

超高效液相色谱检测豆浆中的五种大豆异黄酮含量

LC-132

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定豆浆中的五种大豆异黄酮含量的分析方法。前处理采用超声波萃取方法，样品处理时间短。使用 LC-30A 四元梯度洗脱系统在 7 min 内实现快速分析。实验结果表明：五种大豆异黄酮类物质在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~ 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内，相关系数大于 0.999；0.1、1.0 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.064~0.72% 和 0.30~2.23% 之间。

关键词：豆浆大豆异黄酮超高效液相色谱

异黄酮是黄酮类化合物中的一种，主要存在于豆科植物中，大豆异黄酮是大豆生长中形成的一类次级代谢产物。由于是从植物中提取，与雌激素有相似结构，因此大豆异黄酮又称植物雌激素，能够影响激素分泌、代谢生物学活性、蛋白质合成、生长因子活性，是天然的癌症化学预防剂。异黄酮是典型的植物雌激素，大豆异黄酮既能代替雌激素与 ER 结合发挥雌激素样作用，又能干扰雌激素与 ER 结合，表现为抗雌激素样作用。大豆异黄酮化合物能通过不同的途径改善心肌缺血症状，扩张血管、抑制血小板凝聚，降低血中胆固醇和甘油三酯含量，并有抗心率失常作用。在内分泌系统，异黄酮化合物主要表现为雌激素样作用，与雌激素一样有兴奋和抑制双重作用，有的异黄酮化合物还能影响骨的再吸

收，因而对骨病的治疗有益。

大豆异黄酮的主要成分有：大豆甙 (Daidzin, CAS: 552-66-9)，染料木甙 (Genistin, CAS: 529-59-9)，黄豆黄素 (Glycitin, CAS: 40957-83-3)，黄豆黄素甙元 (Glycitein, CAS: 40957-83-3)，染料木素 (Genistein, CAS: 446-72-0) 等。国家标准《GB/T 26625-2011 粮油检验大豆异黄酮含量测定高效液相色谱法》规定了大豆、豆豉等豆制品中的大豆异黄酮物质的检测方法。

本文使用岛津 LC-30A 超高效液相色谱仪配备四元梯度洗脱系统，分析了豆浆中的五种大豆异黄酮，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 梯度洗脱系统。具体配置为：LC-30AD 输液泵 $\times 2$ ，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，SPD-20A 紫外检测器，CBM-20A 系统控制器，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm i.d. \times 150 mm, 2.2 μm

流动相：A - 0.1% 乙酸水溶液；B - 乙腈

流速：0.45 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：50 $^{\circ}\text{C}$

检测波长：260 nm (波长范围：190-370 nm)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	30
1.50	Pumps	Pump B Conc.	45
4.00	Pumps	Pump B Conc.	45
4.10	Pumps	Pump B Conc.	20
7.00	Controller	Stop	

1.3 样品制备

标准溶液配制：准确称取适量的大豆甙、染料木甙、大豆黄素、黄豆黄素甙元和染料木素标准品，用 60% 甲醇水溶液配制浓度为 1 mg/mL 的单标标准储备液。用 60% 甲醇水溶液将 1 mg/mL 单标标准储备液稀释成浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的混标溶液。用 10% 甲醇水溶液将 50 $\mu\text{g/mL}$ 的混标溶液依次稀释为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 系列浓度的大豆异黄酮混合标准工作液。

样品前处理方法:

参见《GB/T 26625-2011 粮油检验大豆异黄酮含量测定高效液相色谱法》。

称取 5 mL 豆浆样品于 250 mL 具塞三角瓶中, 加 90 mL 90 % 甲醇溶液, 在 60°C 下超声提取 30 min, 然

后以 10000 r/min 转速离心 10 min, 取上清液转移至 250 mL 浓缩瓶中, 60°C 旋转蒸发至体积约 40 mL。浓缩液转入 50 mL 容量瓶中, 采用 10 % 甲醇水溶液定容至刻度。提取液经 0.45 μm 滤膜过滤后, 供高效液相色谱测定。

结果讨论

2.1 标准样品的色谱图

大豆异黄酮 0.5 μg/mL 混合标准溶液的色谱图如图 1 所示, 最大吸收波长 260 nm。

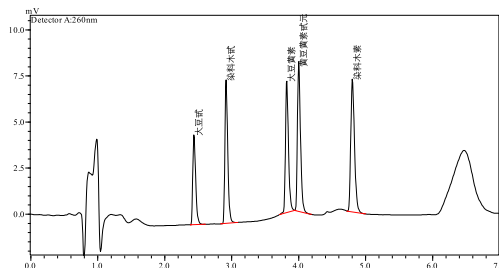


图1 0.5 mg/L 混合标准溶液的色谱图

2.2 线性关系

将 6 个不同浓度的标准工作液, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 外标法制作校准曲线, 如图 2 至图 6 所示。线性方程、线性范围、相关系数见表 2, 线性关系良好。

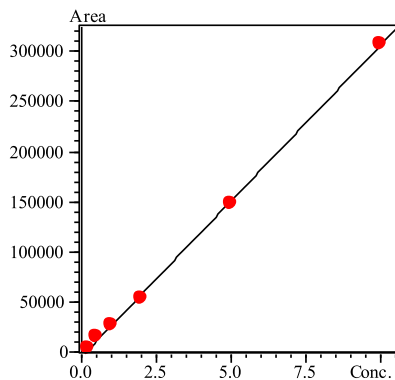


图2 大豆甙的标准工作曲线

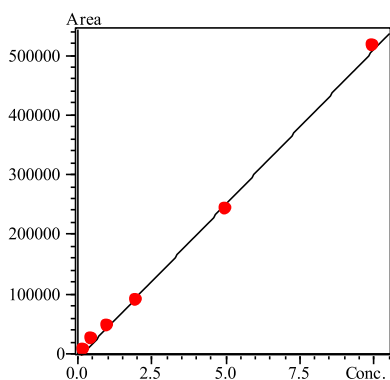


图3 染料木甙的标准工作曲线

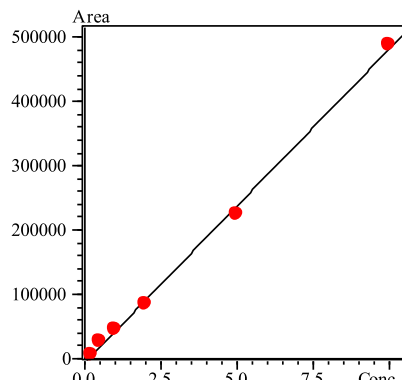


图4 大豆黄酮的标准工作曲线

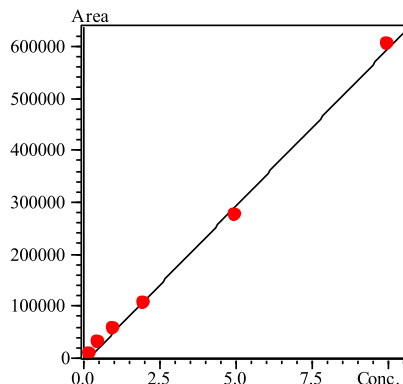


图5 黄豆黄酮甙元的标准工作曲线

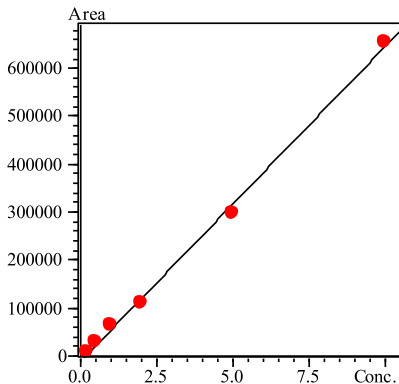


图6 染料木素的标准工作曲线

表2 五种大豆异黄酮的校准曲线参数

名称	校准曲线	相关系数 R
大豆甙	$Y = (31032.1)X + (-4720)$	0.9997
染料木甙	$Y = (51713.1)X + (-8068)$	0.9995
大豆黄酮	$Y = (48845.2)X + (-7504)$	0.9991
黄豆黄酮甙元	$Y = (60518.0)X + (-10740)$	0.9990
染料木素	$Y = (65695.5)X + (-10668)$	0.9992

2.3 检出限和定量限

0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的标样色谱图如下图 7 所示，按照 ASTM 计算信噪比，选取基线为 5.0–6.0min，计算信噪比，以 3 倍信噪比为检测限，计算仪器检出限和定量限结果见表 3。

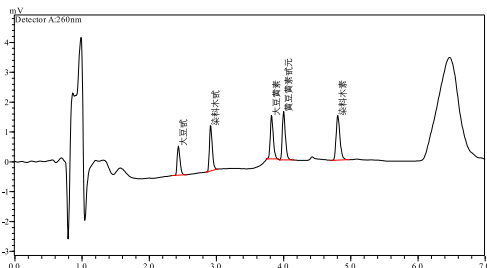


图7 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 大豆异黄酮标准溶液的色谱图

表3 五种大豆异黄酮检出限和定量限 ($\mu\text{g/mL}$)

名称	S/N	检出限	定量限
大豆甙	49.01	0.01	0.04
染料木甙	75.68	0.008	0.026
大豆黄酮	72.67	0.008	0.025
黄豆黄素甙元	80.73	0.008	0.024
染料木素	74.61	0.008	0.026

2.4 精密度实验

取标准工作液中 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 三个浓度，分别平行进样 7 次，五种大豆异黄酮的保留时间和峰面积的相对标准偏差统计结果见表 4~ 表 8。

表 4 大豆甙保留时间和峰面积重复性结果

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
0.2	0.07	0.94
1.0	0.07	1.65
5.0	0.03	0.45

表 5 染料木甙保留时间和峰面积重复性结果

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
0.2	0.06	0.80
1.0	0.05	0.21
5.0	0.02	0.48

表 6 大豆黄酮保留时间和峰面积重复性结果

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
0.2	0.05	1.13
1.0	0.04	0.34
5.0	0.01	0.63

表 7 黄豆黄素甙元保留时间和峰面积重复性结果

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
0.2	0.06	0.71
1.0	0.05	0.60
5.0	0.01	0.44

表 8. 染料木素保留时间和峰面积重复性结果

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
0.2	0.081	0.98
1.0	0.05	1.27
5.0	0.02	0.35

2.5 基质加标实验

按照 1.3 中样品制备方法，制备豆浆样品上机测试。豆浆中检出大豆异黄酮类物质，检测结果见表 9。0.2 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液的色谱图如图 8 所示，豆浆样品的色谱图如图 9 所示。

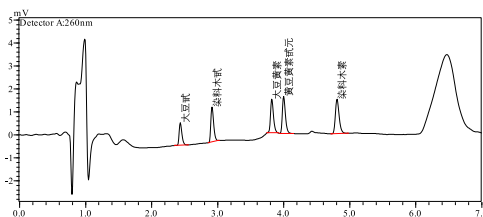


图 8. 0.2 µg/mL 标准溶液的色谱图

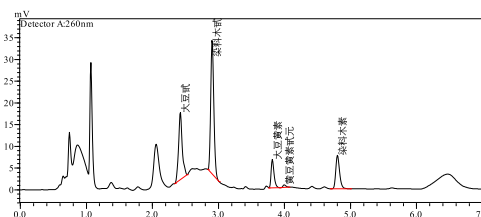


图 9. 豆浆样品色谱图

表9 豆浆样品测试结果表

化合物	RT (min)	Area	Conc. (µg/mL)
大豆甙	2.422	60063	2.070
染料木甙	2.903	100171	2.070
大豆黄素	3.817	19990	0.509
黄豆黄素 甙元	3.998	1816	0.137
染料木素	4.801	30843	0.580

结论

本方法参照《GB/T 26625-2011 粮油检验大豆异黄酮含量测定高效液相色谱法》，采用岛津超高效液相色谱 LC-30A 四元低压梯度系统建立了一种测试豆浆中的五种大豆异黄酮含量的方法。本方法的样品前处理采用超声萃取完成，操作步骤简单。7 min 内完成五种大豆异黄酮的快速分析，方法稳定，灵敏度高，可以用于大豆异黄酮的快速定量测试。