

大豆发酵液中大豆异黄酮甙元高效液相色谱测定方法

黄宏南 陈宏靖

(福建省卫生防疫站,福建 福州 350001)

近年来,西方膳食结构引起的肿瘤,心脑血管等疾病越来越受到关注。研究资料表明,大量消费大豆食品的人群,癌症和冠心病的发病率低。大豆异黄酮甙元是大豆中具有生物活性的物质,其主要成分为染料木素(Genistein, G)和大豆甙元(Daidzein, D)有多种生理作用,应用价值高。^[2]目前,国内有关分析方法的报道尚未多见。本文在参阅 OHTA^[1]等报道的基础上,对其试样提取步骤繁琐,测定时间长等方面作了具体的改进,建立了高效液相色谱定性、定量检测的方法,结果令人满意。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱系统 岛津 LC-4A 高效液相色谱仪;C-RIB 数据处理系统。离心机。

甲醇 色谱纯。流动相 甲醇:水 = 60:40

标准溶液的制备 精确称取标准品 Genistein (美国 Sigma 公司产品,以下简称 G₀) 5.0 mg,用流动相溶解并定容至 100 mL,此溶液每毫升相当于 50 μg 染料木素。

精确称取大豆甙元标准品 Daidzein (美国 Sigma 公司产品,以下简称 D₀) 3.2 mg,用流动相溶解并定容至 100 mL,此溶液每毫升相当于 50 μg 大豆甙元。

1.2 实验方法

试样处理 称取 5 g 大豆发酵液于 100 mL 容量瓶中,加入 80%乙醇定容,超声振荡 5 min。放置略澄清后离心分离(3000 r/m) 5 min,取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后,备用。

色谱条件 Shimpack CLC-ODS 色谱柱(岛津): 150 mm × 600 mm;

紫外检测器 检测波长,260 nm;

流动相 甲醇:水 = 60:40;流速 1.0 mL/min (0 → 5 min)、1.6 mL/min (5 → 10 min)。

柱温 38 °C;衰减 4;纸速 2 cm/m。

进样量 10 μL。

测定 取 10 μL 标准使用液或试样溶液,液相色谱仪测定。以保留时间定性,以试样峰高或峰面积与标准比较定量。

计算

$$X = \frac{h_1 \times C \times V}{h_2 \times m}$$

式中: X - 大豆发酵液中染料木素/大豆甙元的含量, μg/g; h₁ - 试样峰高或峰面积; C - 标准溶液浓度, μg/mL; h₂ - 标准溶液峰高或峰面积; V - 试样定容体积, mL; m - 试样质量, g。大豆发酵液中异黄酮甙元含量为染料木素和大豆甙元含量的总和。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的选择 根据被测化合物的性质以及采用价格较低毒性较小的试剂在较短时间内完成分析的需要,我们对流动相中甲醇与水的比例、洗脱液的流速进行了试验。试验结果表明,甲醇:水为 60:40,流速采用时间程序,出峰时间为 7 min 左右,大豆异黄酮甙元的检测不受杂质及试剂等干扰物质的影响,能够达到试验要求。

2.2 前处理方法的选择 由于大豆发酵液成分较复杂,植物蛋白质含量较高,加入乙醇是为了使蛋白质凝结沉淀,然后离心去除,提取液中常用乙醇体积分数为 20%、40%、50%、60%、70%、80%、100%。通过不同配比试验,发现 80%乙醇提取效果最为理想。

2.3 方法的线性范围 染料木素在 0.01 ~ 0.1 mg/mL,回归方程为 $y = 75697.9x + 61035.7$,相关系数 $r = 0.9996$,大豆甙元在 0.003 ~ 0.03 mg/mL,回归方程为 $y = 10818x + 122794$,相关系数 $r = 0.9845$ 。

2.4 方法的准确度 根据试样测定步骤,做两个浓度的回收试验,每个浓度作 3 个平行样,测定结果见表 1、表 2。

表 1 染料木素回收率实验 mg

本底值	加标量	测定值	回收率 %
0.026	0.010	0.036	100.0
0.026	0.010	0.035	90.0
0.026	0.010	0.035	90.0
0.026	0.040	0.065	97.5
0.026	0.040	0.064	95.0
0.026	0.040	0.064	95.0

表 2 大豆甙元回收率实验 mg			
本底值	加标量	测定值	回收率 %
0.044	0.032	0.074	93.8
0.044	0.032	0.073	90.6
0.044	0.032	0.074	93.8
0.044	0.128	0.173	100.8
0.044	0.128	0.179	105.5
0.044	0.128	0.177	103.9

2.5 方法的精密度 同一试样经前处理后连续进样,测定结果如表 3。

表 3 试样精密度实验								
试样编号	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	RSD %
染料木素 峰面积	4045	4099	4216	4321	4128	4372	4197	3.1
大豆甙元 峰面积	72747	70381	71916	71568	72357	71376	71724	1.2

2.6 试样测定 采集不同批号大豆发酵液,依照上述方法测定,结果如表 4。

表 4 市售大豆发酵液测定结果 $\mu\text{g/g}$			
批号	染料木素	大豆甙元	大豆异黄酮甙元
991021	9.0	53.2	62.2
991026	10.0	54.3	64.3
991027	10.9	56.1	67.0
991103	9.3	53.9	63.2
991108	9.6	55.2	64.8
991110	10.3	57.2	67.5

3 小结 本文描述了高效液相色谱法测定大豆发酵液中大豆异黄酮甙元的方法。本方法简单、快速,回收率及精密度符合食品分析的要求。该方法目前适用于功能性饮料的检测,一般食品中大豆异黄酮的测定方法还在研究中。

参考文献：

[1] NaoKazu OHTA, Goro KUWATA, Hiroshi AKAHORI, et al. Isoflavonoid Constituents of soybeans and isolation of a new acetyl daidzin [J]. Agric Biol Chem. 1979, 43 (7) : 1415 — 1419.

[2] 彭向雷,王蕊,等. 大豆异黄酮研究进展[J]. 中国食品卫生杂志,1998,10(3) :38.

中图分类号 :R15 ;0657.7⁺ 2 ;TS218 文献标识码 :B 文章编号 :1004 - 8456(2001)02 - 0025 - 02

欢迎订阅 2001 年《全国轻工信息》周刊

《全国轻工信息》 $\left(\begin{array}{l} \text{ISSN1002—6584} \\ \text{CN11—1420/TS} \end{array} \right)$ 是立足于企业、市场和消费者,内容具有广泛性、新颖性、实效性的社科类综合性信息周刊。1985 年创刊,实力雄厚,设有行业传真、轻工博览、走进 WTO、特别报道、股海扬帆、经营策略、市场巡礼、专家论坛、信息顾问、数字经纬、政策法规、消费热点等栏目。

《全国轻工信息》以发展经济为指南,以市场为依托,以消费为方向,全方位、多渠道、新视角,及时、准确、快速地报道涉及消费品行业的国内外高新科技、企业经营、消费指南等。我们的目标是进一步更好地为市场测晴雨,助企业铺通途,给消费者指航程。

《全国轻工信息》为大 16 开,彩色封面,图文并茂,全年 50 期,定价 400 元/年,零售价 8 元/期。

编辑出版:《全国轻工信息》杂志社	户 名:《全国轻工信息》杂志社
地 址:北京市阜外大街乙 22 号	开户银行:北京工商银行南礼士路支行
邮 编:100833	阜外大街分理处
电 话:(101)68396607 68396608	帐 号:492—249131—95
传 真:(010)68396607	邮发代号:2—493
E-mail:qkxhl@clii.com.cn	