

核桃乳中掺大豆乳的鉴别研究

张敬敬, 宋合兴, 刘博, 曹小妹, 高文惠

(河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

摘要: 建立了一种用高效液相色谱法检测核桃乳中掺有大豆乳的方法。样品用甲醇超声提取 20 min, 料液比为 1:9 (体积比), 在 4000 r/min 条件下离心 20 min。使用 Promosil C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-水作流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 258 nm。结果表明, 通过对大豆异黄酮的检测, 可以有效地鉴别核桃乳中是否掺有大豆乳; 大豆苷和染料木苷的线性范围为 0.3~200 μg/mL, 大豆苷元和染料木素的线性范围 0.1~150 μg/mL。线性相关系数在 0.9968 和 1.0000 之间, 样品加标回收率为 80.73~116.44%, 相对标准偏差≤4.62% (n=5), 检测限为 0.03~0.1 μg/mL, 该方法快速、灵敏、简便易行。

关键词: 核桃乳; 大豆乳; 掺假; 高效液相色谱法

文章编号: 1673-9078(2013)4-881-884

Identification of Adulteration in Walnut Milk Containing Soybean Milk

ZHANG Jing-jing, SONG He-xing, LIU Bo, CAO Xiao-mei, GAO Wen-hui

(College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: A method for detection of adulteration in walnut milk containing soybean milk by high performance liquid chromatography was established. The extraction conditions were sample-methanol ratio 1:9 (V/V), ultrasonic time 20 min, and centrifugal time 20 min at 4000 r/min. The analysis was carried out with a column C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) using methanol-water as gradient mobile phase at 258 nm. The results showed that walnut milk containing soybean milk was identified effectively through determination of soybean isoflavones. The linear ranges were 0.3~200 μg/mL for daidzin and genistin and 0.1~150 μg/mL for daidzein and genistein, respectively. The linear correlation coefficients were between 0.9968 and 1.0000. And the average recoveries were between 80.73% and 116.44%. The relative standard deviations (RSDs) were less than 4.62% (n=5) and the detection limits were 0.03~0.1 μg/mL. This method was fast, sensitive and simple.

Key words: walnut milk; soybean milk; adulteration; high performance liquid chromatography

核桃乳是一种营养丰富的饮品, 含有蛋白质、维生素 B、尼克酸以及多种微量元素, 其所含磷脂对脑神经有良好的保护作用^[1]。但核桃乳的原材料价格比较昂贵, 一些生产厂商受利益的驱使, 对核桃乳进行掺假, 使用价格低廉的大豆, 通过特定的加工工艺去除大豆腥味^[2], 然后将其掺入到核桃乳中, 使得核桃乳的成本大大的降低。掺假的核桃乳使消费者和一些生产厂商的利益受到损失; 国内外关于核桃、大豆中成分的检测有相关报道^[3~6], 但是关于核桃乳掺假的检测未见报道。因此, 研究一种准确、灵敏、快速的检测方法以鉴别核桃乳是否掺假有着重要的意义。大豆乳中含有大豆异黄酮, 本实验通过对产品中大豆异黄

收稿日期: 2012-12-06

基金项目: 河北省科技支撑计划项目 (10276902D); 石家庄市科技支撑计划项目 (12149472A)

作者简介: 张敬敬 (1987-), 女, 在读研究生, 研究方向: 食品安全与检测
通讯作者: 高文惠 (1963-), 女, 教授, 博士, 研究方向: 食品安全与分离科学

酮的分析, 来鉴别核桃乳中是否掺有大豆乳。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料: 核桃乳: 购自超市、市场和自制核桃乳; 大豆乳: 自制大豆乳。

试剂: 甲醇: 色谱纯, 天津市康科德科技有限公司; 乙腈: 色谱纯, 天津市光复精细化工研究所; 磷酸: 分析纯, 天津市光复精细化工研究所; 95%乙醇: 分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司; 无水乙醇: 分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司; 大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素标准品 (纯度≥98%) 均购自上海纯优生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

日本岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, 岛津国际贸易 (上海) 有限公司; SK5200LHC 型超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司; LD5-2A 低速离心机, 北京雷勃尔离心机有限公司; PHS-3S 酸度计, 萧山市鑫龙

医疗器械有限公司; Barnstead D3750超纯水机, Thermo公司; 科友牌C型玻璃仪器气流烘干机, 河南予华仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 溶液的配制

标准溶液的配制: 分别称取大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素各100 mg, 用甲醇将其溶解并定容至100 mL, 得到浓度均为1 mg/mL的大豆异黄酮标准溶液。

混合标品标准溶液的配制: 分别移取浓度为1 mg/mL的大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素340 μ L、350 μ L、200 μ L和180 μ L于1 mL容量瓶中, 用甲醇定容, 过0.45 μ m有机膜, 备用。

1.3.2 样品的制备及前处理

核桃乳的制备^[7]: 称取去壳核桃仁7.000 g, 置于0.5%氢氧化钠溶液中, 在90 $^{\circ}$ C水中浸泡15 min, 用清水反复冲洗, 加入240 mL、95 $^{\circ}$ C热水, 用打浆机将其打碎, 过200目筛, 均质(温度为75 $^{\circ}$ C, 压力为30 MPa), 杀菌备用。

大豆乳的制备^[8]: 称取干大豆7.000 g, 放入45 $^{\circ}$ C的0.3%碳酸氢钠水溶液浸泡6 h, 用清水冲掉附着的碱液。制浆方法详见核桃乳。打浆后, 需在95 $^{\circ}$ C加热15 min灭酶。

准确量取1 mL样品于10 mL具塞比色管中, 用甲醇定容至10 mL, 在53 Hz条件下超声20 min, 再将其转移到50 mL离心管中在4000 r/min条件下离心20 min。取上清液过0.45 μ m有机滤膜, 备用。

1.3.3 高效液相色谱条件

色谱柱: Promosil C₁₈(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m), 采用甲醇-水为流动相进行梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~5 min时甲醇为40%; 5~15 min时甲醇为60%, 体积流速为1 mL/min, 检测波长为258 nm, 柱温为30 $^{\circ}$ C。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法的优化

大豆异黄酮中大豆苷和染料木苷的含量在90%以上^[9], 且四种大豆异黄酮成分性质相似, 故选用大豆苷和染料木苷标准品作为样品的添加实验优化前处理条件。

2.1.1 提取试剂的选择

根据大豆异黄酮的分子结构和性质, 分别选用甲醇, 80%甲醇, 乙醇和80%乙醇提取液提取样品中的大豆异黄酮, 分别量取1 mL核桃乳和掺假核桃乳于10 mL具塞比色管中, 分别加入浓度为1 mg/mL的大豆苷和染料木苷各18 μ L。按照2.3.2条件进行样品前处理,

采用高效液相色谱法按照2.3.3条件对处理后的样品进行检测。峰面积的大小直接反映了提取试剂对待测组分的提取效果, 不同提取试剂对核桃乳和掺假核桃乳中大豆苷和染料木苷提取效果的影响见图1。

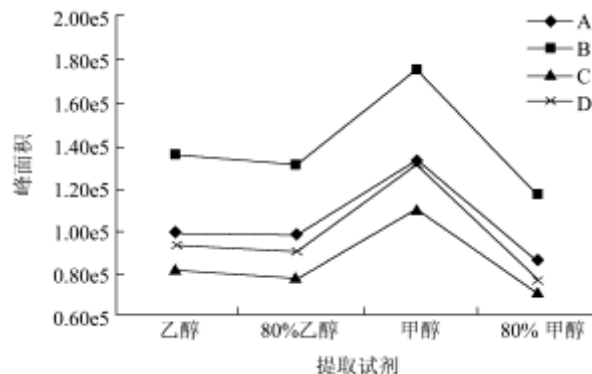


图1 不同提取试剂对大豆异黄酮提取效果的影响

Fig.1 Effect of extracting reagents on extraction of soybean isoflavones

注: A: 掺假核桃乳中大豆苷的提取效果; B: 掺假核桃乳中染料木苷的提取效果; C: 核桃乳中大豆苷的提取效果; D: 核桃乳中染料木苷的提取效果。

通过图1可知, 用甲醇作为提取试剂时, 核桃乳和掺假核桃乳中的大豆苷和染料木苷的提取效果明显大于其它提取试剂, 并且提取液离心后, 用甲醇提取的样品相对澄清, 过膜容易。故选用甲醇作为提取试剂。

2.1.2 提取时间的选择

用甲醇作为提取试剂, 按照3.1.1方法处理样品, 改变超声时间, 超声时间分别为10、20、30、40、50、60 min。不同提取时间对核桃乳和掺假核桃乳中大豆苷、染料木苷的提取效果影响见图2。

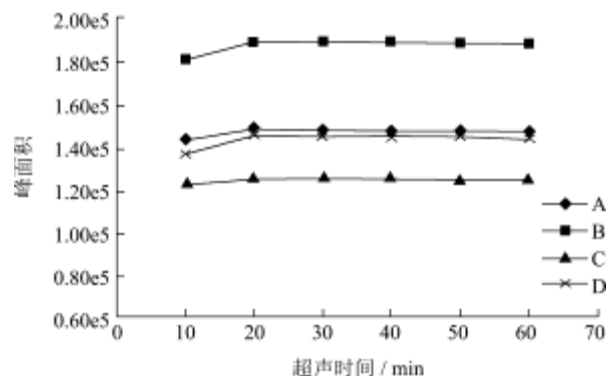


图2 不同超声时间对大豆异黄酮提取结果的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic time on extraction of soybean isoflavones

注: A: 掺假核桃乳中大豆苷的提取效果; B: 掺假核桃乳中染料木苷的提取效果; C: 核桃乳中大豆苷的提取效果; D: 核桃乳中染料木苷的提取效果。

由图2可知, 提取时间为20 min时掺假核桃乳和核桃乳中大豆苷和染料木苷的提取效果高于提取时间为

10 min时的提取效果, 20 min以后随着提取时间增长, 掺假核桃乳和核桃乳中大豆苷和染料木苷的提取效果无明显变化, 故确定提取时间为20 min。

2.1.3 提取频率的选择

用甲醇作为提取试剂, 超声时间为20 min, 按照1.3.2方法处理样品, 改变超声波频率, 超声波频率分别为53 Hz和35 Hz。其提取效果如表1所示。

表1 不同超声频率对大豆异黄酮提取效果的影响

超声频率/Hz	核桃乳中的大豆苷的	核桃乳中的染料木苷的	掺假核桃乳中的大豆苷的	掺假核桃乳中的染料木苷的
	峰面积/mV	峰面积/mV	峰面积/mV	峰面积/mV
35	101562	131152	118728	168673
53	123683	145581	145785	187556

由表1可知, 超声波频率为53 Hz时的提取率均高于35 Hz时的提取效果, 因为超声波频率增大时增加了空化作用, 相当于增加了样品组织的破坏速度, 增大传质动力, 使得相同时间内大豆苷和染料木苷转移到提取剂中的量增大, 改善了提取效果。故提取频率选取53 Hz。

2.2 色谱条件的优化

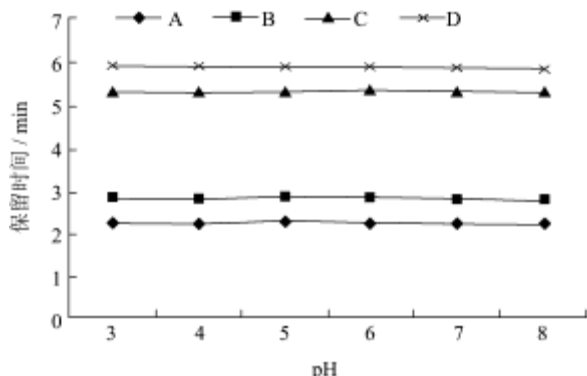


图3 不同pH流动相对四种大豆异黄酮的分离影响

Fig.3 Effect of pH of mobile phases on separation of the four soybean isoflavones

注: A-D 依次代表大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素。

2.2.1 检测波长的选择

通过紫外扫描, 四种大豆异黄酮在258 nm处均有较大吸收, 故选取检测波长为258 nm。

2.2.2 流动相体系 pH 的选择

调节水的 pH, 使其分别为 3、4、5、6、7、8, 制备成一系列甲醇-水流动相, 然后对四种标品进行分离分析, pH 值对四种标品分离效果的影响如图 3 所示。由图 3 可知, pH 值对四种标品保留时间无明显影响, 故实验选用超纯水作为流动相用水。

2.2.3 流动相配比的选择

通过对比等度洗脱和梯度洗脱分离四种大豆异黄酮混合溶液, 可知等度洗脱时四种组分实现完全分离时需要 50 min, 梯度洗脱时在 15 min 内可以实现四种组分的完全分离, 且峰形尖锐。故采用梯度洗脱技术。

在甲醇-水作流动相下, 考察了四种梯度洗脱情况: (1) 0~5 min 时甲醇 40%, 5~15 min 时甲醇 60%; (2) 0~5 min 时甲醇 40%, 5~15 min 时甲醇 70%; (3) 0~5 min 时甲醇 40%, 5~15 min 时甲醇 80%; (4) 0~5 min 时甲醇 30%, 5~15 min 时甲醇 60%。结果表明, 当洗脱程序为 (4) 时不能实现四种物质的完全分离, 其它三个配比条件均可实现四种物质的基线分离, 为了使样品中的物质与大豆异黄酮实现较好的分离, 实验选择梯度洗脱程序为 (1)。

综上所述, 在 2.3.3 最佳色谱条件下, 四种大豆异黄酮标准溶液的色谱分离图如图 4 所示。从图中看出, 在 13 min 内四种大豆异黄酮实现了基线分离。

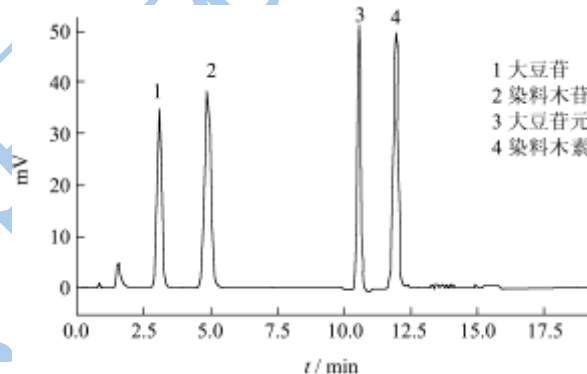


图4 四种大豆异黄酮的色谱分离图

Fig.4 HPLC chromatogram of the four soybean isoflavones

2.3 线性关系和检测限

将四种大豆异黄酮标品配制成一系列不同浓度(浓度范围为0.02~200 μg/mL)的标准溶液, 在2.3.3条件下进样分析, 绘制四种大豆异黄酮的线性关系曲线。四种大豆异黄酮的线性方程、线性相关系数、线性范围和检测限见表2。

表2 四种大豆异黄酮的线性关系和检测限

大豆异黄酮	线性方程	线性相关系数	线性范围/(μg/mL)	检测限/(μg/mL)
大豆苷	y=66799x+8809.1	0.9999	0.3~200	0.1
染料木苷	y=79191x+10463	1.0000	0.3~200	0.1
大豆苷元	y=98953x+17093	0.9990	0.1~150	0.03
染料木素	y=56212x+18046	0.9968	0.1~150	0.05

由表2结果可以看出, 该方法中大豆苷和染料木苷的线性范围为0.3~200 μg/mL, 大豆苷元和染料木素的

线性范围为0.1~150 μg/mL, 线性相关系数 $r \geq 0.9968$, 大豆苷和染料木苷的检测限为0.1 μg/mL, 大豆苷元和染料木素的检测限分别为0.03 μg/mL和0.05 μg/mL。

2.4 样品测定与回收率实验

2.4.1 样品测定

按照2.3.2的前处理方法处理样品, 然后在最佳色谱条件下分别测定掺假核桃乳和核桃乳样品, 样品色谱分离图见图5和图6。

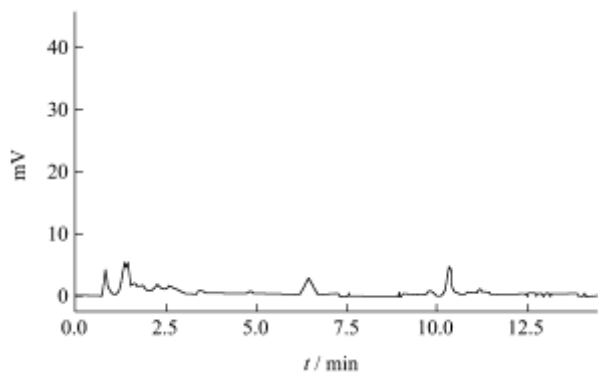


图5 核桃乳样品色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of walnut milk

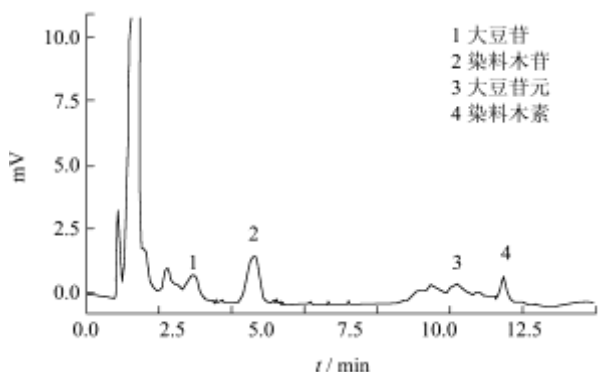


图6 掺假50%核桃乳样品分离图

Fig.6 HPLC chromatogram of walnut milk of 50% adulteration

由图4和图5可知, 在掺假50%核桃乳样品中可以检测到大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素, 其含量分别为0.199、0.443、0.03、0.103 μg/mL, 在核桃乳样品中四种大豆异黄酮均未检出。

2.4.2 回收率实验

采用本方法对掺假核桃乳和核桃乳样品进行添加低水平和高水平的加标回收率实验。其分析结果如表3所示。

表3 不同添加水平的四种大豆异黄酮在掺假核桃乳和核桃乳中的回收率实验结果 (n=5)

Table 3 Recoveries of the four soybean isoflavones in walnut milk and adulterate walnut milk under different added levels

大豆异黄酮	添加水平/(μg/mL)	测定项目	掺假核桃乳	核桃乳
-------	--------------	------	-------	-----

大豆苷	5	平均回收率/%	109.6	112.5
		RSD/%	1.20	3.15
染料木苷	50	平均回收率/%	87.3	82.6
		RSD/%	2.31	3.35
染料木苷	5	平均回收率/%	83.7	116.2
		RSD/%	1.19	2.65
染料木苷	50	平均回收率/%	81.1	87.5
		RSD/%	3.56	3.87
大豆苷元	1	平均回收率/%	107.7	116.4
		RSD/%	1.19	4.62
大豆苷元	10	平均回收率/%	84.8	80.7
		RSD/%	3.76	4.55
染料木素	1	平均回收率/%	96.3	107.0
		RSD/%	2.58	3.11
染料木素	10	平均回收率/%	86.5	80.8
		RSD/%	3.82	4.52

由表3结果可以看出, 该方法的平均回收率在80.7~116.4%之间, 相对标准偏差(RSD)≤4.62% (n=5)。

3 结论

本实验建立了一种简便、快速、灵敏的鉴别核桃乳中是否掺入大豆乳的检测方法。该方法采用甲醇作为提取剂, 高效液相色谱法测定, 能够实现定性定量分析。该方法中大豆苷和染料木苷的线性范围为0.3~200 μg/mL, 大豆苷元和染料木素的线性范围为0.1~150 μg/mL, 线性相关系良好 ($r > 0.99$), 大豆苷和染料木苷的检测限为0.1 μg/mL, 大豆苷元和染料木素的检测限分别为0.03 μg/mL和0.05 μg/mL, 平均回收率在80.73%和116.44%之间, 相对标准偏差(RSD)≤4.62% (n=5)。

参考文献

- [1] 李萍, 卢键鸣. 核桃的加工及其利用[J]. 农产品加工, 2011, 5: 16-17
- [2] 范铮, 孙培龙, 赵培城, 等. 豆乳生产中去除豆腥味的工艺研究[J]. 粮油加工与食品机械加工技术, 2002, 6: 49-51
- [3] 王晓燕, 张彩英, 贾晓艳. 河北省大豆品种脂肪酸组成与含量分析[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(2): 15-18
- [4] A G Patil, M D Oak, S P Taware, et al. Nondestructive estimation of fatty acid composition in soybean Glycine max (L) Merrill seeds using Near-Infrared Transmittance Spectroscopy [J]. Food Chemistry, 2010, 120: 1210-1217
- [5] 毛晓英, 华欲飞, 卢伟. 核桃蛋白质的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(6): 328-331
- [6] 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
- [7] 于明,何伟忠,吴新风.鲜核桃乳工艺研究[J].新疆农业科学,2010,47(10):2117-2120
- [8] 范铮,孙培龙,赵培城,等.豆乳生产中去除豆腥味的工艺研究[J].加工技术粮油加工与食品机械.2002,2:49-51
- 王松,丁立,周荣琦.HPLC 法测定豆粕中大豆异黄酮的含量[J].化工进展,2005,24(2):196-199

现代食品科技