuzhuandou	47.1	113.3	178.2	4.1	4.9	11.5	359.1
早踏扁青 Zaotabianqing	19.3	141.4	115.7	2.9	6.0	8.2	293.6
启东羊眼豆 Qidongyangyandou	23.4	98.6	111.1	3.2	5.0	8.1	249.5
海系 13 Haixi13	12.0	63.8	72.8	3.2	5.0	7.8	164.6
豫豆 2 号 Yudou 2	25.5	47.7	70.4	3.1	6.4	8.1	161.2

3 结论

毛细管电泳法主要缺陷之一是重现性问题。笔者通过勤换电泳缓冲液并选择合适的内标物,方法重现性大为提高。研究发现以鹰嘴豆芽素 A 作为内标物,保留时间适中,与异黄酮组分没有干扰,分析效果较好。实验中由于无需大量有机溶剂,分析样品时也不会污染毛细管柱子,可延长柱子的使用寿命。采用硼砂作为缓冲溶液廉价低毒,既可降低成本,又可减少对人体、环境

准确称取已知异黄酮含量的大豆样品 6 份,分别加入浓度为 100 μg/mL 的 6 种标准溶液各 0.6 mL,按上述方法进行样品溶液提取和分析。由表 3 可以看出,染料木苷、大豆苷、黄豆黄苷、染料木素、大豆苷元和黄豆黄素平均回收率在 97.2% ~ 103.3% 之间,RSD 值均小于 4.0,表明该方法具有较高的准确度,符合检测要求。

表 3 加样回收率结果 (n = 6)				
Table 3 Results of recovery (n = 6)				
组分	添加量	检测量	回收率	标准偏差 (%)
Component	Added/μg	Found/μg	Recovery (%)	RSD
染料木苷 Genistin	60	59.2	98.7	3.5
大豆苷 Daidzin	60	60.8	101.3	2.9
黄豆黄苷 Glycitin	60	62.0	103.3	3.7
染料木素 Genistein	60	58.5	97.5	2.7
大豆苷元 Daidzein	60	58.9	98.2	3.3
黄豆黄素 Glycitein	60	58.3	97.2	2.1

2. 5 样品的测定

根据上述优化的电泳条件,测定了 10 个大豆品种中异黄酮含量,结果见表 4。

的危害和污染。

研究优化出了检测大豆籽粒中异黄酮含量的毛细管电泳法。其具体电泳条件为:以含有体积分数为 5% 甲醇的 40 mmol/L 硼砂溶液 (pH = 10.0) 为电泳缓冲液,压力进样 20 s,在 25 ℃、16.5 kV 恒压下进行电泳分离,并在 254 nm 波长处检测。该方法简单快速、操作简便、线性关系和重现性好、准确度高,可作为大豆籽粒中异黄酮成分测定的一种较理想的检测方法,适合于大豆异黄酮种质资源的筛选和育种材料的鉴定。

表5 豆制品中金属元素含量的测定结果($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
Table 5 The determining result of metal elements in soybean products

元素 Element	大豆 Soybean	豆腐 Tofu	干豆腐 Dried tofu	豆腐皮 Tofu peel	豆腐泡 Tofu vesicle	豆腐干 Dried bean curd	豆浆 Soybean milk	腐竹 Fu zhu	素鸡 Vegetarian Chicken
Cu	13.46	1.05	4.92	9.73	2.53	4.15	1.64	10.24	5.43
Fe	119.26	105.61	106.13	67.13	85.44	104.92	4.72	131.26	72.46
Ni	39.75	39.59	38.59	41.19	41.66	42.33	0.56	40.69	40.89
Cd	14.11	—	0.59	—	—	—	—	0.85	17.18

注：“—”为未检出
Note:“—”Didn't determine out

参 考 文 献

[1] 刘彦明,王辉,刘彦富. 原子吸收光谱法测定大豆及其制品中的微量元素[J]. 光谱学与光谱分析,2004,24(11): 1454 – 1457.
[2] 张玉芝. 微量元素与健康研究[J]. 光谱实验室,2001,18(4): 73 – 74.

[3] 彭珊珊,张霖霖,赵淑华. 微波等离子体炬发射光谱法测定锌的研究[J]. 光谱实验室,2002,19(1): 111 – 112.
[4] 王雷,李丽华,张金生. MPT – AES 法测定合金钢中铜锰钼[J]. 石油化工高等学校学报,2005,18(2):22 – 24.
[5] 张金生,李丽华,金钦汉. 微波消解微波等离子体炬原子发射光谱法测定合金钢中的铜、锰、钼[J]. 分析试验室,2004,23(7): 31 – 33.

(上接 234 页)

参 考 文 献

[1] 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.
[2] Wu Q L,Wang M F,Simon J E. Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds[J]. Journal of Chromatography B, 2004 (812): 325 – 355.
[3] 王松,丁立,周荣琪. HPLC 法测定豆粕中大豆异黄酮的含量[J]. 化工进展,2005,24(2):196 – 199.
[4] 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.
[5] 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.
[6] 邓廷倬,何金兰. 高效毛细管电泳[M]. 北京:科学出版社,

1996:67 – 72.
[7] Aussenac T,Lacombe S,Dayde J. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds; effects of variety and environment[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1998,68(suppl): 1480S – 5S.
[8] 吴同,梁明. 毛细管电泳分离四种大豆异黄酮类化合物[J]. 宜宾学院学报,2003,3:82 – 84.
[9] Peng Y Y,Chu Q C,Liu F H,et al. Determination of isoflavones in soy products by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. Food Chemistry,2004(87): 135 – 139.
[10] Wang C Y,Huang H Y,Kuo K L. Analysis of puerariae radix and it smedicinal preparations by capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A,1998,802(1): 225 – 231.
[11] Peng Y Y,Ye J N. Determination of isoflavones in red clover by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. Fito-terapia,2006 (77): 171 178.