

超高效液相色谱法同时测定保健品中 4种大豆异黄酮

吴俊发*, 谭健辉, 马鑫

[广州检验检测认证集团有限公司, 国家加工食品质量检验中心(广东), 广州 511447]

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)同时测定保健品中大豆苷(daidzin)、染料木苷(genistin)、染料木素(daidzein)和大豆素(genistein)4种大豆异黄酮的分析方法。**方法** 样品用80%甲醇超声提取后,以甲醇-0.1%磷酸水(V/V)作为流动相梯度洗脱分离,使用二极管阵列检测器(photo-diode array, PDA)于260 nm波长下测定。**结果** 4种大豆异黄酮在1.0~50 mg/L范围内,标准曲线线性良好,相关系数 r^2 均大于0.999。平均回收率为86.7%~106%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为1.31%~6.32%。方法检出限为0.5~1.0 mg/kg,方法定量限为1.5~3.0 mg/kg。**结论** 该方法回收率高,灵敏度高,且操作简单,快速高效,可应用于实际样品测定。

关键词: 超高效液相色谱法; 保健品; 大豆异黄酮

Simultaneous determination of 4 kinds of soybean isoflavones in health products by ultra performance liquid chromatography

WU Jun-Fa*, TAN Jian-Hui, MA Xin

[Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Co., National Quality Testing Center for Processed Food (Guangdong), Guangzhou 511447, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 4 soybean isoflavones in health products included daidzin, genistin, daidzein and genistein by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Method** Samples were ultrasonic extracted by 80% methanol-water, then separated by methanol-0.1% phosphoric acid-water (V/V) as mobile phase with gradient elution, finally detected by photo-diode array detector under the wavelength of 260 nm. **Results** The standard curve of four soybean isoflavones exhibited a good linearity in the concentration range of 1.0–50 mg/L, while the correlation coefficient (r^2) were both greater than 0.999. Moreover, the average recoveries were ranged from 86.7% to 106% with the relative standard deviations were ranged from 1.31% to 6.32%. The limits of detection and the limits of quantitation were 0.5–1.0 mg/kg and 1.5–3.0 mg/kg respectively. **Conclusion** This method has high recovery rate and high sensitivity. It is simple operation, fast and efficient that can be applied to actual determination.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography; health products; soybean isoflavones

*通信作者: 吴俊发, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 791291497@qq.com

*Corresponding author: WU Jun-Fa, Assistant Engineer, Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Co., Ltd, 1-2 Zhujiang Avenue, Shilou Town, Panyu District, Guangzhou 511447, China. E-mail: 791291497@qq.com

0 引言

大豆异黄酮(soybean isoflavone, SIF)是存在于植物中的雌激素,是由大豆生长过程中次生代谢产生的^[1]。能够调节生物体内分泌和代谢紊乱等问题,降低垂体激素水平^[2],同时可减轻多囊卵巢综合症大鼠的体质量,改善胰岛素抵抗现象,血清激素紊乱情况,体内慢性炎症状态^[3]。高剂量的大豆异黄酮更有显著的抗炎作用,还有研究表明大豆异黄酮能降低线粒体氧化应激和 DNA 损伤,并减轻肝脏慢性损伤,具有一定的抗肝癌作用^[4-7]。但也有研究表明,虽然大豆异黄酮能上调参与睾酮合成的各关键因子,但高剂量组的促恢复作用要差于中剂量组^[8]。因此,不能通过盲目摄入相关保健品去改善健康状况,可能会适得其反。

天然的大豆异黄酮主要分为大豆苷、染料木苷和黄豆苷 3 类,主要存在形式为游离型、葡萄糖苷型、乙酰基葡萄糖苷型和丙二酰基葡萄糖苷型^[9]。目前,大豆异黄酮含量分析测定的相关报道主要为高效液相色谱法^[10-13]、高效液相色谱-串联质谱法^[14]和高分辨质谱法^[15]。普通的高效液相色谱法,对分离结构相似的多组分化合物,分析时间长,分离难度大,而且保健品中含量较大,使用高效液相色谱-串联质谱法分析,稀释倍数大,操作繁琐,同时高分辨质谱价格昂贵,检测成本高,一般日常测定不适用。保健品中由于基质复杂,在测定过程中,影响较大,目前保健品中大豆异黄酮的超高效液相色谱法也较少。因此本研究建立了超高效液相色谱法对保健品中结构相似的 4 种大豆异黄酮,大豆苷、染料木苷、染料木素和大豆素(结构式见图 1)进行同时测定,以期为大豆异黄酮的分析测定研究提供参考。

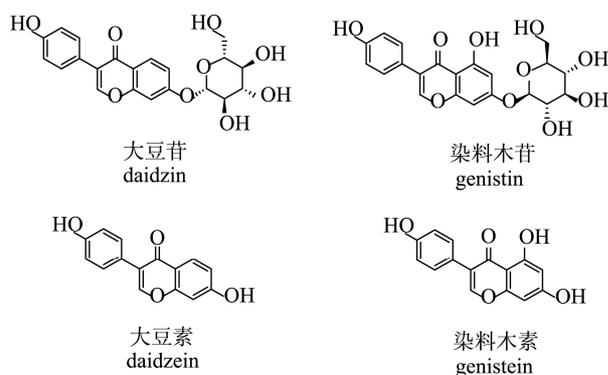


图 1 4 种大豆异黄酮化学结构式

Fig.1 Chemical structural formulas of four soybean isoflavones

1 材料与方法

1.1 仪器设备

岛津 LC-30AD 超高效液相色谱仪(配 PDA 检测器,日

本岛津公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(法国 Merck Millipore 公司); 4k-15 离心机(最大转速为 10000 r/min, 美国西格玛公司); KQ3200V 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); IKA Vortex4 涡旋混匀器(广州仪科实验室技术有限公司)。

1.2 材料与试剂

保健食品(固体片剂和油状液体胶囊)。

大豆苷、染料木苷、大豆素、染料木素(纯度大于 98.5%, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 磷酸、甲醇(色谱级, 美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

标准储备液: 分别称取适量标准品于棕色容量瓶, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得到浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液, 于 4 °C 下避光保存。

混合标准溶液: 用甲醇将标准储备液稀释成 200 mg/L 浓度的混合标准溶液。

混合标准工作溶液: 分别准确移取混合标准溶液, 用 80% 甲醇溶液定容, 得到混合标准工作曲线, 浓度范围为 0.0、1.0、2.0、5.0、10、20、50 mg/L。

1.3.2 不同样品的前处理

油状液体胶囊样品: 取 30 颗胶囊取出内容物混匀待用。

固体样品: 取 30 颗样品粉碎。

称取 1 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 80% 甲醇溶液, 涡旋混匀后超声提取 20 min。后置于离心机中以 10000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至 50 mL 容量瓶中。然后再重复提取 1 次, 合并提取液并定容混匀。固体样品直接过膜上机。油状液体胶囊样品取 1 mL 于 -18 °C 冰箱冷冻 3 h 后过膜上机测定。对 4 种大豆异黄酮含量高超出线性范围的样品可使用 80% 甲醇再稀释后上机。

1.3.3 色谱条件

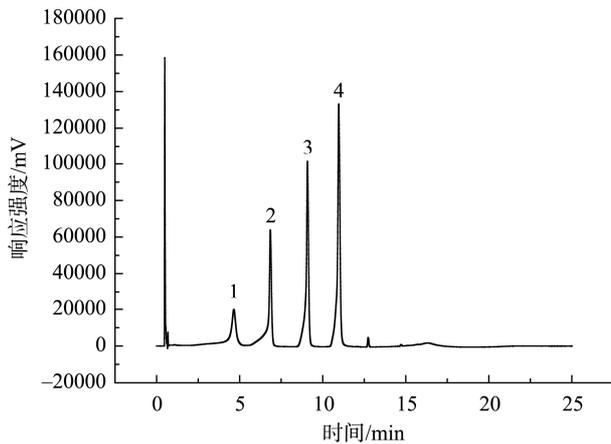
色谱柱: Xbridge BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 进样体积: 10 μL; 流速 0.5 mL/min; 柱温: 40 °C; 测定波长: 260 nm; 流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸(V/V)(B); 梯度洗脱程序如下: 0~2 min, 10%A; 2~15 min, 10%~80%A; 15~20 min, 80%A; 20~21 min, 80%~10%A; 21~25 min, 10%A。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择优化

4 种大豆异黄酮在其黄酮结构上, 均具有极性较大的酚羟基, 而在大豆苷和染料木苷的糖苷结构上则含有更多的醇羟基, 因此 4 种大豆异黄酮在化学结构上整体极性较大, 在色谱柱中保留相对较弱, 同时因为羟基与色谱柱固定相基团上逐级保留的原因, 色谱行为较差, 峰型对称性

会较差。因此,在流动相的水相中加入酸能有效抑制酚羟基的电离,且能减弱次级保留作用,从而改善峰型,经实验初步探究,使用磷酸比使用甲酸所得的色谱峰型要更好。另外由于 4 种大豆异黄酮在色谱中的分离度较低,因此,选择洗脱能力较弱的甲醇作为有机相要比乙腈得到的分离度更大,综合考虑,最终选择甲醇-0.1%磷酸(V/V)作为流动相体系。优化后的色谱图见图 2。



注: 1. 大豆苷; 2. 染料木苷; 3. 染料木素; 4. 大豆素。

图 2 4 种大豆异黄酮色谱图

Fig.2 Chromatogram of four soybean isoflavones

2.2 提取溶剂的对比

由于研究所选取的样品均为阳性样品,因此选择本底值较低的。由于 4 种目标物极性较大,含有羟基较多,因此首先考虑极性较大且含有羟基的醇溶剂作为提取溶剂优化,同时考虑到,甲醇和乙醇结构相似,对回收率结果的差异不大。因此,最终选择甲醇、80%甲醇水溶液(V/V)和乙腈 3 种溶剂进行考察,并以回收率作为选择最终选择依据。回收率结果见图 3。由图 3 发现,由于乙腈极性较低,在提取过程中会提取出更多低极性杂质,甚至脂溶性杂质,因此提取液相对浑浊,且回收率稍低于纯甲醇。80%甲醇水溶液相对于纯甲醇极性更大,作为提取溶剂时,对 4 种目标物有更好的溶解度,回收率较高,并且所得的色谱图杂质较少。因此,最终选择 80%甲醇作为提取溶剂。

2.3 超声时间的优化

实验前期先对提取次数进行探究,结果发现,提取 2 次,回收率基本能达到分析测定的要求。因此确定提取 2 次。进一步对超声时间进行优化,使用 80%甲醇水溶液分别超声 10、15、20、25、30 min。当超声时间为 20 min 时,4 种大豆异黄酮的回收率均达到 90%以上,而超声 20 min 以上时,回收率没有更加明显的提升,但杂质提取更多,而且会导致前处理时间长,效率低。综合考虑,确定前处理步骤为提取 2 次,每次超声 20 min。不同超声时间回收率见图 4。

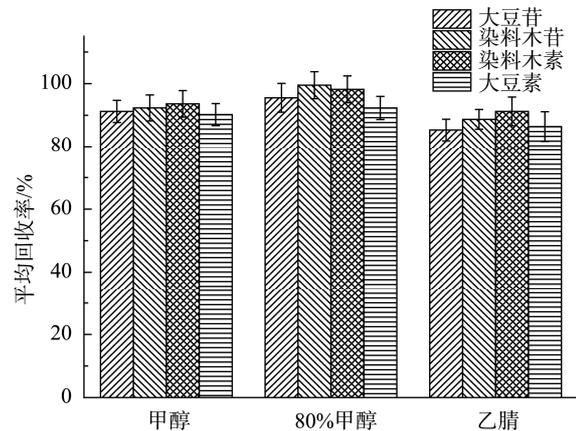


图 3 提取溶剂对回收率的影响(n=3)

Fig.3 Effect of extraction solvent on recoveries (n=3)

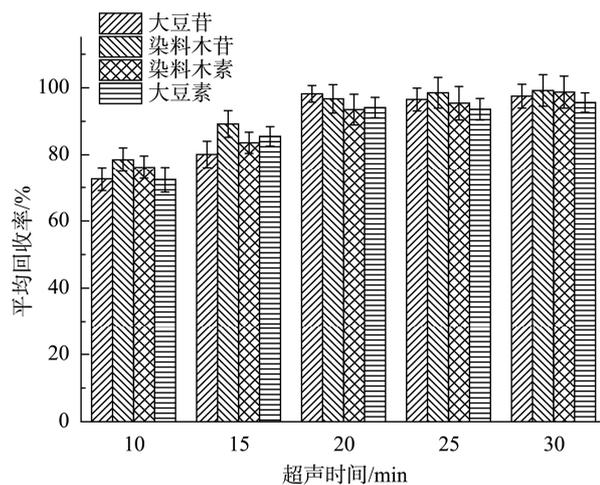


图 4 超声时间对回收率的影响(n=3)

Fig.4 Effect of ultrasonic time on recoveries (n=3)

2.4 线性关系、检出限及定量限

在确定的色谱仪器条件下,将系列标准曲线进行测定,以峰面积(Y)对相应的浓度(X, mg/kg)拟合一次曲线,所得曲线呈现良好的线性关系,相关系数 R^2 均在 0.999 以上,说明该曲线能达到准确定量的要求。通过稀释样品处理液的方法,并根据仪器的信噪比 3 倍($S/N=3$)和 10 倍($S/N=10$)确定方法检出限(limits of detection, LOD)和方法定量限(limits of quantification, LOQ),其中,染料木苷、染料木素和大豆素的方法检出限均为 0.5 mg/kg,定量限均为 1.5 mg/kg,而大豆苷的检出限和定量限分别为 1.0 mg/kg 和 3.0 mg/kg,满足检测的要求(详见表 1)。

2.5 回收率和精密度

初步通过对样品大批量测定,选择大豆异黄酮含量较低的样品为加标实验的试样,确定加标范围。考虑到 4 种大豆异黄酮的定量限不一样,且一般样品的含量尽管差异较大,但含量都要高于定量限,为方便实验,且更加符合实际测定

情况, 最终将加标量定为 10.0、20.0、100 mg/kg, 同时, 使用油状液体胶囊和固体片剂 2 种基质分别加标。平均回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)详见表 2。由表

2 可知, 2 种基质的方法学验证结果差别不大, 4 种大豆异黄酮的平均回收率在 86.7%~106%之间, 相对标准偏差 RSD 在 1.31%~6.32%之间, 说明方法整体稳定, 定量数据可靠。

表 1 4 种大豆异黄酮线性方程、检出限和定量限
Table 1 Linear equations, limits of detection and limits of quantitation for four soybean isoflavones

化合物	浓度范围/(mg/L)	线性方程	相关系数 r^2	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
大豆苷	1.0~50	$Y=17443X-12331$	0.9998	1.0	3.0
染料木苷	1.0~50	$Y=38383X-22996$	0.9994	0.5	1.5
染料木素	1.0~50	$Y=67663X+15787$	0.9995	0.5	1.5
大豆素	1.0~50	$Y=50994X+9963.5$	0.9996	0.5	1.5

表 2 4 种大豆异黄酮的平均回收率和相对标准偏差(n=6)
Table 2 Recoveries and relative standard deviations for four soybean isoflavones (n=6)

基质	化合物	添加水平/(mg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
油状液体胶囊	大豆苷	本底	16.2	-
		10.0	90.7	4.69
		加标	20.0	96.3
	染料木苷	100	102	2.21
		本底	14.1	-
		10.0	100	2.63
	加标	20.0	96.3	3.36
		100	92.3	4.02
		大豆素	本底	6.62
	加标	10.0	89.7	4.52
		20.0	106	3.96
		100	99.5	2.24
染料木素	本底	17.2	-	
	10.0	93.3	6.32	
	加标	20.0	101	4.01
固体片剂	大豆苷	100	94.7	4.52
		本底	5.63	-
		10.0	96.3	2.55
	加标	20.0	96.7	3.41
		100	92.3	2.79
		染料木苷	本底	4.96
	加标	10.0	103	2.41
		20.0	93.5	4.11
		100	91.7	2.22
	大豆素	本底	2.21	-
		10.0	86.7	4.13
		加标	20.0	94.5
染料木素	100	97.2	2.24	
	本底	6.11	-	
	10.0	98.3	1.31	
加标	20.0	105	5.22	
	100	92.8	1.78	

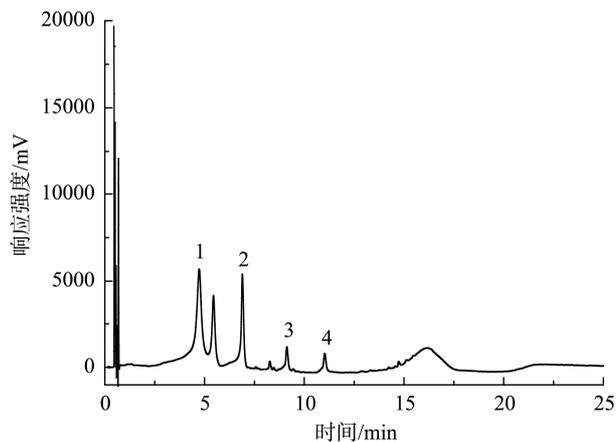
2.6 实际样品的测定

为了进一步考察方法的实际应用情况,用建立的方法实际测定市售的4种大豆异黄酮保健品。结果见表3,由表3可知,不同样品中,4种大豆异黄酮的含量差异很大,在实际测定的过程中,针对不同的样品需要根据其含量按倍数稀释至线性范围内。大豆卵磷脂胶囊实际样品色谱图见图5。消费者在选择产品的时候,需要根据自身所需补充量进行选择,否则对健康会有一些的不良影响。

表3 实际测定的样品中大豆异黄酮数值(n=6)

Table 3 Results of soybean isoflavones in the actual determined samples(n=6)

化合物	大豆卵磷脂胶囊/(mg/kg)	多种植物复合咀嚼片/(mg/kg)	大豆异黄酮软胶囊/(mg/kg)	某药片剂/(mg/kg)
大豆苷	16.2	5.63	33215	4315
染料木苷	14.1	4.96	1212	409
大豆素	6.62	2.21	1452	323
染料木素	17.2	6.11	401	166



注: 1. 大豆苷; 2. 染料木苷; 3. 染料木素; 4. 大豆素。

图5 大豆异黄酮实际样品色谱图

Fig.5 Chromatogram of soybean isoflavones for actual samples

参考文献

- 许永杰, 卢志顺, 罗洁. 大豆异黄酮减轻大鼠非酒精性脂肪肝病变的作用研究[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(2): 188-191.
XU YJ, LU ZS, LUO J. Study on effect of soy isoflavones in reducing lesion of rat non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Mod Med Health, 2019, 35(2): 188-191.
- LIMER JL, SPEIRS V. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention [J]. Breast Cancer Res, 2004, 6(3): 119-127.
- 颜秀敏, 刘凯亮, 高心雨, 等. 不同剂量大豆异黄酮对多囊卵巢综合征大鼠的干预效果研究[J]. 实用妇产科杂志, 2020, 36(8): 626-630.
YAN XM, LIU KL, GAO XY, et al. Therapeutic effect of different doses of soy isoflavones on PCOS rats [J]. J Prac Obstet Gynecol, 2020, 36(8): 626-630.

3 结论与讨论

本研究用80%甲醇水溶液超声提取的方法对样品进行提取,对比了不同超声时间对回收率的影响,同时优化了流动相的组成,并结合超高效液相色谱法,通过调节梯度洗脱程序,使4种大豆异黄酮在12 min左右完全出峰,且分离度和峰型均良好;以本底值较低的样品进行不同浓度的加标实验,回收率和标准偏差结果满足日常测定要求;本方法操作简单,快捷高效,适用于实验室日常的大批量分析。

- DROR S, SANDER L, SCHWARTZ H, et al. Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation [J]. Nat Cell Biol, 2016, 18(9): 1006-1017.
- ZHOU X, YAN T, HUANG C, et al. Melanoma cell-secreted exosomal miR-155-5p induce proangiogenic switch of cancer-associated fibroblasts via SOCS1/JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 242.
- ZHAO XP, WANG M, SONG Y, et al. Membrane microvesicles as mediators for melanoma-fibroblasts communication: Roles of the VCAM-1/VLA-4 axis and the EPK1/2 signal pathway [J]. Cancer Lett, 2015, 360(2): 125-133.
- RUSSO M, RUSSO GL, DAGLIA M, et al. Understanding genistein in cancer: The "good" and the "bad" effects: A review [J]. Food Chem, 2016, 196: 589-600.
- 陈晓林. 大豆异黄酮干预肥胖大鼠睾酮合成与分泌相关因子的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
CHEN XL. Study on the intervention of soybean isoflavones on the related factors of testosterone synthesis and secretion in obese rats [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2016.
- 杨学东, 邓志成, 王晶, 等. 反相高效液相色谱法制备纯化大豆异黄酮糖苷[J]. 色谱, 2006, 24(4): 363-366.
YANG XD, DENG ZC, WANG J, et al. Preparation of soybean isoflavone glucosides by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2006, 24(4): 363-366.
- 郭千祥, 梁幼玲, 史旭华, 等. 黑豆药材的HPLC指纹图谱建立及5种异黄酮类成分的含量测定[J]. 中国药房, 2020, 31(4): 428-434.
GUO QX, LIANG YL, SHI XH, et al. Establishment of HPLC fingerprint and content determination of 5 kinds of isoflavone components in soya bean semen nigrum [J]. Chin Pharm, 2020, 31(4): 428-434.
- 李艳艳, 周光明, 辛丹敏, 等. HPLC法测定豆奶粉中四种大豆异黄酮含量[J]. 现代食品科技, 2009, 25(10): 1227-1230.

- LI YY, ZHOU GM, XIN DM, *et al.* Determination of four isoflavone in soybean milk powder by HPLC [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2009, 25(10): 1227–1230.
- [12] 徐世芳, 陈爱瑛, 姜丽霞. 微胶囊大豆异黄酮有效成分的 HPLC 含量测定[J]. *食品科学*, 2007, 28(11): 473–475.
- XU SF, CHEN AY, JIANG LX. HPLC determination of effective components in soybean isoflavones microencapsule [J]. *Food Sci*, 2007, 28(11): 473–475.
- [13] 王静, 韩丽华, 朱莉芳, 等. 人尿中异黄酮的高效液相色谱分析[J]. *分析化学*, 2006, 34(4): 569–572.
- WANG J, HAN LH, ZHU LF, *et al.* Determination of isoflavones in human urine by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*, 2006, 34(4): 569–572.
- [14] 林胜军, 丘福保, 薛荣旋, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定大豆中3种异黄酮素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(17): 6006–6011.
- LIN SJ, QIU FB, XUE RX, *et al.* Determination for 3 kinds of isoflavones in soybean by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(17): 6006–6011.
- [15] JITKA K, LUDMILA K, JAN L, *et al.* Soybean-derived isoflavone determination in rumen fluid and milk by LC-MS-(TOF) [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(6): 997–1003.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



吴俊发, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 791291497@qq.com