

高效液相色谱法(HPLC)测定大豆异黄酮含量的研究

张海军, 苏连泰, 李琳, 刘雅婧, 李晓薇, 张艳, 王英, 李景文, 王庆钰

(吉林大学植物科学学院, 吉林 长春 130062)

摘要: 建立检测大豆异黄酮5种组分(染料木素、染料木苷、大豆苷元、大豆苷和黄豆苷)含量的高效液相色谱法, 并且测定了大豆各组织和不同时期胚的异黄酮含量。色谱条件: Phenomenex C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); 流动相: 甲醇-水(30:70, v/v); 流速: 1 mL · min⁻¹, 检测波长: 254 nm; 柱温: 40℃, 进样量: 10 μL。试验建立的色谱条件能使大豆异黄酮主要组分得到很好分离, 线性关系 R² 为 0.9994 ~ 0.9998, 回收率为 99.29% ~ 100.76% 且变异系数小于 3%, 适用于大豆异黄酮不同组分的检测。不同大豆品种异黄酮含量表现为: 吉林 32 > GR8836 > 吉大豆 2 号 > 平安 8 > 小黑豆 > 吉林 47 > 吉林 35 > 吉大豆 1 号; 吉林 32 各组分大豆异黄酮含量表现为: 大豆籽粒 > 60 d 胚 > 50 d 胚 > 40 d 胚 > 花 > 荚 > 20 d 胚 > 30 d 胚 > 叶 > 根 > 茎。

关键词: 大豆; 高效液相色谱法; 异黄酮含量

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)04-0672-04

Determination of Soybean Isoflavones Content by High-Performance Liquid Chromatographic Method

ZHANG Hai-jun, SU Lian-tai, LI Lin, LIU Ya-jing, LI Xiao-wei, ZHANG Yan, WANG Ying, LI Jing-wen, WANG Qing-yu

(College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China)

Abstract: The five soybean isoflavones components including Genistein, Genistin, Daidein, Daidzin and Glycitin were determined and separated by the established HPLC method, and isoflavones in different tissues and different grow stages of embryo were measured. The HPLC condition we have established: an phenomenex C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) was applied; the mobile phase was MeOH : H₂O = 30 : 70; the temperature of column was 40℃; the flow rate was 10 mL · min⁻¹; detective wavelength was set at 254 nm. The peak area of five isoflavones had a good linearity with a correlation coefficient of 0.9994-0.9998, and the recoveries of standard spiling of isoflavones were in the range of 99.29%-100.76% with RSD less than 3%. This method was suitable for determination of isoflavones in soybean and other cereal products. The isoflavone content among soybean varieties was Jilin 32 > GR8836 > Jidadou 2 > Pingan 8 > Xiaoheidou > Jilin 47 > Jilin 35 > Jidadou 2, and soybean isoflavone content of Jilin 32 was that in seeds > 60 d embryos > 50 d embryos > 40 d embryos > flowers > pods > 20 d embryos > 30 d embryos > leaves > roots > stems.

Key words: Soybean (*Glycine max*); High-performance liquid chromatographic method (HPLC); Isoflavone content

大豆异黄酮(Soybean isoflavones, 简称 ISO)是一类从大豆中分离的有效活性成分, 具有异黄酮类化合物的典型结构^[1], 包括3种游离型异黄酮苷元(Aglycon)和9种结合型糖苷(Glycosides)^[2]。大豆异黄酮近年来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、妇女更年期综合症的功效, 可提高机体免疫功能, 抗氧化、抗溶血, 抗菌消炎, 降低心血管疾病和

冠心病的发生^[3-5], 异黄酮及其相关产品的开发已经成为研究热点之一^[6]。高效的检测方法是大豆异黄酮研发的基础, 而高效液相色谱法(HPLC)能十分有效地分离大豆异黄酮^[7-9]。自然条件下异黄酮含量有限, 主要分布在豆科蝶形花亚科中, 大豆是其主要来源, 该试验初步建立测定大豆异黄酮5种组分(染料木素, 染料木苷, 大豆苷元, 大豆苷, 黄豆苷)含量的高效液相色谱法, 研究大豆不同组

收稿日期: 2011-05-13

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08004-003); 国家自然科学基金面上资助项目(30971808); 教育部新教师基金资助项目(3M2101936604); 吉林省科技发展计划重点资助项目(20080204)。

第一作者简介: 张海军(1986-), 男, 在读硕士, 研究方向为大豆分子育种。E-mail: zhanghaijun_234@163.com。

通讯作者: 王庆钰(1963-), 女, 教授, 博士, 研究方向为基因工程在育种上的应用与植物杂种优势的理论与其应用。

E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn。

织异黄酮含量差异及不同生长时期胚中异黄酮的积累规律,为深入研究大豆异黄酮含量以及大豆和豆制品的综合利用开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试仪器

高效液相色谱仪(LC-20A)(色谱系统包括:DGU-20A₃脱气机,2个LC-20AT溶剂阵列检测器,紫外检测器SPD-20AV紫外检测器,CTO-10AS柱温箱,CBM-20A系统控制器,LC-Solution工作站,7725手动进样器):日本岛津公司;KQ3200DE型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;高速粉碎机:北京中兴伟业仪器有限公司;HWS24型电热恒温水浴锅:上海一恒科技有限公司;FA2004A型分析天平。

1.2 供试试剂

甲醇(HPLC级):美国Fisher公司;甲醇(分析纯):山东禹王试剂;乙醇(分析纯):北京化工厂;娃娃哈纯净水。

大豆异黄酮标准品:染料木素(Genistein),染料木苷(Genistin),大豆苷元(Daidein),大豆苷(Daidzin),黄豆黄苷(Glycitin),纯度 $\geq 98\%$,均购自美国sigma公司。

1.3 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm);流动相:甲醇-水(30:70, v/v);流速:1 mL · min⁻¹,检测波长:254 nm;柱温:40℃,进样量:10 μL,分析时间:每份样品40~50 min。所有样品平行测定3次,求其峰面积的平均值,根据保留时间定性,根据峰面积定量,根据标准品的标准曲线计算样品中各异黄酮成分的含量。

1.4 标准品的配置

分别精密称取5种标准品各2.5 mg,用甲醇(HPLC级)定容至25 mL,配成标准品母液。分别精密吸取母液0.0625,0.125,0.25,0.50,1.00,2.00,4.00,8.00 mL定容到10 mL,摇匀备用。

1.5 前处理方法选择

根据大豆异黄酮的分子极性和相似相溶原理,分别以80%甲醇(分析纯)和80%乙醇(分析纯)提取大豆各成分;分别将提取液置于4℃和80℃水浴处理;分别把提取液置于80℃水浴处理2、4、6、8、10、12、14、16 h,定容到一定浓度,摇匀备用。

1.6 样品的制备

1.6.1 新鲜组织样品 迅速精确称取大豆品种吉林32的根、茎、叶、花、荚以及发育20、30、40、50、60 d胚各组织鲜重约0.5 g,加入80%的甲醇(分析

纯)提取液(按400 μL · 100 mg⁻¹鲜重比例)于研钵研磨至匀浆,室温静置2.5 h,混匀后转入1.5 mL离心管,置于80℃水浴14 h,12 000 g离心15 min,将上清液经0.45 μm滤膜过滤得预处理液,转入HPLC专用小瓶中封口,4℃下保存待测。

1.6.2 籽粒样品 各品种(吉林32,吉林35,小黑豆,GR8836,平安8,吉林47,吉大豆1号,吉大豆2号)随机抽取50粒大豆种子均匀粉碎后过40目筛,准确称取100 mg粉样,加入80%(v/v)的甲醇提取液4 mL,室温下静置2.5 h,置于80℃水浴14 h,12 000 g离心15 min,经0.45 μm滤膜过滤得预处理液,将上清液转入HPLC专用小瓶中封口,4℃下保存待测。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 检测波长的选择 比较了250、254和260 nm波长的检测效果,结果发现254 nm下灵敏度高,峰形良好,适宜多异黄酮成分的检测,因此选用254 nm波长检测。

2.1.2 流动相的选择 分别以甲醇:水=80:20,甲醇:水=70:30,甲醇:水=60:40,甲醇:水=50:50,甲醇:水=40:60,甲醇:水=30:70,甲醇:水=20:80作为流动相,试验结果表明甲醇:水=30:70条件下峰形尖锐,灵敏度及保留时间均较好,分离效果也较为理想,故选择甲醇:水=30:70为流动相。

2.1.3 前处理方法的选择 结果表明,80%甲醇(分析纯)提取处理的样品峰形稳定且尖锐,采用80%甲醇(分析纯)作为提取溶剂;对比分析结果发现,经80℃水浴处理后测定的异黄酮含量高且80℃水浴处理14 h的大豆异黄酮含量最高且基本保持稳定,这与宋志峰等^[8]的研究结果一致。因此决定采用80%甲醇(分析纯)提取样品置于80℃水浴处理14 h制得待测液。

2.1.4 线性关系的考察 HPLC法测定不同浓度的标准品液,分别以浓度和峰面积为横纵坐标作回归方程,得到5种标准品的标准曲线(表1)。

2.2 检验方法的验证

2.2.1 精密度试验 取某一浓度的标准品液连续进样6次,测定峰面积,大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、染料木素、大豆苷元的RSD值分别为0.89%、1.04%、1.11%、2.84%和2.05%(n=6),表明机器精密度良好。

2.2.2 重现性试验 取同一供试样品,平行处理5次,测定峰面积,大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、染料木素、大豆苷元的RSD分别是0.56%、

0.58%、0.47%、0.51%和0.63% (n=5),说明在该条件下结果重现性好,方法可靠。

表1 5种大豆异黄酮成分线性关系

Table 1 Linear relation of five soybean isoflavones

组分 Constituent	线性范围 Linear range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	标准曲线 Standard curve	R^2
大豆苷 Daidzin	0.625 ~ 80	$y = 88326x + 31694$	0.9994
黄豆黄苷 Glycitin	0.625 ~ 80	$y = 83929x + 12081$	0.9995
染料木苷 Genistin	0.625 ~ 80	$y = 97335x - 25588$	0.9998
染料木素 Genistein	0.625 ~ 80	$y = 100012x + 46643$	0.9998
大豆苷元 Daidein	0.625 ~ 80	$y = 139491x + 59875$	0.9997

2.2.3 稳定性试验 样品测定后,密封4℃保存,对某一浓度的样品每隔4 h进样一次,连续进样72 h,结果大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、染料木素、大豆苷元的日内稳定性RSD分别是0.81%、0.52%、0.31%、0.78%和0.86% (n=6);日间稳定性RSD分别是:1.88%、1.72%、2.40%、1.32%和1.56% (n=3),说明样品在24 h和48 h内稳定。

2.2.4 加样回收率试验 分别精确量取5种标准品4、5、6 mL用某一已知浓度的样品定容至10 mL,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=(测得浓度-本底浓度)/加标量 $\times 100\%$ 。由表2可知,测定的大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、染料木素、大豆苷元的回收率分别为99.81%、100.76%、100.49%、99.29%和99.67% (n=3),其RSD值分别为1.88%、1.74%、2.25%、1.83%和0.73% (n=3)。

表2 大豆异黄酮加样回收率的测定结果

Table 2 Determination results of recovery of soybean isoflavones

组分 Constituent	编号 No.	样品含量 Sample content/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	加入量 Amount/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得量 Measure/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率 Recoveries/%	平均回收率 Average recovery/%	RSD (% , n=3)
大豆苷 Daidzin	1	16.26	10.00	26.05	97.83	99.81	1.88
	2	16.26	20.00	36.27	100.02		
	3	16.26	40.00	56.89	101.57		
黄豆黄苷 Glycitin	1	7.08	10.00	16.96	98.78	100.76	1.74
	2	7.08	20.00	27.38	101.48		
	3	7.08	40.00	47.89	102.03		
染料木苷 Genistin	1	25.17	10.00	34.97	98.07	100.49	2.25
	2	25.17	20.00	45.69	102.60		
	3	25.17	40.00	65.49	100.81		
染料木素 Genistein	1	11.15	10.00	20.94	97.91	99.29	1.83
	2	11.15	20.00	30.87	98.61		
	3	11.15	40.00	51.69	101.35		
大豆苷元 Daidein	1	4.34	10.00	14.35	100.09	99.67	0.73
	2	4.34	20.00	24.36	100.09		
	3	4.34	40.00	43.87	98.83		

2.3 样品测定

按1.6方法制备供试溶液并测定,根据孙君明等的研究结果,在80℃水浴处理条件下,丙二酰基结合体的含量迅速降低,游离态的含量迅速升高,且降低与升高的量基本相同,异黄酮总含量基本保持不变^[9],且水解处理后游离型异黄酮占总量的99.7%^[10],测定的5种成分含量基本接近大豆异黄酮总量。用外标法计算样品,样品HPLC色谱图见图1,测定结果见图2。不同大豆品种异黄酮含量吉林32 > GR8836 > 吉大豆2号 > 平安8 > 小黑豆 >

吉林47 > 吉林35 > 吉大豆1号,其中吉林32和GR8836是高异黄酮含量品种^[11]。由表3可知,大豆苷和染料木苷含量占异黄酮总量90%以上,黄豆黄苷含量较少,其它组分均不能检出,说明其含量甚微。结合图2可知,吉林32各成分大豆异黄酮含量:籽粒 > 60 d 胚 > 50 d 胚 > 40 d 胚 > 花 > 荚 > 20 d 胚 > 30 d 胚 > 叶 > 根 > 茎。未成熟胚中大豆异黄酮的积累基本符合随着成长天数的增加大豆异黄酮含量逐步增加(30 d 略微降低)的规律,与董李平等^[12]的研究结果相似。

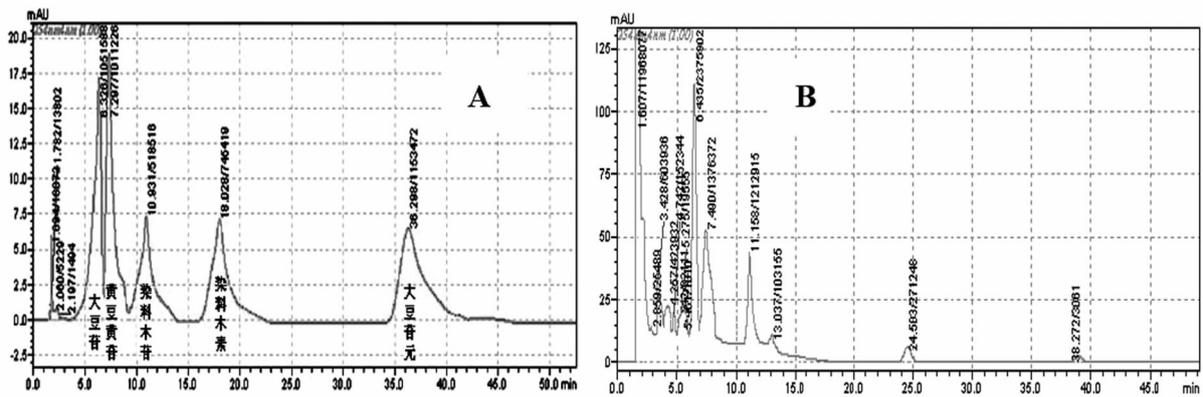


图1 大豆异黄酮标准品(A)和样品(B)图谱

Fig.1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and sample(B)

表3 不同品种大豆异黄酮含量分析

Table 3 Analysis of isoflavone content among soybean varieties($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

品种 Varieties	总异黄酮含量 Total isoflavone content	大豆苷含量 Daidzin content	黄豆苷含量 Glycitin content	染料木苷含量 Genistin content
吉林 32 Jilin 32	4.67	2.23	0.30	2.14
GR8836	4.43	2.04	0.44	1.95
吉大豆 2 号 Jidadou 2	3.88	1.77	0.36	1.75
平安 8 Pingan 8	3.48	1.49	0.34	1.65
小黑豆 Xiaohaidou	3.32	1.85	0.21	1.26
吉林 47 Jilin 47	2.98	1.39	0.12	1.47
吉林 35 Jilin 35	2.91	1.37	0.36	1.18
吉大豆 1 号 Jidadou 1	2.52	1.07	0.20	1.25

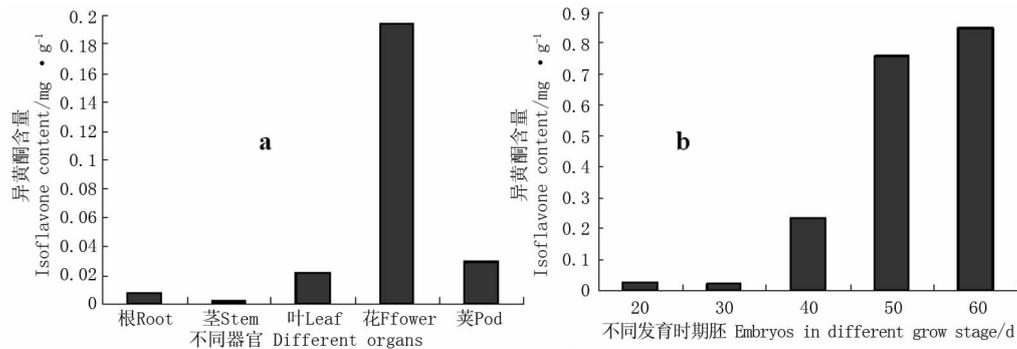


图2 吉林 32 各组分大豆异黄酮含量

Fig.2 Soybean isoflavones content of Jilin 32

3 讨论

试验优化了色谱条件,提高了分析精确度,能有效分离 5 种大豆异黄酮组分,为异黄酮开发提供有力的技术保证。以往研究多采用葡萄糖苷酶或者酸解法将结合型的糖苷降解成游离型的苷元,以提高大豆苷元、染料木素等的含量,但因成本昂贵、工艺复杂、残留物较多等原因未能得到广泛应用^[13]。该试验采用 80% 提取后 80℃ 水浴处理 14 h 的方式提取大豆异黄酮,方便快捷,异黄酮含量高且保持稳定,可用于大豆异黄酮的批量提取,籽粒样品主要水解为大豆苷,黄豆苷和染料木苷 3 种

组分,水解条件温和,得到的异黄酮组分性质稳定。

通过分析 8 种大豆品种的异黄酮及各单体组分的具体含量,可知吉林 32 和 GR8836 含量最高,分别达到 4.67 和 4.43 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,各品种中染料木苷的含量与大豆苷的含量接近,明显高于黄豆苷的含量。大豆不同组织异黄酮含量相差很大,以籽粒中含量最高^[10],茎中含量最少。该试验表明大豆胚中异黄酮含量要高于其它组织,未成熟胚中大豆异黄酮的积累基本随时间增加而增加,30 d 胚略微降低。大豆体内异黄酮的具体代谢和分布规律还有待于通过进一步研究异黄酮合成相关酶基因(如 IFS、PAL、CHS、CHI、IFR 等)的表达调控验证。

(下转第 679 页)

元素,溶样流程简单,所用试剂少,线性关系好,方法精确度高,不污染环境,同时具备多元素同时检测能力,提高了检测效率,缩短了检测时间,适合日常检验的需要。

参考文献

- [1] GB 1352-2009 大豆[S]. (GB 1352-2009 soybean[S].)
- [2] GB 5009.12-2010 食品中铅的测定[S]. (GB 5009.12-2010 Determination of lead in foods[S].)
- [3] GB/T 5009.15-2003 食品中镉的测定[S]. (GB/T 5009.15-2003 Determination of cadmium in foods[S].)
- [4] GB/T 5009.90-2003 食品中铁、镁、锰的测定[S]. (GB/T 5009.90-2003 Determination of iron, magnesium, manganese in foods[S].)
- [5] GB/T 5009.13-2003 食品中铜的测定[S]. (GB/T 5009.13-2003 Determination of copper in foods[S].)
- [6] GB/T 5009.14-2003 食品中锌的测定[S]. (GB/T 5009.14-2003 Determination of zinc in foods[S].)
- [7] GB/T 5009.16-2003 食品中锡的测定[S]. (GB/T 5009.16-2003 Determination of stannum in foods[S].)
- [8] GB/T 5009.11-2003 食品中总砷及有机砷的测定[S]. (GB/T 5009.11-2003 Determination of total arsenic and abio-arsenic in foods[S].)
- [9] GB/T 5009.17-2003 食品中总汞及有机汞的测定[S]. (GB/T 5009.17-2003 Determination of total mercury and organic-mercury in foods[S].)
- [10] 李丽华,任苏凤,刘礼彬.微波消解-AAS法测定果蔬罐头中镉、铅、铜、锌[J].理化检验-化学分册,1999,35(7):309-311. (Li L H, Ren S F, Liu L B. AAS determination of cadmium, lead, copper and zinc in canned fruits and vegetables by microwave-acid digestion[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B (Chemical Analysis), 1999, 35(7):309-310.)
- [11] 辛仁轩.等.等离子体发射光谱分析[M].北京:化学工业出版社,2004:3. (Xin R X. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry analysis[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 3.)
- [12] 邓全道,许光,林冠春,等.微波消解-耐氢氟酸系统进样电感耦合等离子体发射光谱法测定锰矿中铝、磷、镁、铁、锌、镍[J].冶金分析,2011,31(1):35-39. (Deng Q D, Xu G, Lin G C, et al. Determination of aluminum, phosphorus, magnesium, iron, zinc, nickel in manganese ore by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with hydrofluoric acid resistant sampling system after microwave digestion[J]. Metallurgical Analysis, 2011, 31(1): 35-39.)

(上接第 675 页)

参考文献

- [1] Wang H J, Murphy P A. Isoflavone content in commercial soybean foods [J]. Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(8): 1666-1673.
- [2] 孙君明,丁安林,张艳,等.大豆异黄酮的研究概况[J].大豆科学,1995,14(2):160-166. (Sun J M, Ding A L, Zhang Y, et al. General review in the study of the soybean isoflavone[J]. Soybean Science, 1995, 14(2):160-166.)
- [3] Lo F H, Mak N K, Leung K N. Studies on the anti-tumor activities of the soyisoflavone daidzein on murine neuroblastoma cells[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2007, 61(9):591-595.
- [4] Watanabe S, Uesugi S, Kikuchi Y. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2002, 56(6):302-312.
- [5] Aedin C, Bryn H, Rosa M. Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80: 1044-1047.
- [6] Gardner C D, Chatterjee L M, Franke A A. Effects of isoflavone supplements vs soy foods on blood concentrations of genistein and daidzein in adults [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2009, 20(3):227-234.
- [7] 王春娥,赵团结,盖钧镒.大豆异黄酮组分 HPLC 快速分析技术及其在豆腐加工中的应用[J].作物学报,2010,36(12):2062-2072. (Wang C E, Zhao T J, Gai J Y. Establishment of a rapid HPLC method for quantifying isoflavone components and its application in tofu processing[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(12):2062-2072.)
- [8] 宋志峰,王丽,孟凡钢,等.吉林省普通大豆品种(系)异黄酮含量分析[J].大豆科学,2009,28(6):1076-1080. (Song Z F, Wang L, Meng F G, et al. Analysis of isoflavones content in normal soybean varieties (lines) in Jilin province [J]. Soybean Science, 2009, 28(6):1076-1080.)
- [9] 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 sample [J]. Soybean Science, 2000, 19(1):15-20.)
- [10] Kudou S, Fleury Y, Welt D, et al. Malony isoflavone glucosides in soybean seeds (*Glycine max* Merri.) [J]. Agricultural and Biological Chemistry. 1991, 55(9):2227-2233.
- [11] 孙君明,丁安林,常汝镇,等.中国大豆异黄酮含量的初步分析[J].中国粮油学报,1995,10(4):51-54. (Sun J M, Ding A L, Chang R Z, et al. The survey of content of soybean isoflavone in china [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 1995, 10(4):51-54.)
- [12] 董李平,吴珍龄,易泽林.大豆结实前异黄酮积累规律的研究[J].西南农业大学学报(自然科学版),2004,26(6):756-758. (Dong L P, Wu Z L, Yi Z L. Studies on isoflavone distribution and variation before seed-setting in soybean (*Glycine Max* L. Merri) [J]. Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science), 2004, 26(6):756-758.)
- [13] 张晓波,吴岩,林红.高效液相色谱法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]. Cereals & Oils, 2006(4):19-21.)