

吉林省普通大豆品种(系)异黄酮含量分析

宋志峰¹,王 丽¹,孟凡钢²,王新风²,黄 璜¹,马 巍²,富 健²

(1. 吉林省农业科学院 农业环境与资源研究中心,吉林 长春 130033;2. 吉林省农业科学院 大豆研究中心,吉林 长春 130033)

摘 要:利用超声波法对吉林省 26 份普通大豆品种(系)大豆异黄酮含量进行 HPLC 测定。建立了一种 HPLC 测定大豆籽粒中异黄酮含量的方法。结果表明:异黄酮各异构体在 50 ~ 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性系数良好,相关系数为 0.9998 ~ 0.9999;检出限为 1.09 ~ 2.06 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,定量限为 3.25 ~ 6.46 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;异黄酮各异构体回收率为 97.11% ~ 103.31%;相对标准偏差(RSD, $n = 7$)分别为 2.03% ~ 4.32%。该方法线性范围广,线性关系好,灵敏度和准确度高,适合于大豆及大豆制品中异黄酮含量的测定。测得吉林省 261 份普通大豆品种(系)中的异黄酮含量范围 1.46 ~ 4.97 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,超过 4 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的品种(系)有 23 个,占测定品种(系)总数的 8.81%。

关键词:HPLC;大豆籽粒;异黄酮;测定

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)06-1076-05

Analyse of Isoflavones Content in Normal Soybean Varieties(Lines) in Jilin Province

SONG Zhi-feng¹, WANG Li¹, MENG Fan-gang², WANG Xin-feng², HUANG Huang¹, MA Wei², FU Jian²

(1. Research Center of Agricultural Enviroment and Resource, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, Jilin; 2. Research Center of Soybean, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, Jilin, China)

Abstract: A HPLC method for rapid determination of isoflavones from soybean is presented. The isoflavones were extracted by 80% methanol and followed hydrolyzing at 100 $^{\circ}\text{C}$ to complete conversion of the acetyl and malonyl forms of isoflavones to β -glucoside and aglucone forms. The isoflavones were separated on a C_{18} short column using gradient elution; column oven temperature, 40 $^{\circ}\text{C}$; the diode array detector monitoring wavelength, 260 nm. The peak area of isoflavones versus their concentration had a good linearity(correlation coefficient were 0.9998-0.9999) in the range of 50-1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Limits of detection(LOD) were in the range of 1.09-2.06 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, limits of quantification(LOQ) were in the range of 3.25-6.46 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The recoveries of standard spiking of isoflavones were in the range of 97.11% - 103.31%. The relative standard deviation(RSD, $n = 7$) were in the range of 2.03% - 4.32%. The linearity of the method was good in a wide range. This method has high analytic sensitivity and accuracy, and was suitable for determination of isoflavones in soybean and other cereal products. The isoflavone content in 261 Jilin province normal soybean varieties(lines) ranged from 1.46 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ to 4.97 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The isoflavone content of 23 varieties(lines) soybean exceeded 4 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The research results indicated that the content range and characteristics of the soybean oligosaccharides in Jilin province and lay a foundation for the further research of soybean quality breeding and processing and utilization of soybean isoflavone.

Key words: HPLC; Soybean; Isoflavone; Determination

大豆是人类重要的食物资源之一,它不仅含有优质的蛋白质和脂肪,而且富含许多生物活性物质,大豆异黄酮就是其中一种。据有关文献报道,大豆异黄酮具有防治心脑血管疾病,预防癌细胞生长和骨质疏松症,改善更年期症状等特殊的生物功

效^[1]。随着大豆育种研究的不断深入,为了给育种工作培育高异黄酮新品种提供科学依据,迫切需要一个简便快捷、灵敏度和准确度高的大豆异黄酮的检测方法。

大豆异黄酮的检测国家尚未制定统一的标准,

收稿日期:2009-04-08

基金项目:吉林省农业科学院大豆研究中心青年基金资助项目。

第一作者简介:宋志峰(1975-),男,助理研究员,研究方向为农产品质量与安全。

通讯作者:富健,研究员。E-mail: tywt0001@ yahoo. com. cn。

目前大豆异黄酮的检测方法主要有:紫外分光光度法、气-质联用法、高效液相色谱法、液-质联用法、毛细管电泳法、免疫法。其中紫外分光光度法干扰多并需进行复杂的前处理,气-质联用法需对样品衍生后测定步骤繁琐,液-质联法、毛细管电泳法仪器昂贵,免疫检测法抗体不易制备^[2-3]。在大豆异黄酮生理活性及检测方法的基础上,采用高效液相色谱法对有关文献的前处理方法进一步改进,并对色谱条件进行逐一分析研究,建立了操作简便快速,准确的大豆异黄酮含量的检测方法^[4]。

目前发现大豆异黄酮有 12 种,包括游离型苷元和结合型糖苷两大类,其中丙二酰基和乙酰基形式的异黄酮标准样品极易降解^[5-6]。采用超声波法提取,水解转化为苷和苷元后,使用 HPLC 检测,内标法定量。与传统方法相比,超声波法具有前处理步骤简单,分析时间短,采用内标法定量更加准确等优点。该试验利用超声波法对吉林省 261 份普通大豆品种(系)大豆异黄酮含量进行了测定,初步明确了吉林省大豆品种(系)异黄酮含量范围及特点,并为进一步培养高异黄酮大豆品种和大豆异黄酮加工和利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试仪器

Agilent 1100 色谱仪包括:真空脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器和化学工作站,美国 Agilent 公司;KQ-2500B 超声波清洗器,中国昆山超声波仪器有限公司;EBA 21 型台式高速离心机,德国 Hettich 公司;高速粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司;电热恒温干燥箱(最高温度 350℃,控温精度 $\pm 1^\circ\text{C}$),日本 Yamato 公司。

1.2 供试试剂

大豆异黄酮标准品:大豆苷元(Daidzein)、大豆苷(Daidzin)、染料木素(Genistein)、染料木苷(Genistin)、黄豆黄素(Glycitein)和黄豆黄苷(Glycitin)(上海同田生化技术有限公司);内标黄酮(美国 Sigma-Aldrich 公司);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);醋酸(分析纯,德国 Merk 公司);二甲基亚砜(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);水为 2 次蒸馏水。

大豆样品由吉林省农业科学院大豆研究中心提供。

标准液配制:称取大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素和黄酮各 10 mg,分别置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容(其中大豆苷元、黄豆黄素和染料木素需要加入少量的二甲基亚砜助溶)。临用时各吸取相同的体积溶液混合,并稀释至不同浓度的混合标准液,用于标准曲线的绘制。

提取液配制:准确称取黄酮 72 mg,使用 80% 甲醇溶液溶解并定容至 100 mL,配制成提取母液, -20°C 保存。临用时稀释至浓度为 $7.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,用于提取大豆异黄酮。

1.3 试验方法

1.3.1 样品处理 准确称取粉碎后的大豆样品(40 目)75 mg,置于水解管中,加提取液 10 mL,充氮气 3 min 后封盖,超声波提取 30 min。然后放入恒温干燥箱中 $100\pm 1^\circ\text{C}$ 水解 2.5 h。取出后冷却至室温,吸取水解液 1 mL 于离心管中, $14\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液 100 μL 于 HPLC 样品瓶中,上机测定。

1.3.2 色谱条件 色谱柱: C18 $150\times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$ (美国 Agilent 公司);流动相 A:10% 甲醇溶液(含 0.5% 醋酸, v/v);流动相 B:100% 甲醇;洗脱梯度: $0\sim 17.0\ \text{min}$ (B%: $0\sim 86.0$), $17.0\sim 17.1\ \text{min}$ (B%: $86.0\sim 100.0$), $17.1\sim 21.0\ \text{min}$ (B%: $100.0\sim 100.0$), $21.0\sim 21.1\ \text{min}$ (B%: 100.0);流速: $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。进样量: $5\ \mu\text{L}$;柱温: 40°C ;检测波长: 260 nm。

2 结果与讨论

2.1 色谱图

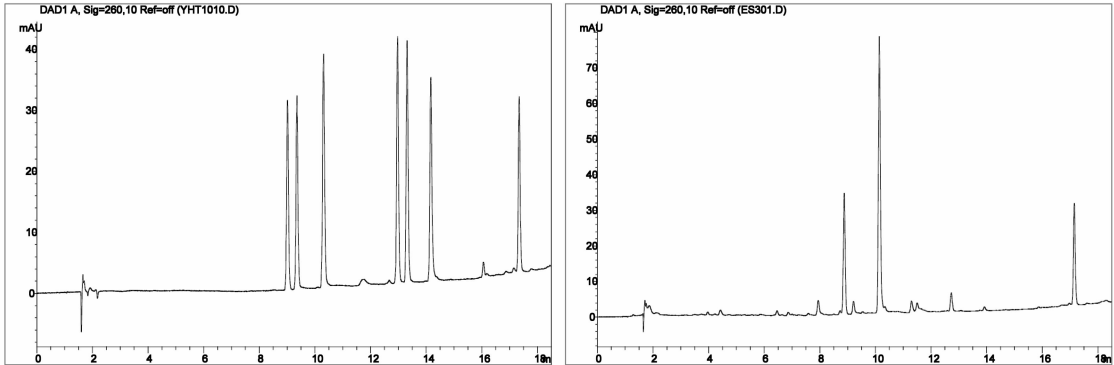
标准样品和大豆样品色谱分离见图 1。各异黄酮异构体的分离度均大于 1.2,满足准确定量分析的要求。分析时间仅需 20 min,分析效率高。

2.2 前处理方法的选择

2.2.1 提取溶剂的选择 分别准确称取样品 75 mg 3 份置于 3 个试管中,分别加入 10 mL 的 80% 甲醇溶液、50% 乙腈溶液和 70% 乙醇溶液,超声波提取 30 min,由于丙二酰基和乙酰基异黄酮没有标准物质,所以以峰面积大小表示提取效率的高低,丙二酰基和乙酰基异黄酮的定性参考文献[7],结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出 70% 乙醇的提取大豆异黄酮的含量略高于其它两种溶剂,但考虑到与流动

相的溶剂保持一致,另外乙醇提取物的色谱图中杂峰较多,使测定结果误差较大,综合 2 种原因采用

80% 甲醇溶液为提取溶剂。



1. 大豆苷;2. 黄豆黄苷;3. 染料木苷;4. 大豆苷元;5. 黄豆黄素;6. 染料木素;7. 黄酮
1. Daidzin, 2. Glycitin, 3. Genistin, 4. Daidzein, 5. Glycitein, 6. Genistein, 7. Flavone

图 1 异黄酮标准液(a)和大豆样品(b)色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard with soybean isoflavone(a)and sample(b)

表 1 不同提取溶液提取效果

提取溶剂	提取物色谱峰面积总和
Extraction solvent	Areas sum of peaks of extracts
80% 甲醇溶液	379.5
80% methanol solution	
50% 乙腈溶液	369.9
50% acetonitrile solution	
70% 乙醇溶液	387.6
70% ethanol solution	

2.2.2 提取时间的选择 准确称取样品 75 mg, 加入 10 mL 80 % 甲醇溶液。同样以峰面积作为提取效率的衡量标准。如表 2 所示,随着时间的增加,提取效率与 0.5 h 几乎相等,所以提取时间以 0.5 h 为宜。

表 2 不同提取时间提取效果

提取时间	0.5	1.0	2.0
Extraction time/h			
峰面积	381.2	377.6	379.3
Areas of peak			

2.2.3 水解溶剂和水解方式的选择 大豆异黄酮有 12 种异构体,其中丙二酰基和乙酰基异构体性质非常不稳定,配制成溶液后极易降解,所以标准品很难购买,即使买到配制成溶液后,保存也十分困难,因此实际工作中测定这些异构体的含量存在很大难度,但是它们通过水解的手段可以转化为性质稳定的苷和苷元再进行测定。为确定最佳的水解方法,

分别采用 10 mL 80% 甲醇溶液和文献[8]报道的 2 mL 10 mol · L⁻¹ 盐酸加 8 mL 乙醇为水解溶剂,水解方式分别采用沸水浴回流水解和 100℃ 封管水解(即将样品装入水解管,充氮气后封盖,放入 100℃ 烘箱中水解)进行了对比,称样量均为 75 mg,水解时间均为 3 h。结果如表 3 所示,80% 甲醇溶液的提取和水解转化效率明显高于 2 mL 10 mol · L⁻¹ 盐酸加 8 mL 乙醇溶液,因此,采用 80% 甲醇溶液为水解溶剂。封管水解和沸水浴回流水解效果相当,因封管水解操作更加简便,故采用 100℃ 封管水解的方式。

表 3 不同水解溶剂和水解方式的水解效果

水解溶剂	水解方式	异黄酮含量
Hydrolyzed solvent	Hydrolyzed means	Isoflavone content/ mg · g ⁻¹
80% 甲醇溶液 80% methanol solution	100℃ 封管	1.98
	Closed hydrolyzed tube at 100 °C	
2 mL 10 mol · L ⁻¹ 盐酸 + 8 mL 乙醇溶液 2 mL 10 mol · L ⁻¹ HCl solution + 8 mL of ethanol	沸水浴回流	2.01
	Reflux in a boiling water bath	
	100℃ 封管	1.26
	Closed hydrolyzed tube at 100 °C	
	沸水浴回流	1.28
	Reflux in a boiling water bath	

2.2.4 水解时间的选择 以 80 % 甲醇溶液为水解溶剂,100℃ 封管水解,水解时间分别为 1. 0、2. 0、2. 5、3. 0、3. 5 h,测定大豆异黄酮含量,结果见表 4。水解时间少于 2. 5 h 测得的含量较低,从色谱图上看,仍有部分丙二酰基和乙酰基异黄酮没有完全转化,水解时间达到 2. 5 h 丙二酰基和乙酰基异黄酮完全转化,并随着时间的延长异黄酮总量不再增加,因此选择 2. 5 h 为水解时间。

表 4 不同水解时间的水解效果

Table 4 Hydrolyzed efficiency for different hydrolyzed time	
水解时间	异黄酮含量
Hydrolyzed time/h	Isoflavone contents/mg · g ⁻¹
1. 0	1. 541
2. 0	2. 197
2. 5	2. 322
3. 0	2. 310
3. 5	2. 327

2.3 色谱条件的选择

2.3.1 洗脱方式的选择 文献[8]报道的洗脱方式有 2 种,即等度洗脱和梯度洗脱。但是采用等度洗脱方式会使分析时间延长并且结构相近的组分可能不能完全分离,因此在仪器设备条件允许的情况下,分析不易分离组分时,应该尽量采用梯度洗脱的方式。分离大豆异黄酮各异构体时,采取梯度洗脱的方式,大大缩短样品的分析时间,同时提高了各组分的分离度,使定量更加准确。

2.3.2 流动相的选择 以 10% 甲醇溶液为流动相 A。证明使用纯水作为 A 相效果与前者相同,但是在使用纯水时容易滋生藻类,造成色谱柱堵塞。因此加入 10% 的甲醇可以起到抑制藻类生长的作用,同时对分离效果也不会产生影响。

表 5 6 种大豆异黄酮的线性回归方程、相关系数、检出限、定量限、回收率和精密度

Table 5 Linear regression equation, correlation coefficient, limit of detection, limit of quantification, recovery and relative standard deviation of 6 soybean isoflavones						
大豆异黄酮	线性回归方程	相关系数	检出限	定量限	回收率	RSD/%
Soybean isoflavones	Linear regression equation	Correlation coefficient	LOD/mg · L ⁻¹	LOQ/mg · L ⁻¹	Recovery/%	(n = 5)
大豆苷 Daidzin	Y = 15. 29X - 1. 42	0. 9999	1. 39	4. 69	98. 33	2. 53
黄豆黄苷 Glycitin	Y = 14. 18X - 1. 53	0. 9998	1. 78	5. 59	97. 11	3. 27
染料木苷 Genistin	Y = 17. 39X - 1. 62	0. 9999	2. 06	6. 46	102. 39	2. 03
大豆苷元 Daidzein	Y = 20. 85X - 1. 71	0. 9998	1. 09	3. 25	101. 22	4. 10
黄豆黄素 Glycitein	Y = 19. 00X - 1. 90	0. 9999	1. 24	3. 83	103. 31	4. 32
染料木素 Genistein	Y = 15. 69X - 1. 95	0. 9998	1. 43	4. 82	97. 52	3. 01

2.5 样品测定

对吉林省农业科学院大豆研究中心提供的 261 份大豆品种(系)的异黄酮含量进行了测定,并对测

定结果进行了分析,结果见表 6。测得大豆苷平均含量为 1. 13 mg · g⁻¹,变幅为 0. 52 ~ 1. 77 mg · g⁻¹;黄豆黄苷平均含量为 0. 23 mg · g⁻¹,变幅为 0. 08 ~

在流动相中加入适量的冰醋酸可改善色谱峰拖尾现象,提高各组分分离度,但加入过多会使流动相 pH 降低,缩短色谱柱的使用寿命,结果证明加入 0. 1% 较为合适。

2.3.3 柱温的选择 色谱柱温度对分离的影响较大,分别将柱温设定为 25℃、30℃、35℃、40℃ 来进行分离。结果发现随着柱温的升高,分离度不断提高,但是过高的柱温也会降低色谱柱的使用寿命,所以选择 40℃ 作为分析时的柱温。

2.3.4 检测波长的选择 通过紫外波长扫描,发现大豆异黄酮各异构体最大吸收波长为 260 nm,而内标物黄酮的最大吸收波长为 280 nm。为检测方便选择 260 nm 作为检测波长。通过适当增加内标物黄酮的称重量来调节内标物和异黄酮异构体的峰比。

2.4 线性关系、检出限、精密度和回收率

将 1. 2 中所配制的大豆异黄酮标准液,按 2. 2 的色谱条件进行测定,以各异黄酮峰面积 Y 为纵坐标,浓度 X(μmol · L⁻¹)为横坐标进行线性回归得到回归方程,各异黄酮浓度在 50 ~ 1 000 μmol · L⁻¹范围内具有良好的线性关系,相关系数 r 在 0. 9998 ~ 0. 9999 之间。以信噪比 S/N = 3 计算最小检出限(LOD),以信噪比 S/N = 10 计算最小定量限(LOQ),结果见表 1。

称取已测定出异黄酮含量的大豆样品 5 份,分别按各异黄酮含量 80%、100% 和 120% 左右加入异黄酮标准液,测定其回收率和相对标准偏差(RSD)。结果表明,各异黄酮异构体的回收率在 97. 11% ~ 103. 31% 范围内,RSD 为 2. 03% ~ 4. 32%。说明该方法准确度和精密度高,方法可靠。

0.46 mg · g⁻¹;染料木苷平均含量为 1.46 mg · g⁻¹, 变幅为 0.62 ~ 2.17 mg · g⁻¹;大豆苷元平均含量为 0.06 mg · g⁻¹,变幅为 0.01 ~ 0.14 mg · g⁻¹;染料木素平均含量为 0.02 mg · g⁻¹, 变幅为 0.01 ~ 0.04 mg · g⁻¹;总异黄酮平均含量为 2.96 mg · g⁻¹, 变幅为 1.46 ~ 4.97 mg · g⁻¹,总含量超过 4 mg · g⁻¹的品种(系)有 23 个, 占有所有测定品种(系)的 8.81%。自然条件下大豆中异黄酮主要以葡萄糖苷、乙酰基葡萄糖苷和丙二酰基糖苷的形式存在,经加热水解,则测定的总异黄酮中以葡萄糖苷异黄酮为主,说明乙酰基葡萄糖苷和丙二酰基糖苷以全部转化为葡萄糖苷异黄酮,其中大豆苷和染料木苷两项之和占总异黄酮的 82.27% ~ 95.53%。染料木苷与大豆苷之比平均为 1.33 左右。

表 6 吉林省部分普通大豆品种(系)异黄酮含量分析
Table 6 Analysis of isoflavone content in some normal soybean varieties(lines)in Jilin province

项 目 Item	平均值 Average	标准偏差 Standard deviation	最小值 Minimum	最大值 Maximum
大豆苷 Daidzin/ mg · g ⁻¹	1.13	0.27	0.52	1.77
黄豆苷 Glycitin/ mg · g ⁻¹	0.23	0.066	0.08	0.46
染料木苷 Genistin/ mg · g ⁻¹	1.46	0.26	0.62	2.17
大豆苷元 Daidzein/ mg · g ⁻¹	0.06	0.027	0.01	0.14
染料木素 Genistein/ mg · g ⁻¹	0.02	0.006	0.01	0.04
总异黄酮 Isoflavone/ mg · g ⁻¹	2.96	0.66	1.46	4.97
(大豆苷 + 染料木苷) /总异黄酮 (Daidzin + Genistin)/ Isoflavone	0.89	3.01	0.82	0.95
染料木苷/大豆苷 Genistin/Daidzin	1.33	0.21	0.81	2.24

所有样品中均未检出黄豆黄素,其它 2 种苷元(大豆苷元和染料木素)含量也很少,说明自然条件下大豆籽粒中不含有异黄酮苷元或含量甚微,而由大豆加工的食品则含有异黄酮苷元,这是由于加工过程中会发生各种复杂的化学反应(如加碱水解或加酶水解等),使异黄酮糖苷转化为相应的苷元。

3 结论

建立了大豆异黄酮的检测方法。采用超声波提取、水解转化、内标定量、HPLC 方法检测。结果表明,方法线性范围广,线性关系好,灵敏度和准确度高,适合于大豆及大豆制品中异黄酮含量的测定。
对吉林省 261 份大豆品种(系)测定结果表明,总异黄酮平均含量为 2.96 mg · g⁻¹,变幅为 1.36 ~ 4.62 mg · g⁻¹,总含量超过 4 mg · g⁻¹的品种(系)有 23 个,占有所有测定品种(系)的 8.81%。

参考文献

[1] 谢明杰,高爽,邹翠霞,等. 大豆异黄酮生理功能研究进展[J]. 食品发酵工业,2004,30(5):94-98. (Xie M J,Gao S,Zou C X,et al. The physiology function of soybean isoflavones[J]. Food and Fermentation Industries,2004,30(5):94-98.)
[2] 高荣海,李长彪,刘长江,等. 大豆异黄酮分离及检测方法研究概述[J]. 粮食与油脂,2006(5):22-24. (Gao R H,Li C B,Liu C J,et al. Survey on the methods of separation and detection for soy isoflavone[J]. Journal of Cereals and Oils,2006(5):22-24.)
[3] 张晓波,吴岩,林红. 高效液相色谱测定水解大豆中异黄酮方法研究[J]. 粮食与油脂,2006(4):19-21. (Zhang X B,Wu Y,Lin H. Study on method of hydrolyze isoflavone in soybean by HPLC [J]. Journal of Cereals and Oils,2006(4):19-21.)
[4] 石荣,王少云,侯准,等. 大豆异黄酮指纹图谱中保留时间漂移的校正研究[J]. 色谱,2006,24(1):65-68. (Study on retention time shift correction of fingerprint chromatograms of soybean isoflavones [J]. Chinese Journal of Chromatography,2006,24(1):65-68.)
[5] 金米聪,龚文杰,马建明,等. 大豆及制品中 12 种大豆异黄酮的 HPLC 及 HPLC-MS 法测定研究[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(8):900-903. (Jin M C,Gong W J,Ma J M,et al. Determination of 12 soybean isoflavones in soybeans and soy-based foods by high performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Health laboratory Technology, 2005,15(8):900-903.)
[6] Song T,Barua K,Buseman G,et al. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard[J]. American Journal of Clinical Nutrition,1998,68(Supplement):1474-1479.
[7] Aaron P G,Mark W C. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A,2001,913:397-413.
[8] Nakamura Y,Kaiharu A,Yoshii K,et al. Content and composition of isoflavonoids in mature or immature beans and bean sprouts consumed in Japan[J]. Journal of Health Science,2001,47(4):394-406.