

高效液相色谱法测定保健食品中大豆异黄酮含量

杨 洁¹, 蒙缔亚¹, 李 露²

(1. 农业部食品质量监督检验测试中心, 湖北 武汉 430064;

2. 湖北省农业科学院, 湖北 武汉 430064)

摘 要: 建立了高效液相色谱法(HPLC)测定保健食品中大豆异黄酮含量的方法, 运用二极管阵列检测器(PDA)建立了 4 种大豆异黄酮 D、G、De、Ge 的光谱库, 测定了 D、G、Ge 与 De 响应值之比。采用 PDA 检测, C₁₈ 反相柱, 以甲醇: 水: 醋酸(HAC) = 55: 45: 1(V/V/V) 为流动相测定了同一批保健食品美龄营养片中 4 种大豆异黄酮 D、G、De、Ge 的含量分别为 2.24%、10.82%、0.085%、0.027%, 变异系数小于 5%, 回收率为 92.51% ~ 99.30%。该方法快速, 精密度及准确度在允许范围内, 可作为保健食品中 D、G、De、Ge 的同时测定方法。

关键词: 保健食品; 大豆异黄酮; 高效液相色谱法

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2007)02-0130-06

大豆异黄酮(Soybean isoflavones ISO)是一种新兴的天然雌激素, 最新研究表明它在防止癌症、保护心血管系统方面具有特殊的生理作用, 可抑制生物体内产生的活性氧^[1], 抑制过氧化物的生成及脂质过氧化作用并减少 DNA 的氧化损伤及抗血栓形成^[2~4], 还能改善和预防妇女更年期综合征。

大豆异黄酮属于黄酮类化合物中的异黄酮类成分, 其母核为 3-苯基苯并吡喃酮, 大豆中共有 12 种异黄酮, 分游离型苷元和结合型糖苷^[5]。目前保健食品中加入的大豆异黄酮成分主要为染料木素 Ge、大豆苷元 De、染料木苷 G、大豆苷 D 4 种。其化学结构见图 1^[6]。

国内外测定 ISO 的方法主要有紫外分光光度法^[7], 气质联用法^[8], 高效液相色谱法(HPLC)^[9~11], 液质联用法^[12]等。紫外分光光度法仅能测定总异黄酮, 气质联用及液质联用法, 仪器昂贵, 推广不易。经综合比较, HPLC 在众多检测方法中是最佳的^[10], 但需多种标准品, 除 De 中国药品生物制品检定所提供外, 其余三种标准品均需从国外公司购买, 价格昂贵, 若将 ISO 水解为甙元后再进行检测, 水解时加入的氯离子会缩短色谱柱的使用寿命^[13], 这给 ISO 的 HPLC 法定性定量分析带

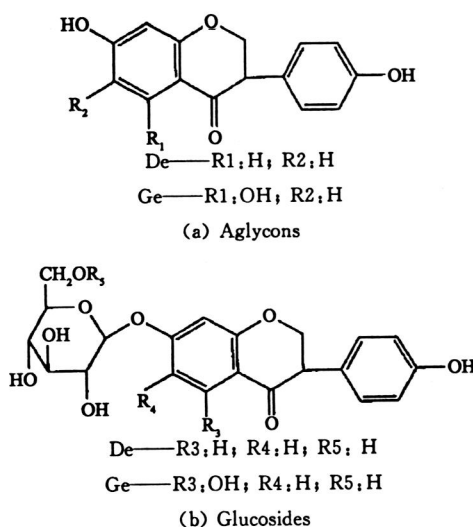


图 1 D、G、De、Ge 的化学结构

Fig. 1 Structures of D, G, De, Ge

来困难。本文介绍的 HPLC 方法中先用标准品建立了各 ISO 的光谱库, 然后样品中 ISO 各组份经二极管阵列检测器(PDA)定性, 能迅速准确地确定各色谱峰的归属, 其含量可根据 D、G、Ge 与 De 响应值之比来计算, 因而只需要 De 一种标准品, 就可进行定量分析, 给异黄酮的定性定量分析带来极大的方便。本文所介绍的方法国内外未见报道。

收稿日期: 2007-04-23; 修订日期: 2007-05-24.

作者简介: 杨洁, 助理研究员, 多年来从事高效液相色谱领域内的新方法研究及保健食品成分检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪: 配置 510 泵, 717 自动进样器, 996 二极管阵列检测器 (PDA), Millenium 32 色谱工作站. 大豆苷 (D)、染料木苷 (G)、大豆苷元 (De)、染料木素 (Ge) 均为 Sigma 公司的产品. 甲醇: 色谱纯, 其余试剂均为分析纯. 样品: 美龄营养片 (大豆异黄酮片), 由武汉红桃 K 集团生产.

1.2 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈ 柱 5 μm, 4.6 × 250 mm, 检测波长: 260 nm.

流动相: MeOH : H₂O : HAC = 55 : 45 : 1 (V/V/V); 流速: 1.0 mL/min.

1.3 标准溶液的配制

1.3.1 标准溶液储备液

在 25 mL 容量瓶中, 准确称取标准品 D、G、De、Ge 各 20 mg 左右 (准确至 ±0.01 mg), 以甲醇溶解、定容至刻度, 作为标准溶液储备液.

1.3.2 标准溶液使用液

分别取 1.3.1 各标准储备液 1.00 mL, 用甲醇定

容至 50 mL. De、Ge 再稀释 10 倍, 各标准品 D、G 浓度为 15 μg/mL 左右, De、Ge 为 1.5 μg/mL 左右.

1.4 样品的提取

将大豆异黄酮片于研钵中研成粉末, 于 50 mL 容量瓶中精密称取 100 mg 左右样品 (准确至 ±0.1 mg), 加入甲醇适量, 超声 30 min, 冷至室温, 用甲醇定容 50 mL, 过滤, 滤液过 0.45 μm 膜后, 直接进样.

2 结果和讨论

2.1 最佳色谱条件的确定

2.1.1 流动相中有机相比比例的选择

对于大豆异黄酮的测定, 文献多用乙腈体系作为流动相, 但乙腈价格昂贵, 毒性大. 由于甲醇水体系粘度小, 柱压低, 价格便宜, 毒性小, 故选用甲醇水体系为流动相. 实验表明, 流动相中甲醇的比例小于 40% 时, D、G 可以很好分离, 但 De、Ge 保留时间过长. 当甲醇比例大于 60% 时, D、G 不能完全分离; 当甲醇比例为 55% 时, 4 个主峰能够完全分离, k' 在合适范围内, 分离结果见图 2. (各标准品浓度为 15 μg/mL 左右, 进样量 10 μL).

2.1.2 流动相 pH 值对保留时间的影响

分别配制表 1 所示 5 种流动相, 进行 4 种标准

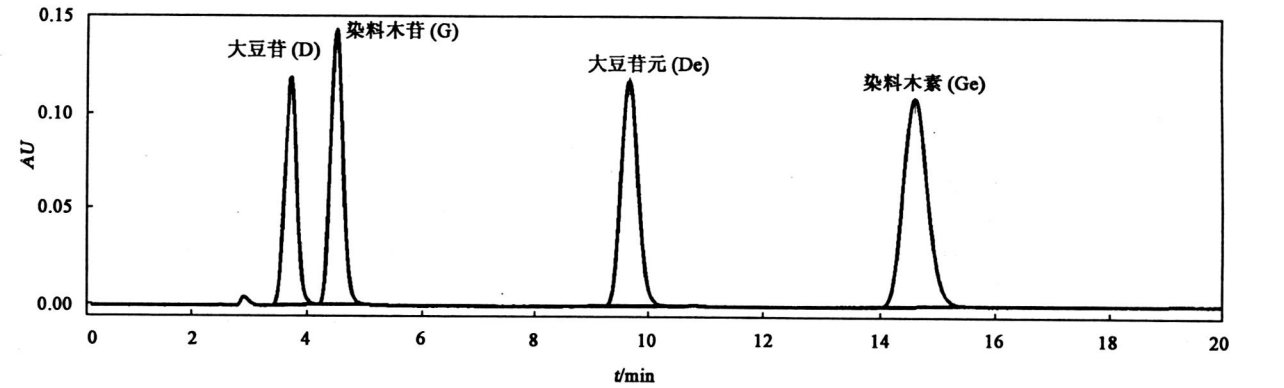


图 2 D、G、De、Ge 标准品色谱图

Fig. 2 Standard samples' chromatogram of D, G, De, Ge

品的分离, 色谱图见图 3. 由图 3 可以看出以醋酸调节流动相 pH 值, pH 值越小, 分离时间越短. 但 HAC 为弱酸, 它的含量对 pH 值影响不大, 考虑到酸对色谱柱的影响, 定 MeOH : H₂O : HAC = 55 : 45 : 1 (V/V/V) 为流动相.

2.1.3 检测波长的选择

用二极管阵列检测器得到了 D、G、De、Ge 的光谱图, 见表 2.

表 1 不同流动相比比例 (V/V/V) 及 pH 值

Table 1 The ratios of different mobile phase and pH

流动相	甲醇	水	醋酸	pH 值
1	55	45	0.0	6.80
2	55	45	0.5	3.34
3	55	45	1.0	3.17
4	55	45	1.5	3.09
5	55	45	2.5	3.00

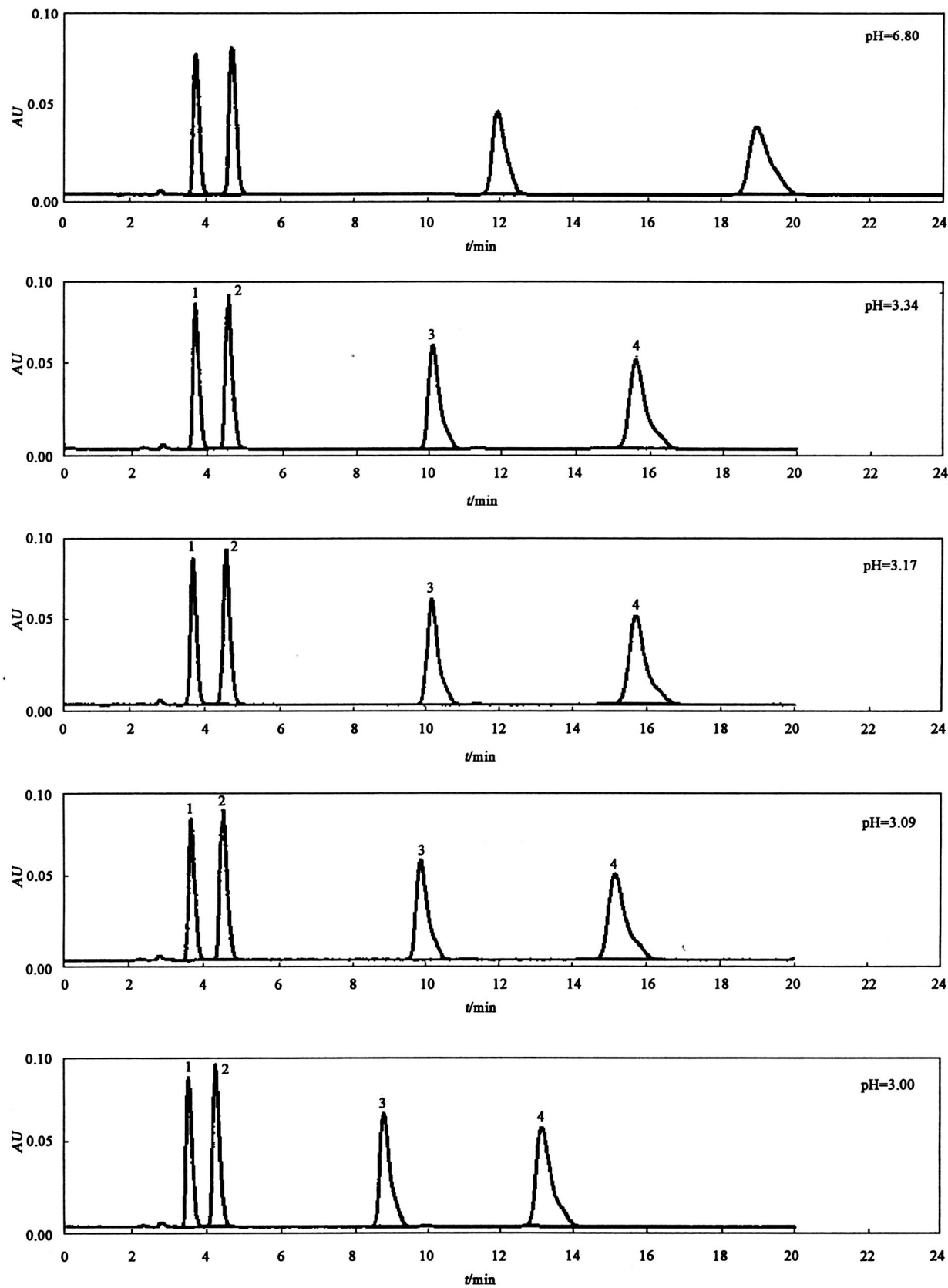


图 3 不同酸度条件下色谱图

Fig. 3 The chromatogram in different pH of mobile phases

根据表 2, 经综合比较, 选择 ISO 的最佳检测波长为 260 nm.

表 2 D、G、De、Ge 的光谱数据

Table 2 The spectrum date of D、G、De、Ge nm

	D	G	De	Ge
λ1	211.1	258.2	212.3	212.3
λ2	248.8	326.0	246.4	258.2

2.2 标准曲线的制作

在 1.2 所述色谱条件下, 将 1.3.2 所配的标准溶液使用液依次进样 1、2、5、10、15、20 μL, 以大异黄酮进样量 X(μg) 与峰面积 y 作线性回归.

回归方程分别为:

D: $y = 4.50 \times 10^5 X - 1.02 \times 10^5$; $r = 0.9996$

G: $y = 5.14 \times 10^6 X - 1.49 \times 10^5$; $r = 0.9994$

De $y = 6.80 \times 10^6 X - 1.70 \times 10^5$; $r = 0.9994$

Ge $y = 9.21 \times 10^6 X - 4.12 \times 10^5$; $r = 0.9991$

在本方法的色谱条件下, 4 种大豆异黄酮浓度与其色谱峰峰面积有着很好的线性关系, 线性范围 D、G 为 16~ 320 ng, De、Ge 为 1.6~ 32.0 ng.

2.3 De 与 D、G、Ge 响应值之比

以 5 次峰面积测定平均值计算 D/De、G/ De、Ge/ De 分别为 1.56、1.08、0.709.

2.4 样品提取条件

按 1.4 分别用 50%、80%、100% 甲醇提取样品并进行 ISO 测定, 结果见表 3. 实验证明当比例为 100% 甲醇时, ISO 提取效果最好.

表 3 不同提取液对样品中大豆异黄酮含量的影响(n= 5)

Table 3 Effect of different extraction solvents on contents of ISO %

ISO	50% 甲醇	80% 甲醇	100% 甲醇
D	0.550	2.210	2.240
G	4.250	10.570	10.840
De	0.068	0.082	0.085
Ge	0.014	0.019	0.027

2.5 样品的测定

按本方法选定的色谱条件, 对同一批大豆异黄酮片进行了含量及加标回收率测定, 考察了方法的精密性及准确性, 测定结果见表 4 和表 5, 样品色谱图见图 4.

2.6 方法检出限

在本方法条件下, 当试样称样量为 100 mg, 定容到 50 mL, 进样量为 50 μL, 四种大豆异黄酮的检出限为 0.1 mg/kg, 结果的相对标准偏差小于 5%.

2.7 峰纯度分析及光谱鉴定

在大豆异黄酮提取物中, 有多种黄酮类物质的结构与大豆异黄酮类似, 色谱保留行为相近, 大豆异黄酮色谱峰里往往混有共流出物, 我们运用二极管阵列检测器, 以标准品光谱图为参照, 对主峰大豆甙 D、染料木甙 G、大豆甙元 De、染料木素 Ge 进行峰纯度分析及光谱鉴定, 该手段能指出峰中不纯物处及显示 1~ 4 阶光谱图, 为摸索最佳色谱分离条件提供了依据, 消除了结构相近黄酮对大豆异黄酮准确

表 4 样品中大豆异黄酮测定结果(%)及精密性(n= 5)

Table 4 Contents(%) of soybean isoflavones in sample and accuracy

ISO	1	2	3	4	5	平均值	RSD/%
D	2.240	2.240	2.250	2.260	2.230	2.240	0.5
G	10.820	10.830	10.820	10.810	10.840	10.820	0.1
De	0.087	0.085	0.084	0.086	0.083	0.085	1.9
Ge	0.028	0.027	0.028	0.027	0.027	0.027	2.0

表 5 加标回收率结果(n= 5)

Table 5 Results of recovery

ISO	加入量/μg	本底值/μg	理论值/μg	平均测定值/μg	平均回收率/%	变异系数/%
D	1250.0	24449.60	25699.60	25519.70	99.30	2.1
G	1075.0	118100.30	119175.30	117673.70	98.74	1.9
De	113.5	87.32	200.82	187.73	93.48	2.7
Ge	206.0	305.62	511.62	473.30	92.51	3.0

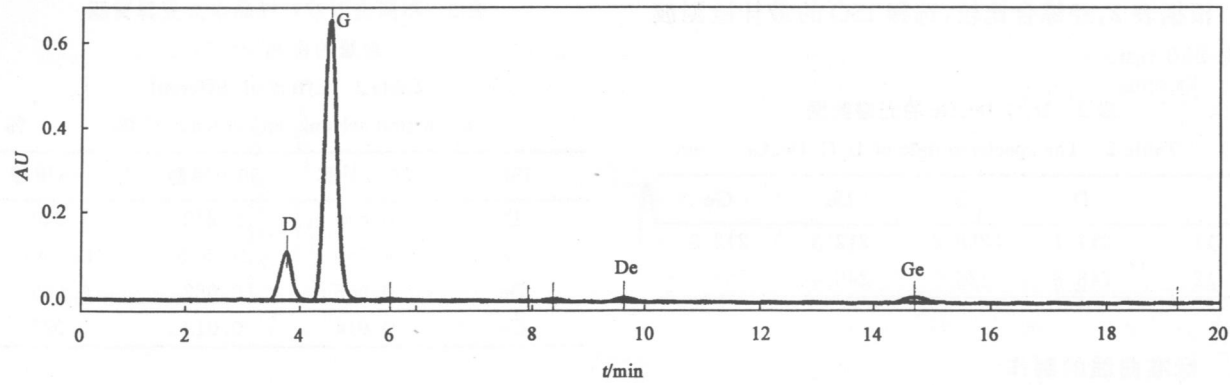


图 4 样品色谱图
Fig.4 The chromatogram of sample

定量的干扰。

2.8 制剂辅料对大豆异黄酮测定的影响

考察的辅料有羟甲淀粉钠、微粒硅胶、微晶纤维素、淀粉、羟丙纤维素、PEG600 等 9 种,在 10 mL 容量瓶中将各辅料称取 30 mg(准确至 ±0.2 mg)加适量甲醇,超声,定容,过滤,用测大豆异黄酮色谱条件进行 HPLC 分析,所测试 9 种辅料对大豆异黄酮测定无干扰。

3 结论

本文采用 HPLC 法测定了保健食品中 4 个大豆异黄酮(D、G、De、Ge)组分的含量。运用二极管阵列检测器(PDA)分别测定 4 个组分的光谱图及 D、G、Ge 与 De 响应值之比。在样品测试中,待测组分用 PDA 定性,仅用一个易于获得的标准品 De 就可以定量。避免了采用价格昂贵的标准品,大大降低了检测成本。方法简便、快速、准确,精密度和准确性在允许范围内,可应用于保健食品中大豆异黄酮含量测定。

参考文献:

[1] Toda S, Shirataki Y. Inhibitory effects of isoflavones on liquid peroxidation by reactive oxygen species[J]. *Phytother Res*, 1999, 13: 163-165.

[2] Steele V E, Pereira M A, sigma c c, et al. Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein[J]. *J Nutr*, 1999, 125: 713-716.

[3] Djuric Z, Chen G, Doerge D R, et al. Effect of soy isoflavone supplement on markers of oxidative stress in men and women[J]. *Cancer Lett*, 2001, 172: 1-6.

[4] Tikkauen MJ, Adlererentz H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens could they have a role in coronary heart disease prevention [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60: 1-5.

[5] 崔洪斌. 大豆生物活性物质的开发与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.

[6] Jong J K. Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years [J]. *Food Research International*, 2005, 38: 435-444.

[7] 张玉梅 张学斌. 紫外分光光度法测定大豆异黄酮的含量[J]. *中国食品科学杂志*, 2000, 12(4) : 7-9.

[8] Liggins J. Bluck L J C. Daidzin and genistein content of Fruits and nuts [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000, 11(6) : 326-331.

[9] 徐颖. 高效液相色谱法测定大豆异黄酮含量[J]. *油脂开发*, 2006, 14(6): 33-45.

[10] 刘涛, 刘宁. 食品中大豆异黄酮的 HPLC 法测定[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2006, 22(2) : 54.

[11] Mullner C, Sontag G. Determination of some phytoestrogens in soybeans and their processed products with HPLC and coulometric electrode array detection[J]. *Fresenius J Anal Chem*, 1999, 364: 261-265.

[12] 董怀海, 谷文英. 高效液相色谱-质谱法在大豆异黄酮测定中的应用[J]. *粮食与饲料工业*, 2002, (5) : 48-50.

[13] 鞠兴荣, 袁健, 汪海峰. 高效液相色谱法测定大豆提取物中大豆异黄酮含量[J]. *中国粮油学报*, 2000, 15 (4): 26.

Determination of Soybean Isoflavones in Health Foods by HPLC

YANG Jie¹, MENG Di-ya¹, LI Lu²

- (1. Food Quality Supervision Inspection and Testing Center (Wuhan) of Chinese Ministry of Agriculture, Wuhan 430064, China;
2. Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

Abstract: A HPLC method for determination of soybean isoflavones including D, G, De, Ge in health foods was reported. The 1–4th derivative spectra of D, G, De, Ge was established by PDA.

The sample was analyzed on a C₁₈ reversed-phase column (5 μm, 4.6 × 250 mm) with a isogradient mobile of methanol: water: HAC= 55: 45: 1 (V/V/V). ISO in a health Meiling nutritions tablets was tested. The contents of D, G, De, Ge were 2.24%, 10.82%, 0.085%, 0.0027% respectively, and variation coefficient was less than 5%, and the recovery was 92.51% ~ 99.30%.

This method is simple, sensitivity, reproducibility and can be used for the determination of 4 soybean isoflavones in health foods.

Key words: health foods; soybean isoflavones; HPLC

Classifying number: O657.32