

HPLC 法测定食品中金雀异黄素

常凤启 陈桂茹 韩会新 秦振顺

(河北省疾病预防控制中心,河北 保定 071000)

摘要:为保证保健食品的质量,建立了测定食品中金雀异黄素的 HPLC 方法。试样以乙醚脱脂,甲醇+水(80+20,体积分数)超声提取 30 min,定容后过 0.45 μm 滤膜,上 250.0 mm ×4.6 mm、粒径 10 μm 的 C₁₈ 柱,甲醇+醋酸铵(0.050 mol/L,pH 4.6)作流动相,二极管阵列检测器测定。染料木苷、黄豆苷、黄豆苷元对测定不产生干扰。方法回收率 85%~110%,相对标准偏差 2%~8%,最低检出限为 0.10 μg。本方法适用于保健食品中金雀异黄素的测定。

关键词:豆科;异黄酮类;色谱法,高压液相

HPLC method for the determination of genistein in foods

Chang Fengqi, et al.

(Hebei Provincial Center for Disease Prevention and Control, Hebei Baoding 071000, China)

Abstract: A rapid method using a reverse-phase high performance liquid chromatography for the determination of genistein in foods was presented. After the sample was sonicated for 30 minutes and passed through a 0.45 μm filter, it was then separated on a C₁₈ reversed-phase column (25 cm ×4.6 mm i. d.; 10 μm particles) and methanol-0.050 mol/L ammonium acetate (46%+54%, by volume), pH 4.6 was used as the mobile phase at a velocity of 1.2 mL/min. The eluate was detected by a photo diode-array detector at 210 nm~400 nm. The separation of genistein, genistin, daidzein and daidzin was achieved successfully in about 20 minutes. The recovery of genistein was 85%~110% and the variation coefficient was 2%~8%. This method was suitable for the determination of genistein in foods.

Key Words: Legumes; Isoflavones; Chromatography, High Pressure Liquid

金雀异黄素为保健食品功效成分之一,在大豆中含量丰富。金雀异黄素(染料木因),化学名称 5,7,4-三羟基异黄酮,英文名 Genistein,分子式 C₁₅H₁₀O₅,分子量 270,为大豆异黄酮中生理活性最强的一种,具有预防乳腺癌、前列腺癌、^[1]降低心血管疾病、^[2]缓解妇女更年期综合症和减少、治疗骨质疏松的重要生理保健作用。^[3]

国外研究大豆异黄酮的测定方法有气相色谱-质谱联用法、^[4]高效液相色谱法、^[5,6]高效液相色谱-质谱联用法、^[7]毛细管电泳法。^[8]气相色谱-质谱联用法样品需衍生后测定;高效液相色谱法主要采用梯度洗脱,紫外或二极管阵列检测器测定,梯度洗脱除测定时间长外,系统平衡也需要时间;高效液相色谱-质谱联用法、毛细管电泳法仪器价格昂贵,很难普及。国内有高效液相色谱仪梯度法测定大豆异

黄酮的报道。^[9]上述方法样品提取一般需要 2~4 h,测定时间需要 40~60 min。

本方法样品经乙醚脱脂,超声提取 30 min,定容后过 0.45 μm 滤膜,采用高效液相色谱法,国产 250 mm ×4.6 mm i. d.; 10 μm C₁₈ 柱,甲醇+0.050 mol/L, pH 4.6 醋酸铵(46+54,体积分数)作流动相,1.2 mL/min 恒流洗脱,二极管阵列检测器测定,测定时间只需 20 min 左右。测定金雀异黄素的方法回收率在 85%~110%,最低检出量为 0.10 μg。本方法适用于食品中金雀异黄素的测定。

1 材料与方法

1.1 原理 试样经乙醚脱脂,弃取乙醚后用甲醇+水(80+20,体积分数)超声提取 30 min,过 0.45 μm 滤膜,定容后进行液相色谱分析。样品中的金雀异

基金项目:卫生部保健食品专项基金课题(BJ-01-06)

作者简介:常凤启 男 副主任技师

This work was supported by the Special Funds Health Food of Ministry of Health, China. (BJ-01-06)

黄素用 C_{18} 柱分离,二极管阵列检测器测定峰面积,外标法定量。

1.2 试剂 本方法所用试剂(除注明外)均为分析纯,水为石英亚沸蒸馏水。

甲醇(色谱纯);无水乙醚;甲醇+水(80+20);金雀异黄素,染料木苷,黄豆苷,黄豆苷元均购自Sigma试剂公司;0.050 mol/L 醋酸铵溶液(pH 4.6):准确称取 3.85 g 醋酸铵于小烧杯中,适量水溶解,转移至 1 000 mL 容量瓶中,加水 500 mL,加 3.0 mL 冰醋酸,摇匀,加水至容量瓶刻度,摇匀即可。

1.3 仪器 Waters600E 高效液相色谱仪(二极管阵列检测器);20.0 μ L 定量管;TCQ-250 超声波清洗器(北京医疗设备二厂)。

1.4 分析步骤 高效液相色谱参考条件,色谱柱:不锈钢柱,内径 4.6 mm,长 250 mm C_{18} 柱,粒径 10 μ m,大连依利特科学有限公司产品。流动相:甲醇+0.05 mol/L 乙酸铵,pH4.6(46+54,体积分数)。流量:1.2 mL/min。进样量:20.0 μ L。

1.5 试样制备及测定

1.5.1 保健食品 准确称取 1 g 试样,加 50 mL 甲醇+水(80+20)超声提取 30 min,抽滤上清液,残渣用甲醇+水洗,洗液一并抽滤,定容至 100.0 mL,过 0.45 μ m 滤膜,测定。

1.5.2 豆奶粉类食品 准确称取豆粉或奶粉类试样 5~10 g,用 60~100 mL 乙醚分 3 次脱脂,弃取乙醚层,加 50 mL 甲醇+水超声提取 30 min,抽滤上清液,残渣用甲醇+水洗,洗涤液一并抽滤,定容后过 0.45 μ m 滤膜,测定。

1.5.3 各种豆腐 准确称取试样 10 g,用玻棒搅匀后用 60 mL 乙醚分 3 次脱脂,加 50 mL 甲醇+水超声提取 30 min,过滤,测量体积后过 0.45 μ m 滤膜,测定。

1.5.4 豆腐丝、豆腐干 准确称取试样 10 g,加无水硫酸钠研磨,转入具塞三角瓶中,加 50 mL 甲醇+水超声提取 30 min,过滤,定容后过 0.45 μ m 滤膜,测定。

1.5.5 金雀异黄素储备液 精密称取金雀异黄素标准品 10.0 mg,用甲醇溶解并定容至 10 mL。此液为 1.00 mg/mL。

1.5.6 金雀异黄素应用液 分别取金雀异黄素储备液 0.010、0.050、0.100、0.300、0.500、1.250 mL,用甲醇定容至 10.0 mL(浓度各为 1.00、5.00、10.00、30.00、50.00、125.00 μ g/mL)。在上述色谱条件下注入标准溶液和试样溶液,以保留时间定性,峰面积、外标法定量。

1.6 计算

按下列公式计算

$$X = \frac{A \times C_i \times V \times K}{A_i \times m}$$

式中: X —试样中金雀异黄素的含量 mg/kg; A —试样的峰面积或峰高; C_i —金雀异黄素标准溶液的浓度, μ g/mL; A_i —标准溶液的峰面积或峰高; m —试样质量,g; V —试样定容体积,mL; K —稀释因子。

2 结果与讨论

2.1 试样提取 对于食品中游离金雀异黄素的提取,超声提取 10 min,提取效率完全符合方法学要求。关于大豆基质的样品,文献报导有浓盐酸+96%乙醇(1+4)或 77%的乙醇中含有 2 mol/L 盐酸的酸水解回馏提取 4 h 法、^[6]酶水解^[4]测定结合和游离金雀异黄素的方法以及甲醇+水(80+20)回馏提取 2~4 h^[9]或乙醇+水(80+20)回馏提取 2 h 测定试样中游离金雀异黄素的方法。

试验表明,酸水解回馏提取 4 h 测定金雀异黄素,染料木苷不能完全水解为金雀异黄素。酶水解染料木苷水解为金雀异黄素的效果好。但酶水解需要特殊的水解酶,这种酶难以买到且价格昂贵,水解后不能反映大豆制品的基质组成。

甲醇+水(80+20)回馏提取 2 h 和超声提取 30 min 测定试样中游离金雀异黄素,经 F 检验差异存在显著性。结果表明用甲醇+水(80+20)超声 30 min 提取金雀异黄素的效率优于甲醇+水(80+20)回馏 2 h。本文选用超声提取 30 min 测定试样中游离金雀异黄素,结果见表 1。

表 1 脱脂大豆粉中金雀异黄素(Ge)的含量 μ g/g

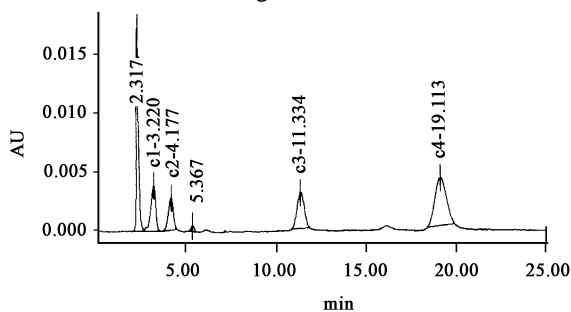
甲醇+水(80+20)超声 30 min	甲醇+水(80+20)回馏 2 h
14.8	14.2
13.8	13.6
14.3	14.2
15.1	13.1
14.5	13.0
14.2	13.5
均值 $\bar{x}_1 = 14.5$ $s_1 = 0.46$	均值 $\bar{x}_2 = 13.6$ $s_2 = 0.52$
$RSD = 3.2\%$	$RSD = 3.8\%$

F 检验: $F_{表} = 5.05 > F_{计算} = 1.29$,说明两种提取方法的标准偏差差异无显著性。

t 检验: $t_{0.95} = 2.23 < t_{计算} = 3.39$,说明两方法存在差异显著性。

2.2 流动相的选择 采用甲醇+醋酸铵体系作流动相,试剂价格便宜易得。甲醇量提高,保留时间缩短,影响黄豆苷和染料木苷的分离;醋酸铵浓度升高,pH 值降低,保留时间缩短,不影响色谱峰的分

离。本方法采用甲醇 + 0.050 mol/L, pH4.6 醋酸铵作流动相, 不仅可延长色谱柱的使用寿命, 还可以同时测定黄豆苷、黄豆苷元和染料木苷。分离效果参见标准色谱图 1 (1.00 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准)。



c1: 黄豆苷 (Daidzin), c2: 染料木苷 (Genistin), c3: 黄豆苷元 (Daidzein), c4: 金雀异黄素 (Genistein)

图 1 标准色谱图

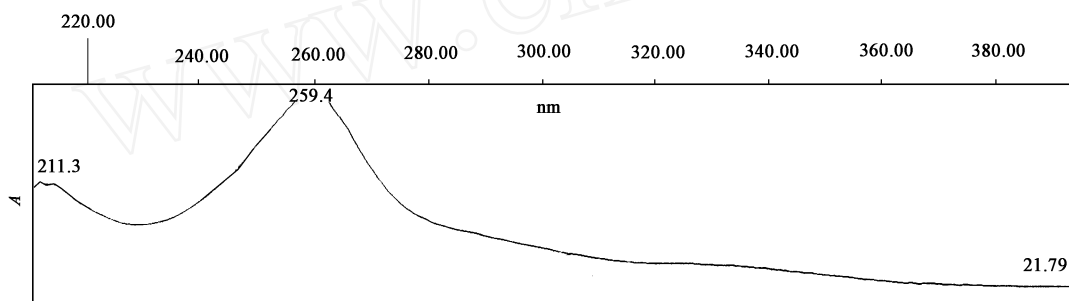


图 2 金雀异黄素的吸收光谱图

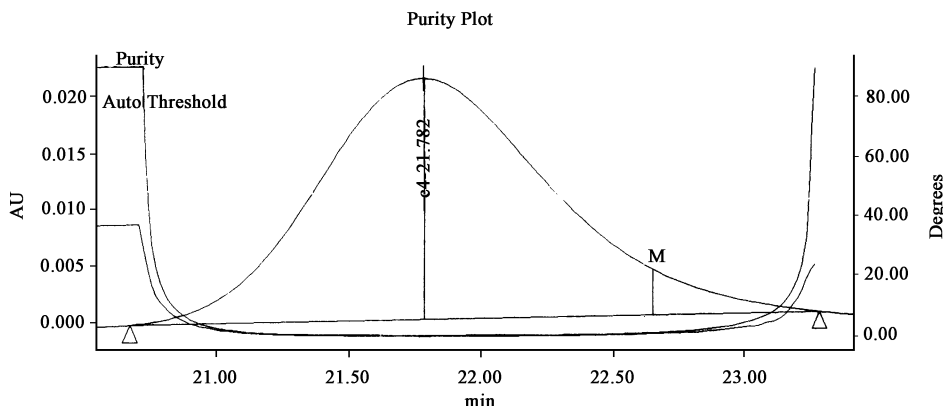


图 3 金雀异黄素的峰纯度图

豆苷元、染料木苷和金雀异黄素。本方法中黄豆苷、黄豆苷元、染料木苷对金雀异黄素的测定不产生干扰。采用二极管阵列检测器给出的峰纯度指标, 可以判断单一色谱峰中干扰因素的存在。某保健食品和普通食品的测定见色谱图 4。

2.5 精密度 应用本方法对同一试样进行 6 次测定, 测定结果见表 2。

结果表明, 由于采用超声提取相对提取效率高, 平行性好, 测定同一试样同一实验室的 RSD 为 0.5%, 方法的重现性令人十分满意。

2.3 金雀异黄素的吸收光谱和峰纯度图 采用二极管阵列检测器, 检测波长范围 210 ~ 400 nm, 建立金雀异黄素的吸收光谱标准谱库, 吸收光谱谱图见图 2。除采用保留时间定性外, 还可根据试样峰吸收光谱与金雀异黄素标准吸收光谱的匹配性, 增加定性的准确度。根据峰纯度参数, 可排除同一色谱峰中可能存在的杂质峰, 增加定量的准确性。金雀异黄素的峰纯度图见图 3 (注: 单一物质色谱峰峰纯度值小于阈值; 峰纯度值大于阈值说明峰不纯)。

2.4 干扰因素 大豆中异黄酮主要以 6 - O - 丙二酰基葡萄糖异黄酮苷存在, 在加工豆腐、豆腐丝、豆浆等豆制品过程中, 6 - O - 丙二酰基葡萄糖异黄酮苷主要转化为染料木苷和黄豆苷, 在烧烤制品中主要转化为乙酰基葡萄糖异黄酮苷。加热提取和超声提取的大豆异黄酮的 4 种主要成分为黄豆苷、黄

表 2 精密度试验 $\mu\text{g/g}$

序号	金雀异黄素
1	250
2	253
3	251
4	252
5	253
6	250
均值 \bar{x}	252
s	3.5
$RSD \%$	0.5

2.6 准确度 采用加标回收实验进行准确度分析,在豆豉中加入 8.69 $\mu\text{g/mL}$ 和 41.81 $\mu\text{g/mL}$ 的金雀异黄酮,回收率测定结果分别见表 3 和表 4。加标 8.69 $\mu\text{g/mL}$ 的平均回收率为 93.7%;加标 41.81 $\mu\text{g/mL}$ 的平均回收率为 99.4%。

表 3 加标金雀异黄酮(8.69 $\mu\text{g/mL}$) 试样的测定结果 $\mu\text{g/mL}$

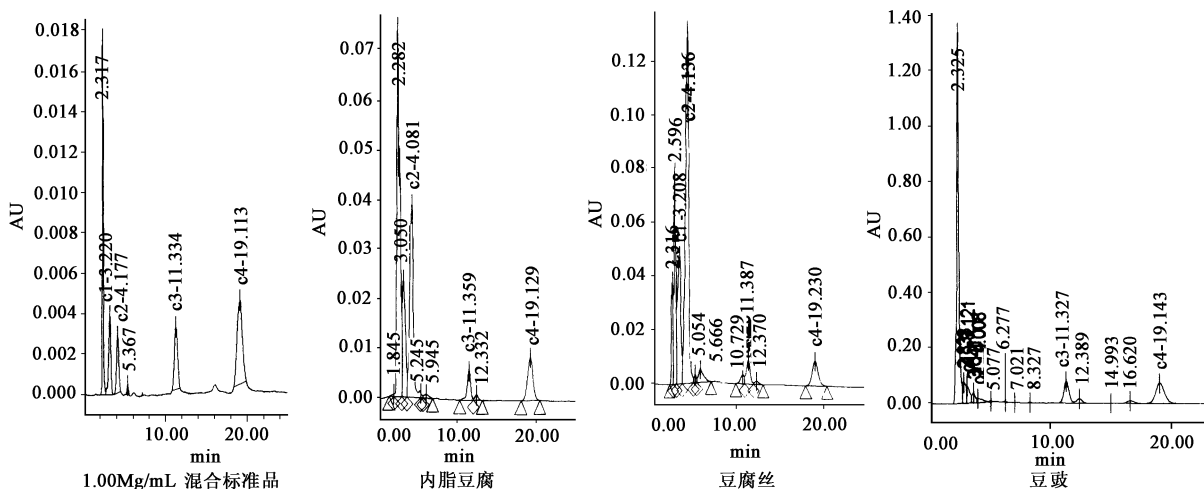
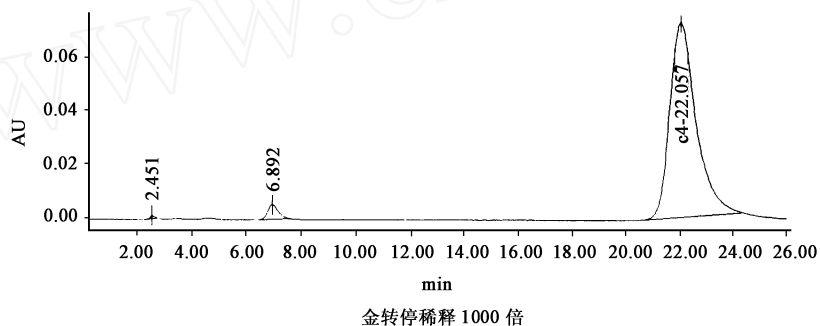
试样	样品量 g	本底浓度	加标浓度	测定值	回收率 %
豆豉	1.0770	27.40	8.69	34.94	86.8
	1.0651	27.10	8.69	34.56	85.8
豆豉	1.0392	26.44	8.69	34.91	97.5
	1.0392	26.44	8.69	35.04	99.0
豆豉	1.0770	27.40	8.69	35.20	89.8
	1.0651	27.10	8.69	36.05	103.0
\bar{x}				35.12	93.7
RSD %				1.43	7.6

表 4 加标金雀异黄酮(41.81 $\mu\text{g/mL}$) 试样的测定结果 $\mu\text{g/mL}$

试样	样品量 g	本底浓度	加标浓度	测定值	回收率 %
豆豉	1.0498	25.70	41.81	67.64	100.3
	1.0498	25.70	41.81	66.62	97.9
豆豉	1.0626	26.01	41.81	67.32	98.8
	1.0626	26.01	41.81	66.43	96.7
豆豉	1.0352	25.34	41.81	67.38	100.6
	1.0352	25.34	41.81	68.07	102.2
\bar{x}				67.24	99.4
RSD %				0.92	2.0

2.7 校正曲线 将标准溶液配制浓度为 1.0、5.0、10.0、30.0、50.0、125.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列,作校正曲线,见图 5,结果: $y = 1.41e + 5x + 9.69e + 4$, $r = 0.9999$ 。

2.8 检出限 进样量 20.0 μL ,金雀异黄酮的最小



备注:混合标准品为金雀异黄酮(Genistein)、染料木苷(Genistin)、黄豆苷(Daidzin)、黄豆苷元(Daidzein)、6-O-丙二酰基葡萄糖异黄酮苷(6-O-malonylgenistin)、乙酰基葡萄糖异黄酮苷(6-O-acetylgenistin)。

图 4 保健食品和普通食品的测定色谱图

检出量为 0.10 μg 。结果相对允许偏差 $< 10\%$ 。

3 实际样品的测定 采用超声提取 30 min,对市售保健食品、豆豉和大豆制品中金雀异黄酮的含量进行测定,测定结果见表 5。在大豆制品和豆豉中金雀异黄酮含量最高。各种豆类中金雀异黄酮的含量

见表 6。结果表明,除黑豆、乌豆、黄豆和青豆外,所测其它豆类基本上不含有金雀异黄酮。

黑豆、黄豆金雀异黄酮的测定结果与文献报道^[9]相吻合,其它豆类未见相关报道。

4 小结 综上所述实验结果表明,HPLC 法测定食品中

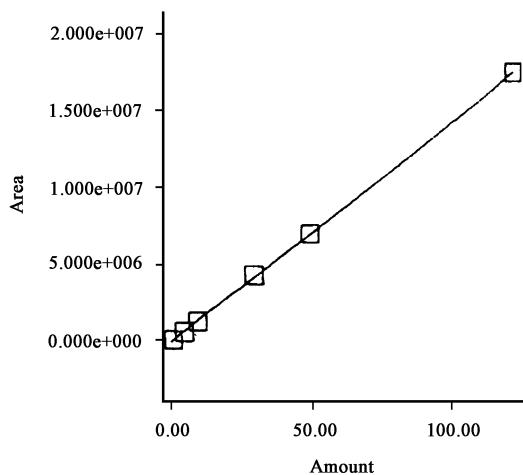


图5 校正曲线

表5 实际样品的测定

样品名称	金雀异黄素 $\mu\text{g/g}$
保健食品	147 mg/g
豆豉	257.00
普通豆腐	4.72
内酯豆腐	10.40
豆浆	2.26
豆奶粉	15.40
大豆酱油	<0.50
豆腐丝	9.51

表6 各种豆类中金雀异黄素的含量测定结果

品名	产地	金雀异黄素 $\mu\text{g/g}$
白芸豆	内蒙	ND
小黑豆	吉林	50.6
园花豆	甘肃	ND
狸小豆	新疆天山	ND
青豌豆	廊坊固安	ND
小黑豌豆	山西阳原	ND
荷兰豆	新疆	ND
狸芸豆	云南	ND
红小豆	赤峰	ND
乌豆	张家口	26.9
黄豆	黑龙江	22.0
黄豆	河北清苑	14.4
蚕豆	甘肃	ND
麻豇豆	通辽	ND
白奶花豆	黑龙江	ND
青豆	河北邢台	22.7

注:ND为未检出。

金雀异黄素,方法简便、快速,干扰少,方法精密度高、准确度高,线性好、线性范围宽。二极管阵列检测器具有吸收峰匹配和提供峰纯度参数的优点,检测数据的准确度明显优于紫外吸收检测器。在大豆制品中以发酵制品中金雀异黄素含量最高。异黄酮以黄豆苷的形式存在。本方法不仅适用于保健食品中金雀异黄素的测定,同样适用于普通大豆制品中金雀异黄素的测定。

参考文献:

- [1] Messina M, Persky V, Setchell K D R, et al. Soy intake and cancer risk: A review of the *in vitro* and *in vivo* data[J]. Nutr Cancer, 1994, 21:113.
- [2] Anderson J W, Johnstone B M, Cook-Newell M E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids[J]. New Engl J Med, 1995, 332:276.
- [3] Blair H C, Jordan S E, Peterson T G, et al. Variable effect of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats[J]. J Cell Biochem, 1996, 60:1761.
- [4] Liggins J, Bluck L J, Coward W A, et al. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food[J]. Analytical Biochemistry, 1998, 264(1):1.
- [5] Franke A A, Custer L J, Wang W, et al. HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 217(3):263.
- [6] Franke A A, Custer L J, Cerna C M, et al. Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1995, 208(1):18.
- [7] Barnes S, Coward L, Kirk M, et al. HPLC-Mass spectrometry analysis of isoflavones[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 217(3):254.
- [8] Aussenac T, Lacombe S, Dayd J. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment[J]. Am J Clin Nutr, 1998, 68(6 suppl):1480.
- [9] 孙梅君, 骆炼, 史长颖, 等. 中国大豆制品中异黄酮含量测定分析研究[J]. 食品与发酵工业, 1999, 26(5):14.

[收稿日期:2003-01-09]

中图分类号:R15;O657.72;TS218

文献标识码:B

文章编号:1004-8456(2003)06-0500-05