

一测多评法测定 6 种大豆异黄酮的质量分数

李 秀, 马家辉, 顾 阳, 杨 燕, 成向荣*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 基于高效液相色谱紫外双波长检测方法, 建立只用一个对照品同时测定 6 种大豆异黄酮含量的一测多评方法, 以降低食品中大豆异黄酮含量测定的分析成本并提高分析效率。样品经甲醇超声波辅助提取后, 采用 C18 反相色谱柱; 柱温 25 °C; 进样量 10 μ L; 检测波长 262 nm 和 248 nm; 流量 1.0 mL/min; 以体积分数 0.2% 甲酸水溶液和甲醇运行洗脱。通过一测多评分析确定 6 种大豆异黄酮的定量标准曲线、线性范围、相对校正因子、相对保留时间及相对峰面积, 并对检测结果的精密度、稳定性、重复性、加样回收率以及系统的耐用性和适应性进行验证, 且与外标法实验结果相比对, 6 种大豆异黄酮在检测范围内均呈现出良好的线性关系 ($R^2 > 0.999\ 9$)。

关键词: 大豆异黄酮; 一测多评; 相对校正因子; 高效液相色谱

中图分类号: TS 201.4 文章编号: 1673-1689(2020)04-0093-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.04.013

Quantitative Analysis of Six Soybean Isoflavones by QAMS

LI Xiu, MA Jiahui, GU Yang, YANG Yan, CHENG Xiangrong*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The study aimed to establish a method for quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) to quantify six soybean isoflavones by HPLC with ultraviolet detection of dual wavelength, which would decrease the cost of quantitative analysis of isoflavones and enhance the efficiency. The sample was extracted by methanol under the ultrasonic wave assistance, then analyzed by HPLC with a C18 column. The running condition was 25 °C, injection volume of 10 μ L, detection wavelength of 262 nm and 248 nm, elution rate of 1.0 mL/min with 0.2% formic acid in water and methanol. Six soybean isoflavones were used for the QAMS to obtain the standard curves, linear ranges, relative correction factors (RCF), relative retention times, and relative peak areas. The precision, stability, repeatability, sample recovery rate, system durability and adaptability of QAMS method were tested and compared with those of external standard method. The results showed that six soybean isoflavones had good linearity within the analysis range ($R^2 > 0.999\ 9$).

Keywords: soybean isoflavone, quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS), relative correction factor (RCF), high performance liquid chromatography

收稿日期: 2018-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31700301)。

作者简介: 李 秀(1985—), 女, 硕士, 实验师, 主要从事食品功能分析研究。E-mail: IcebergXiu@163.com

* 通信作者: 成向荣(1985—), 男, 博士, 副教授, 主要从事天然产物化学与功能研究。E-mail: cheng-xiangrong@hotmail.com

大豆异黄酮是豆类生长过程中形成的一类次生代谢产物,在大豆及其制品中含量丰富。作为豆类及其制品中重要的生物活性物质,其抗氧化等生理活性^[1-6],受到营养学家广泛关注。人们从大豆中成功分离出的大豆异黄酮已经达到 12 种,包括 3 种游离型异黄酮苷元、3 种异黄酮葡萄糖苷、3 种异黄酮乙酰基葡萄糖苷和 3 种异黄酮丙二酰基葡萄糖苷^[7-8]。其中,异黄酮乙酰基葡萄糖苷、丙二酰基葡萄糖苷在豆制品加工过程中较不稳定,且对照品极难制备与获取。目前美国分析化学家协会 AOAC 主要通过对大豆及其制品进行提取、皂化后进行 HPLC 测定大豆异黄酮苷元及葡萄糖苷的含量^[9]。目前,国内对 6 种大豆异黄酮的测定主要参照《保健食品中大豆异黄酮的测定方法 高效液相色谱法》(GB/T23788-2009)^[10]和《粮油检测 大豆异黄酮含量测定 高效液相色谱法》(GB/T26625-2011)^[11]。这两种国标方法均是对大豆苷、大豆苷元、黄豆苷元、黄豆黄素、染料木苷、染料木素等 6 种大豆异黄酮进行高效液相色谱测定,需要购置多个对照品配置标准溶液,检测效率相对较低且增加检测成本^[12]。

“一测多评”法 (quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)是近年来主要应用于中药领域的多成分质量控制的研究方法,它运用成分间存在的内在函数关系,采用单个易获得的对照品对多个成分进行定量,实现多个成分(对照品没有或难以供应)的同步测定,目前已用于解决中药质量控制中缺乏对照品这一瓶颈问题^[13-15]。作者以豆制品中含量丰富、对照品易得的大豆苷为参照,通过分析大豆苷、大豆苷元、黄豆苷元、黄豆黄素、染料木苷、染料木素等 6 种大豆异黄酮在高效液相色谱行为学上的差异,基于它们的结构共性,寻找在色谱行为学及光谱学上的内在联系,以此建立大豆异黄酮的一测多评分析方法,并运用于常见的大豆及其制品中大豆异黄酮的含量测定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆苷、大豆苷元、黄豆苷元、黄豆黄素、染料木苷、染料木素:江苏永健公司产品;甲醇(色谱纯)、甲酸(分析纯):国药集团产品。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪:岛津公司产品;1525

高效液相色谱仪:沃特世公司产品;1100 高效液相色谱仪;Inertsil ODS-SP C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm)、Ultimate AQ C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm)、Kromasil C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm):安捷伦公司产品;UV2300 双光束紫外可见分光光度计:上海天美科学仪器有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 样品处理 称取腐竹、豆腐干、千张、大豆和豆腐样品 10~50 g,粉碎,55 ℃真空干燥 24 h,进一步粉碎后过 100 目筛,精密称取 0.2 g,置于试管中,加入 5 mL 甲醇,密塞,超声提取 30 min,用甲醇补足原质量,离心过滤,滤液备用。

1.3.2 对照品处理 精确称取大豆苷 14.4 mg,大豆苷元 3.0 mg,黄豆黄苷 3.0 mg,黄豆黄素 1.2 mg,染料木苷 1.2 mg,染料木素 6 mg,置于 100 mL 烧杯中,混合,先加少量甲醇溶解后,移入 200 mL 容量瓶中并用甲醇稀释至刻度,配成质量浓度分别为 72、15、15、6、6、30 μg/mL 的混合对照品溶液,并等比例稀释 2.5 倍 5 次,得到 6 个不同质量浓度梯度的溶液,以制作混合对照品的标准曲线确定线性范围。

另精确称取大豆苷 14.4 mg,大豆苷元 3.0 mg,黄豆黄苷 3.0 mg,黄豆黄素 1.2 mg,染料木苷 1.2 mg,染料木素 6 mg,先加少量甲醇溶解后,分别移入 200 mL 容量瓶中并用甲醇稀释至刻度,配成质量浓度分别为 72、15、15、6、6、30 μg/mL 的单一对照品溶液,与混合对照品一样分别按等比例稀释 2.5 倍 5 次,得到 6 个不同质量浓度梯度的 6 组单一对照品溶液,以制作 6 种大豆异黄酮单一对照品的标准曲线。

1.3.3 色谱条件 采用岛津 LC-20A 高效液相色谱仪进行大豆异黄酮的检测,色谱柱:Inertsil ODS-SP C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm);柱温 30℃;进样量 10 μL;双检测波长 262 nm 和 248 nm;流量 1.0 mL/min;流动相:A 为体积分数 0.2%甲酸水溶液,B 为甲醇,并设计了 3 组洗脱程序:

0~60 min,B: 体积分数 55%等度洗脱;0~20 min,B:35%~55%梯度;20~35 min,B:55%等度洗脱;0~30 min,B:30%~90%梯度洗脱。

1.3.4 建立一测多评分析方法

1) 线性关系考察 分别精密吸取 6 个质量浓度梯度的混合对照品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪中,按 1.3.3 色谱条件测定。以对照品溶液的

峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,计算标准曲线。计算6种大豆异黄酮的回归方程,确定线性范围。

2)相对校正因子、相对保留时间、相对峰面积的计算 分别精密吸取6个不同质量浓度的单一对照品溶液各10 μL ,注入高效液相色谱仪中,按1.3.3色谱条件测定。对262 nm下的测定结果进行分析,按公式1计算以大豆苷为内参物,对黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的相对校正因子 $f_{k/m}$;按公式2计算以大豆苷为内参物的相对保留时间 T_{mk} 。计算262 nm和248 nm下的峰面积比值,即为相对峰面积,记为 $A_{262/248}$ ^[16]。

$$f_{k/m} = \frac{f_k}{f_m} = \frac{W_k/A_k}{W_m/A_m} \quad (1)$$

$$T_{mk} = \frac{T_m}{T_k} \quad (2)$$

式(1)、(2)中: W_k 为内参物 k 的质量浓度; A_k 为内参物 k 的峰面积; W_m 为待测成分 m 的质量浓度; A_m 为待测成分 m 的峰面积; T_k, T_m 分别为待测成分和内参物的保留时间。

3)精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液10 μL 注入高效液相色谱仪中,连续进样6次,按1.3.3色谱条件测定,记录262 nm下的色谱图,测定峰面积。计算6种大豆异黄酮各成分峰面积的RSD值。

4)稳定性试验 取同一混合对照品溶液,分别在0, 2, 4, 8, 12, 24 h时,精密吸取10 μL 注入高效液相色谱仪中,按1.3.3色谱条件测定,记录262 nm下的色谱峰,测定峰面积。计算6种大豆异黄酮各成分峰面积的RSD值。

5)重复性试验 精密称取腐竹样品粉末0.2 g,共6份,按1.3.1样品溶液的处理方法制备后,精密吸取10 μL 按1.3.3色谱条件进样,记录262 nm下的色谱图,测定峰面积。采用一测多评分析方法,大豆苷的含量按外标法进行测定,再结合相对校正因子,按如下公式3计算样品中另外5种大豆异黄酮的含量^[17]。

$$W_m = \frac{W_k \times A_m}{f_{km} \times A_k} \quad (3)$$

式(3)中: W_k 为内参物 k 的质量浓度; A_k 为内参物 k 的峰面积; W_m 为待测成分 m 的质量浓度; A_m 为待测成分 m 的峰面积。

6)加样回收率试验 精密称取适量已测定含量的样品粉末6份,分别加入一定量的大豆苷、黄

豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素对照品溶液,按1.3.2样品溶液的处理方法制备加标样品后,分别精密吸取10 μL 注入高效液相色谱仪中,按1.3.3色谱条件测定,记录262 nm下的色谱图,测定峰面积。按如下公式计算加样回收率^[18]。

$$\text{回收率} = \frac{\text{实测质量}}{(\text{样品质量} + \text{添加质量})} \quad (4)$$

1.3.5 耐用性试验 在1.3.3色谱条件下,改用安捷伦和沃特世的高效液相色谱仪以及Ultimate AQ C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), Kromasil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,进行测定,记录262 nm下的色谱图,测定峰面积,计算以大豆苷为内参物,对于黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的相对校正因子,考察3个不同品牌的高效液相色谱仪以及3根不同品牌的色谱柱对其相对校正因子的影响。

在1.3.3色谱条件下,改变流量(0.9, 1.0, 1.1, 1.2 mL/min)和柱温(25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$),进行测定,记录262 nm下的色谱图,测定峰面积,计算以大豆苷为内参物,对于黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的相对校正因子,考察流速和温度对其相对校正因子的影响。

1.3.6 系统适应性试验 按照1.3.5的步骤,记录262 nm和248 nm下的色谱图,测定峰面积。并记录262 nm下6种大豆异黄酮的保留时间,然后以大豆苷为内参物,计算对黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的相对保留时间。

1.3.7 验证比对 精密吸取样品溶液、混合对照品溶液以及单一大豆苷对照品溶液各10 μL ,分别注入高效液相色谱仪,按1.3.3色谱条件测定,记录色谱图,测定峰面积。分别采用外标法和一测多评法计算待测样品中的6种大豆异黄酮含量。并将常规的外标法实测含量与一测多评计算的含量采用夹角余弦值进行比较,公式如式(5),验证建立的一测多评分析方法的准确性^[19]。

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i)^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i)^2}} \quad (5)$$

对建立的一测多评分析方法进行应用与验证时,按如下公式6计算两种方法的相对误差。

$$\text{相对误差} = \frac{(\text{QAMS法测定值} - \text{外标法测定值})}{\text{QAMS法测定值}} \times 100\% \quad (6)$$

2 结果与分析

2.1 一测多评方法的建立

2.1.1 色谱条件的优化 6种大豆异黄酮的甲醇溶液在200~400 nm进行紫外波长下扫描,结果发现异黄酮分别在208、248、262 nm处出现明显吸收峰(图1)。为了减少溶剂的干扰的影响,选用262 nm作为HPLC检测波长。同时为了较好地识别待测色谱峰,选用248 nm作为辅助的检测波长。

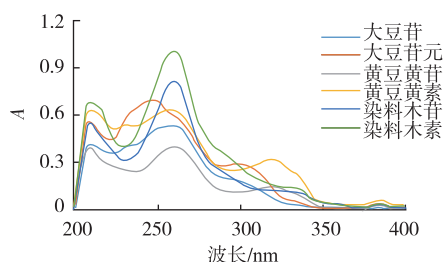


图1 6种大豆异黄酮的紫外光谱图

Fig. 1 Ultraviolet spectra of six soybean isoflavones

周光明等人^[20]在测定绿豆芽4种大豆异黄酮含量时,液相色谱条件采用的流动相为A:体积分数0.2%甲酸水溶液,B:乙腈;洗脱程序为:0~10 min,B:5%~80%;10~16 min,B:80%;16~22 min,B:80%~5%。于寒松等人^[8]在测定12种大豆异黄酮时,液相色谱条件采用的流动相为A:体积分数0.1%乙酸水溶液,B:体积分数0.1%乙酸的乙腈溶液。洗脱程序为:0~80 min,B:体积分数13%~40%。作者参考了上述的色谱条件,并设计了3组洗脱程序(见实验方法1.3.3)。考虑到大豆及其制品中存在较多的水溶性成分,可能对待测目标成分形成干扰,因此控制待测目标成分在10 min后出峰。其中洗脱程序(2)可以较好的分离所测的6个大豆异黄酮,且分析所需

的总时间较短,可在35 min内同时检测6个目标大豆异黄酮,优于另外两个洗脱程序。

经优化后,确定高效液相色谱分析条件如下:色谱仪:岛津LC-20A高效液相色谱仪;色谱柱:Inertsil ODS-SP C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:A为体积分数0.2%甲酸水溶液,B为甲醇;洗脱程序如下;流量为1.0 mL/min;进样量10 μL;柱温为30℃;检测波长:262 nm和248 nm。

2.1.2 线性关系 对6个梯度质量浓度的混合对照品溶液进行HPLC分析,色谱图如图2所示。以对照品溶液的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到6种大豆异黄酮对照品的回归方程,见下表1。分析结果表明,大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素在各自的线性范围内均具有良好的线性关系($R^2 > 0.9999$)。

2.1.3 相对校正因子 按实验方法1.3.3进行大豆异黄酮对照品的混标分析,根据公式1计算以大豆苷为内参物,对黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的相对校正因子^[21],结果如下表2所示。在262 nm检测波长下,相对校正因子分别为 $f_{\text{大豆苷/黄豆黄苷}}=1.0786$, $f_{\text{大豆苷/染料木苷}}=1.9185$, $f_{\text{大豆苷/大豆苷元}}=1.8972$, $f_{\text{大豆苷/黄豆黄素}}=3.0700$, $f_{\text{大豆苷/染料木素}}=3.1684$,其相对标准偏差RSD分别为1.10%、1.85%、1.76%、1.40%和0.56%,RSD均<2.0%,表明实验结果平行性较好^[22]。

2.1.4 精密度 对同一混合对照品溶液进行精密度试验,结果显示大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素RSD值分别为0.90%、0.90%、0.88%、0.85%、0.87%和1.12%,表明本方法精密度良好。

2.1.5 稳定性 对同一混合对照品溶液进行稳定

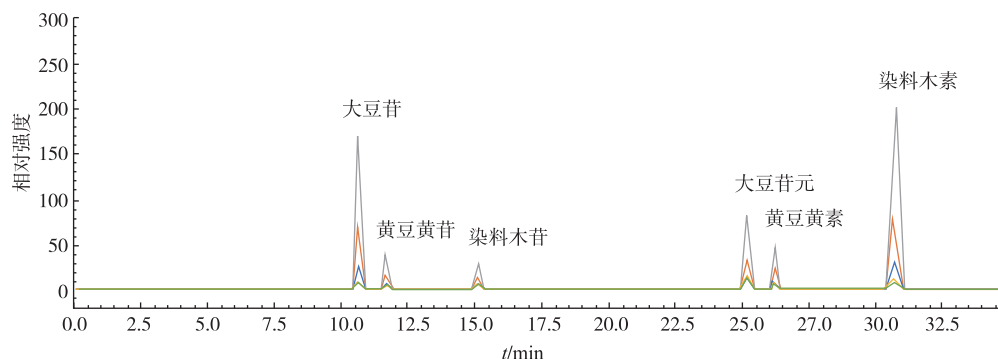


图2 6个质量浓度梯度的混合对照品色谱图

Fig. 2 HPLC analysis of six soybean isoflavones with different concentrations

表 1 6 种大豆异黄酮的回归方程及线性范围(262 nm)

Table 1 Regressive equations and liner range of six soybean isoflavones

化合物	回归方程	R^2	质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)
大豆苷	$y=37\ 629.3x+1387.8$	0.999 98	0.737 3~72
黄豆黄苷	$y=40\ 944.5x-12.2$	0.999 99	0.153 6~15
染料木苷	$y=72\ 290.8x-106.6$	0.999 99	0.061 44~6
大豆苷元	$y=70\ 944.4x+451.0$	0.999 98	0.153 6~15
黄豆黄素	$y=114\ 151.3x+493.4$	0.999 98	0.061 44~6
染料木素	$y=119\ 424.9x+920.1$	0.999 98	0.307 2~30

表 2 大豆苷对其他 5 种大豆异黄酮的校正因子

Table 2 RCF of daidzein to 5 other soybean isoflavones

编号	黄豆黄苷	染料木苷	大豆苷元	黄豆黄素	染料木素
1	1.088 0	1.920 7	1.885 5	3.034 2	3.172 8
2	1.083 6	1.912 7	1.883 2	3.035 7	3.174 4
3	1.082 8	1.903 6	1.881 6	3.036 9	3.158 9
4	1.088 9	1.887 2	1.872 6	3.021 2	3.148 5
5	1.068 9	1.899 8	1.897 1	3.053 9	3.157 3
6	1.059 3	1.987 0	1.963 3	3.238 1	3.198 9
平均值	1.078 6	1.918 5	1.897 2	3.053 3	3.168 4
RSD/%	1.10	1.85	1.76	1.40	0.56

性试验,结果显示大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素 RSD 值分别为 1.71%、1.63%、1.81%、1.75%、1.88%和 1.08%,表明该样品在 24 h 内保持稳定。

2.1.6 重复性 以腐竹为待测样品进行重复性试验,采用外标法测定腐竹中大豆苷的含量,一测多评法测定其它 5 种大豆异黄酮的含量。结果显示大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素 RSD 值分别为 1.13%、2.05%、2.05%、2.02%、2.19%和 2.23%,表明本方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率 大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的加样回收率分别为 102.71%、99.57%、100.24%、97.36%、99.35%和 98.14%,其 RSD 分别为 0.42%、0.38%、1.64%、1.49%、2.20%和 0.52%,结果表明方法的加样回收率良好。

2.2 耐用性和系统适应性评价

2.2.1 不同色谱柱及高效液相色谱仪考察 分析不同品牌液相和不同色谱柱下,大豆异黄酮之间的相对校正因子,结果如表 3 所示。大豆苷对于其他 5 种大豆异黄酮的相对校正因子的平均值为 $f_{\text{大豆苷/黄豆黄苷}} =$

$1.114\ 1, f_{\text{大豆苷/染料木苷}} = 1.950\ 0, f_{\text{大豆苷/大豆苷元}} = 1.876\ 4, f_{\text{大豆苷/黄豆黄素}} = 3.083\ 7, f_{\text{大豆苷/染料木素}} = 3.257\ 4$,其 RSD 值分别为 2.26%、1.83%、2.22%、2.66%、和 2.77%,均小于 3%,表明本方法适用范围广,可适用于不同的仪器和色谱柱,便于推广应用。

2.2.2 流量与柱温的考察 不同流量的条件下对 6 种大豆异黄酮进行 HPLC 分析,计算大豆苷对于其他 5 种大豆异黄酮的相对校正因子的 RSD 值,分别为 0.06%、0.14%、0.14%、0.12%和 0.25%;在不同温度的条件下 HPLC 分析发现,5 种大豆异黄酮的相对校正因子 RSD 值分别为 0.15%、0.06%、0.15%、0.13%和 0.21%。实验结果表明,HPLC 分析时的流量、柱温对 6 种大豆异黄酮的一测多评分析中相对校正因子的影响极小。

2.2.3 大豆异黄酮色谱峰的指认 在仅使用 1 个对照品时,如何指认待测样中其他 5 种大豆异黄酮的色谱峰是影响一测多评法高效性、准确性的关键。目前,一测多评分析过程中通常采用相对保留时间差、光谱相关色谱进行色谱峰指认^[14]。作者通过计算大豆异黄酮与内参物大豆苷的相对保留时间,以及 262、248 nm 下色谱峰面积的比值,从而判断

表 3 不同品牌液相和不同色谱柱测得的相对校正因子

Table 3 RCF of daidzein to 5 other soybean isoflavones in different HPLC instruments and columns

仪器	色谱柱	黄豆黄苷	染料木苷	大豆苷元	黄豆黄素	染料木素
岛津	Inertsil	1.078 6	1.918 5	1.897 2	3.070 0	3.168 4
	Kromasil	1.166 1	1.917 7	1.882 8	3.057 5	3.168 5
	Ultimate	1.113 8	1.927 1	1.873 8	3.079 0	3.182 8
安捷伦	Inertsil	1.114 2	1.930 7	1.866 7	3.067 2	3.223 2
	Kromasil	1.098 4	1.919 0	1.830 3	2.999 0	3.215 3
	Ultimate	1.113 5	1.954 1	1.846 2	3.094 9	3.240 6
沃特世	Inertsil	1.099 0	1.985 0	1.963 5	3.250 3	3.393 7
	Kromasil	1.105 8	1.989 3	1.897 8	3.160 5	3.361 3
	Ultimate	1.137 9	2.008 8	1.829 6	2.975 3	3.363 0
平均值		1.114 1	1.950 0	1.876 4	3.083 7	3.257 4
RSD/%		2.26	1.83	2.22	2.66	2.77

其他 5 种待测大豆异黄酮色谱峰的准确位置。

在改变仪器型号、色谱柱型号、流量、柱温等条件下,分别考察相对保留值和保留时间差在不同品牌仪器和不同品牌色谱柱中的重现性。结果发现保留时间差的波动较为明显,相对保留值的波动相对较小,采用相对保留值法进行大豆异黄酮类成分色谱峰的定位较为可行。在 3 个不同品牌高效液相色谱仪和 3 根不同品牌色谱柱的条件下,其他 5 种大豆异黄酮对于大豆苷的相对保留时间分别为 $T_{\text{黄豆黄苷/大豆苷}} = 1.10$, $T_{\text{染料木苷/大豆苷}} = 1.38$, $T_{\text{大豆苷元/大豆苷}} = 2.32$, $T_{\text{黄豆黄素/大豆苷}} = 2.47$, $T_{\text{染料木素/大豆苷}} = 2.85$,如下表 4 所示。在不同流量条件下,其相对保留时间分别为 1.10、1.43、2.41、2.51 和 2.93。在不同温度条件下,其相对保留时间

分别为 1.09、1.42、2.34、2.44 和 2.88。在检测条件变动情况下,相对保留时间的 RSD 均 $<5\%$,表明改变这些条件对其相对保留时间的影响不大。

另外,在双波长的检测条件下,大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的平均相对峰面积比值 $A_{262/248}$ 分别为 0.95、1.20、1.42、0.76、1.08 和 1.50,如下表 5 所示。因此,可以在相对保留时间基础上,参照双波长下的峰面积比值对大豆异黄酮的色谱峰进行准确指认。

2.3 一测多评法准确性评价

以 6 份腐竹提取液为待测样品,分别采用外标法和一测多评法测定提取液中 6 种大豆异黄酮的含量,结果分别如表 6 所示。计算其他 5 种大豆异

表 4 不同仪器色谱柱测得的相对保留时间

Table 4 Relative retention time in different instruments and columns

仪器	色谱柱	黄豆黄苷	染料木苷	大豆苷元	黄豆黄素	染料木素
岛津	Inertsil	1.10	1.42	2.37	2.46	2.89
	Ultimate	1.11	1.41	2.34	2.47	2.81
	Kromasil	1.13	1.42	2.44	2.68	3.01
安捷伦	Inertsil	1.07	1.38	2.30	2.40	2.87
	Ultimate	1.09	1.32	2.18	2.40	2.69
	Kromasil	1.08	1.34	2.23	2.38	2.72
沃特世	Inertsil	1.08	1.40	2.37	2.48	2.94
	Ultimate	1.11	1.35	2.29	2.53	2.85
	Kromasil	1.09	1.38	2.32	2.47	2.85
平均值		1.10	1.38	2.32	2.47	2.85
RSD/%		1.71	2.64	3.37	3.66	3.51

表 5 262 nm 与 248 nm 波长下峰面积的比值

Table 5 Peak area ratio of 262 nm to 248 nm

$A_{262/248}$	大豆苷	黄豆黄苷	染料木苷	大豆苷元	黄豆黄素	染料木素
1	0.95	1.18	1.50	0.83	1.07	1.49
2	0.95	1.18	1.52	0.83	1.06	1.50
3	0.95	1.19	1.49	0.83	1.07	1.50
4	0.96	1.22	1.51	0.83	1.06	1.49
5	0.95	1.24	1.53	0.84	1.11	1.49
6	0.91	1.20	1.55	0.82	1.10	1.52
平均值	0.95	1.20	1.52	0.83	1.08	1.50
RSD/%	1.86	2.00	1.42	0.76	1.98	0.78

表 6 外标法与一测多评法测定腐竹中 6 种异黄酮的质量分数

Table 6 Contents of six isoflavones in yuba determined by external standard method and QAMS (μg/g)

编号	大豆苷	黄豆黄苷		染料木苷		大豆苷元		黄豆黄素		染料木素	
	外标法	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS
1	59.2	12.97	12.87	67.64	67.63	17.64	17.6	2.57	2.49	21.50	21.28
2	59.9	13.2	13.1	69.91	69.89	17.97	17.94	2.67	2.6	22.11	21.89
3	57.94	12.66	12.56	66.85	66.84	17.39	17.35	2.62	2.55	21.2	20.99
4	59.32	13.51	13.41	69.29	69.28	17.2	17.16	2.64	2.57	21.67	21.45
5	58.76	13.23	13.13	68.82	68.81	17.06	17.02	2.6	2.52	20.82	20.61
6	58.23	12.92	12.82	65.92	65.91	16.95	16.91	2.49	2.41	20.76	20.55

黄酮的一测多评计算含量与外标法实测含量的夹角余弦值,分别为0.999 98,1.000 00,0.999 99,0.999 98和0.999 99,表明2种方法测得的含量没有显著性差异,所建立的一测多评分析方法有良好的准确性。

2.4 一测多评法的再验证与应用

对腐竹、豆腐干、千张、大豆和豆腐等豆制品提取液进行 HPLC 分析,采用一测多评法计算 6 种大豆异黄酮的含量,结果见图 3。此外,采用外标法计算和验证 5 种豆制品中大豆异黄酮的含量,按公式 6 计算两种测定方法下的相对误差,结果显示黄豆黄苷的测定相对误差为 0.06%~1.43%,染料木苷的测定相对误差为 0.57~3.65%,大豆苷元的测定相对误差为 0.95%~3.72%,黄豆黄素的测定相对误差为 0.85%~3.95%,染料木素的测定相对误差为 0.07%~2.74%。参考周园等的研究^[23],比较一测多评法与外标法的相对误差小于 5%,说明建立的一测多评分析方法测定结果具有较高的准确性和可信度。

对选取的豆制品中大豆异黄酮含量测定结果表明,豆制品中大豆异黄酮以染料木苷、大豆苷为主,异黄酮苷元含量相对较低,豆腐干中大豆异黄

酮的含量高于其他豆制品。研究表明,大豆异黄酮在加工过程中不同组分间易发生转化,如加热导致大豆异黄酮苷分解成苷元^[8]。此外,不同气候、产地等因素,也是导致豆制品原料中大豆异黄酮含量差异的重要因素。目前,国内对豆制品中不同大豆异黄酮的定量分析不多,系统评价日常膳食中大豆异黄酮的含量,是分析居民大豆异黄酮日摄入量与健康相关性的重要数据基础,而一测多评分析技术可极大促进膳食营养素、功能因子的含量测定。

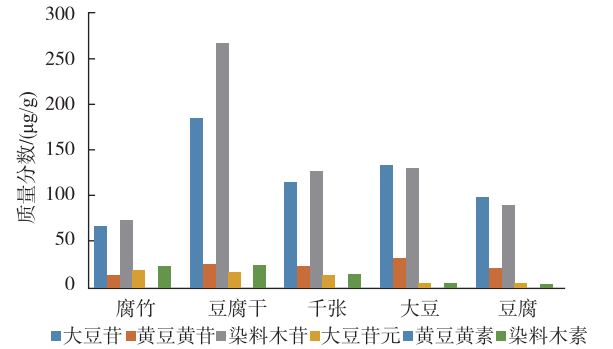


图 3 一测多评法测定豆制品中大豆异黄酮的质量分数
Fig. 3 Contents of soybean isoflavones in bean products determined by QAMS

3 结 语

膳食中的天然功能因子,如黄酮、酚酸等,许多以系列衍生物的形式存在,具有结构共性和差异性。通过分析黄豆苷元、黄豆苷、染料木素、染料木苷、黄豆黄素、黄豆黄苷等6种大豆异黄酮在高效液相色谱行为学上的差异,基于它们的结构共性,寻找在色谱行为学及光谱学上的内在联系,研究建立了6种大豆异黄酮的一测多评方法。通过大量实验数据建立了6种大豆异黄酮间的相对校正因子($f_{262\text{ nm}}$, $f_{\text{大豆苷/黄豆黄苷}}=1.114\ 1$, $f_{\text{大豆苷/染料木苷}}=1.950\ 0$, $f_{\text{大豆苷/大豆苷元}}=1.876\ 4$, $f_{\text{大豆苷/黄豆黄素}}=3.083\ 7$, $f_{\text{大豆苷/染料木素}}=3.257\ 4$),以相对保留时间($T_{\text{黄豆黄苷/大豆苷}}=1.10$,

$T_{\text{染料木苷/大豆苷}}=1.38$, $T_{\text{大豆苷元/大豆苷}}=2.32$, $T_{\text{黄豆黄素/大豆苷}}=2.47$, $T_{\text{染料木素/大豆苷}}=2.85$)和相对峰面积($A_{262/248}$ 分别为0.95,1.20,1.52,0.83,1.08,1.50)对大豆异黄酮的色谱峰进行了准确指认。

对建立的一测多评方法进行了方法学验证,研究表明本方法精密度高,供试品稳定良好,结果重复性及加样回收率高,耐用性和系统适应性均表现良好,在不同型号仪器、色谱柱、流量、柱温等条件下均可进行,便于推广。对日常豆制品中异黄酮含量进行测定,结果表明一测多评法测定结果与外标法结果相对误差小,所建立的一测多评法测定结果准确,可用于大豆异黄酮的快速定量分析及相关产品的质量评价。

参考文献:

- [1] MESSINA M. Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2014, 100(1(S)): 423S-430S.
- [2] MA Binggang, HAO Qingnan, MA Chao. The methods for separation and detection of soybean isoflavone and hygienical functions of soybean isoflavones[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27(6): 6-13. (in Chinese)
- [3] YIN Xueze, JIN Ming, JIN Yanhua, et al. Protective effects of soy isoflavones and saponins on acute liver injury induced by acetaminophen in mice[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(12): 1266-1269. (in Chinese)
- [4] LI Yang, ZHANG Haiyan. Soybean isoflavones ameliorate ischemic cardiomyopathy by activating Nrf2-mediated antioxidant responses[J]. *Food & Function*, 2017, 8(8): 2935-2944.
- [5] DONG Xin, XU Wenqing, SIKES R A, et al. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 1923-1933.
- [6] 马丽娟.大豆异黄酮对心肌的保护作用及其机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2006.
- [7] XU Meirong, HAN Shunyu, KOU Xianglong. Correlation analysis between isoflavones and their components and quality in soybean planted in Gansu[J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2018(01): 37-40. (in Chinese)
- [8] YU Hansong, CHEN Jinzhao, HU Yaohui. HPLC method optimization for 12 kinds of soy isoflavones monomers determination and method application some soy products[J]. *Oil Engineering*, 2015(4): 24-28. (in Chinese)
- [9] YAN Huili, FENG Zhibiao, LIU Ning, et al. Analysis of AOAC official method of determination of soybean isoflavones [J]. *China Oils and Fats*, 2010, 35(4): 63-67. (in Chinese)
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准管理委员会. GB/T 23788-2009 保健食品中大豆异黄酮的测定方法 高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准管理委员会. GB/T 26625-2011 粮油检验 大豆异黄酮含量测定 高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [12] YIN Lijun, LI Lite, LI Zaigui. Rapid determination of isoflavones in fermented soybean products by HPLC[J]. *Food Science*, 2002, 23(2): 100-103. (in Chinese)
- [13] WANG Z M, GAO H M, FU X T, et al. Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine[J]. *China Journal of Chinese medicine*, 2006, 31(23): 1925-1928. (in Chinese)
- [14] WANG Zhimin, QIAN Zhongzhi, ZHANG Qiwei, et al. Establishment technical guidelines of quantitative analysis of multi-

- components by single-marker[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, 36(6): 657-658. (in Chinese)
- [15] YAN L, WEI X, JI T, et al. Development of a novel method combining multi-wavelength HPLC fingerprint and quantitative analysis of multi-component by single marker for quality control of *Houttuynia cordata*[J]. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2014, 6(8): 347-356.
- [16] WAN Q, XIONG H, ZHANG S. Determination of four flavones in *Chrysosplenium nudicaule* Bunge by QAMS method[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, 36(6): 1053-1058.
- [17] REN Yongshen, XIONG Hui, SHEN Yuxia, et al. Simultaneous determination of five flavones in *Berchemia lineata* extraction by HPLC-QAMS[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2015, 35(12): 1099-1103. (in Chinese)
- [18] KUN L, GANG H U, SHI-NAN Z. Assay of starch in tobacco with zymolysis-continuous flow method [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2006, 12(1): 20-22.
- [19] LIU Xiangnan, LI Mingzhu, SHANG Xiaona, et al. Determination of six active ingredients in *gycyrrhizae radix et rhizoma* by quantitative analysis of multi-components with a single-marker[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2013, 19(24): 56-59. (in Chinese)
- [20] ZHOU Guangming, LI Yanyan, XIN Danmin. Determination of four isoflavone in mung bean sprout by HPLC [J]. *Food Research and Development*, 2010, 31(8): 98-102. (in Chinese)
- [21] LI Muzi, WANG Jinghui, GUO Hongzhu, et al. Simultaneous determination of multiple components in decoction pieces of *Atractylodes Macrocephala* by HPLC[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2017, 37(9): 1585-1592. (in Chinese)
- [22] BORKHODOEV V Y. Estimation of limits of detection and determination in X-ray fluorescence analysis by the dependence of the relative standard deviation on analyte concentration[J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 71(9): 872-877.
- [23] ZHOU Yuan, DONG Qiuju, FENG Wei, et al. Determination of seven effective constituents in crude and processed *Cuscuta australis* by quantitative analysis of multi-components with single marker[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(1): 227-232. (in Chinese)

科 技 信 息

欧盟评估一种甘油三酯脂肪酶的安全性

2020年3月11日, 欧盟食品安全局发布关于来自一种转基因汉逊酵母 (*Ogataea polymorpha*) 的甘油三酯脂肪酶 (triacylglycerol lipase) 安全性的评估结果。

据了解, 这种食品酶是由 Danisco US Inc. 用转基因汉逊酵母菌株 DP - Jzk33 生产的。这种食品酶旨在用于烘焙和谷物加工, 不含生产生物体的活细胞和重组 DNA。经过评估, 专家小组得出结论, 这种食品酶在预期使用条件下不会引起安全问题。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟评估一种甘油三酯脂肪酶的安全性 [EB/OL]. (2020-3-11). <http://news.foodmate.net/2020/03/553319.html>

欧盟重新评估偏酒石酸作为食品添加剂的安全性

2020年3月11日, 据欧盟食品安全局 (EFSA) 消息, 欧盟食品添加剂和调味剂小组 (FAF) 重新评估了偏酒石酸 (metatartaric acid) (E 353) 作为食品添加剂的安全性。

经过评估, 专家小组认为在规定的用途和使用水平下, 偏酒石酸作为食品添加剂不存在安全问题。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟重新评估偏酒石酸作为食品添加剂的安全性 [EB/OL]. (2020-3-11). <http://news.foodmate.net/2020/03/553270.html>