

豆浆中水溶性大豆异黄酮检测方法的建立

李怡然^{1,2}, 赵丽芹², 李爱科¹, 刘 珊¹, 负婷婷¹, 陈海旭^{1,2}, 綦文涛¹

(1. 国家粮食局科学研究院, 北京 100037; 2. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:对4种大豆异黄酮(大豆甙、染料木甙、大豆苷元和染料木素)的高效液相检测程序进行了优化,并结合超高速离心技术,进行了不同豆浆中水溶性大豆异黄酮的含量分析。结果表明:采用C18色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm),流动相A为含0.1% (V/V)乙酸水溶液,流动相B为含0.1% (V/V)乙酸甲醇溶液,进行梯度洗脱,流速为0.8 mL·min⁻¹,检测波长为260 nm,豆浆中的4种异黄酮组分能得到很好的分离,大豆甙、染料木甙、大豆苷元、染料木素的相关系数(R^2)分别是0.999 2, 0.999 1, 0.999 3和0.999 4,线性良好。通过豆浆产品的检测分析发现,不同类型豆浆中水溶性异黄酮含量差异较明显,自制豆浆中的水溶性异黄酮含量显著高于常见市售豆浆。

关键词:高效液相色谱;大豆异黄酮;豆浆

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.03.0429

Construction of Detection Method for Water-soluble Isoflavone Content in Soybean Milk

LI Yi-ran^{1,2}, ZHAO Li-qin², LI Ai-ke¹, LIU Shan¹, YUN Ting-ting¹, CHEN Hai-xu^{1,2}, QI Wen-tao¹

(1. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China; 2. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: The method for the detection of isoflavone in soybean milks by the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was optimized. And ultra high-speed centrifugation was used for the determination of water-soluble isoflavone contents including Daidzin, Genistin, Daidein and Genistein. The result showed that under the conditions of a C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), mobile phase A containing 0.1% (V/V) acetic acid in ultrapure aqueous, mobile phase B containing 0.1% (V/V) acetic acid in methanol, a gradient mobile phase at 260 nm, a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, the four different kinds of isoflavones in soybean milk could be well separated and detected which good linearities with the correlation coefficient of daidzin, genistin, daidein, genistein were 0.999 2, 0.999 1, 0.999 3 and 0.999 4, respectively. The result also showed that there were significant differences among the four kinds of isoflavone contents in different types of soymilk product. Furthermore, homemade soymilk has a significantly higher isoflavone content than common commercially soymilk. The method constructed can be used for the fast and accurate detection of isoflavone in different kinds of soybean milk.

Key words: HPLC; Isoflavone; Soybean milk

大豆异黄酮(Isoflavone)是一种弱的植物雌性激素,结构与雌激素相似,能够与雌激素结合表现出雌激素活性和抗雌激素活性^[1]。大豆异黄酮还是强力的抗氧化物,能够降低自由基对于低密度脂蛋白的氧化,降低低密度脂蛋白——胆固醇在动脉中沉积,减少动脉硬化的风险^[2]。近年来大豆异黄酮被确定为抗肿瘤作用的功能因子,具有预防和治疗乳腺癌、结肠癌、皮肤癌、骨质疏松症、妇女更年期综合征的功效^[3]。此外,大豆异黄酮还可提高机体免疫功能,降低心血管疾病和冠心病的发生,因此,异黄酮及其相关产品的开发已经成为研究热点之一。目前发现的异黄酮类物质有12种,包括3种游离型异黄酮苷元(Aglycon)和9种结合型糖苷(Glycosides)^[4],其中大豆甙、染料木甙、大豆苷元、

染料木素在豆制品中含量较高。天然大豆异黄酮的水溶性较低,然而,经不同加工过程得到的大豆食品,其含有的异黄酮的种类和数量通常都会发生变化,从而改善功能活性成分的水溶性。植物中富含的生物活性物质通常水溶性越好,越容易被人体吸收,从而发挥其特有功效。因此不同加工途径得到的大豆食品,其对人体健康所发挥的功效也不相同。

豆浆作为中国人喜食的豆制品,富含蛋白质和钙、铁、磷、锌等几十种矿物质以及维生素A、维生素B等多种维生素。豆浆中蛋白质的含量比牛奶的还要高,另外豆浆中还含有卵磷脂、大豆皂甙、大豆异黄酮等有防癌健脑意义的特殊保健因子。近年来我国政府提出了一系列政策和措施以促进大豆和豆制品的生产及推广。特别是“国家大豆行动计

收稿日期:2013-11-26

基金项目:中央级事业单位公益性专项课题(ZX1214)。

第一作者简介:李怡然(1989-),女,在读硕士,主要从事食品工程研究。E-mail:liyiran0325@163.com。

通讯作者:綦文涛(1977-),男,博士,副研究员,主要从事分子营养学研究。E-mail:qwt@chinagrains.org。

划”和“学生饮用豆奶工程”的实施,对我国大豆和大豆制品的生产与利用起到了积极的作用^[5]。我国居民饮用豆浆方式主要有家庭自磨豆浆及市售豆浆粉冲制等。

目前关于不同豆制品中异黄酮定性定量等问题的研究已有很多,但关于豆浆中水溶性异黄酮含量测定还不多见。为此在大豆异黄酮国标测定的基础上,对豆浆中4种组分大豆异黄酮(大豆甙、染料木甙、大豆苷元和染料木素)的检测方法进行了优化,并测定分析了几种常见消费模式和种类的豆浆中的水溶性异黄酮的含量情况,以期为更深入研究豆浆的合理加工和消费提供基础数据和理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因大豆、市售非转基因大豆、市售3种品牌豆浆粉。

E2695 高效液相色谱,Empower 2 色谱工作站,紫外检测器(美国 Watters 公司);FA2004A 型分析天平($d=0.001\text{ g}$)(METTLER TOLEDO 公司);Mini Spain 离心机(美国 Eppendorf 公司);JYDZ-35 豆浆机(九阳股份有限公司);Milli-Q50 处理器(Millipore 公司)。

甲醇(HPLC 级,Dikma 公司);乙酸(分析纯,北京化工试剂)。

大豆异黄酮标准品:染料木素(Genistein)、染料木甙(Genistin)、大豆苷元(Daidein)、大豆甙(Daidzin),纯度 $\geq 98\%$,均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 标准储备液的配制 大豆异黄酮标准储备液配制:分别称取5 mg 大豆甙、染料木甙、大豆苷元、染料木素标准品,分别用60% 甲醇配成浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准储备液。

1.2.2 样品的制备 称取大豆80 g,溶于1 000 mL 100℃ 水中,用九阳豆浆机粉碎研磨30 min 后制成豆浆,终浓度为 $0.07\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$;称取豆浆粉0.7 g,加入10 mL 100℃ 水,充分溶解。液体豆浆以 $14\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心40 min,取上清液经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤。用HPLC 分析其中水溶性异黄酮的含量。

1.2.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent C18($150\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}, 5.0\text{ }\mu\text{m}$);分别测定了254,256 和260 nm 波长下的检测效果,并分别对甲醇-水,甲醇-0.1% 乙酸,0.1% 乙酸甲醇-0.1% 乙酸3 种流动相体系下的分离效果进行了对比实验。洗脱过程采用梯度洗脱法,洗脱程序见表1,流速为 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进

样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$;柱温为室温。连续进样6 次,平行试验5 次,确定梯度洗脱程序。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient mobile phase of the program

时间 Time/min	流动相 A Mobile phase A/%	流动相 B Mobile phase B/%
0	50	50
6	55	45
10	75	25
12	75	25
15	50	50

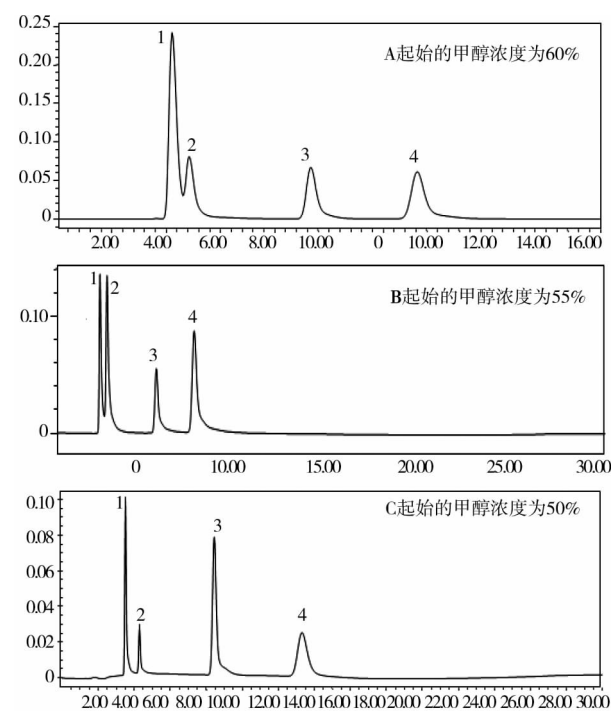
1.3 数据处理

数据处理采用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 统计软件进行处理,各组间均数差异性比较采用的是 One-Way ANOVA 方法。豆浆水溶性异黄酮含量分析采用的是 Waters 公司 Empower 2 色谱工作站,测定出目标峰峰面积之后,带入标准曲线计算其含量。

2 结果与分析

2.1 HPLC 测定大豆异黄酮色谱条件的优化

2.1.1 大豆异黄酮 HPLC 检测方法的有效性 由图1 看出,以0.1% 乙酸甲醇-0.1% 乙酸为流动相,在260 nm 紫外波长下进行检测,起始有机相浓度越



1:大豆甙;2:染料木甙;3:大豆苷元;4:染料木素。

1: Daidzin; 2: Genistin; 3: Daidein; 4: Genistein.

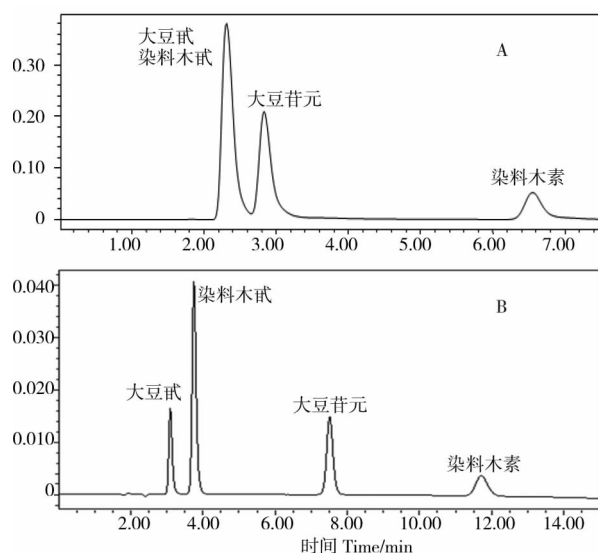
图1 不同起始浓度下液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of different mobile phase

低,大豆甙和染料木甙分离效果越好,通过改变流动相比比例发现,当起始甲醇浓度为 50% 时,大豆甙和染料木甙达到了良好的基线分离,4 种异黄酮能够完全分离,且具有较好的谱峰形态。

由图 2 看出,采用 0.1% 乙酸甲醇-0.1% 乙酸为流动相,在 260 nm 紫外波长下进行检测,等度洗脱时,大豆甙和染料木甙峰型重叠,无法分开,且整个洗脱过程在 7 min 内完成,但出峰时间太早,不利于样品物质的分离;因此采用梯度洗脱,以 0.1% 乙酸甲醇-0.1% 乙酸为流动相,在 260 nm 的紫外波长检测下,4 种大豆异黄酮准品均得到了有效分离,且峰型尖锐无拖尾。出峰时间(Retention Time, RT)分别为大豆甙:3.033 min,染料木甙:3.783 min,大豆苷元:7.511 min,染料木素:11.711 min,整个分析过程可在 15 min 内完成。

2.1.2 线性关系的考察 HPLC 法测定不同浓度的标准品液,以峰面积(A, AU·s⁻¹)为横坐标,浓度(C, μg·mL⁻¹)为纵作标绘制标准曲线。对所得数据进行线性回归,分别得到大豆甙、染料木甙、大豆苷元和染料木素方程详见图 3。

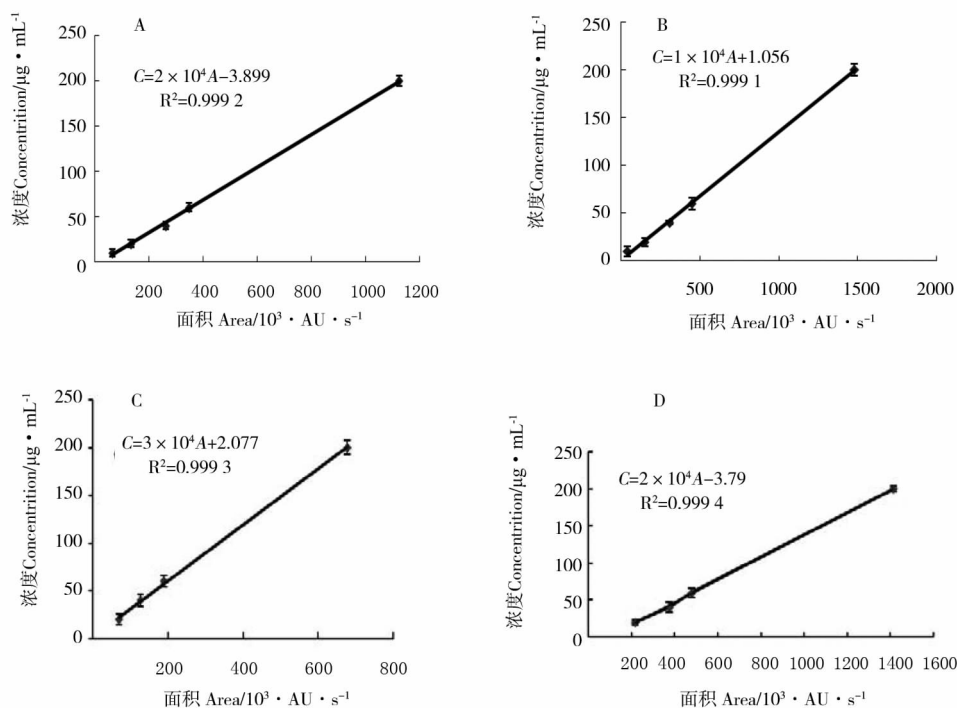


A: 等度洗脱; B: 梯度洗脱。

A: Gradient elution; B: Isocratic elution.

图 2 梯度洗脱和等度洗脱的对照品色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference substances by gradient elution and isocratic elution



A: 大豆甙; B: 染料木甙; C: 大豆苷元; D: 染料木素。

A: Daidzin; B: Genistein; C: Daidzein; D: Genistein.

图 3 大豆异黄酮 HPLC 法检测的标准曲线图

Fig. 3 Standard curves of isoflavone by HPLC

进一步分析表明,大豆甙、染料木甙的检测范围为 10.00 ~ 200.00 μg·mL⁻¹,大豆苷元、染料木素的检测范围为 20.00 ~ 200.00 μg·mL⁻¹,且检测范围内线性良好。

2.2 检验方法的验证

2.2.1 精密度实验 取 200 μg·mL⁻¹ 的标准品液连续进样 6 次,测定峰面积,大豆甙、染料木甙、大豆苷元、染料木素的 RSD 值分别为 0.73%、0.86%、

1. 15% 和 0.72% ($n=6$), 表明机器精密度良好。
- 2.2.2 重现性实验 取同一供试样品, 平行处理 5 次, 在上述色谱条件下各进样 10 μL , 以测得的峰面积 ($A, \text{AU} \cdot \text{s}^{-1}$) 为指示标, 相对标准偏差 RSD 为 0.89% ($n=5$), 说明在该条件下结果重现性好, 方法可靠。
- 2.2.3 加样回收率实验 精确吸取 5 份已知浓度的样品各 1 mL, 分别加入 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准品溶

液 1 mL, 用 60% 甲醇定容, 按 1.4 的色谱条件进行分析, 每个样品平行进样 3 次, 测定峰面积, 计算平均值, 根据外标曲线计算加样回收率, 加样回收率 (%) = $[(\text{测得浓度} - \text{本底浓度}) / \text{加标量}] \times 100$ 。测定的大豆甙、染料木甙、大豆苷元、染料木素的回收率分别为 94.430%、96.276%、101.050%、94.288% ($n=5$) (表 2)。

表 2 大豆异黄酮加样回收率的测定结果

Table 2 Determination results of soybean isoflavones recovery

组分 Constituent	检测次数 No.	样品含量 Sample content/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	加入量 Amount/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得量 Measure/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率 Recoveries/%	相对标准偏差 $RSD/\%$ ($n=5$)
大豆甙 Daidzin	1	610.50	20	629.934	97.170	0.17
	2	470.59	20	489.888	96.490	0.36
	3	180.71	20	199.510	94.000	0.13
	4	181.05	20	200.012	94.810	0.78
	5	251.44	20	269.376	89.680	0.52
染料木甙 Genistin	1	500.12	20	521.204	105.420	1.69
	2	436.38	20	455.672	96.460	1.06
	3	123.89	20	141.456	87.830	1.53
	4	120.78	20	139.242	92.310	1.75
	5	197.68	20	217.552	99.360	0.31
大豆苷元 Daidzein	1	21.47	20	43.476	110.030	0.48
	2	16.96	20	36.088	95.640	0.64
	3	3.24	20	23.326	100.430	0.85
	4	2.08	20	22.066	99.930	0.40
	5	6.11	20	25.954	99.220	0.71
染料木素 Genistein	1	—	20	17.984	89.920	0.66
	2	—	20	19.926	99.630	0.78
	3	—	20	18.890	94.450	0.44
	4	—	20	18.556	92.780	1.79
	5	—	20	18.932	94.660	0.24

2.3 不同加工方式豆浆中水溶性异黄酮含量的比较分析

由表 3 可见, 样品中异黄酮的含量主要是糖苷的含量, 且不同类型豆浆产品水溶性异黄酮含量差

异较大, 非转基因自磨豆浆水溶性物质中大豆异黄酮含量 ($1174.79 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 高于转基因自磨豆浆 ($923.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 自磨豆浆中的异黄酮含量显著高于市售豆浆粉。

表 3 不同豆浆水溶性大豆异黄酮含量分析

Table 3 Analysis of water-soluble isoflavone content among different kinds of soybean milk ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

样品 Sample	大豆甙 Daidzin	染料木甙 Genistin	大豆苷元 Daidzein	染料木素 Genistein	总异黄酮含量 Total isoflavone
非转基因大豆自制豆浆 Homemade soymilk by non-genetically modified soybeans	615.61 a	507.85 a	24.40 a	0.53 a	1174.79 a
转基因大豆自制豆浆 Homemade soymilk by genetically modified soybeans	473.39 b	417.68 b	22.63 b	0.47 b	923.89 b
市售品牌 1 Common commercially soymilk1	185.10 c	132.85 c	9.10 c	ND	328.22 c
市售品牌 2 Common commercially soymilk2	184.18 c	127.02 c	6.47 c	ND	317.67 c
市售品牌 3 Common commercially soymilk3	247.50 d	191.68 d	15.69 d	0.18 c	453.24 d

同列不同小写字母代表 0.05 水平差异显著。

Different lowercase letter in the same line indicate significant difference at 0.05 probability level.

3 结论与讨论

大豆中异黄酮含量在千分之几,其中易被人体吸收的活性功能成分是游离型苷元,仅占大豆异黄酮的2%~3%,其余的糖苷占97%~98%,但不易被人体吸收利用^[6-7]。本研究结果看出,几种不同类型豆浆由于加工方式及来源的不同,其水溶性物质中异黄酮含量也存在显著差异,水溶性糖苷型异黄酮含量占水溶性异黄酮总量的95%以上。这与文献报道的大豆中异黄酮极少以苷元形式存在,大部分以糖苷的形式存在是一致的。天然异黄酮主要以糖苷的形式存在这一事实也体现在豆浆产品水溶性物质中。

韩慧等^[8]研究发现,加热使大豆异黄酮苷元、糖苷的含量和比例发生改变,具有活性功能的游离型苷元(黄豆苷元和染料木素)含量增加,所占比例增大。Eisen和Grun等^[9-10]研究发现,染料木甙和黄豆甙在高温下将产生热降解,在豆浆的生产储藏过程中,环境温度的升高将直接导致染料木甙和黄豆甙的降解。在豆浆高温的生产条件下,糖苷型的异黄酮极易发生水解而转变成为苷元^[11]。因此,推测自磨豆浆中的苷元型异黄酮含量高于市售的3种豆浆,其原因可能是市售豆浆的生产经历了更多的高温加工,从而导致大豆黄素和染料木素的降解多,造成了苷元的损失。

本研究确定利用高效液相色谱仪同时检测豆浆中4种异黄酮的最佳色谱条件为:流动相A为含0.1%(V/V)乙酸水溶液,流动相B为含0.1%(V/V)乙酸甲醇溶液,采用梯度洗脱,洗脱程序为:0~6 min,B 50%~45%;6~10 min,B 45%~25%;10~12 min,B 25%;12~15 min,B 25%~50%;体积流量:0.8 mL·min⁻¹;进样量:10 μL;检测波长:260 nm;柱温:室温。该方法与目前已有报道检测方法相比,其精度和分离效率都得到了极大提高,且显著缩短了检测时间,此外实验所用甲醇,其毒性小于乙腈,价格比乙腈便宜,这进一步提高了检测方法的安全性、经济性和适应性。

通过对不同类型豆浆的检测发现,几种不同类型豆浆水溶性物质中异黄酮含量差异显著,自磨豆浆中的水溶性异黄酮含量明显高于市售豆浆,在5种不同类型豆浆中有两种类型的豆浆中未能检测出染料木素,其他3种豆浆检测出的染料木素含量较低。

转基因大豆自磨豆浆中同样具有较高的异黄酮含量,但本研究中的数据不能明确转基因大豆所含外源基因所存在的潜在安全性问题,因此,不能作为转基因大豆在自磨豆浆中推广使用的依据。

参考文献

- [1] Messina M, Hughes C. Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplements for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flush frequency[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2003, 6(1):1-11.
- [2] Lichtenstein A H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk [J]. *The Journal of Nutrition*, 1998, 128 (10): 1589-1592.
- [3] Kjeld Hermansen M D, Hoie L H. Effects of soy and other natural products on LDL:HDL ratio and other lipid parameters: a literature review[J]. *Advances in Therapy*, 2003, 20(1):50-78.
- [4] 崔洪斌. 大豆生物活性物质的开发和应用[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2001:30-47. (Cui H B. Development and application of soy bioactive substances[J]. Beijing: China Light Industry Press, 2001:30-47.)
- [5] 林旭东, 潘巨忠, 凌建刚. 豆浆的保健功能及研究进展[J]. *现代农业科技*, 2007(24):146-149. (Lin X D, Pan J Z, Ling J G. Health functions and research progress in soymilk[J]. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2007(24):146-149.)
- [6] Murota K, Shimizu S, Miyamoto S, et al. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids[J]. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132(7):1956-1961.
- [7] Scheiber M D, Liu J H, Subbiah M T R, et al. Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women[J]. *Menopause*, 2001, 8(5):384-392.
- [8] 韩慧, 张如玲. 热处理与大豆异黄酮苷元的转化分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2010, 22(3):250-253. (Hang H, Zhang R L. Heat treated soybean and the transformation of soy isoflavone aglycone[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2010, 22(3):250-253.)
- [9] Eisen B, Ungar Y, Shimoni E. Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(8):2212-2215.
- [10] Grün I U, Adhikari A, Li C, et al. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(6):2839-2843.
- [11] 黄惠华. 豆浆热处理过程中3种大豆异黄酮苷元的热降解比较[J]. *食品科学*, 2006, 27(9):132-136. (Hang H H. Comparison study on heat-induced degradation of aglycones of soy isoflavones in soymilk[J]. *Food Science*, 2006, 27(9):132-136.)