



doi: 10.12452/j.fxcxb.240621161

碱-酶水解结合分散式固相萃取提高大豆异黄酮活性总量测定的准确性

顾文¹, 黎晨曼², 孙震², 庞月红¹, 冯永巍², 沈晓芳^{1*}

(1. 江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 无锡市食品安全检验检测中心, 国家市场监管技术创新中心(特殊食品), 江苏 无锡 214142)

摘要: 通过碱性甲醇溶液超声提取, 结合杏仁来源 β -葡萄糖苷酶水解及聚酰胺分散式固相萃取步骤, 建立了超高效液相色谱测定大豆异黄酮活性总量的方法。样品中的丙二酰及乙酰类大豆异黄酮苷在碱性条件下水解成基本型苷, 并在 β -葡萄糖苷酶的作用下进一步脱去糖基转变为相应的苷元。样品中12种不同形式的大豆异黄酮转变为仅含3种大豆异黄酮苷元(大豆苷元、黄豆黄素、染料木素)后, 以聚酰胺粉进行分散式固相萃取, C_{18} 反相色谱柱(2.1 mm i. d. $\times$ 50 mm, 1.8 μ m)分离。结果显示, 大豆苷元、黄豆黄素及染料木素在3 min内实现基线分离, 3种异黄酮苷元的标准曲线相关系数(r^2)均大于0.999, 总异黄酮的回收率为94.3%~102%, 相对标准偏差(RSD, $n=6$)小于5.0%, 具有较高的准确度和精密性。该方法通过检测样品中的全部苷元来计算异黄酮总量, 有助于降低异黄酮检测在分离度、准确度及检测成本上带来的挑战; 考虑异黄酮在体内的转化吸收机制和生理效应, 以苷元总量计能更科学地反映实际的异黄酮活性水平, 避免因通过苷和苷元的简单加和而造成对异黄酮含量水平的高估。

关键词: 大豆异黄酮; 聚酰胺(PA); 分散式固相萃取(d-SPE); β -葡萄糖苷酶; 超高效液相色谱(UPLC)

中图分类号: O657.7; TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2025)01-0106-10

Alkaline-Enzymatic Hydrolysis and Dispersive Solid-phase Extraction for Improved Quantitation of Total Biological Isoflavones

GU Wen¹, LI Chen-man², SUN Zhen², PANG Yue-hong¹, FENG Yong-wei², SHEN Xiao-fang^{1*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Technology Innovation Center of Special Food for State Market Regulation, Wuxi Food Safety Inspection and Test Center, Wuxi 214142, China)

Abstract: To determine the total isoflavones (ISF), most analytical methods have focused on the three aglycone ISFs and three basic glucoside ISFs due to the unavailability of reference standards for malonyl- and acetyl- glucosides, and resulted in bias. Hence, an ultra performance liquid chromatography (UPLC) method was developed that allows the quantitation of all 12 ISFs using only 3 isoflavone standards. All glucoside ISFs, including daidzin, malonyl and acetyl daidzin, glycitin, malonyl and acetyl glycitin, genistin, malonyl and acetyl genistin, were converted into only 3 aglycone ISFs via alkaline methanol extraction and enzymatic hydrolysis. The malonyl glucosides and acetyl glucosides in sample were firstly hydrolyzed to their corresponding glucoside forms in alkaline methanol, the produced glucosides were further hydrolyzed by a β -glucosidase from almonds, and the sugar moieties from glucoside were removed. The released and original existed aglycone units were concentrated by polyamide through a dispersive solid-phase extraction, and determined by UPLC. All 3 aglycone ISFs (daidzein, glycitein and genistein) were separated in a reversed-phase C_{18} column (2.1 mm i. d. $\times$ 50 mm, 1.8 μ m). The mobile phase, mixed acetonitrile and phosphoric acid aqueous solution was employed to enable a 3 min of isocratic elution. All linearity correlation coefficients (r^2) were higher than 0.999, and the recoveries were between 94.3% and 102% with relative standard deviations (RSD, $n=6$) less than 5.0%, that demonstrated precise and accurate results in the determi-

收稿日期: 2024-06-21; 修回日期: 2024-07-19

基金项目: 江苏省市场监督管理局科技计划项目(KJ2024070)

* 通讯作者: 沈晓芳, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与质量控制, E-mail: xfshen@jiangnan.edu.cn

nation of total ISFs. To determine the total ISFs by simply summing the concentrations of the aglycon ISF will mitigate the pressure from interference, deviation and cost on test. In addition, based on the mechanisms of absorption and metabolism, using aglycone (free) forms to quantitate total ISFs is expected to present actual bioactivity of the phytoestrogens, this will avoid overestimate isoflavone levels or intake by simply adding of free and glucoside forms of isoflavone concentrations.

Key words: isoflavone; polyamide (PA); dispersive solid-phase extraction (d-SPE); β -glucosidase; ultra performance liquid chromatography (UPLC)

大豆异黄酮(ISF)具有与 β -雌二醇类似结构, 因而又被称为植物雌激素^[1], 可用于更年期综合征的辅助治疗^[2]。此外, 研究表明 ISF 同时具有抗氧化^[3]、预防肥胖^[4]、预防糖尿病^[5]、降低癌症发生风险^[6]、预防高血压^[7]及防止骨质疏松的作用^[8], 因而通过饮食摄入一定量的 ISF 有助于人体健康并可降低现代文明病的发生率^[9]。虽然 ISF 主要来源于大豆, 但依然被认为是一种内分泌干扰物^[10], 过量地摄入 ISF 也会危害健康^[11]。最新研究表明, 在早期发育过程中如果摄入大量 ISF, 如长期食用豆基婴儿配方食品^[12]可能对生殖系统产生不良影响^[13-14]。在我国及其他亚洲国家有普遍食用大豆及其制品的习惯, 同时大豆蛋白作为可替代动物蛋白的少数植物蛋白被广泛用于食品工业及膳食营养补充^[15], 而大豆分离蛋白均残留有一定量的 ISF, 导致过量摄入植物雌激素的风险与日俱增^[16]。因此, 特别是针对豆基婴幼儿配方食品, 有必要建立一种准确、快速、经济的 ISF 活性总量测定方法, 为消费者提供合理的饮食指导, 同时促进大豆深加工产业链的发展, 推动低 ISF 残留大豆分离蛋白的开发和应用^[17]。

ISF 包括苷和苷元两类, 具有 12 种不同的结构 (如图 1 所示)。目前测定 ISF 的方法主要为高效液相色谱法 (HPLC)^[18-22]及液质联用法^[23-25], 同时也有报道采用酶联免疫法^[26]以及毛细管电泳法^[27]测定 ISF。但是由于丙二酰及乙酰类 ISF 不稳定, 在无法获得定量标准品的情况下^[19,28-29], 目前多数方法包括现行国家标准^[22]仅能对样品中的 3 种苷元 (大豆苷元、黄豆黄素、染料木素) 和 3 种基本苷 (大豆苷、黄豆苷、染料木苷) 进行测定, ISF 总量也仅以上述 6 种成分的总和来计算。由于未体现丙二酰及乙酰类 ISF, 因而测定结果往往较真实值偏低。为准确测定 12 种 ISF 的总量, 美国分析化学家协会 (AOAC) 收录的 ISF 测定方法^[19]以参考图谱比对的方式通过分子量换算计算丙二酰及乙酰类 ISF 的量。但是, 采用上述方法需要确保色谱条件的充分一致性, 包括色谱柱的规格、品牌的选择, 以保证获得相对一致的保留时间^[19]。当样品基质复杂或保留时间发生偏移时往往引起较大的误差, 同时色谱运行时间也长达 60 min。考虑到同时测定 12 种 ISF 所带来的成本、分离度及准确度的挑战, 一些方法^[18,29]将乙酰及丙二酰类大豆异黄酮苷进行水解, 将其转化为 3 种基本型异黄酮苷后进行定量, 保证了测试结果的准确性。

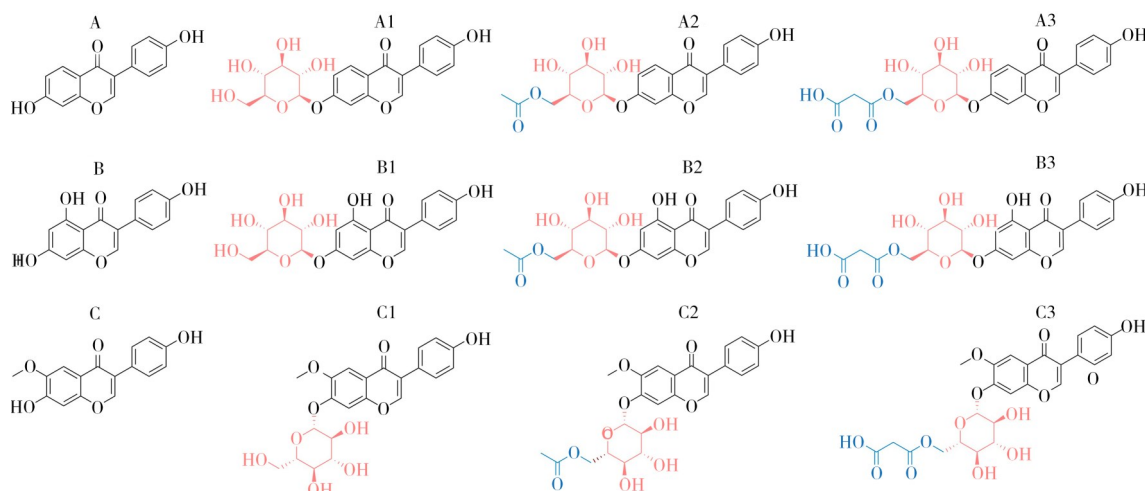


图1 大豆异黄酮苷元及苷的结构式

Fig. 1 Structures of isoflavones and glucosides

A: daidzein (大豆苷元), A1: daidzin (大豆苷), A2: acetyl daidzin (乙酰大豆苷), A3: malonyl daidzin (丙二酰大豆苷); B: genistein (染料木素), B1: genistin (染料木苷), B2: acetyl genistin (乙酰染料木苷), B3: malonyl genistin (丙二酰染料木苷); C: glycitein (黄豆黄素), C1: glycitin (黄豆黄苷), C2: acetyl glycitein (乙酰黄豆黄苷), C3: malonyl glycitein (丙二酰黄豆黄苷)

异黄酮苷很难被直接吸收^[30],但当进入人体肠道后,在肠道菌群和葡萄糖苷酶的共同作用下可水解为苷元并在小肠迅速吸收^[31-32],因此检测苷元总量可以反映实际的ISF活性水平;此外,异黄酮苷由于结构上含有糖基,平均分子量是苷元的1.6倍,如果ISF总量以苷及苷元的简单加和来计算^[22]则会造成测定值高于单以苷元形式计的结果,因此在ISF总量的定义上有必要进行统一,避免由于在苷及苷元形式上表述不统一而造成结果差异^[33]。为此,本文结合碱性溶液提取及 β -葡萄糖苷酶水解,实现了全部9种大豆异黄酮苷到苷元的定量转化;通过聚酰胺(PA)分散式固相萃取(d-SPE),建立了以超高效液相色谱(UPLC)快速测定ISF活性总量的分析方法。该方法的建立使得检测目标物由原来的12种ISF转变为仅需检测3种苷元,检测成本也由于标准品的减少而有效降低;此外,目标物的减少将有助于消除基质对色谱峰的干扰并有效缩短仪器运行时间。

1 实验部分

1.1 材料与设备

大豆苷元及染料木素标准品购自Merck公司;大豆苷及染料木苷标准品购自BePure公司;黄豆黄素及黄豆黄苷标准品购自上海源叶生物科技有限公司;定性用脱脂大豆粉参考物质来源于美国药典(USP);杏仁来源 β -葡萄糖苷酶购自Sigma公司。乙腈、甲醇及甲酸均为色谱纯,来自西班牙Scharlau公司;冰醋酸(优级纯)、磷酸(优级纯)、氢氧化钠(分析纯)、乙酸钠(分析纯)、氨水(分析纯)、聚酰胺粉(分析纯,80~100目)均购自上海沪试实验室器材股份有限公司。豆基婴儿配方粉、异黄酮补充剂及其他豆基类食品分别购自超市及电商平台。

Agilent Infinity II 1290超高效液相色谱仪,配备喷射流技术大气压电喷雾离子源的Agilent Triple Quad MS G6470A三重四极杆质谱仪(美国安捷伦公司);Agilent Mass-Hunt质谱定性软件(Ver. B. 08.00);Waters Acquity超高效液相色谱仪,配备TUV紫外检测器(美国沃特世公司);Waters Empower Pro 3色谱软件(Ver. 7.21.00);Mettler Toledo XPE205DR分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KUDOS SK2200H超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);JULABO SW22振摇水浴锅(德国优莱博公司);Sigma 2-16离心机(德国西格玛公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 定性色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈色谱柱(2.1 mm i. d. ×50 mm, 1.8 μ m);流动相A:含有0.1%甲酸的水溶液,流动相B:乙腈;梯度洗脱程序:流动相B在12 min内由8%线性增至25%并保持1 min,随后降至8%进行平衡,运行时间15 min;流速:0.4 mL·min⁻¹;柱温:(40±2) °C;进样量:1 μ L。

质谱条件:大气压电喷雾离子源(ESI);正离子模式,多重反应监测(MRM)模式;干燥气温度300 °C;干燥气流速10 L·min⁻¹;雾化气压力138 kPa;鞘气温度300 °C;鞘气流速10 L·min⁻¹;毛细管电压2 000 V。

1.2.2 定量色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈色谱柱(2.1 mm i. d. ×50 mm, 1.8 μ m);流动相A:含有0.1%磷酸的水溶液;流动相B:乙腈;流速:0.4 mL·min⁻¹;柱温:(40±2) °C;检测波长:260 nm;进样量:3 μ L。梯度洗脱条件:流动相B在5 min内由5%线性增至30%并保持1.5 min,随后在0.1 min内降至5%进行平衡;运行时间10 min。等度洗脱条件:74%A, 26%B;运行时间5 min。

1.2.3 标准溶液的制备 ISF标准储备溶液:精密称取ISF标准品(大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素)各约20 mg,分别置于100 mL棕色容量瓶中,加入适量甲醇,超声使溶解,用甲醇定容至刻度,混匀,质量浓度约为0.02 mg·mL⁻¹。取上述储备液适量,用80%甲醇水溶液逐级稀释至不同浓度,按色谱条件进样并绘制标准工作曲线。

定性用大豆粉标准溶液:称取USP脱脂大豆粉参考物质约100 mg置于100 mL棕色锥形瓶中,置于烘箱内,在120 °C下加热120 min,放冷,定量加入50 mL 80%甲醇水溶液超声提取20 min。取适量提取液,用0.2 μ m的聚丙烯(PP)滤头过滤后待用,此提取溶液作为质谱定性用参考样品。

1.2.4 检测样品的制备 精密称取一定量的样品粉末置于100 mL棕色锥形瓶中,加入80 mL含0.3%

氢氧化钠的80%甲醇水溶液, 超声提取20 min, 放冷, 加入4 mL冰醋酸中和, 转移并用甲醇定容至100 mL。取提取液1 mL置于15 mL PP离心管内, 加入9 mL醋酸钠缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.0)及0.1 mL β -葡萄糖苷酶溶液(5 U), 在50 °C水浴条件下酶解120 min。取出, 趁热加入0.2 g PA粉, 剧烈振摇1 min。收集PA于6 mL固相萃取管内, 用10 mL 10%甲醇溶液分次荡洗离心管并用5 mL纯水淋洗小柱内的PA, 用真空泵抽至近干。用5 mL含0.3%氨水的甲醇洗脱, 收集洗脱液, 取适量, 用0.2 μm PP滤头过滤后进行测试。样品的制备及检测流程如图2所示。

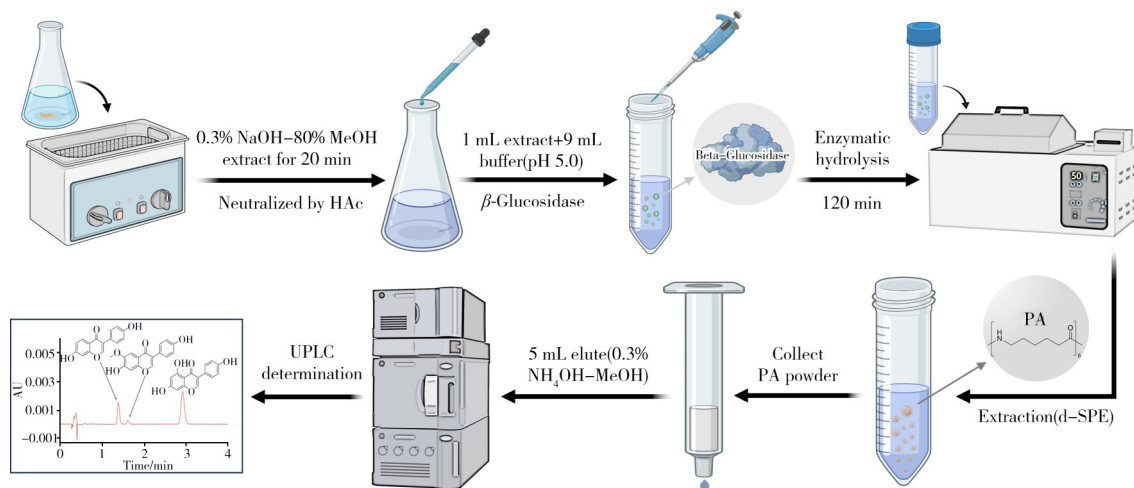


图2 大豆异黄酮的提取及检测流程图

Fig. 2 Schematic flow diagram of sample extraction and isoflavones determination

2 结果与讨论

2.1 大豆异黄酮的定性

样品中的大豆苷、黄豆苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素可通过与标准品的色谱保留时间比对, 以及在相同质谱条件下获得的准分子离子进行定性, 如图3所示。对于丙二酰及乙酰类大豆异黄酮苷, 在缺乏相应标准品的情况下以USP来源的脱脂大豆粉参考物质为样品, 经80%甲醇水溶液超声提取后, 采用多级质谱扫描的方式进行分子鉴定^[34], 在选择离子监测模式下利用优化质谱条件下获得的各离子的平均碰撞能对样品进行子离子扫描, 扫描范围为100~500 m/z , 从而确定在该色谱条件下丙二酰及乙酰类大豆异黄酮苷的出峰位置。表1列出了丙二酰及乙酰类大豆异黄酮苷的定性子离子及保留时间, 以此为依据, 利用质谱的绝对响应为后续的水解研究提供基础。

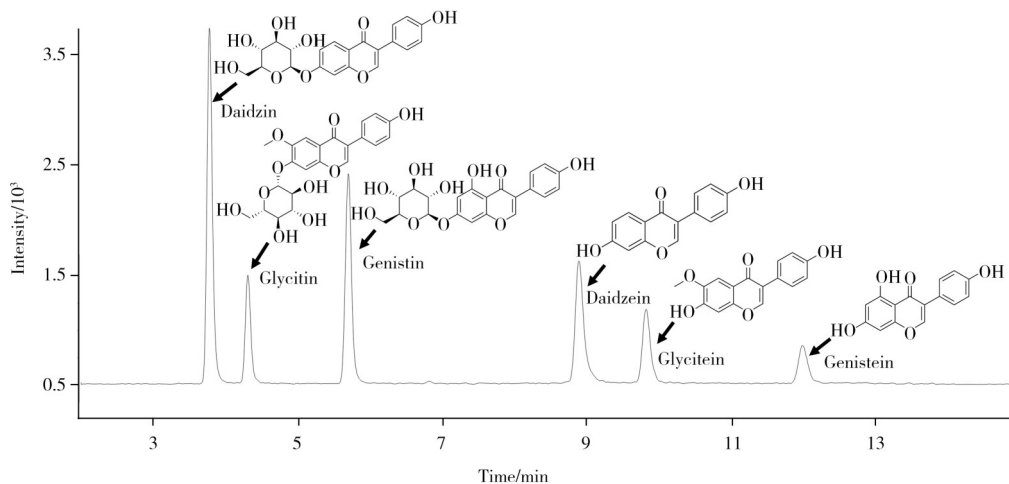


图3 大豆异黄酮苷及苷元在多重反应监测模式下的总离子流色谱图

Fig. 3 Total ion chromatogram of glucoside and aglycone ISF under MRM mode

表 1 质谱 MRM 模式下丙二酰及乙酰类大豆异黄酮苷的离子参数及色谱保留时间

Table 1 Ion parameters and retention times of malonyl and acetyl glucoside ISFs from mass spectra MRM mode

No.	Isoflavones	Precursor ion(<i>m/z</i>)	Product ion(<i>m/z</i>)	Retention time/min
1	Malonyl daidzin	503	255	6.63
2	Malonyl glycitin	533	285	7.00
3	Acetyl daidzin	459	255	7.97
4	Acetyl glycitin	489	285	8.47
5	Malonyl genistin	519	271	8.50
6	Acetyl genistin	475	271	10.35

2.2 水解条件的选择

2.2.1 葡萄糖苷酶对大豆异黄酮苷的水解活性 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)又称葡萄糖水解酶,通过糖苷化和去糖苷化的双取代机制能高效地水解苷类化合物分子中非还原性末端的葡萄糖基,使苷转变为苷元,因而 β -葡萄糖苷酶被广泛用于食品工业的水解工艺中^[35]。由于大豆异黄酮苷是以大豆苷元、黄豆黄素及染料木素作为配糖体通过糖苷键与葡萄糖基形成的一类苷,因此在一定条件下 β -葡萄糖苷酶可将大豆异黄酮苷定量转化为相应的苷元。考虑到已有较多文献使用杏仁来源 β -葡萄糖苷酶对异黄酮苷进行水解^[36-37],且该酶相对价廉且易获得,因而作为本文的研究用酶。杏仁来源 β -葡萄糖苷酶活性在 pH 4.0~5.5 的范围内稳定,且允许的反应温度可达 50 °C^[37],故实验温度控制在 50 °C 以获得较快的水解效率;该酶的最佳水解 pH 值一般为 5.0^[36],因而本文以 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液将 pH 控制在 5.0±0.1 范围内进行异黄酮苷的水解。酶解后,以定性质谱条件通过对比样品中各异黄酮苷的质谱响应值变化来考察不同酶用量对水解率的影响。由于豆基婴儿配方粉中添加有多种维生素及矿物质等营养素,因此选择该样品基质研究苷元的转化具有代表性。样品经 80% 甲醇超声提取后,取 1 mL 提取液与 9 mL 醋酸钠缓冲液及 10 mL 纯甲醇混合,滤过后进样;另一份同样移取 1 mL 提取液,加入 9 mL 含酶缓冲液后进行水解,最后加入 10 mL 纯甲醇混合,进样。以两样品获得的质谱绝对响应值计算水解率,公式如下:

$$\text{大豆异黄酮苷水解率(\%)} = 100\% - \frac{A_1}{A_2} \times 100\%$$

式中: A_1 为样品经酶解后各异黄酮苷的质谱绝对响应值; A_2 为参考样品中各异黄酮苷的质谱绝对响应值。

如图 4A 所示,经过 2 h 的酶解,当使用 1 U 的 β -葡萄糖苷酶时即对大豆苷及染料木苷表现出良好的水解效率,随着浓度增加到 5 U 时,大豆苷、黄豆黄苷及染料木苷的水解率均达到 95% 以上。但该酶对丙二酰及乙酰类大豆异黄酮苷显示出较低的水解活性。在同样的水解时长下,乙酰大豆苷的水解率为 28.2%,而乙酰黄豆黄苷和乙酰染料木苷的水解率均低于 20%(图 4B);对于丙二酰类异黄酮苷,3 种异黄酮苷在 5 U 酶的条件下水解率均低于 10%(图 4C)。基本型异黄酮苷与丙二酰及乙酰类异黄酮苷在水解难易性上存在较大差异,其原因可能为糖基上的乙酰基或丙二酰基侧链对酶的亲核取代形成了空间位阻作用,阻碍了糖基-酶共价中间体的生成进而无法迅速释放苷元。对于丙二酰及乙酰类异黄酮苷,通过提高酶的使用量并延长水解时间可能会获得进一步的苷元转化,但会增加测试成本,且较长的酶解时间也不利于方法的时效性。因此有必要引入其他水解方式先将丙二酰及乙酰类异黄酮苷转化为基本型异黄酮苷,再利用葡萄糖苷酶对基本型异黄酮苷较高的水解活性来满足分析方法的要求。由于丙二酰及乙酰类大豆异黄酮苷分子中的酯键在碱性条件下易发生水解^[29],有研究表明当使用含 0.3% 氢氧化钠的甲醇溶液时可将丙二酰及乙酰类大豆异黄酮苷的酰基全部水解并定量转化为 3 种基本型异黄酮苷(大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷)^[34]。基于此,本文以含 0.3% 氢氧化钠的 80% 甲醇溶液作为提取溶剂,将样品超声提取 20 min 后用冰醋酸中和。经质谱检测发现,样品中丙二酰及乙酰类异黄酮苷中的最高质谱响应(丙二酰染料木苷)仅为直接用 80% 甲醇提取样品的 0.4%,说明所有丙二酰及乙酰类异黄酮苷均发生了比较完全的水解。

2.2.2 大豆异黄酮底物浓度对葡萄糖苷酶水解活力的影响 如前所述,丙二酰及乙酰类大豆异黄酮苷分子上的酯键侧链可以阻碍与葡萄糖苷酶的特异性结合,进而在一定条件下使其无法迅速释放苷元。而对于 3 种基本型异黄酮苷,杏仁来源的 β -葡萄糖苷酶则表现出良好的水解活性,在一定酶浓度下即

可将苷基本定量转化为苷元, 从而满足检测要求。由于不同样品中异黄酮的含量存在差异, 选择合适的酶浓度是实现全部异黄酮苷元准确测定的关键, 因而需要进一步探究大豆苷、黄豆黄苷及染料木苷浓度对该酶活力的影响。本文以酶促反应动力学 Michaelis-Menton 方程, 通过对反应速度 v 和底物浓度 $[S]$ 之间关系的非线性拟合分别计算 $v_{\max}$ 及 K_m :

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_m}$$

式中: K_m 是指酶反应速度达到最高速度一半时的底物浓度, 单位为 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $v_{\max}$ 代表在最适条件下被底物饱和时的理论最高酶水解能力, 单位为 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

实验将各异黄酮苷标准溶液制备成不同浓度的底物溶液, 实验浓度约为线性范围最高浓度点的 200 倍。加入 1 U β -葡萄糖苷酶反应 60 min, 并按“1.2.2”的梯度洗脱色谱条件测定水解后各异黄酮苷及苷元的浓度, 以 GraphPad Prism (Ver. 9.3.0) 进行非线性拟合计算。结果如图 5 所示, 3 个异黄酮苷浓度对应于苷元的线性回归系数 (r^2) 均在 0.999 以上, 说明在实验浓度范围内, 反应速度 v 和底物浓度 $[S]$ 基本呈线性关系, 所使用的异黄酮苷浓度对于 1 U 的 β -葡萄糖苷酶来说远未达到饱和。杏仁来源的 β -葡萄糖苷酶对染料木苷的 K_m 值为 $6.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 相较于大豆苷 ($8.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及黄豆黄苷 ($8.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 其 K_m 值最低, 表现出最高的亲和力, 即在较低底物浓度时就能表现出较高的催化效率; 对于 $v_{\max}$ 值, 葡萄糖苷酶水解大豆苷的数值为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 明显高于黄豆黄苷 ($0.057 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) 及染料木苷 ($0.087 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), 表明水解大豆苷的反应速度最快, 这与图 4 结果基本一致。且 $v_{\max}$ 取决于酶的浓度, 对于水解效率较低的黄豆黄苷, 当 β -葡萄糖苷酶的用量达到 5 U 时水解效率增至 96.8%, 基本完成了苷到苷元的转化。

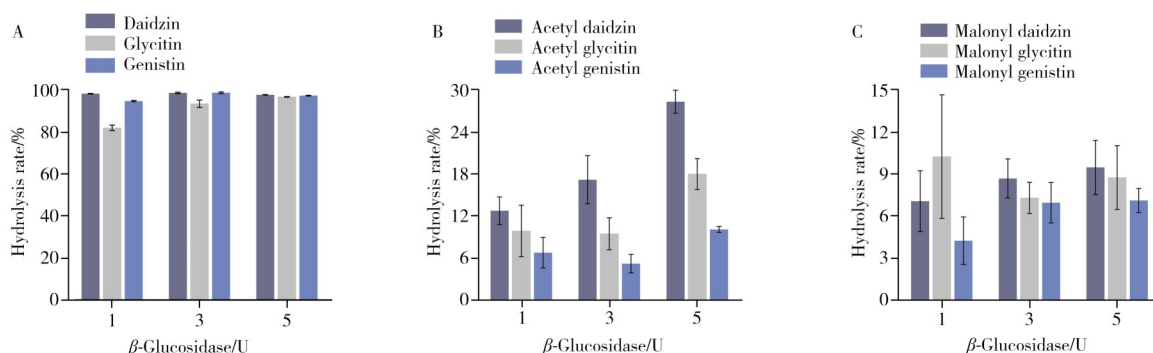


图4 大豆异黄酮苷经不同浓度 β -葡萄糖苷酶酶解 2 h 后的水解率

Fig. 4 Hydrolysis rate of glucoside ISFs after 2 h incubation with different concentrations of β -glucosidase

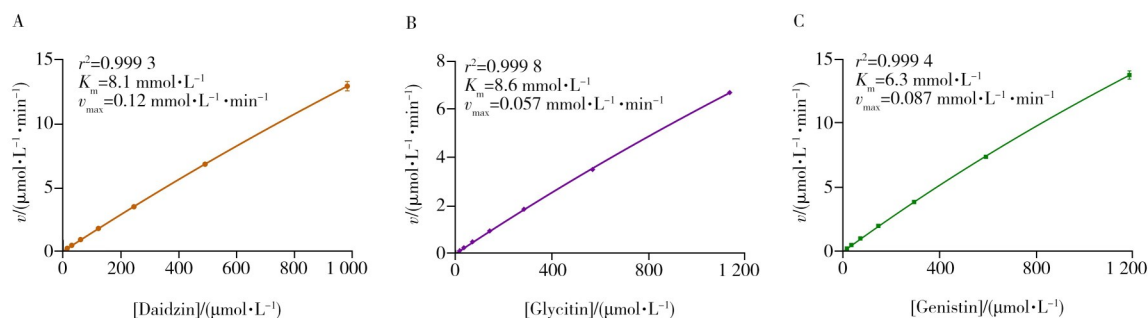


图5 大豆异黄酮苷对杏仁来源的 β -葡萄糖苷酶转化活力的影响

Fig. 5 The yield efficiency of aglycone ISFs based on β -glucosidase from almonds

A: daidzin hydrolyzed to daidzein (大豆苷转化为大豆苷元); B: glycitin hydrolyzed to glycitein (黄豆黄苷转化为黄豆黄素); C: genistin hydrolyzed to genistein (染料木苷转化为染料木素)

2.3 样品富集

豆基食品中的异黄酮含量一般较低, 当使用紫外检测且受限于超高效液相色谱的进样量时^[38], 其响应灵敏度往往无法满足定量要求, 因而需对样品进行富集以获得较低的定量下限。固相萃取技术由

于避免了液液萃取的大量溶剂消耗, 且具有重现性好、回收率高的特点, 因而在样品富集方面应用广泛, 但商品化的固相萃取柱一般是一次性使用, 检测成本较高。考虑到聚酰胺粉在层析分离方面应用广泛^[39-40]且具有亲水性, 同时价廉易得, 因而本文以聚酰胺为吸附剂, 通过分散式固相萃取的方式直接将聚酰胺粉加入到样品提取液中, 利用其结构上的酰胺羰基与异黄酮酚羟基形成的氢键作用力以及烷烃碳链的疏水缔合双重作用实现即时吸附。此外, 由于异黄酮苷元在水中的溶解度低于其糖苷形式, 溶液中需要含有一定比例的甲醇使生成的苷元能被充分溶解, 而 PA 的加入则避免了甲醇的进一步稀释, 从而提高最终样品的浓度。

2.3.1 洗脱剂的选择 聚酰胺粉具有氢键作用力和疏水缔合的双重吸附作用, 为确定最佳的洗脱条件, 考察了不同浓度的甲醇对异黄酮苷元洗脱效果的影响。结果表明, 随着甲醇浓度的增加, 异黄酮的回收率逐渐提高, 当使用 100% 甲醇时达到最大洗脱 (如图 6A)。由于氢键作用力的存在, 使用纯甲醇无法获得最佳洗脱效果, 为此在甲醇中加入不同比例的氨水进一步探究对 3 种大豆异黄酮苷元的解吸附作用。结果如图 6B~D 所示, 当甲醇中含有 0.3% (体积分数) 氨水时, 5 mL 甲醇溶液即可获得最佳的洗脱回收率。这表明在碱性条件下可以抑制 PA 酰胺的离子化作用, 从而有助于异黄酮的解吸附, 但碱性的增加也使得酚羟基的酸性增强, 进而增强氢键作用力。

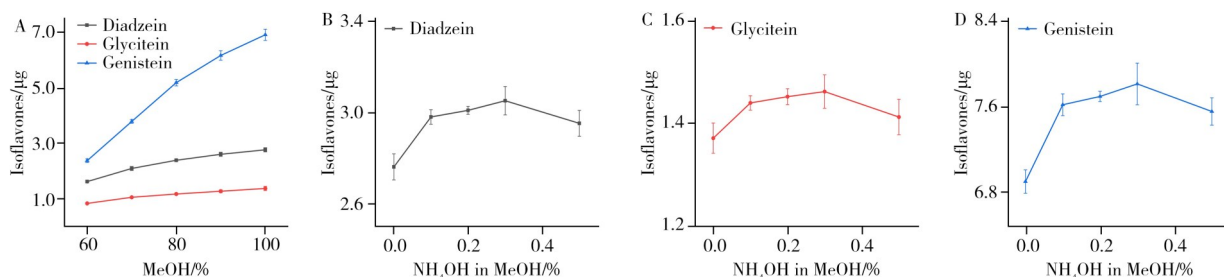


图 6 不同浓度甲醇对大豆异黄酮苷元的洗脱(A), 以及甲醇中含不同浓度氨水对大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的洗脱(B~D)

Fig. 6 Elution of aglycone ISFs by different concentrations of methanol(A), elution of daidzein, glycitein and genistein by different concentrations of ammonia in methanol(B-D)

2.3.2 PA 用量的选择 吸附容量取决于吸附剂的比表面积, 在颗粒大小一致的情况下, 吸附剂的用量则成为主要因素。较少的吸附剂由于提供的表面积无法满足目标物的充分吸附, 将造成回收损失; 但过量的吸附剂会增加洗脱剂用量, 在一定程度上无法满足富集的要求。为此, 本文以异黄酮标准溶液线性范围的上限为实验条件, 通过在水解液中加入不同量的聚酰胺并以最大洗脱量确认最佳的吸附剂量。结果如图 7 所示, 当使用 0.2 g PA 时即可满足实验要求。

2.4 超高效液相色谱条件的建立

超高效液相色谱由于使用更小粒径的色谱柱填料, 具有更高的柱效及较短的分析时间, 在提升效率及减少溶剂用量方面具有明显优势。为保证较快的线速度, 超高效液相色谱柱一般使用更小的柱内径, 但当采用较大的进样量时会发生明显的色谱展宽效应, 因而在保证灵敏度的前提下, 进样量一般限制在 5 μL 以下。由于本文采用 PA 对异黄酮苷元进行了有效富集, 当采用 3 μL 进样时即可获得满意的灵敏度, 且色谱峰展宽不明显。同时, 将 9 种异黄酮苷元定量转化为相应的 3 种基本苷元, 分析目标物的减少也降低了色谱峰容量的要求, 为使用 50 mm 长度的 C₁₈ 短柱 (2.1 mm i. d. × 50 mm, 1.8 μm) 提供了条件, 在保证分离度的情况下可获得更快的出峰时间。当采用等度洗脱, 流动相中乙腈比例为 26% 时, 3 种异黄酮苷元在 3 min 内出峰, 并获得基线分离 (图 8)。

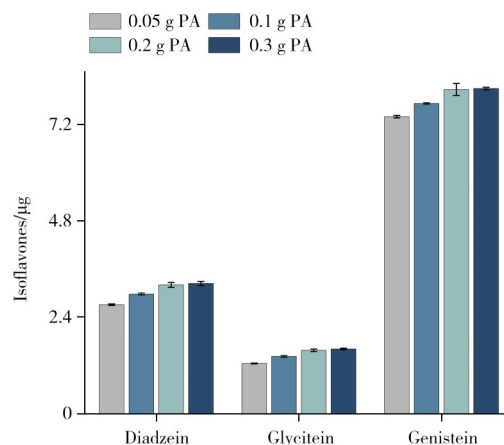


图 7 不同聚酰胺用量对异黄酮的吸附比较
Fig. 7 The comparison of eluted ISFs from different amounts of PA

2.5 方法验证

2.5.1 方法线性及线性范围 取大豆异黄酮标准储备溶液适量，以80%的甲醇溶液逐级稀释成5个不同的浓度。取3 μL 进样分析，通过各级异黄酮苷元的浓度对色谱响应峰面积进行拟合，以外标法获得大豆苷元、黄豆黄素及染料木素的拟合曲线。同时以信噪比为10:1时相应浓度确定各异黄酮的定量下限。结果如表2所示，各大豆异黄酮的质量浓度在相应的线性范围内与峰面积呈良好的线性关系，相关系数(r^2)均大于0.999；方法定量下限均在5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 以下，满足定量分析要求。

2.5.2 方法的准确度及精密度 为考察方法的准确度，选用含ISF的不同基质样品，包括大豆分离蛋白粉(原料)、黄豆粉(研磨)、豆基婴儿配方粉、营养蛋白粉、营养代餐粉、豆奶粉及异黄酮补充剂(胶囊)，采用样品加标的方式进行回收率测定。平行进行3组不同浓度的测试，其中1组样品(加标量为0%)直接按方法步骤测定，获得的苷元浓度作为样品本底，另2组分别添加不同浓度的大豆异黄酮苷标准溶液(加标量分别相当于本底苷元量的50%及100%)。每组平行测定3份样品，分别检测样品经水解后各大豆异黄酮苷元的量，其中异黄酮苷元的理论添加量通过与异黄酮苷的分子量比值计算获得。结果显示(表3)，不同产品中大豆异黄酮的平均回收率为94.3%~102%，相对标准偏差(RSD, $n=6$)均小于5.0%，表明该方法具有良好的准确度和精密度。

表2 大豆异黄酮苷元的标准曲线线性关系及定量下限

Table 2 Linearity and LOQ of aglycone isoflavone standards

Isoflavone	Linear range/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r^2	LOQ ^a /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Daidzein	0.15~1.5	0.999 9	3.71
Glycitein	0.030~0.30	0.999 9	4.36
Genistein	0.25~2.5	0.999 9	4.22

*limit of quantitation, based on 1 g of sample

表3 不同产品中大豆异黄酮的回收率测试结果

Table 3 Recovery test results for the total isoflavones in different products

Sample	Daidzein		Glycitein		Genistein		Total isoflavones
	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Average recovery/% ^a
Soy protein-based infant formula	98.9	1.9	94.5	1.8	97.2	2.4	96.9
Soy milk powder	97.8	1.5	95.5	2.2	95.9	1.7	96.4
Protein powder	94.6	3.9	95.0	3.4	93.4	3.4	94.3
Meal replacement powder	100	3.0	95.9	2.9	98.3	1.6	98.1
Soy protein isolate	96.8	1.5	93.9	1.8	95.9	1.7	95.5
Dried soybean	102	1.4	101	1.8	100	1.2	101
Isoflavones supplement	97	2.5	97.7	2.5	91.8	1.6	95.5

*the average recovery of total isoflavones was calculated based on the recoveries of daidzein, glycitein and genistein

2.5.3 方法差异性对比 为进一步考察方法间的差异性，本文以最新的ISF测定方法QB/T 5397-2019^[22]作为参考，对7种产品分别采用QB/T方法同时进行测定，并与本方法所得结果进行对比。结果如表4所示，使用法定推荐方法所测得的异黄酮活性总量(以苷元计)与本方法存在明显差异，各种样品中的异黄酮苷元总量均低于本方法的结果，其原因为QB/T方法仅以乙腈水进行振荡提取，样品处理过程中缺乏对丙二酰及乙酰类异黄酮苷的水解步骤，使其无法转化为相应的基本型苷或苷元，且该方法仅对12种ISF中的3种基本型异黄酮苷及3种异黄酮苷元进行测定，因此造成了这部分含量的缺失。本方法虽然只测定3种异黄酮苷元，但通过联合水解的方式将样品中其他9种异黄酮苷全部定量转化为苷元，总量结果包含了来源于全部12种ISF的苷元部分。此外在ISF总量表述方面，结果以苷元计不但真实体现了ISF的活性含量，同时也可避免ISF总量由于苷和苷元的简单加和而造成的ISF水平高估^[33]。

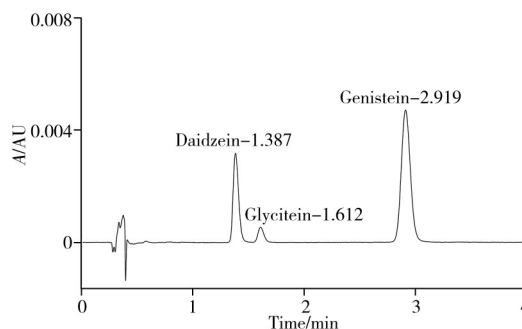


图8 异黄酮苷元的超高效液相色谱图

Fig. 8 UPLC chromatogram of isoflavone

表4 不同方法条件下大豆异黄酮含量水平的比较
Table 4 Comparison for the level of total isoflavones with different methods

Sample	Total isoflavones/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^a		Comparison/% ^b
	This method	QB/T 5397-2019	
Soy protein-based infant formula	347.1	250.9	72.3
Soy milk powder	622.0	368.4	59.2
Protein powder	630.3	371.1	58.9
Meal replacement powder	1 572.4	759.1	48.3
Soy protein isolate	1 578.5	1 085.4	68.8
Dried soybean	1 407.7	603.1	42.8
Isoflavones supplement	15 427.7	11 182.0	72.5

a: total ISFs=sum of concentration of aglycones and aglycone equivalent concentration of glucosides, aglycone equivalent(based on the ratio of molecular weight): daidzin $\times 0.611$, glycitin $\times 0.637$, genistin $\times 0.625$; b: the percentage was calculated by dividing the results of two methods

3 结 论

本文通过碱性条件提取结合杏仁来源 β -葡萄糖苷酶水解,实现了样品中异黄酮苷到苷元的定量转化,使得全部ISF检测目标物由原来的12种成分简化为3种异黄酮苷元;通过对聚酰胺粉吸附条件的优化,实现了对大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的有效富集,并以此建立了大豆异黄酮活性总量的UPLC测定方法。对比其他方法,该方法仅使用3个异黄酮苷元标准品即实现了异黄酮总量的准确测定。目标物的简化有助于降低样品基质干扰,在获得准确结果的同时可以充分缩短色谱运行时间;此外标准品使用种类的减少也降低了检测成本。目前的大豆异黄酮测定方法对于总异黄酮的测定存在不一致的情况,而充分检测样品中的各种异黄酮并最终用苷元总量来表述总异黄酮水平将有助于行业标准的规范和统一。对于食用豆基食品的婴幼儿个体,当需要考虑植物雌激素的潜在影响时,明确的含量标识将充分警示和指导消费者的选择和使用。该方法的建立有助于大豆加工行业的产品质量优化,如生产低异黄酮残留的大豆分离蛋白,消除由于摄入过多植物雌激素而造成的内分泌紊乱风险。

参考文献:

- [1] Krizova L, Dadakova K, Kasparovska J, Kasparovsky T. *Molecules*, **2019**, 24(6): 1076.
- [2] Kang I, Rim C H, Yang H S, Choe J S, Kim J Y, Lee M. *Nutr. Res. Pract.*, **2022**, 16: S147-S159.
- [3] Li S, Wang J. *Soybean Sci.*(李硕, 王建.大豆科学), **2020**, 39(4): 633-640.
- [4] Tan J L, Huang C, Luo Q H, Liu W T, Cheng D J, Li Y F, Xia Y, Li C, Tang L, Fang J, Pan K C, Qu Y P, Cheng A C, Chen Z L. *Molecules*, **2019**, 24(15): 2809.
- [5] Zou X, Zhao R, Wu M M, Wan Q Y, Li T. *Nutrients*, **2023**, 15: 1358.
- [6] Hatono M, Ikeda H, Suzuki Y, Kajiwaru Y, Kawada K, Tsukioki T, Kochi M, Suzawa K, Iwamoto T, Yamamoto H, Shien T, Yamane M, Taira N, Doihara H, Toyooka S. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2021**, 185: 307-316.
- [7] Silva H. *Biology-Basel*, **2021**, 10(1): 49.
- [8] Lambert M N T, Jeppesen P B. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2018**, 21(6): 475-480.
- [9] Pabich M, Materska M. *Nutrients*, **2019**, 11(7): 1660.
- [10] Gonsioroski A, Mourikes V E, Flaws J A. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21(6): 1929.
- [11] Caceres S, Crespo B, Alonso-Diez A, de Andres P J, Millan P, Silvan G, Illera M J, Illera J C. *Nutrients*, **2023**, 15(5): 1261.
- [12] GB 10765-2021. Infant Formula. National Standards of the People's Republic of China(婴儿配方食品. 中华人民共和国国家标准).
- [13] Suen A A, Kenan A C, Williams C J. *Biochem. Pharmacol.*, **2022**, 195: 114848.
- [14] Qin H, Lin Z J, Vasquez E, Luan X, Guo F F, Xu L. *Nutr. Res.*, **2019**, 71: 30-42.
- [15] Lin F Y, Huang Y N, Chu H J, Wang W X, Song Y, Xue Y N, Zheng F, Li G. *China Oils and Fats*(林凤岩, 黄永娜, 褚洪俊, 王文昕, 宋宇, 薛亚南, 郑峰, 李庚.中国油脂), **2023**, 48(11): 33-37.
- [16] Canivenc-Lavier M C, Bennetau-Pelissero C. *Nutrients*, **2023**, 15(2): 317.
- [17] Bensaada S, Chabrier F, Ginisty P, Ferrand C, Peruzzi G, Valat M, Bennetau-Pelissero C. *Foods*, **2023**, 12(7): 1540.
- [18] Klump S P, Allred M C, MacDonald J L, Ballam J M. *J. AOAC Int.*, **2001**, 84(6): 1865-1883.
- [19] Collison M W. *J. AOAC Int.*, **2008**, 91(3): 489-500.
- [20] Miguez V H, David J M, Gomes A F, David J P. *Food Anal. Methods*, **2022**, 15: 367-376.
- [21] Shim Y S, Yoon W J, Hwang J B, Park H J, Seo D, Ha J. *Food Chem.*, **2015**, 187: 391-397.

- [22] QB/T 5397-2019. Determination of Soybean Isoflavones in Soyfoods. Light Industry Standards of the People's Republic of China(大豆食品中异黄酮含量的测定. 中华人民共和国轻工行业标准).
- [23] Chien H J, Wang C S, Chen Y H, Toh J T, Zheng Y F, Hong X G, Lin H Y, Lai C C. *Anal. Chim. Acta*, **2020**, 1103: 122-133.
- [24] Min J L, Wang Z T, Lian C L, Li W J, Shao J, Zhu K R, Zhou L, Cheng J, Luo S H, Yu L H, Wu Y D, Xie M Y, Hu X J. *J. Agric. Food Chem.*, **2020**, 68(11): 3485-3494.
- [25] Hu P, Jin H. *Sci. Technol. Food Ind.*(胡珀, 金华. 食品工业科技), **2019**, 40(13): 193-196.
- [26] Sakamoto S, Yusakul G, Pongkitwitoon B, Paudel M K, Tanaka H. *Food Chem.*, **2015**, 169: 127-133.
- [27] Zhang Y F, Ma H X, Zhang Y H, Dong Y M. *Electrophoresis*, **2022**, 43(11): 1140-1147.
- [28] Phillips M M, Bedner M, Reitz M, Burdette C Q, Nelson M A, Yen J H, Sander L C, Rimmer C A. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, 409(4): 949-960.
- [29] Magdalena W K, Ireneusz S, Grazyna S, Karolina Z, Ryszard K, Tomasz B. *Chem. Papers*, **2016**, 70(8): 1087-1093.
- [30] Izumi T, Piskula M K, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. *J. Nutr.*, **2000**, 130(7): 1695-1699.
- [31] Zubik L, Meydani M. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2003**, 77(6): 1459-1465.
- [32] Chen J X, Chen K Y, Lian Y, Yao X S, Huang Y X, Gao Y, Xiao Y. *Food Res. Dev.*(陈嘉序, 陈扣扬, 连媛, 姚欣硕, 黄钰昕, 高瑶, 肖愈. 食品研究与开发), **2021**, 42(9): 176-182.
- [33] McCarver G, Bhatia J, Chambers C, Clarke R, Etzel R, Foster W, Hoyer P, Leeder J S, Peters J M, Rissman E, Rybak M, Sherman C, Toppari J, Turner K. *Birth Defects Res. Part B*, **2011**, 92(5): 421-468.
- [34] Gu W, Pang Y H, Li Y L, Shen X F, Liu J. *ACS Food Sci. Technol.*, **2024**, 4(1): 263-271.
- [35] Singh G, Verma A K, Kumar V. *3 Biotech*, **2015**, 6: 3.
- [36] Aresta A, Grumo F D, Zambonin C. *Food Anal. Methods*, **2016**, 9(4): 925-933.
- [37] Hati S, Ningtyas D W, Khanuja J K, Prakash S. *Food Biosci.*, **2020**, 34: 100542.
- [38] Cruz J C, Souza I D D, Lancas F M, Queiroz M E C. *J. Chromatogr. A*, **2022**, 1668: 462925.
- [39] Tang T X, Xu X J, Wang D M, Zhao Z M, Zhu L P, Yang D P. *Food Anal. Methods*, **2015**, 8: 459-466.
- [40] Liu Z K, Xu Q Q, Yang C, Li J, Zhou W F, Gao H X, Zhang S B, Lu R H. *J. Res. Sci.*, **2021**, 44: 1931-1938.

(责任编辑: 丁 岩)