

文章编号: 1671-4513 (2011)01-0038-04

高效液相色谱法测定纳豆及纳豆胶囊中的大豆异黄酮含量

张 岩, 王莉娜

(北京燕京啤酒集团公司 技术中心, 北京 101300)

摘 要: 建立了纳豆及纳豆胶囊中大豆异黄酮的高效液相色谱分析方法, 该方法重复性及样品稳定性良好. 实验对原料黄豆、纳豆和纳豆胶囊样品采用石油醚索氏脱脂后, 对固体样品进行乙醇回流提取, 分析了 4 种大豆异黄酮组分, 即大豆苷、染料木苷、大豆素和染料木素. 结果表明, 原料黄豆总异黄酮质量比为 1 260 mg/kg, 纳豆比原料黄豆总异黄酮含量明显高约 30%, 纳豆胶囊比原料黄豆总异黄酮含量高约 11%.

关键词: 纳豆; 纳豆胶囊; 大豆异黄酮; 液相色谱法

中图分类号: TS214

文献标志码: A

纳豆是一种大豆发酵食品, 它是将黄豆洗净、蒸煮后, 加入纳豆菌, 包装成型, 在固定的温度和湿度下发酵, 再放入 4 ℃ 以下后熟一定时间制成. 新鲜的纳豆色泽金黄、口感酥软, 用筷子挑起时有很长的拉丝样粘液物质, 这种粘液物质是果聚糖的混合物. 纳豆胶囊是将冻干后的纳豆经过适当处理, 加入一些添加物混合而成, 之后做成胶囊. 纳豆作为一种功能性保健食品, 具有溶血栓、抗肿瘤、降血压、降血脂、抗氧化性、防止骨质疏松、促凝血等对人体较高的生理功能及营养保健作用, 正在被越来越多的消费者所关注. 目前, 国内外对于纳豆激酶研究已深入到分子生物学水平, 对纳豆激酶溶栓通栓作用机理也研究得较为深入. 国内对纳豆的研究集中在纳豆激酶, 对于纳豆中其他活性成分或抗营养因子以及某些药理作用研究报道较少.

纳豆的原料是黄豆, 而黄豆本身含有丰富的大豆异黄酮 (soybean isoflavones, ISO), 因此大豆异黄酮也存在于纳豆及纳豆胶囊中. 大豆异黄酮是纳豆和纳豆胶囊中富含的功能性有效成分的一种, 是一类芳香族化合物, 对温度比较稳定, 易溶于甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等极性溶剂, 难溶于水. 大豆异

黄酮属于黄酮类化合物, 分为游离型的苷元和结合型的糖苷两类, 其中包括 12 种组分, 本研究仅对其中的大豆苷 (daidzin)、染料木苷 (genistin)、大豆素 (daidzein) 和染料木素 (genistein) 4 种大豆异黄酮进行研究^[1].

对于大豆异黄酮的检测, 国内外采用的定量分析方法有: 比色法、薄层法、气相色谱法及液相色谱法, 经比较, 液相色谱法速度快、灵敏度高、重现性好、变异系数低, 比较适用于工业分析^[2]. 大豆异黄酮的提取, 文献中报道主要集中在超声法和索氏提取法, 研究发现, 超声法对样品中大豆异黄酮的提取不完全, 造成液相色谱分析含量偏低, 本实验所采用提取方法为索氏提取, 先对样品进行脱脂, 之后回流提取^[3-6]. 本实验对纳豆及纳豆制品中大豆异黄酮含量测定的液相色谱法进行了研究, 并对样品的预处理方法进行了比较, 希望为纳豆产品的进一步研究及工业生产的产品检测打好基础.

1 材料与方法

1.1 样品和试剂

原料黄豆、纳豆及纳豆胶囊由燕京中发生物技

收稿日期: 2010-12-01

作者简介: 张 岩, 男, 硕士, 研究方向为液相色谱检测技术的开发与应用;

王莉娜, 女, 北京燕京啤酒集团技术中心副主任, 高级工程师, 主要从事色谱技术在啤酒风味质量研究中的应用研究.

术有限公司提供。

大豆异黄酮标准品大豆苷 (daidzin)、染料木苷 (genistin)、大豆素 (daidzein) 和染料木素 (genistein) 购于 Sigma 试剂公司。乙腈 (色谱纯)、甲醇 (色谱纯)、磷酸 (85% 分析纯)、二甲亚砜 (色谱纯) 均为市售。

1.2 仪器和设备

1100 型高效液相色谱仪 (配紫外检测器), 美国安捷伦科技公司; Soxtec™ 2055 型索氏脂肪分析仪, FOSS 公司; KQ-500DE 型超声波振荡器, 昆山市超声仪器有限公司; 分析天平 (0.01 mg 感量)、酸度计、离心机、流动相过滤装置、容量瓶 (10 mL)。

1.3 标准储备液配制

分别称取大豆苷、染料木苷、大豆素和染料木素 5 mg (精确至 0.01 mg) 置于 10 mL 容量瓶中, 加入二甲亚砜至接近刻度, 超声处理 30 min 至样品溶解完全, 再用二甲亚砜定容。

1.4 混标溶液配制

吸取大豆苷、染料木苷、大豆素和染料木素四种标准储备液各 0.2 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加入等体积水, 用体积分数为 50% 二甲亚砜水溶液定容, 混匀备用。

1.5 样品预处理

a. 超声 20 min (常温): 固体样品粉碎、磨细, 过 80 目筛, 混匀, 称取 0.05 ~ 0.5 g (精确至 0.1 mg), 用体积分数为 80% 甲醇溶解并转至 50 mL 容量瓶中, 加 80% 甲醇至接近刻度。利用超声处理 20 min, 用 80% 甲醇定容, 摇匀。取样品溶液 30 mL 置于离心管中, 离心 15 min (转速 8 000 r/min)。取上清液滤膜过滤, 收集滤液备用。

b. 超声 40 min (常温): 处理方法同 a, 仅超声时间延长至 40 min。

c. 超声 20 min (60 °C): 处理方法同 a, 仅超声温度控制在 60 °C。

d. 摇床处理 30 min (常温): 固体样品粉碎、磨细, 过 80 目筛, 混匀, 称取 0.05 ~ 0.5 g (精确至 0.1 mg), 用 50 mL 80% 甲醇溶解并转至三角瓶中, 经摇床处理 30 min, 取样品溶液 30 mL 置于离心管中, 离心 15 min (转速 8 000 r/min)。取上清液滤膜过滤, 收集滤液备用。

e. 索氏提取-回流-旋转蒸发-回容: 固体样品粉碎、磨细, 过 80 目筛, 混匀, 称取 6 g (精确至 0.1 mg), 经过索氏提取 150 min 脱脂后, 将剩余固体样

品烘干加入圆底烧瓶, 加入 75 mL 80% 乙醇, 回流 3 h, 回流两次, 合并滤液, 经旋转蒸发去乙醇, 回容至 50 mL 色谱级甲醇, 备用。

f. 索氏提取-回流: 固体样品粉碎、磨细, 过 80 目筛, 混匀, 称取 6 g (精确至 0.1 mg), 经过索氏提取 150 min 脱脂后, 将剩余固体样品烘干加入圆底烧瓶, 加入 75 mL 80% 乙醇, 回流 3 h, 回流两次, 合并滤液, 取样品溶液 30 mL 置于离心管中, 离心 15 min (转速 8 000 r/min)。取上清液滤膜过滤, 收集滤液备用。

1.6 色谱条件

色谱柱: Gemini 5 μ C18110A Phenomenex, 250 mm \times 4.6 mm, i. d.; 流速: 1.0 mL/min; 波长: 260 nm; 进样量: 10 μ L; 柱温: 30 °C; 梯度洗脱程序如表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

| t/min | 流动相体积配比/% | |
|-------|-----------|------------------|
| | A (乙腈) | B 磷酸-水, pH = 3.0 |
| 0 | 12 | 88 |
| 10 | 18 | 82 |
| 23 | 24 | 76 |
| 30 | 30 | 70 |
| 50 | 30 | 70 |
| 55 | 80 | 20 |
| 56 | 12 | 88 |
| 60 | 12 | 88 |

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

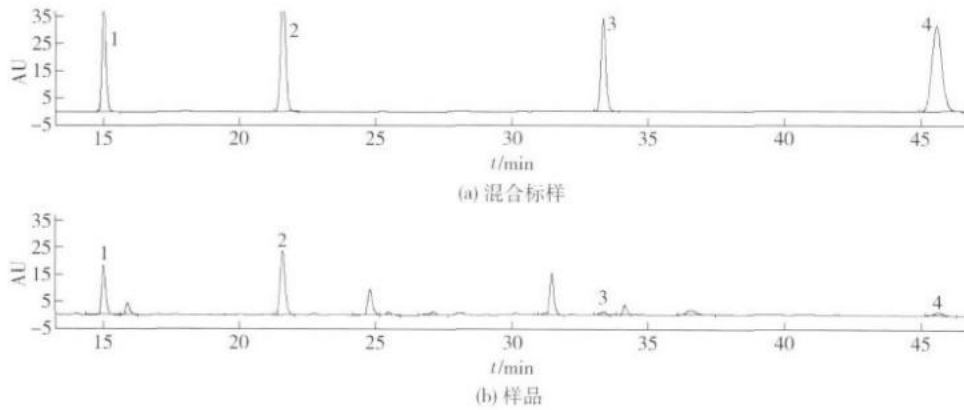
大豆异黄酮属黄酮类化合物, 经紫外扫描, 发现 260 nm 为最佳检测波长。关于大豆异黄酮的梯度洗脱的确定, 文献中已有大量报道, 本研究参考了文献 [7] 的测定方法。大豆异黄酮混合标样与样品液相色谱检测结果见图 1。

2.2 预处理方法对大豆异黄酮液相色谱分析的影响

实验采用超声、摇床震荡及索氏提取等不同方法对同一批次纳豆胶囊样品进行预处理, 具体结果见表 2。

由表 2 可以看出:

1) 对于超声法, 超声时间的延长和超声温度的增加对结果影响不大;



1. 大豆苷; 2. 染料木苷; 3. 大豆素; 4. 染料木素

图1 大豆异黄酮混合标样(a)与样品(b)液相色谱比较结果

Fig. 1 HPLC of mixing standards of soybean isoflavone and samples

表2 不同预处理方法对纳豆胶囊中大豆异黄酮液相色谱分析结果

Tab. 2 Effect of different pretreatment on the soybean isoflavone content in natto capsule by HPLC

| 名称 | mg/kg | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 方法 a | 方法 b | 方法 c | 方法 d | 方法 e | 方法 f |
| 大豆苷 | 592.9 | 591.9 | 592.6 | 617.8 | 611.6 | 651.9 |
| 染料木苷 | 604.3 | 598.8 | 612.6 | 615.3 | 656.7 | 677.5 |
| 大豆素 | 100.1 | 102.3 | 109.0 | 83.1 | 108.5 | 112.5 |
| 染料木素 | 100.7 | 99.9 | 99.5 | 97.2 | 105.9 | 109.3 |

2) 摇床震荡提取法与超声法比较, 大豆苷和染料木苷有所提高, 但大豆素和染料木素有所下降;

3) 方法 e 和 f 比较, 由于方法 f 未经过旋转蒸发和回容, 结果比方法 e 有所提高;

4) 实验需要对样品进行脱脂后分析, 研究发现, 不经过脱脂对含量分析有一定影响, 脱脂处理后比不脱脂处理大豆异黄酮含量有明显升高, 黄豆及纳豆本身为豆类食品, 自身含有大量的油脂, 这可能在萃取时对黄酮类化合物产生了一定的保护作用, 使得大豆异黄酮不容易被萃取完全。

因此, 本实验选择方法 f 为预处理方法。

2.3 分析方法学研究

2.3.1 仪器精密度实验

取同一样品连续重复进样 6 次, 测定大豆异黄酮各组分保留时间和峰面积, 计算标准偏差, RSD 值均小于 3%, 表明仪器的精密度良好。

2.3.2 方法重复性实验

精密称取同一批次样品 6 份, 按相同的预处理方法进行制备, 经同样的色谱条件进样分析, 测定保留时间和峰面积, 计算标准偏差, RSD 值均小于 5%, 表明方法重复性良好。

2.3.3 样品稳定性实验

取同一份样品分别在一天不同的时间 (0, 6, 12, 18, 24 h) 进样, 计算大豆异黄酮各组分含量, 计算标准偏差, RSD 值均小于 2.5%, 表明样品稳定性良好。

2.4 大豆异黄酮在黄豆、纳豆及纳豆胶囊中的分析与比较

经液相色谱分析, 黄豆、纳豆和纳豆胶囊的大豆异黄酮含量如表 3, 分析结果如图 2。

表3 大豆异黄酮在黄豆中液相色谱分析结果

Tab. 3 Soybean isoflavone content of soybeans, natto, and natto capsule by HPLC

| 名称 | mg/kg | | | | | | | | |
|------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 黄豆 1 | 黄豆 2 | 黄豆 3 | 黄豆 4 | 纳豆 1 | 纳豆 2 | 胶囊 1 | 胶囊 2 | 胶囊 3 |
| 大豆苷 | 573.6 | 556.1 | 449.3 | 550.3 | 660.4 | 728.7 | 569.7 | 597 | 624.4 |
| 染料木苷 | 670.7 | 664.1 | 445.4 | 561.2 | 738.5 | 756.5 | 609.3 | 655.4 | 657.4 |
| 大豆素 | 20.4 | 18.7 | 5.4 | 7.0 | 71.8 | 66.8 | 65.2 | 54.2 | 74.0 |
| 染料木素 | 16.1 | 20.4 | 5.2 | 8.2 | 110.5 | 132.7 | 92.9 | 78.1 | 107.4 |
| 总含量 | 1 280.8 | 1 259.3 | 905.3 | 1 126.7 | 1 581.2 | 1 684.7 | 1 336.9 | 1 384.6 | 1 463.2 |

注: 黄豆 1 和 2 为原料黄豆, 黄豆 3 和 4 为市售普通黄豆; 纳豆 1 和 2 为冻干后的分析结果。

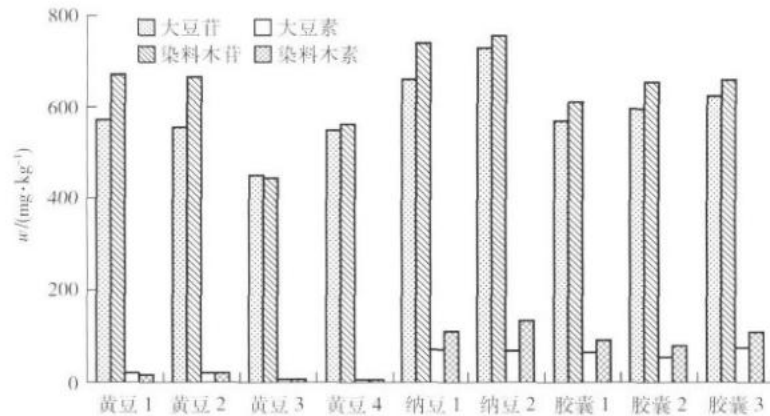


图2 黄豆、纳豆及纳豆胶囊中大豆异黄酮含量分析结果

Fig. 2 Soybean isoflavone content of soybeans, natto, and natto capsule

2.4.1 原料黄豆与市售普通黄豆比较

由表3和图2可以看出,不同品种黄豆的大豆异黄酮含量的差别,原料黄豆比市售普通黄豆各大豆异黄酮组分普遍偏高;市售普通黄豆因品种差异,各组分各有不同,大豆素和染料木素质量比为5~9 mg/kg,比原料黄豆低一个数量级。

2.4.2 纳豆与原料黄豆比较

由表3和图2可以看出,纳豆与原料黄豆相比,大豆苷质量比高约80~180 mg/kg;染料木苷质量比高约0~80 mg/kg;大豆素质量比高约40~60 mg/kg;染料木素质量比高约90~100 mg/kg。

2.4.3 纳豆胶囊与原料黄豆比较

由表3和图2可以看出,纳豆胶囊中的大豆苷质量比为560~660 mg/kg,染料木苷质量比为630~700 mg/kg,大豆素质量比为50~100 mg/kg,染料木素质量比为50~110 mg/kg。与原料黄豆相比,大豆苷质量比高约0~100 mg/kg,染料木苷质量比相差不多,大豆素质量比高约20~50 mg/kg,染料木素质量比高约60~80 mg/kg。

3 结论

1)建立了纳豆及纳豆胶囊中大豆异黄酮的高效液相色谱测定方法。该方法采用Gemini 5 μ C18110A Phenomenex (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μ m)色谱柱,以乙腈和磷酸-水(pH=3.0)作为流动相梯度洗脱,流速为1 mL/min,柱温为30 $^{\circ}$ C,进样量为10 μ L,检测波长为260 nm。该方法精密度、重复性及样品稳定性良好。

2)比较了不同的预处理方法对纳豆胶囊大豆

异黄酮分析的影响,结果显示样品预处理方法通过索氏提取对纳豆胶囊样品脱脂150 min后,将剩余固体样品烘干加入圆底烧瓶,加入75 mL 80%乙醇,回流3 h,回流两次,合并滤液,离心后,取清液直接进样分析最佳。

3)比较了原料黄豆、市售普通黄豆、纳豆和纳豆胶囊中大豆异黄酮的质量比,结果表明,原料黄豆比市售普通黄豆各大豆异黄酮组分普遍偏高,原料黄豆总异黄酮含量为1260 mg/kg,纳豆比原料黄豆总异黄酮含量明显高200~400 mg/kg,纳豆胶囊比原料黄豆总异黄酮含量高50~260 mg/kg。

参考文献:

- [1] 夏剑秋,刘宇峰. 国内外大豆异黄酮的研发及生产动态[J]. 中国油脂,2002(6):10-12.
- [2] 高荣海,李长彪,孟宪长,等. 大豆异黄酮分离机检测方法的研究进展[J]. 中国调味品,2006(7):4-8.
- [3] 谢明杰,宋明,邹翠霞,等. 超声波提取大豆异黄酮[J]. 大豆科学,2004(4):74-75.
- [4] 王松,丁立,周荣琪. HPLC法测定豆粕中大豆异黄酮含量[J]. 化工进展,2005(2):196-199.
- [5] 段智变,董改香,温晓庆,等. 纳豆及其提取物生物活性物质测定[J]. 山西工业大学学报:自然科学版,2008(2):180-183.
- [6] 宋冰,李鹏月,王丕武,等. 大豆异黄酮的品种间差异分析[J]. 大豆科学,2008,27(4):80-83.
- [7] GB/T23788—2009. 保健食品中大豆异黄酮的测定方法高效液相色谱法[S].

(下转第53页)

Identification and Carbon Metabolic Fingerprinting Analysis of a Pathogen Isolated from Postharvest Peach Fruit

WANG You-sheng, GUO Xiao-min, YAO Zi-peng, LI Li-ping

School of Food/Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

Abstract: A fungal pathogen, strain 074#, was isolated from infected peach fruit during postharvest storage periods. Morphological characterization and ITS rDNA analysis confirmed that the strain 074# was *Botrytis elliptica*. The pathogenicity tests confirmed that *Amygdalus persica* is a natural host of *Botrytis elliptica*. The Biolog Microbial Identification System with FF MicroPlate was applied for carbon source utilization test of *Botrytis elliptica* based on their abilities to utilize 95 discrete substrates. And the result showed that the carbon metabolic fingerprinting of isolated strain was composed of 26 optimal carbon sources, including D-fructose, sucrose, L-malic acid, succinic acid, D-gluconic acid, L-aspartic acid, L-serine, adenosine, deinosine-5'-monophosphate, as well as 14 available carbon sources and 55 unavailable carbon sources.

Key words: peach fruit; fungal pathogen; ITS rDNA sequence analysis; carbon metabolic fingerprinting

(责任编辑:叶红波)

(上接第 41 页)

Determination of Soybean Isoflavones in Natto and Natto Capsule by HPLC

ZHANG Yan, WANG Li-na

Technology centre, Beijing yanjing beer group corp, Beijing 101300, China

Abstract: A high performance liquid chromatographic method was developed for the determination of soybean isoflavones in Natto and Natto Capsule, and the method showed good repeatability and sample stability. Soybean isoflavone were extracted from defatted soybean, Natto and Natto capsule by heating reflux method. Four kinds of soybean isoflavone including daidzin, genistin, daidzein and genistein were determined. The results showed that the soybean isoflavones in Natto were 1 260 mg/kg, which were 30% higher than that in soybean, and the soybean isoflavones in Natto capsule were 11% higher than that in soybean.

Key words: natto; natto capsule; soybean isoflavones; high performance liquid chromatography

(责任编辑:叶红波)