

高效液相色谱法快速检测饲料中大豆异黄酮的主要组分含量

张晶莹, 孙君明, 李 斌, 韩粉霞, 闫淑荣, 田 玲, 陈明阳, 邹 筱, 范胜栩, 杨 华

(中国农业科学院 作物科学研究所/农业部北京大豆生物学重点实验室, 北京 100081)

摘要:大豆异黄酮作为一种植物雌激素,具有增强哺乳动物机体免疫力、提高繁殖能力和分泌能力以及促进动物生长等生理作用。以市售的9种动物饲料为材料,采用0.1% (V/V) 乙酸的70% (V/V) 乙醇水溶液提取异黄酮组分,利用高效液相色谱(HPLC)技术检测其异黄酮各组分含量。结果表明:该方法可以快速检测到饲料中除乙酰基黄豆苷(AGL)外的其他所有异黄酮组分。相较于大豆籽粒中异黄酮组分而言,饲料中的丙二酰基异黄酮组分含量较少,而其相应的游离型甙元组分含量明显增加,且乙酰基染料木苷(AG)含量较高。由于配方和选料的差异,不同品牌动物饲料中异黄酮组分含量存在明显差异。经验证,该方法具有准确性高和重复性好的特点,可以快速检测饲料中异黄酮的组分含量,更好地为畜禽生产提供指导作用。

关键词:大豆;饲料;异黄酮;HPLC

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)04-0530-05

A Rapid Method for Determination of Soybean Isoflavone Components in Feeds by HPLC

ZHANG Jing-ying, SUN Jun-ming, LI Bin, HAN Fen-xia, YAN Shu-rong, TIAN Ling, CHEN Ming-yang, ZOU Xiao, FAN Sheng-xu, YANG Hua

(Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Ministry of Agriculture (MOA) Key Laboratory of Soybean Biology, Beijing 100081, China)

Abstract: Isoflavone is a kind of new feed additives with enhancing immunity, improving animal reproduction, secretion ability and other physiological functions. However, the unreasonable dose will cause potential side effect. In this study, we extracted the isoflavone with 0.1% (V/V) acetic acid 70% (V/V) ethanol solution from nine kinds of feeds, and identified the isoflavone components by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the method could quickly detect all the isoflavone components except for acetylglycitin in feeds. Comparing to the soybean seed, the malonyl-glucoside groups of isoflavone were less, the free aglycone groups were increased correspondingly and the acetylgenistin content was higher in feeds. Owing to the various formulas and materials, there was significant difference in the isoflavone content in various kinds of feeds. Based on the ANOVA analysis, the method presented high accuracy and stability. It can be used to rapidly detect the isoflavones content in feeds and to provide guidance for livestock and poultry production.

Key words: Soybean; Feed; Isoflavone; HPLC

大豆异黄酮是一种植物雌激素,对人体具有预防癌症、抗心脑血管、抗氧化和减轻妇女更年期综合症等重要的生理和保健功能^[1-4]。目前,大豆异黄酮作为一种新型饲料添加剂开始广泛应用于畜禽业,引起众多学者的研究兴趣。我国从20世纪90年代开始研究植物雌激素异黄酮类化合物的生物学功能及其在养殖业中的应用^[5-7]。1999年,Setchell等首次证实大豆异黄酮与哺乳动物雌激素结构相似,具有类雌激素作用^[8]。张荣庆等证明异黄酮植物雌激素可以提高小鼠免疫功能,促进大鼠乳腺发育,且明显提高血浆中的生长激素和泌乳素的含量^[9-10]。Messina等的研究结果同样证明了异

黄酮可提高禽畜免疫功能^[11]。另外,大豆异黄酮具有提高产蛋率,增加卵巢重和血清生长激素等功效^[12-14]。综上所述,在畜禽饲料中添加适量的大豆异黄酮,具有增强动物机体免疫力、提高其繁殖能力和分泌能力以及促进生长等生理作用。

然而,异黄酮类化合物在畜禽饲料中的使用并非越多越好,其添加剂量和使用时期及方法会影响畜禽的生理功能甚至引起副作用。刘根桃等研究表明大豆异黄酮可促进20~30日龄的公仔猪体重显著增加,而母仔猪则增加不显著,表现出显著的性别差异,且对20d以后的泌乳后期有一定的副作用^[15-16]。郭慧君等对去势仔猪添加5 mg·kg⁻¹大豆

收稿日期:2013-01-13

基金项目:转基因重大专项(2011ZX08004-003);国家自然科学基金(31171576);国家“十二五”科技支撑计划(2011BAD35B06-3)。

第一作者简介:张晶莹(1987-),女,在读硕士,主要从事大豆品质育种研究。E-mail: zhangjycaas@163.com。

通讯作者:孙君明(1972-),男,博士,研究员,主要从事大豆品质基因分子标记辅助育种研究。E-mail: sunjunming@caas.cn。

异黄酮,可促进去势公猪的生长以及显著提高饲料利用率,而对去势母猪却有一定的副作用^[17]。由于饲料的主要原料——大豆和豆粕本身含有异黄酮类物质,饲料中异黄酮的含量会直接影响到其添加剂量。所以在使用异黄酮饲料添加剂时应参考饲料的配方和选料,并根据其所起生物学功能以及动物的种类、性别和生长期的不同酌情添加,以减少其潜在的副作用。为了使新型饲料添加剂异黄酮更好地发挥生物学功能,快速检测饲料中的异黄酮含量是亟待解决的问题。

目前,检测大豆异黄酮的方法主要有毛细管电泳法^[18]、紫外分光光度法^[19]和高效液相色谱法(high performance liquid chromatographic, HPLC)。其中高效液相色谱法因具有分离效果好、重复性好、准确性高、分析速度快,以及仪器自动化程度高等优点,已被广泛用于对大豆异黄酮的分析检测^[20]。饲料中大豆异黄酮含量检测的研究进展缓慢,相关报道较少。杨华明等利用 HPLC 法检测到饲料添加剂糖肽酮萜素中黄豆苷(daidzin, D)、黄豆苷元(daidzein, DE)、染料木苷(genistin, G)和染料木素(genistein, GE)4种异黄酮组分的含量^[21]。阮洪生等采用 HPLC 法测定了豆粕中黄豆苷元和染料木素的含量^[22]。但这些方法仅仅检测到个别异黄酮组分的含量,并且准确性以及实用性等方面有待验证。本研究旨在提供一种利用 HPLC 技术快速检测饲料中异黄酮不同组分含量的有效方法,以便更好地为畜禽生产提供指导作用。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所采用的9种小鼠饲料样品购自市售的主要商业品牌饲料,分别为1:军科院维持料,2:军科院SPF繁殖料,3:华阜康/SPF/繁殖料,4:华阜康/SPF/维持料,5:5C02鼠料,6:5CG4C,7:5C02C,8:5001和9:科澳清洁繁殖料。其中,6、7和8为国外饲料。

1.2 大豆异黄酮提取和检测

大豆异黄酮的12种组分可分为黄豆苷类、染料木苷类、黄豆黄素苷类3类,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^[23]。分别是:黄豆苷元(daidzein, DE)、黄豆苷(daidzin, D)、乙酰基黄豆苷(acetyldaidzin,

AD)、丙二酰基黄豆苷(malonyldaidzin, MD)、染料木素(genistein, GE)、染料木苷(genistin, G)、乙酰基染料木苷(acetylgenistin, AG)、丙二酰基染料木苷(malonylgenistin, MG)、黄豆黄素(glycitein, GLE)、黄豆黄苷(glycitin, GL)、乙酰基黄豆黄苷(acetylglycitin, AGL)和丙二酰基黄豆黄苷(malonylglycitin, MGL)。

1.2.1 异黄酮提取 每种饲料设置3重复,每个重复随机选取20 g,在旋风磨(Retsch ZM100Φ=1.0 mm, Rheinische, Germany)中磨粉,准确称取100 mg饲料粉放入带有螺帽的有机玻璃试管中,加入5 mL含0.1% (V/V)乙酸的70% (V/V)乙醇水溶液,在室温下震荡提取12 h, 5 000 r·min⁻¹,离心10 min,上清液通过0.2 μm滤膜过滤,4℃冰箱保存备用。

1.2.2 异黄酮含量检测 采用Agilent 1100高效液相色谱仪,手动进样,进样量为10 μL。色谱柱:YMC-Pack, ODS-AM-303, 250 mm×4.6 mm I. D., S-5 μm, 120 Å;柱温:35℃;流动相A为含0.1% (V/V)乙酸的超纯水,B为含0.1% (V/V)乙酸的乙腈水溶液;梯度洗脱:梯度范围为13%~35%;运行时间:70 min;流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:260 nm。

1.3 数据分析

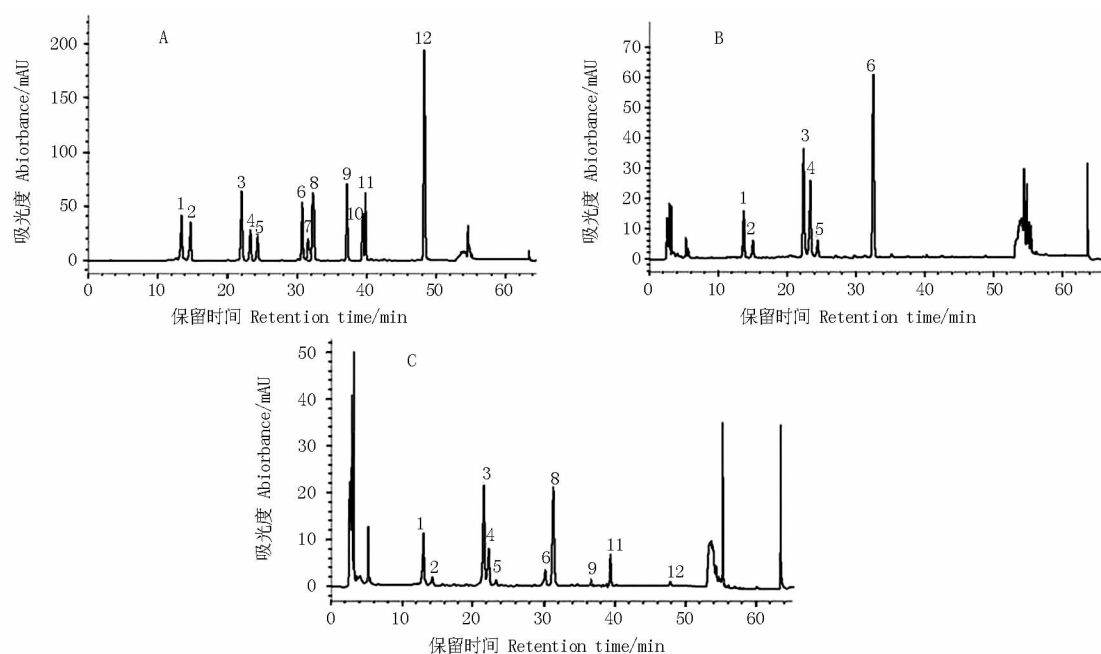
大豆异黄酮12种组分标准品均为色谱级试剂,进行等量混合制成混合标准样品备用。根据12种异黄酮标准样品的保留时间和最大吸收光谱进行定性,以黄豆苷在260 nm波长的紫外吸收值为基础,参照Sun等^[24]的方法计算样品中各组分含量。

利用SAS 9.1软件的PROC ANOVA程序对异黄酮各组分含量在品种和重复之间进行方差显著性分析。

2 结果与分析

2.1 异黄酮各组分的HPLC图谱分析

异黄酮12种组分的洗脱先后顺序如图1A所示。以大豆籽粒为样品,在同等条件下检测其异黄酮含量,结果表明大豆籽粒中主要有6种组分,分别是D、GL、G、MD、MGL和MG(图1B)。在9种饲料中,除检测到大豆籽粒中6种主要组分外,AG也被检测到,且含量较高。此外,AD、DE和GE虽然含量较少,但也均被检测到(图1C)。通过3个检测图谱可以看到,饲料中大豆异黄酮的各组分与标准样品的保留时间和峰型完全一致。



A:大豆异黄酮 12 种标准样品;B:大豆籽粒样品;C:饲料样品

A:12 standard samples of isoflavone;B:Soybean seeds;C:Feed samples

1:D;2:GL;3:G;4:MD;5:MGL;6:AD;7:AGL;8:MG;9:DE;10:GLE;11:AG;12:GE

图 1 大豆异黄酮的 HPLC 检测图谱

Fig.1 The HPLC chromatogram of soybean isoflavone components

2.2 饲料样品中大豆异黄酮组分含量分析

从图 2 中可以看出,除了 AGL 外,其他异黄酮组分均被检测到,且不同饲料样品的异黄酮组分含量变化较大。9 种饲料除 5CG4C 外,均检测到 MGL。虽然 GLE 含量较少,但在饲料 5001 中仍被检测到,这说明该饲料较其他饲料相比可能具有独特的生理功能。总体而言,9 种饲料中的丙二酰基葡

萄糖苷型组分含量相对较少,相应的游离型甙元组分的含量比例有所上升,这可能是由于在饲料制作过程中高温环境使丙二酰基葡萄糖苷型组分分解成游离型组分所致。在 9 种饲料中,饲料 5C02 鼠料和 5CG4C 两种饲料的异黄酮总含量较低,饲料 5001 的异黄酮总含量较高,这可能由于饲料所选原料大豆、豆粕的品种不同所致。

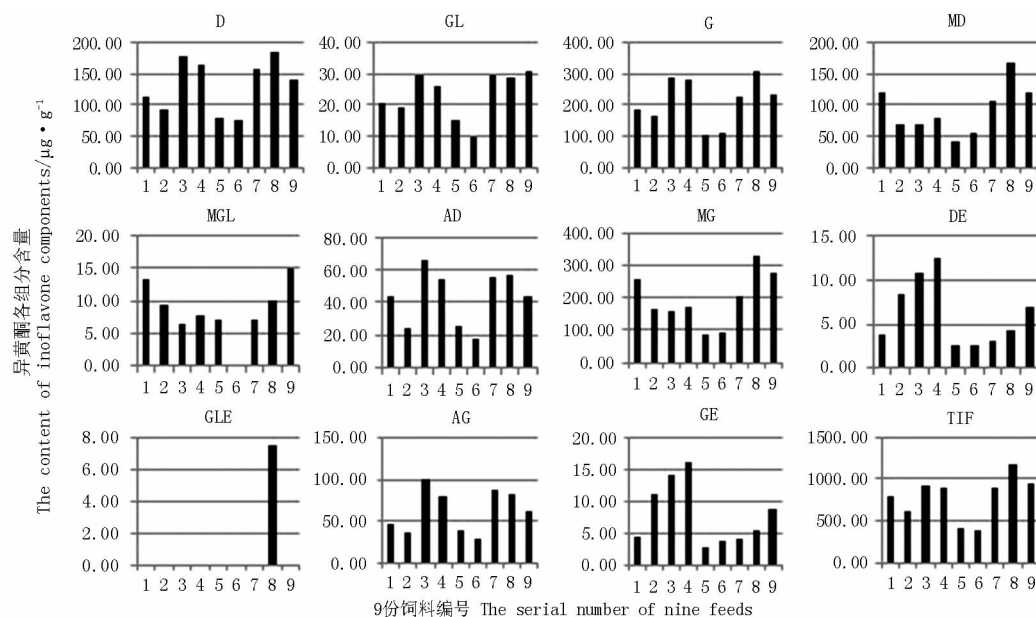


图 2 9 种饲料样品的异黄酮组分含量分布图

Fig.2 Distribution of isoflavone components content in nine feeds

2.3 饲料中大豆异黄酮含量检测方法的分析与验证

采用 HPLC 法可以检测到饲料中除 AGL 外其他所有大豆异黄酮组分,并且各组分与标准样品的保留时间和峰型完全一致(图 1),说明该检测方法是有效、准确的。由表 1 可知,除了饲料 5CG4C 中没有检测到 MGL 外,其他组分在不同饲料间均存在

极显著差异。表明不同饲料由于饲用配方和目的不同导致大豆异黄酮各组分变化较大。经过多份样品的多重复检测,发现所有饲料样品的异黄酮组分含量在重复间差异不显著,再一次验证所采用的 HPLC 方法是有效和准确的,可以准确快速地检测饲料样品中的异黄酮组分含量。

表 1 饲料样品中异黄酮各组分含量的方差分析
Table 1 Variance analysis of the isoflavone components in feeds

异黄酮组分 Isoflavone component	样品 Samples				变异来源 Variable source			
	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P > F	重复 Repeat			
					自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P > F
黄豆苷 D	8	5553.44	113.74	<0.0001	2	16.74	0.34	0.715
黄豆黄苷 GL	8	172.86	9.22	0.0001	2	14.42	0.77	0.480
染料木苷 G	8	17383.78	194.82	<0.0001	2	3.77	0.04	0.959
丙二酰基黄豆苷 MD	8	4612.95	127.39	<0.0001	2	5.08	0.14	0.870
丙二酰基黄豆黄苷 MGL	7	29.73	5.28	0.004	2	5.08	0.90	0.428
丙二酰基染料木苷 MG	8	873.30	31.37	<0.0001	2	24.31	0.87	0.437
异黄酮总含量 TIF	8	19973.41	164.93	<0.0001	2	16.61	0.14	0.873
大豆黄素 DE	8	42.46	338.38	<0.0001	2	0.05	0.40	0.674
黄豆黄素 GLE	8	1998.75	421.24	<0.0001	2	0.50	0.10	0.901
染料木素 GE	8	71.75	639.76	<0.0001	2	0.02	0.19	0.825
甾元总量 TIFA	8	208327.19	190.33	<0.0001	2	70.28	0.06	0.938

3 讨 论

杨华明等^[21]以糖肽酮萜素而非饲料为研究材料,检测到 D、DE、G 和 GE 共 4 种异黄酮组分,其研究中没有设置重复,检测方法的准确性有待验证。阮洪生等^[21]采用连续进样的方法,只检测到豆粕中 DE 和 GE 的含量。因此前人的研究结果只检测到个别异黄酮组分,这可能是由于采用高温提取使得丙二酰基型组分降解或者检测方法的不同所致。本文以 9 份市售的国内外主要商业品牌饲料为研究材料,采用常温提取以确保各组分不被降解,以含 0.1% (V/V) 乙酸的乙腈水溶液作为流动相,进行 13% ~ 35% 的线性梯度洗脱,检测到除 AGL 外的所有异黄酮组分。另外,9 份饲料样品在重复间均差异不显著,说明该检测方法较为准确。

大豆作为动物饲料的主要添加成分,不仅蛋白质和油份含量高,并且含有一些有益的生物活性成分,如大豆磷脂具有动物促生长、调解生理功能、增强细胞活力的作用^[25-27],大豆异黄酮具有增强动物机体免疫力、提高动物繁殖能力和分泌能力以及促进动物生长等生理作用^[5-17]。大豆籽粒中主要含有 6 种异黄酮组分,且以丙二酰基葡萄糖苷型组分为主,而饲料中的丙二酰基葡萄糖苷型异黄酮组分含量相对较少,相应的游离型组分的含量比例有所上

升,推测这可能是由于饲料在加工过程中经过高温处理使丙二酰基型异黄酮组分降解为相应的游离型组分所致^[23]。此外,饲料中的 AG 含量较高,其在高温环境下却没有被降解,说明乙酰基型异黄酮组分具有较强的耐高温能力。异黄酮组分 AGL 在所有饲料样品中均未检测到,这可能与大豆本身 AGL 含量极低有关。

在检测的所有饲料样品中,5C02 鼠料和 5CG4C 的异黄酮总含量较低,而 5001 的异黄酮总含量较高,这可能是由于不同饲料所选用的原料大豆品种或豆粕的来源不同所致。由于大豆异黄酮的提取与合成成本相对较高,如果采用异黄酮含量较高的大豆品种作为饲料的主要原料,可以相应地降低异黄酮添加剂的成本。因此,在禽畜生产中,可以根据禽畜在不同生育阶段对异黄酮添加剂的不同反应,采取有针对性的措施和配方加以科学使用,以使异黄酮的生物学作用达到最理想的效果。本文的 HPLC 快速检测方法可以为解决异黄酮作为饲料添加剂的使用剂量问题提供契机,同时为指导畜禽饲料生产提供方法。

参考文献

[1] Messins M, Barnes S. The role of soy products in reducing cancer risk [J]. Journal of the National Cancer Institute, 1991, 83: 541-546.

- [2] Coward L, Barnes N C, Setchell K D R. Genistein, daidzein, and their-glycoside conjugates; antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41: 1961-1967.
- [3] Ma D F, Qin L Q, Wang P Y, et al. Soy isoflavone intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women; Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Clinical Nutrition, 2008, 27(1): 57-64.
- [4] Nagata C. Factors to consider in the association between soy isoflavone intake and breast cancer risk [J]. Journal of Epidemiology, 2010, 20(2): 83-89.
- [5] 张响英, 王根林, 唐现文. 异黄酮植物雌激素在动物中的作用 [J]. 饲料研究, 2000(11): 12-14. (Zhang X Y, Wang G L, Tang X W. Effects of isoflavonic phytoestrogen on animals [J]. Feed Research, 2000(11): 12-14.)
- [6] 屈健. 异黄酮类化合物的生物学功能及其在养殖业中的应用 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2002(7): 18-20. (Qu J. The biological function and application of isoflavone compounds in aquaculture industry [J]. Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives, 2002(7): 18-20.)
- [7] 亢守亭, 车向荣, 高俊杰, 等. 植物雌激素在畜牧生产中的研究 [J]. 饲料工业, 2004, 25(3): 31-34. (Kang S T, Che X R, Gao J J, et al. Research in animal production of phytoestrogen [J]. Feed Industry, 2004, 25(3): 31-34.)
- [8] Setchell K D R, Cassidy A. Dietary isoflavones; Biological effects and relevance to human health [J]. Nutrition, 1999, 129: 758-767.
- [9] 张荣庆, 韩正康. 异黄酮植物雌激素对小鼠免疫功能的影响 [J]. 南京农业大学学报, 1993(2): 64-68. (Zhang R Q, Han Z K. Effects of isoflavonic phytoestrogen on immune function in mice [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1993(2): 64-68.)
- [10] 张荣庆, 韩正康. 黄酮类化合物对小鼠免疫功能和血中 β -内啡肽水平的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 1994, 10(2): 91-92. (Effects of flavonoids on peptide levels of β -endorphin in the blood and immune function in mice [J]. Journal of Chinese Immunology, 1994, 10(2): 91-92.)
- [11] Messina M, Gardner C, Barnes S. Gaining insight into the health effects of soy but a long way still to go; Commentary on the fourth international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease [J]. Journal of Nutrition, 2002, 132: 547-551.
- [12] 薛竹风. 大豆黄酮对肥育猪生产性能和猪体外形的影响 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2000(5): 24. (Xue Z F. Effects of daidzein on finishing pigs and pig body shape [J]. Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives, 2000(5): 24.)
- [13] 刘燕强, 韩正康. 异黄酮植物雌激素-大豆黄酮对产蛋鸡生产性能及其血液中几种激素水平的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 1998, 34(3): 9-10. (Liu Y Q, Han Z K. Effect of isoflavone phytoestrogens-daidzein on performance and blood hormone levels in laying hens [J]. Journal of Chinese Animal Science, 1998, 34(3): 9-10.)
- [14] 周玉传, 赵茹茜, 卢立志, 等. 大豆黄酮的产蛋后期绍兴鸭生产性能及血清中一些激素水平的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(1): 73-76. (Zhou Y C, Zhao R Q, Lu L Z, et al. Effect of daidzein on egg laying performance and hormone levels in serum of Shaoxing ducks during the late stage of egg production cycle [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2002, 25(1): 73-76.)
- [15] 刘根桃, 陈杰, 韩正康. 异黄酮植物雌激素 (IFV-D) 对哺乳母猪作用的研究 [J]. 畜牧与兽医, 1997, 29(1): 5-7. (Liu G T, Chen J, Han Z K. Effects of isoflavonic phytoestrogen daidzein to lactating sows [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 1997, 29(1): 5-7.)
- [16] 刘根桃, 郑元林, 陈伟华, 等. 妊娠后期母猪饲喂大豆异黄酮对泌乳性能及初乳中激素水平的影响 [J]. 南京农业大学学报, 1998, 22(1): 69-72. (Liu G T, Zheng Y L, Chen W H, et al. Effect of daidzein fed to pregnant sows on milk production and the levels of hormones in colostrum [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1998, 22(1): 69-72.)
- [17] 郭慧君, 韩正康, 王国杰. 日粮添加大豆黄酮对去势仔猪生长性能及有关内分泌的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 1994, 19(3): 4-7. (Guo H J, Han Z K, Wang G J. Effect of diet supplemented with isoflavone on the growth performance and related endocrine of castrated piglets [J]. Journal of Chinese Animal Science, 1994, 19(3): 4-7.)
- [18] Vanttinen K, Mocavcova J. Phytoestrogen in soy foods determination of daidzein and genistein by capillary electrophoresis [J]. Czech Journal of Food Science, 1999, 17(2): 61-67.
- [19] 鞠兴荣, 袁健, 汪海峰. 三波长紫外分光光度法测定大豆异黄酮的研究 [J]. 食品科学, 2001, 22(5): 46. (Jin X R, Yuan J, Wang H F. Determination of soybean isoflavones by three wavelength ultraviolet spectrophotometry [J]. Food Science, 2001, 22(5): 46.)
- [20] 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. (Sun J M, Ding A L, Dong H R. High performance liquid chromatographic determination of isoflavone content in soybean test samples [J]. Soybean Science, 2000, 19(1): 15-20.)
- [21] 杨华明, 祁宏伟, 于秀芳, 等. 高效液相色谱法测定饲料中大豆异黄酮 [J]. 中国饲料, 2006(18): 33-34. (Yang H M, Qi H W, Yu X F, et al. Determination of soybean isoflavones in feed by HPLC [J]. Chinese Feed, 2006(18): 33-34.)
- [22] 阮洪生, 葛文中, 安红波. 高效液相色谱法测定豆粕中染料木素和大豆苷元的含量 [J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 361-363. (Ruan H S, Ge W Z, An H B. Determination of genistein and daidzein in soybean residue by HPLC [J]. Soybean Science, 2006, 25(4): 361-363.)
- [23] Kudou S, Fleury Y, Welti D, et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds [Glycine max (L.) Merrill] [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(9): 2227-2233.
- [24] Sun J M, Sun B L, Han F X, et al. Rapid HPLC method for determination of 12 isoflavone components in soybean seeds [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(1): 70-77.
- [25] 王晓刚, 张云海. 磷脂添加在生长肥育猪饲料中的效果 [J]. 饲料与畜牧, 2002(2): 13-14. (Wang X G, Zhang H Y. Effect of phospholipid additive in growing-finishing pig feed [J]. Feed and Animal Husbandry, 2002(2): 13-14.)
- [26] 杨亚丽. 大豆磷脂营养功能及在动物生产中的应用 [J]. 中国饲料, 2008(20): 27-29. (Yang Y L. The physiological function of soybean phospholipids and the application in animal production [J]. Chinese Feed, 2008(20): 27-29.)
- [27] 廖志勇, 王远孝, 王恬. 大豆磷脂的生理功能及其在动物饲料中的应用研究进展 [J]. 家禽生态学报, 2010, 31(4): 92-95. (Liao Z Y, Wang Y X, Wang T. Progress of the physiological function of soybean phospholipid and application in animal feed [J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2010, 31(4): 92-95.)