

大豆中生物活性成分及其检测技术研究进展

杨福明¹, 冯丽丽², 罗淑年², 王立枫¹, 史永革^{2*}

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 九三粮油工业集团有限公司, 哈尔滨 150090)

摘要: 我国是大豆的原产地, 豆制品在我国有着悠久的食用历史。大豆中不仅有丰富的蛋白质、脂肪、维生素、矿物质等营养物质, 而且还含有磷脂、甾醇、异黄酮、皂甙、低聚糖、维生素 E、多肽、膳食纤维等多种生物活性成分, 是功能性因子的宝库。随着研究的不断深入, 生物活性物质的功能性已逐渐清晰, 这些物质的分析和检测方法也在逐步的完善。特别是最近几十年, 随着色谱、质谱、光谱技术的不断发展和进步, 大豆中生物活性物质的检测取得了很大进展, 检测手段更加先进, 定性和定量的检测方法也更加科学、严谨、高效。检测技术的进步, 必将促进大豆中生物活性物质的深度开发和利用, 让大豆为人类的营养和健康做出更大贡献。本文主要对大豆中生物活性成分的种类和功能性以及生物活性成分检测技术的研究进展情况进行综述, 为大豆生物活性物质未来的质量安全控制和更加深入的科学研究提供参考。

关键词: 大豆; 生物活性成分; 检测技术

Research progress of bioactive components in soybean and their detection technologies

YANG Fu-Ming¹, FENG Li-Li², LUO Shu-Nian², WANG Li-Feng¹, SHI Yong-Ge^{2*}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2. Jiusan Grains and Oils Industry Group Co., Ltd., Harbin 150090, China)

ABSTRACT: Soybean is origin from China, and soybean products have been eaten for a long time in China. Soybean is not only rich in protein, fat, vitamins, minerals and other nutrients, but also contains phospholipids, sterols, isoflavones, saponins, oligosaccharides, vitamin E, polypeptides, dietary fiber and other bioactive components, which is the treasure house of functional factors. With the continuous research, the function of bioactive substances has become more clear, and the analysis and detection methods of these substances are also gradually improved. Especially in recent decades, with the continuous development and progress of chromatography, mass spectrometry and spectrum technology, the detection of bioactive substances in soybean has made great progress, the detection methods are more advanced, and the qualitative and quantitative detection methods are more scientific, rigorous and efficient. The progress of detection technology will promote the deeper development and utilization of bioactive substances in soybean, and make greater contribution to human nutrition and health. This paper reviewed the types and functions of bioactive components in soybean and the progress of detection technology of bioactive components in soybean, and it provides a reference for the future quality and safety control and more in-depth scientific research of soybean bioactive substances.

KEY WORDS: soybean; bioactive components; detection technology

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1601905)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Projects(2017YFC1601905)

*通信作者: 史永革, 硕士, 研究员级高级工程师, 主要研究方向为大豆深加工。E-mail: shiyongge@263.net

*Corresponding author: SHI Yong-Ge, Master, Professor, Jiusan Grains and Oils Industry Group Co., Ltd., No.386, Changjiang Road, Nangang District, Harbin 150090, China. E-mail: shiyongge@263.net

0 引言

大豆原产于中国,由乌苏里大豆衍生而来,在我国有5000年的种植历史。大豆中不仅含有蛋白质、脂肪、维生素、矿物质等基本营养物质,而且含有磷脂、甾醇、异黄酮、皂甙、低聚糖、维生素E等多种生物活性成分^[1]。生物活性成分的提取与应用是近年世界范围内大豆研究的热点,随着技术的不断进步,生物活性成分的纯度越来越高、产品质量越来越好,部分活性成分实现产业化,在大豆食品、大豆保健品中得到了广泛应用^[2]。生物活性成分的检测不同于基础营养物质,蛋白质、脂肪等基础营养物质的检测方法已经非常成熟,而有些生物活性成分的检测方法还在不断的研究和完善过程中^[3-4]。随着光谱、色谱、质谱等检测手段的不断进步,大豆中生物活性物质的分析技术取得了很大进展。本文从大豆中生物活性成分的种类和功能性出发,对生物活性成分的来源、制备方法和应用领域进行综述,并对大豆中生物活性成分研究过程中采用的检测方法进展进行介绍,以便于读者在较短时间内了解这方面的研究现状,为大豆生物活性物质未来的质量控制和更加深入的科学研究提供参考。

1 大豆中生物活性成分的种类与功能性

1.1 大豆磷脂

大豆磷脂来源于大豆油水化脱胶过程中产生的油脚,是大豆油加工的副产物。目前,商业化的大豆磷脂产品主要有浓缩磷脂和粉末磷脂2种^[5]。油脚经薄膜蒸发器在高温、真空状态下脱水,加工制成大豆浓缩磷脂。浓缩磷脂呈粘稠状的液态,含有40%左右的大豆油,大多作为食品添加剂或饲料添加剂,应用在巧克力、饼干、动物饲料中^[6]。粉末磷脂又称脱油磷脂,是大豆浓缩磷脂采取丙酮萃取或超临界萃取的方法,进一步脱除所含有的40%左右油脂,得到的纯度95%以上的粉末状磷脂产品。大豆粉末磷脂是一种性能优良的乳化剂,在乳饮料、婴幼儿配方奶粉、烘焙食品等产品中有着广泛的应用^[7-8]。

大豆磷脂由磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)、磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositol, PI)、磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline, PC)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine, PS)几种主要组分构成,具有亲水、亲油的双重特性,是一种天然的乳化剂,多作为食品添加剂应用在食品中。大豆磷脂还具有活化细胞、软化血管、调节血脂、预防心脑血管疾病的生物活性。目前,大豆磷脂已被加工成冲剂类、软胶囊类保健品^[9]。

1.2 大豆甾醇

大豆甾醇是植物甾醇的一种,从豆油脱臭馏出物中

提取,主要由 β -谷甾醇(46.9%)、菜油甾醇(25.5%)、豆甾醇(27.6%)3种组分组成,不溶于水,油中溶解度1%左右^[10-11]。大豆甾醇本身无毒,动物实验以及临床实验研究表明,大豆甾醇具有降低胆固醇、抗氧化、消炎、防癌等多种生物活性^[12-13]。

2010年,我国卫生部批准植物甾醇和植物甾醇酯为新资源食品,植物甾醇建议食用量为 ≤ 2.4 g/d,植物甾醇酯的建议食用量为 ≤ 3.9 g/d。因此,大豆甾醇可以以游离态或者甾醇酯的形式直接加入到食用油、人造奶油中,作为普通食品食用^[14]。

1.3 大豆维生素E

维生素E(VE)又名生育酚,存在于植物组织的绿色部分和禾本科种子的胚芽中,作为一种常用药、营养保健品及抗氧化剂,广泛应用于医疗、化妆品、食品和饲料工业。大豆来源的VE是一种天然维生素,主要成分为 α -VE、 β -VE、 γ -VE、 δ -VE 4种^[15]。由于结构和构型上的差异,不同的VE组分所显示出的生理活性和特殊的化学性质也有所不同,各种组分在生物体内的活性强弱顺序是: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ 。因此,医学、食品、饲料等用途的VE均以 α 型为基础^[16]。近年来,国内外专家学者对维生素E的生理和药理作用进行了更深入的研究,发现VE能参与机体多方面的代谢过程,作用广泛而复杂,并认为它具有不少和人参相类似的作用,临床价值日显重要,用途甚多,已涉及到内、外、妇、儿、传染、皮肤、放射各科,成为现代流行的药物^[17]。自VE问世以来,它特有的生理功能,使之在医药、食品、化妆品、饲料等工业领域的应用日益扩大,成为国际市场上发展最快的维生素之一。

1.4 大豆异黄酮

大豆中异黄酮的含量约占大豆籽粒质量的0.05%~0.70%。自从1931年WATZ用90%甲醇从大豆中首次提取分离出大豆异黄酮糖苷以来,现已分离出3种异黄酮苷元和9种异黄酮糖苷,其中的6种是大豆异黄酮的主要组分^[18-19]。大豆异黄酮糖苷和异黄酮苷元具有许多重要的生理活性,除具有抗肿瘤作用外,还能抗氧化、抗溶血,对心血管疾病、骨质疏松症以及更年期综合症具有预防甚至治愈作用^[20]。此外,大豆异黄酮作为植物雌激素可以提高动物的免疫功能,改善动物体内的生理过程和繁殖能力。近年来,国外的研究发现,一直被视为抗营养因子的大豆异黄酮具有与动物体内源雌激素相似的结构,对雌激素依赖的疾病有较好的预防和治疗作用^[21]。

大豆异黄酮在大豆中主要以糖苷形式存在,人体摄入大豆及其制品后,异黄酮糖苷在肠道中经糖苷酶分解,释放出糖苷和具有生物活性的糖苷配基,这些活性物质在肠道被直接吸收或被转化成雌马酚等代谢物进入血液^[22]。

人体摄入大豆制品几个小时后, 血浆的异黄酮浓度升高, 血液中的异黄酮浓度与大豆食物中异黄酮浓度存在相关性, 尿液、粪便、乳汁中均含有较高含量的异黄酮物质^[23]。美国、日本等国家把异黄酮作为添加剂用于保健食品、医药制品及功能助剂等产品和制品的生产。

1.5 大豆皂甙

大豆皂甙是以大豆、大豆粕或大豆胚芽为原料提取出来, 由低聚糖与齐墩果烯三萜缩合形成的一类由 5 种大豆皂甙元组成的化合物分子^[24]。近年来, 世界上许多专家、学者对大豆皂甙的理化性质、生物功能性进行了研究, 结果表明大豆皂甙具有降血脂、抗氧化、抗病毒、防血栓形成、增强机体免疫力的生物活性^[25]。

大豆皂甙是两亲性化合物, 有发泡性和乳化性, 是一种天然的食品添加剂, 可以改善食品的色、香、味。大豆皂甙加到啤酒、易起泡性的饮料中, 可增加泡沫体积, 保持泡沫的稳定性, 有利于改善啤酒、饮料的风味。日本的一些学者在食品中添加大豆皂甙的研究较为深入, 开发研制了富含大豆皂甙的保健食品、减肥食品及大豆皂甙饮料等^[26]。在医药行业, 大豆皂甙应用于医药领域前景广阔。目前大豆皂甙制成的胶囊、霜剂用来治疗口腔溃疡、疱疹性口唇炎, 在抑制血栓形成、减肥、抗癌、抗病毒等方面也有应用, 均取得了满意的临床效果^[27]。

1.6 大豆低聚糖

大豆低聚糖是一种广泛存在于豆科植物中的碳水化合物, 它是由水苏糖、棉子糖和蔗糖三种低分子糖按一定比例组成的混合物, 占大豆固形物的 7%~10%, 可以以大豆、大豆粕、大豆胚芽为原料生产^[28]。

大豆低聚糖最重要的作用是能够作为与人的生长、机体的新陈代谢息息相关的双歧杆菌的最好增殖物质, 被誉为“双歧因子”。食用双歧因子是改善人体内菌群结构, 促使体内双歧因子增殖的有效方法^[29]。因此, 低聚糖受到人们的重视而广泛应用于食品和饲料生产。

目前, 国际上对于低聚糖的研究有了飞跃发展, 各种化学结构与含量均可检测, 应用范围不断开拓, 以高科技为背景的新功能性低聚糖的开发应用, 已成为生物技术领域研究的新热点^[30]。1988 年大豆低聚糖在日本正式上市, 产品有糖浆、粉末、颗粒剂等。据报道 1996 年, 世界各种低聚糖的产量已经达到 85000 t, 并已普遍应用到各种保健食品、营养食品中。在日本和欧洲, 以功能性低聚糖开发的产品多达 400~500 种, 如日本市场较有名的“Oligo CC”功能饮料中主要致甜成分为低聚糖, 最高年销售 9000 万瓶。欧洲的低聚糖功能食品有比利时的 FYOS 饮料和西班牙的 Seltess 乳品^[31-32]。此外, 美国、荷兰、比利时、瑞典、英国均有大学和研究机构相继开

始了低聚糖的研究。

2 大豆中生物活性成分的检测方法

2.1 大豆磷脂检测方法

2.1.1 丙酮不溶物法

目前, 大豆精深加工产生浓缩磷脂和粉末磷脂 2 种商业化产品。大豆浓缩磷脂和大豆粉末磷脂产品的纯度以丙酮不溶物为指标进行评价, 丙酮不溶物以百分含量计算, 指的是磷脂中不溶于丙酮的物质的质量与不溶于乙醚的物质的质量之差占试样总质量的质量分数^[33]。其检测过程是先使用乙醚溶解磷脂的可溶物, 用 G3 玻璃砂芯漏斗过滤, 分离出乙醚不溶物, 称取乙醚不溶物质量。然后, 用冷丙酮洗除磷脂中的油脂等丙酮可溶物, 再扣除乙醚不溶物, 剩余物为丙酮不溶物^[34]。这种检测方法具有一定的科学性和可操作性, 但略显粗放, 严谨性稍差, 且丙酮不溶物法无法进行磷脂组分的检测。

2.1.2 磷脂组分析法

大豆磷脂含有磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酸(phosphatidyl acid, PA)、溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)等多种组分, 目前多采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)进行磷脂中不同组分含量的检测, 液相色谱法又分为液相色谱-紫外检测器法(HPLC-ultraviolet, HPLC-UV)和液相色谱-蒸发光散射检测器法(HPLC-evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD)。HPLC-UV 法采用的是 UV 检测器, 正向硅胶色谱柱, 流动相是正己烷+异丙醇+1%乙酸水溶液的混合溶液(8:8:1, V:V:V), 这种方法能检测出 PE、PI、PC 三种组分, 检测稳定性较好, 但检测时间长(40 min 左右), PC 组分的色谱峰易出现肩峰, 分离度稍差^[35-36]。HPLC-ELSD 法采用的是 ELSD 检测器, 正向硅胶色谱柱, 流动相是 A 相(正己烷+异丙醇+乙酸水溶液+三乙胺水溶液的混合溶液)与 B 相(异丙醇+乙酸水溶液+三乙胺水溶液的混合溶液)梯度洗脱^[37]。这种检测方法能检测出 PA、PE、PC、PI、LPC 5 种组分, 且检测时间短(20 min 左右), 各组分分离度好。缺点是检测重现性较差, 氮气消耗量大, 检测成本较高。

2.1.3 磷含量检测法

现代食用植物油制取工业中磷脂含量是毛油的一个重要指标, 多数的大豆油脂加工企业会限定大豆毛油中磷脂含量 ≤ 200 mg/kg。毛油中磷脂含量的检测是先将液体毛油试样在电炉上灼烧成炭黑状, 然后置于马弗炉中 550 °C 条件下烧成白色灰状物质, 此过程中磷脂经过充分燃烧转化成了磷元素。磷在酸性条件下再与钼酸铵反应生成磷钼酸铵, 磷钼酸铵继续与亚硫酸钠、对苯二酚反应生成蓝色化合物钼蓝。钼蓝在 660 nm 处的吸光度值与磷的浓度成

正比,用分光光度计测定试样溶液的吸光度,与磷酸二氢钾标准曲线比较定量^[38]。这种方法适用于低磷脂含量食品的检测,检测精度和准确度较好,但对磷脂含量高的食品则不适用。

2.2 大豆甾醇检测方法

植物甾醇的种类很多,高达250多种,仅大豆中甾醇的组分就有10余种, β -谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇3种组分含量占大豆甾醇总含量的99%,其他组分仅占1%左右^[39]。甾醇的检测方法主要有气相色谱法、液相色谱法、气相色谱质谱法、紫外分光光度法,其中紫外分光光度法已较少使用,检测方法的建立向着快速、准确、高分辨率、多组分同时检测的方向发展。

2.2.1 气相色谱法

气相色谱法(gas chromatography, GC)在植物甾醇的检测中应用较多,文献报道中多采用的是内标法,达到对大豆甾醇中各组分定性、定量的目的。样品和内标物先用氢氧化钾-乙醇溶液在加热、回流的条件下皂化,皂化液加入到氧化铝层析柱,用溶剂洗涤进行固相萃取分离。氧化铝层析柱将皂化液中的脂肪酸阴离子吸附,而大豆甾醇则流出层析柱。旋转蒸发去除掉不皂化物中的溶剂后,采用薄层色谱板分离法,将大豆甾醇与其他的不皂化物分离。最后以桦木醇为内标物,通过样品和内标物气相色谱峰的保留时间对甾醇组分进行定性,通过色谱峰峰面积进行总含量的定量^[40]。GC法的优点是检测灵敏度高,能检测出甾醇组分的种类多,检出限可以达到很低的数值。缺点是检测方法的前处理过程很繁琐,需要皂化、薄层色谱分离、硅烷化衍生等步骤,前处理阶段花费时间较长。

2.2.2 HPLC法

随着现代分析技术的不断进步,HPLC法在大豆甾醇以及大豆甾醇酯检测上的应用逐渐展开,且检测方法向着前处理简单、多组分同时检测的方向发展。液相色谱法采用常用的UV检测器,检测波长210 nm。液相色谱法在流动相的选用上有所不同,较早期的文献报道采用传统的甲醇流动相或乙腈+水流动相,传统流动相的极性较强,检测时间短,但对甾醇组分的分离度不是很好^[41]。近年来,HPLC法在流动相的选用上进行了改进,采取乙腈+丙酮[1:3(V:V)的比例]的方式降低了流动相极性。改进后的HPLC法除了可以进行甾醇组分的检测,还可以对不同种类的甾醇酯组分定量^[42]。与GC法相比,HPLC法的前处理过程操作简单,将样品直接用流动相溶解,滤垫过滤后可以直接上机检测,但HPLC法的检测灵敏度稍差,检出限的数值稍高。

2.2.3 气相色谱-质谱法

气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectro

metry, GC-MS)的检测过程与GC法相似,也是采取氢氧化钾-乙醇皂化、固相萃取柱净化、硅烷化试剂衍生,不同之处在于使用胆甾醇为内标物,并省略了薄层色谱分离的处理步骤^[43]。处理完成的试样经GC-MS检测,会得到总离子流色谱图和质谱图。对于有商业化标准品的甾醇组分(如 β -谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇),可根据其标准品对应的保留时间和质谱图进行定性分析。由于质谱具有标准质谱图谱库,GC-MS法还具有一个较大的定性优势,对其他不易购买到商业标准品的甾醇组分,可将试验样品所得质谱图与谱库进行比对,结合保留时间进行定性。GC-MS法也可定量,对衍生后的试样,经GC-MS分别测定在提取离子条件下的峰面积,根据内标物的峰面积和质量浓度进行含量计算。GC-MS法定量方面的优点在于检测灵敏度高,能够定量分析的甾醇组分种类多。

2.3 大豆维生素E检测方法

2.3.1 HPLC法

HPLC法应用于VE的检测,有正向和反向之分。反向HPLC法应用更多,采取常用的甲醇(100%)和甲醇:水(98:2, V:V)为流动相, C₁₈型色谱柱,UV或二极管阵列检测器,波长290 nm^[44]。正向HPLC法采用Si₆₀型硅胶色谱柱,以正己烷+1,4-二氧六环(97:3, V:V)为流动相,UV或二极管阵列检测器,波长295 nm。正向HPLC法也可采用荧光检测器,激发波长298 nm,发射波长325 nm^[45]。VE是脂溶性维生素,检测大豆中VE含量时通常需要先先将大豆粉碎,充分提取其中所含有大豆油,然后检测大豆油中VE含量,如果是大豆油产品则直接检测油脂中VE含量即可。样品的前处理一般采用皂化、提取、浓缩的方法,也可以采取流动相浸泡、超声波振荡直接提取。皂化处理法去除了脂肪酸、甘油三酯等杂质,杂峰少,不易污染色谱柱,检测效果好^[46]。直接提取法则溶解了部分油脂,易污染色谱柱,得到的色谱峰杂峰多,检测效果稍差。对 α -VE、 β -VE、 γ -VE、 δ -VE 4种组分,正向法和反向法的出峰顺序有所不同,反向法的顺序为 δ -VE、 γ -VE、 β -VE、 α -VE,这2种HPLC法的检测时间均较短,一般20 min内即可完成大豆VE的分析。

2.3.2 GC法

HPLC法在VE各组分的含量检测上应用很多,相对而言GC法则发展较晚,且GC-MS法也在逐渐探索,但GC法应用上还达不到HPLC法的水平^[47]。GC法采用氢火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID), DB-5或HP-5毛细管色谱柱,以正三十二烷为内标物,内标法定量,可单独进行VE各组分的含量检测,也有将VE和其他各组分同时定量的报道^[48-49]。GC-FID法和GC-MS法的样品前处理和HPLC法相同,也需要将油脂样品进行皂化、提取、纯化,然后上机检测。GC法的总体优势

在于方法的检出限更低、灵敏度更高,更加适合低含量样品中 VE 组分的检测。

2.4 大豆异黄酮检测方法

大豆异黄酮的检测一般采用 HPLC-UV 法,分别取大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素 6 种异黄酮组分的标准品,配制 5 个不同浓度的标准溶液。试样大豆经粉碎、过筛、混匀后,称取样品 0.2 g,用 80%~90%的甲醇水溶液(或 80%的乙醇水溶液)超声波振荡提取,提取液经过滤后定容至 50 mL 容量瓶中,在 UV 波长 254 nm 条件下, HPLC 进样 10~20 μ L 测定,外标法定量^[50]。由于异黄酮的组分较多,不同组分的极性差异较大, HPLC 法的流动相多采用乙腈+磷酸水溶液或乙腈+乙酸水溶液梯度洗脱的方式^[51-52]。乙腈+磷酸水溶液梯度洗脱的检测方式用时较长,约需要 45 min;乙腈+乙酸水溶液梯度洗脱的方式则用时较短,25 min 时间内便可将 6 种组分完全分离。HPLC-UV 法检测结果重现性好,分离度高,检测时间略长。随着现代色谱技术的发展,超高效液相色谱法(ultra high performance liquid chromatography, UHPLC)和液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)已经应用于大豆异黄酮的检测, UHPLC-UV 法检测时间更短,分离效果更高; LC-MS 法的检出限更低,检测精度更高^[53-54]。

2.5 大豆皂甙检测方法

大豆皂甙结构复杂,种类繁多,5 种皂甙元和 6 种单糖组成了 A 族、B 族、E 族和 DDMP 族大豆皂甙。因此,大豆皂甙的分析和检测存在一定的难度。

2.5.1 紫外分光光度法

紫外分光光度法的检测原理是:大豆皂甙在强酸催化下与香草醛发生显色反应,并在 560 nm 处产生吸收,因此,在此波长处测定其吸光度值对其进行定量。样品用 50%甲醇水溶液溶解,在酸性条件下水解,以乙酸乙酯萃取出皂甙的甙元,然后与香草醛、高氯酸反应显色,在 560 nm 波长下测定吸光度,与标准曲线比较定量^[55]。这种方法操作较简便,以一种或多种不同浓度的大豆皂甙组分的标准溶液来制作标准曲线,定出的含量是大豆皂甙的总含量。这种检测方法的相对标准偏差是 2.29%,平均加标回收率为 99.15%,可用于豆粉、腐竹、豆腐、豆皮、豆腐干、豆芽等多种豆制品中大豆皂甙含量的检测。但方法的定量方式略显粗放,且无法测定出每一种大豆皂甙组分的具体含量。

2.5.2 HPLC 法

皂甙分子不容易被气化,且在高温下会发生裂解,因此 GC 法在大豆皂甙检测中的应用受到了限制。又由于大

豆皂甙不易挥发、极性很强, HPLC 法在大豆皂甙的分析中得到了广泛应用。HPLC 法的研究很多,有 HPLC-UV 法、HPLC-ELSD 法和 HPLC-MS 法。这些方法的前处理和色谱条件相似,不同之处在于检测器的选用。试样用 80%乙醇溶解后,经 0.45 μ m 滤膜过滤,采用 C₁₈ 反相键合色谱柱,甲醇+水+甲酸或乙腈+水+三氟乙酸为流动相,根据各组分色谱峰峰面积定量,计算大豆皂甙各单体的含量之和为大豆皂甙含量^[56-57]。HPLC 法的样品需用量少、前处理简单,可对各种不同组分进行定量,结果相对准确可靠。HPLC-UV 法可以对 B 族和 DDMP 族大豆皂甙进行分离,日内变化系数和日间变化系数分别不超过 7.9%和 9.0%^[56]。HPLC-ELSD 法可以对 4 种大豆皂甙组分进行分离,这种方法的定量限为 10.4~14.2 mg/mL,回收率为 96.8%~101.0%^[57]。最近几年, HPLC-MS 法的研究和应用较多,这种方法更适合动物血浆、代谢产物中痕量大豆皂甙的检测^[58]。

2.6 大豆低聚糖检测方法

大豆低聚糖含量的检测是采用 HPLC 法,UV 或示差折光检测器(differential refractive detector, RID),氨基色谱柱,流动相是甲醇+水(92%+8%)或乙腈+水(80%+20%),低聚糖总含量以半乳糖、甘露糖、棉子糖、水苏糖、果糖、葡萄糖、蔗糖等成分的含量之和来计算。待测试的样品首先用 80%乙醇充分溶解,微孔滤膜过滤后,反相 HPLC 法进行测定^[59]。目前大豆低聚糖的检测方法还不是非常成熟,实际的实验过程中发现, HPLC 法的基线不稳定,各组分色谱峰的重现性差,精密度和回收率不是很好,有待进一步的研究和改进。

3 展望

大豆中含有磷脂、甾醇、VE、异黄酮、皂甙、低聚糖等多种生物活性物质,是功能性因子的宝库。除了上述提到的生物活性物质外,大豆多肽、大豆膳食纤维、大豆蛋白等其他生物活性物质的研究也在大量的探索中。生物活性物质的功能性已逐渐清晰,这些物质的分析和检测方法也在逐步的完善中。未来,随着色谱、质谱、光谱技术的不断发展和进步,大豆中生物活性物质的检测手段会更加的先进,定性和定量的检测方法也会更加科学、严谨、高效。检测技术的进步,也会促进大豆中生物活性物质的深度开发和利用,让大豆为人类的营养和健康做出更大贡献。

参考文献

- [1] 孙磊. 新时代背景下发展中国大豆科技和振兴大豆产业策略分析[J]. 大豆科技, 2020, 4: 20-23.

- SUN L. Strategy analysis of developing Chinese soybean science and technology and revitalizing soybean industry under the background of new era [J]. *Soybean Sci Technol*, 2020, 4: 20–23.
- [2] SUNG DO, YUNSOO Y, SO YL, *et al.* A comparison of the characteristic properties between soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) seeds with different seed coat colors [J]. *Acta Univ Agric*, 2019, 46(4): 971–980.
- [3] HAN JC, CHANG SW, YU HC, *et al.* Rapid determination of isoflavones and other bioactive compounds in soybean using SWATH-MS [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1103(3): 122–133.
- [4] BERHOW MA, SINGH M, BOWMAN MJ, *et al.* Quantitative NIR determination of isoflavone and saponin content of ground soybeans [J]. *Food Chem*, 2020, 317:126–137.
- [5] SCHOLFIELD CR. Composition of soybean lecithin [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1981, 58(10): 889–892.
- [6] RYDHAG L, WILTON I. The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1981, 58(8): 830–837.
- [7] YIP SHH, ASHRAF KM, TAYLOR LT. Analytical scale supercritical fluid fractionation and identification of single polar lipids from deoiled soybean lecithin [J]. *J Sep Sci*, 2015, 31(8): 1290–1298.
- [8] JANGLE RD, MAGAR VP, THORAT BN. Phosphatidylcholine and its purification from raw de-oiled soya lecithin [J]. *Sep Purif Technol*, 2013, 102: 187–195.
- [9] MANJULA S, SUBRAMANIAN R. Laboratory studies on membrane deoiling of lecithin [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2008, 85(6): 573–580.
- [10] FUMING Y, SAMSON AO, YING M. Novel synthesis of phytosterol ester from soybean sterol and acetic anhydride [J]. *J Food Sci*, 2016, 81(7): 1629–1635.
- [11] YANG H, YAN F, WU D, *et al.* Recovery of phytosterols from waste residue of soybean oil deodorizer distillate [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(5): 1471–1476.
- [12] WOLFS M, DE JN, OCKÉ MC, *et al.* Effectiveness of customary use of phytosterol/-stanol enriched margarines on blood cholesterol lowering [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(10): 1682–1688.
- [13] BRUFAU G, CANELA MA, RAFECAS M. Phytosterols: Physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties [J]. *Nutri Res*, 2008, 28(4): 217–225.
- [14] FUMING Y, SAMSON AO, WEILI X, *et al.* *In vitro* bioaccessibility and physicochemical properties of phytosterol linoleic ester synthesized from soybean sterol and linoleic acid [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2018, 92: 265–271.
- [15] YOSHIDA H, KAJIMOTO G. Effects of microwave energy on the tocopherols of soybean seeds [J]. *J Food Sci*, 2010, 54(6): 1596–1600.
- [16] WINKLER-MOSER JK, LOGAN A, BAKOTA EL. Antioxidant activities and interactions of α - and γ -tocopherols within canola and soybean oil emulsions [J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2014, 116(5): 606–617.
- [17] MAWANG CI, LIM YY, ONG KS, *et al.* Identification of α -tocopherol as a bioactive component of dicranopterislinearis with disrupting property against pre-formed biofilm of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Appl Microbiol*, 2017, 123(5): 1148–1159.
- [18] ELDRIDGE AC, KWOLEK WF. Soybean isoflavones: Effect of environment and variety on composition [J]. *J Agric Food Chem*, 1983, 31(2): 394–396.
- [19] DRAPIER FE. Soybean isoflavones [J]. *Repro Humaet Horm*, 2004, 17(4): 299–331.
- [20] ANTHONY MS, CLARKSON TB, HUGHES CL, *et al.* Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys [J]. *Nutr J*, 1996, 126(1): 43–50.
- [21] NAIM M, GESTETNER B, ZILKAH S, *et al.* Soybean isoflavones: Characterization, determination, and antifungal activity [J]. *J Agric Food Chem*, 1974, 22(5): 806–811.
- [22] XIA X, HARRIS KS, HUEI JW, *et al.* Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women [J]. *Nutr J*, 1995, (9): 2307–2315.
- [23] SHAW W, MOMOKO Y, TOMOTAKA S, *et al.* Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako) [J]. *Nutr J*, 1998, (10): 1710–1715.
- [24] MARK AB, CHARLES LC, SANDRA MD, *et al.* Analysis and quantitative determination of group B saponins in processed soybean products [J]. *Phytochem Anal*, 2002, 13(6): 343–348.
- [25] BERHOW MA, WAGNER ED, VAUGHN SF, *et al.* Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins [J]. *Mutat Res*, 2000, 448(1): 11–22.
- [26] YOSHIKI Y, KUDOU S, OKUBO K. Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 1998, 62(12): 2291–2299.
- [27] JI HK, IN HH, MI KS, *et al.* Soybean saponin inhibits tumor cell metastasis by modulating expressions of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 [J]. *Cancer Lett*, 2008, 261(1): 84–92.
- [28] LOWELL CA, KUO TM. Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds [J]. *Crop Sci*, 1989, 29(2): 459–465.
- [29] HAYAKAWA K, MIZUTANI J, WADA K, *et al.* Effects of soybean oligosaccharides on human faecal flora [J]. *Micro Eco Heal Dis*, 2009, 3(6): 293–303.
- [30] CHEN H, LIU LJ, ZHU JJ, *et al.* Effect of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats [J]. *Food Chem*, 2010, 119(4): 1633–1636.
- [31] CRUZ R, PARK YK. Production of fungal α -Galactosidase and its

- application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk [J]. *J Food Sci*, 2010, 47(6): 1973–1975.
- [32] WADA K, WATABE J, MIZUTANI J, *et al.* Effects of soybean oligosaccharides in a beverage on human fecal flora and metabolites [J]. *Microb Ecol Health Dis*, 1992, 66(2): 127–135.
- [33] EL SY, ALY SM. Soybean lecithin: Acetone insoluble residue fractionation and their volatile components [J]. *Grasas Y Actes*, 2002, 53(3): 319–324.
- [34] SMILES A, KAKUDA Y, MACDONALD BE. Effect of degumming reagents on the composition and emulsifying properties of canola, soybean and sunflower acetone insolubles [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1989, 66(3): 348–352.
- [35] WU LQ. Analysis of phosphatidylcholine in soybean lecithins by HPLC [J]. *Chem Ind Tim*, 2008, 11: 35–38.
- [36] MURAKAMI C, WAKEBE M, MARUYAMA T, *et al.* Determination of phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl choline and lyso-types in foods by HPLC [J]. *J Jap Oil Chem Soc*, 1999, 48(8): 801–806.
- [37] BROUWERS JFHM, GADELLA BM, GOLDE LMGV, *et al.* Quantitative analysis of phosphatidylcholine molecular species using HPLC and light scattering detection [J]. *J Lipid Res*, 1998, 39(2): 344–348.
- [38] RACICOT LD, HANDEL AP. Degumming of soybean oil: Quantitative analysis of phospholipids in crude and degummed oil [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1983, 60: 1098–1101.
- [39] YEBOAH SO, MITEI YC, NGILA JC, *et al.* Compositional and structural studies of the major and minor components in three cameroonian seed oils by GC-MS, ESI-FTICR-MS and HPLC [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2011, 88(10): 1539–1549.
- [40] SAMANTHA D, NORBERT S, SAMAN B, *et al.* Rapid measurement of phytosterols in fortified food using gas chromatography with flame ionization detection [J]. *Food Chem*, 2016, 211: 570–576
- [41] NZEKOU AFK, CAPRIOLI G, RICCIUTELLI M, *et al.* Development of an innovative phytosterol derivatization method to improve the HPLC-DAD analysis and the ESI-MS detection of plant sterols/stanols [J]. *Food Res Inter*, 2020, 131: 1089–1098.
- [42] ISHIDA N. A method for simultaneous analysis of phytosterols and phytosterol esters in tobacco leaves using non aqueous reversed phase chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry detector [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1340: 99–108.
- [43] ZHANG X, JULIEN DD, MIESCH M, *et al.* Identification and quantitative analysis of β -sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Steroids*, 2005, 70(13): 896–906.
- [44] MOSTOW ND, ONEILL R, NOON DL, *et al.* Determination of α -tocopherol in rat liver by high-performance liquid chromatography utilizing ultraviolet detection [J]. *J Chromatogr B*, 1985, 344: 137–143.
- [45] LIN J, MIN Q, REN LP, *et al.* Simultaneous determination of four kinds of tocopherol in ethyl polyenoate soft capsules by HPLC with fluorescence detection [J]. *Chi J Pharm Anal*, 2015, 10: 27–29.
- [46] WARNER K, MOUNTS TL. Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1990, 67(11): 827–831.
- [47] KMOSTAK S, KURTZ DA. Rapid determination of supplemental vitamin E acetate in feed premixes by capillary gas chromatography [J]. *J AOAC Int*, 1993, 76(4): 735–741.
- [48] BALLESTEROS E, GALLEGO MMV. Gas chromatographic determination of cholesterol and tocopherols in edible oils and fats with automatic removal of interfering triglycerides [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 719(1): 221–227.
- [49] LU D, YANG Y, SUN C, *et al.* Determination of tocopherols and tocotrienols in cereals and nuts by dispersive solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Method*, 2019, 11(42): 5439–5446.
- [50] ELDRIDGE AC. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates, and isolates [J]. *J Agric Food Chem*, 1982, 30(2): 353–355.
- [51] NIAMNUY C, NACHAISIN M, LAOHAVANICH J, *et al.* Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions [J]. *Food Chem*, 2011, 129(3): 899–906.
- [52] KLEJDUS B, RADKA M, JITKA P, *et al.* Determination of isoflavones in soy bits by fast column high-performance liquid chromatography coupled with UV-visible diode-array detection [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1084(1): 71–79.
- [53] KORNELIJA L, MORNAR A, BILJANA N. Quality by design (QbD) approach for the development of a rapid UHPLC method for simultaneous determination of aglycone and glycoside forms of isoflavones in dietary supplements [J]. *Anal Method*, 2020, 12(16): 2082–2092.
- [54] YUAN Y, XIN M, TENG L, *et al.* Quantification of isoflavone glycosides and aglycones in rat plasma by LC-MS/MS: Trouble shooting of interference from food and its application to pharmacokinetic study of semen sojæ præparatum extract [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2018, 161: 444–454.
- [55] Chen YJ, Zhang YZ, LU RM, *et al.* Optimization of processes for recovery of soyasaponins from bean product waste by orthogonal design [J]. *Chi Tra Herb Drug*, 2001, 7: 30–35.
- [56] HUBERT J, BERGER M, DAYDÉ J. Use of a simplified HPLCUV analysis for soyasaponin B determination: Study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(10): 3923–3930.
- [57] MARKUS G, HERMANN S, KHAN IA. Simultaneous determination of

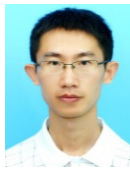
saponins and isoflavones in soybean (*Glycine max* L.) by reversed-phase liquid chromatography with evaporative light-scattering and ultraviolet detection [J]. *J AOAC Int*, 2004, 87(5): 1189-1194

[58] JIN M, YANG Y, SU B, *et al.* Determination of soyasaponins Ba and Bb in human serum by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 846(1-2): 169-175.

[59] HUA C, LIU LJ, ZHU JJ, *et al.* Chemical composition analysis of soybean oligosaccharides and its effect on ATPase activities in hyperlipidemic rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 46(2): 229-231.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



杨福明, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品脂质。

E-mail: yfmhj@163.com



史永革, 硕士, 研究员级高级工程师, 主要研究方向为大豆深加工。

E-mail: shiyongge@263.net

“天然产物综合利用与检测”专题征稿函

天然产物是指由动物、植物或昆虫、海洋生物和微生物体内分离出来的生物二次代谢产物及生物体内源性生理活性化合物。近年来随着养生理念逐渐深入人心, 天然产物对健康促进作用的相关研究也获得了越来越多的关注。此外, 茶多酚、香辛料、壳聚糖、细菌素等天然产物在食品的护色保鲜领域也起着重要的作用。我国是天然资源大国, 也是应用天然产物历史最悠久的国家之一。如何充分发挥我国的资源优势, 从而更好地利用我国丰富的自然资源, 是亟待解决问题。

鉴于此, 本刊特别策划了“天然产物综合利用与检测”专题。专题将围绕天然产物的作用机理、分离鉴定、分析提纯、活性评价以及天然产物综合利用与检测等, 或您认为本领域有意义的问题综述及研究论文均可, 专题计划在 2021 年 4 月出版。

本刊主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员与本专题主编吕兆林教授特邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 综述、研究论文和研究简报均可。请在 2021 年 2 月 28 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**天然产物综合利用与检测**):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者

登录-注册投稿-投稿栏目选择“2021 专题: 天然产物综合利用与检测”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: 天然产物综合利用与检测专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部