

β -环糊精对豆浆中异黄酮苷原热稳定性的影响

汪锋, 黄惠华

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 对 β -环糊精对豆浆中的三种异黄酮苷原(黄豆苷原(daidzein)、大豆黄素(glycitein)和染料木黄酮(genistein))的热稳定性的影响进行了研究。结果表明用 HPLC 分析时, 流动相的配比为甲醇:5%冰乙酸 = 40:60(V/V)时, 标样及样品溶液的 HPLC 色谱分离效果最好。添加 1% β -环糊精能提高豆浆中三种异黄酮苷原的热稳定性; 95 °C 处理 10 min 后, 添加 β -环糊精的豆浆中黄豆苷原含量比未添加的豆浆增加 8.89%, 大豆黄素增加 13.81%, 染料木黄酮增加 9.75%; 121 °C 处理 1 min 后, 添加 β -环糊精的豆浆中上述三种异黄酮苷原含量比未添加的豆浆分别增加 9.59%、8.77%、2.45%; 140 °C 处理 10 s 后, 则分别增加 8.90%、11.92%、6.69%。

关键词: 高效液相色谱法; 异黄酮苷原; β -环糊精; 热稳定性

中图分类号: TS201.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)02-0128-04

Effect of β -CD on the Thermal Stability of Isoflavone Aglycones in Soybean Milk

WANG Feng, HUANG HUI-hua

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effects of β -Cyclodextrin (β -CD) on three aglycones (daidzein, glycitein and genistein) in soybean milk were investigated by HPLC. The best mobile phase was the mixture of methanol and 5% acetic acid glacial (40:60, V/V). It was found that adding 1% of β -CD into soybean milks could increase the thermal stabilities of the three aglycones. The contents of daidzein, glycitein and genistein in soybean milk containing β -CD were 8.89%, 13.81% and 9.75% respectively higher than those in soybean milks without of β -CD after incubated at 95 °C for 10 min, were 9.59%, 8.77% and 2.45% respectively higher than those in soybean milks without of β -CD after incubated at 121 °C for 1min and were 8.90%, 11.92%, and 6.69% respectively higher than those in soybean milks without of β -CD after incubated at 140 °C for 10 s.

Key words: HPLC method; isoflavone aglycones; β -Cyclodextrin; thermal stability

大豆具有丰富的营养成分, 是一种理想的优质植物蛋白资源, 近年来, 世界各国非常重视大豆制品的开发。作为大豆主要功能性成分之一的大豆异黄酮, 研究显示有着很好的生理与营养作用(植物雌激素和抗氧化活性), 被认为具有优越的预防慢性疾病效果^[1], 成为近年来国内外研究的一大热点。大豆异黄酮多以葡萄糖苷形式存在, 但游离型的异黄酮苷原是其

主要活性形式^[2]。豆浆作为我国传统豆类制品, 深受广大人民群众喜爱。豆浆需要经过热处理, 然而热处理会引起异黄酮损失。如何减少豆浆热处理过程中异黄酮苷原的损失, 已成为下一步有待解决的问题^[3,4]。由于 β -环糊精和染料木黄酮经包合作用能形成摩尔比为 1:1 的水溶性好、热稳定性强的包合物^[5], 因此 β -环糊精对异黄酮苷原可

能有保护作用。本实验通过对豆浆添加 β -环糊精, 研究豆浆中异黄酮苷原的热稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆, 购自广州金莎生鲜超市; β -环糊精, 市售; 黄豆苷原(daidzein)、染料木黄酮(genistein)和大豆黄素(glycitein)标准品, 购自 Sigma-Aldrich 公司; HCl、柠檬酸、乙腈、冰乙酸为分析纯; 甲醇为色谱纯。

1.2 仪器

电热恒温水浴锅, 浙江临海市东方仪器厂; SD-2B 型海菱牌食品粉碎机, 上海海菱电器有限公司; 恒温磁力搅拌器、振荡培养箱, 深圳市沙头角国华仪器厂; 冷冻干燥机, 广州三元科技有限公司; 高效液相色谱系统, 戴安中国有限公司; Thermo C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 粒径 ϕ =5 μ m)。

收稿日期: 2007-11-08

作者简介: 汪锋, 男, 在读硕士研究生

通讯作者: 黄惠华, 博士, 教授

1.3 实验方法

1.3.1 豆浆的制作与样品取样

按照传统的制作方法制作豆浆,具体如下:

└─ 添加 1% β -环糊精 (m/V) → 热处理 → 取样

取 100 g 原粒大豆 → 加入 1000 mL 水浸泡过夜 → 磨浆 → 过 150 目纱布 → 生豆浆 → 热处理 → 取样

1.3.2 β -环糊精的添加和豆浆的热处理

将添加 β -环糊精生豆浆在室温下以一定速度搅拌 0.5 h, 再静置 10 min, 然后分别在 95 °C 处理 10 min、121 °C 处理 1 min 和 140 °C 处理 10 s 进行热处理。

豆浆的热处理在 1 条特制的螺旋状不锈钢制毛细管中进行, 毛细管内径为 2 mm, 壁厚 0.56 mm, 长约 2 m, 大约可以装进 25 mL 的豆浆。管的两端安装有小阀门。为了精确起见, 需要考虑和预留物料在毛细管内的温升至 121~140 °C 所需要的时间。95 °C 时由于加热时间较长, 可忽略升温时间。经测定物料在毛细管内温升至 121~140 °C 所需要的时间约为 7~9 s, 热处理时, 用吸耳球将豆浆装入毛细管内, 关上两端阀门, 95 °C 用水浴, 121 °C 和 140 °C 热处理用聚乙二醇浴。达到预定时间后, 立即将毛细管移至冷水中冷却。热处理后的样品使用真空冷冻干燥机在 -40 °C 下冻干过夜。冻干样品用研钵研成粉末状。

1.3.3 异黄酮苷原的提取

准确称取 1.5 g 粉末状冻干样品, 加入 2.5 mL 0.1 mol/L HCl 和 10 mL 乙腈, 置振荡培养箱中 25 °C 下振荡提取 2 h 后用滤纸过滤, 滤液在低于 25 °C 的温度下用通风柜蒸发至干, 蒸干所得残留物用 80% 甲醇溶解并定容至 5 mL。所得样品溶液用 0.45 μ m 微孔过滤膜过滤, 滤液转入 HPLC 专用内小瓶中并封口待测。

1.3.4 HPLC 分析

1.3.4.1 流动相比例的选择及标准曲线的绘制

精确称取减压干燥至恒重的黄豆苷原标样 7.7 mg、大豆黄素标样 4.5 mg、染料木黄酮标样 7.2 mg, 用 80% 甲醇溶解并定容至 25 mL。根据相关文献^[4,6], 使用不同配比的 5% 冰乙酸和甲醇作为流动相, 在流速 0.5 mL/min、柱温 25 °C、检测波长 254 nm 的色谱条件下, 注射体积为 20 μ L 对三种异黄酮苷原标样和样品进行测定, 根据出峰效果好坏确定流动相比例。选用确定好的色谱条件, 改变注射体积, 分别测定不同含量黄豆苷原标样、大豆黄素标样、染料木黄酮标样的色谱峰面积, 以异黄酮苷原含量为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 并计算回归方程。

1.3.4.2 样品溶液中三种异黄酮苷原含量的测定

依 1.3.4.1 中确定好的色谱条件, 对样品进行测定,

用外标法定量, 根据回归方程计算, 染料木黄酮、黄豆苷原和大豆黄素的含量以干基计算。

1.3.5 异黄酮苷原热稳定性提高百分比的计算方法

添加一定量 β -环糊精的生豆浆, 热处理后取样, 经冷冻干燥所得冻干样品就含有相应质量的 β -环糊精。为了使结果具有可比性, 染料木黄酮、黄豆苷原和大豆黄素的含量以纯冻干基计算, 见公式①。各自稳定性提高百分比计算方法见公式②。

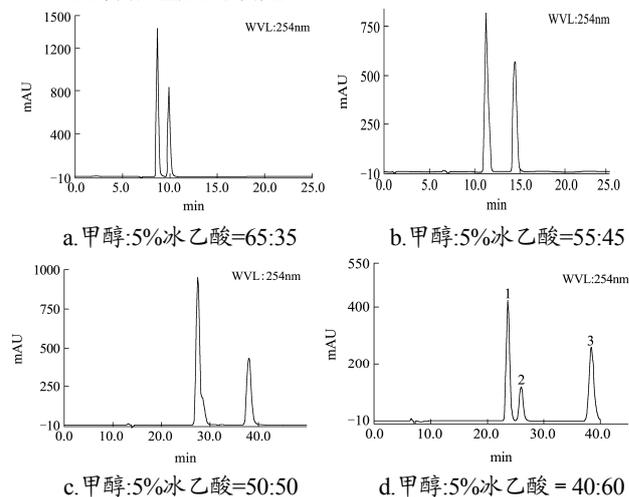
$$Y = \frac{m_3 \times \frac{5000}{20}}{1.5 \times (m_1 - m_2)} = \frac{500 m_1 \times m_3}{3(m_1 - m_2)} \quad (1)$$

$$X = \frac{Y_2 - Y_3}{Y_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中: Y 为 1 g 纯冻干基料中异黄酮苷原的含量 (μ g), m_1 为冻干样品的质量 (g), m_2 为冻干样品中相应 β -环糊精的质量 (g), m_3 为 20 μ L 样品溶液中异黄酮苷原的含量 (μ g); X 为稳定性提高百分比, Y_1 为生豆浆所对应纯冻干基料中的 Y , Y_2 为热处理豆浆所对应纯冻干基料中的 Y , Y_3 为含 β -环糊精豆浆热处理所对应纯冻干基料中的 Y 。

2 结果与分析

2.1 流动相组成的确定



注: 1 为黄豆苷原; 2 为大豆黄素标; 3 为染料木黄酮。

图 1 三种异黄酮苷原的 HPLC 图谱

Fig.1 Chromatogram of the three isoflavone aglycones

图 1 为在不同配比的流动相, 流速为 0.5 mL/min、柱温 25 °C、检测波长 254 nm 的色谱条件下, 注射体积为 20 μ L 三种异黄酮苷原标样的 HPLC 图谱。从图 1 知, 当甲醇所占比例大于 5% 冰乙酸时, 混合标准液中只能分离出两个样品峰且出峰时间较早, 效果不

好;降低甲醇比例,出峰时间则往后推迟,甲醇占50%时前一个峰有一肩峰,当甲醇占40%混标中能出三个峰且各峰分离效果很好。在该条件下对样品溶液进行测定,也能检测三个对应的峰(见图2)。另外单标进行定性时,各苷原保留时间能与混标对应,黄豆苷原:24.6 min;大豆黄素:27.1 min;染料木黄酮:39.4 min。

2.2 回归方程的建立

根据已确定的色谱条件,采用单标定量法,分别注射5、10、15、20 μL三种异黄酮苷原标样测定各自的标准曲线,并得黄豆苷原、大豆黄素、染料木黄酮的线性回归方程,分别为: $y=172.47x-94.161$ ($R^2=0.9986$)、 $y=62.779x-23.102$ ($R^2=0.9995$)、 $y=102.63x-12.761$ ($R^2=0.9899$)。

2.3 1% β-环糊精对豆浆中异黄酮苷原热稳定性影响

本实验,β-环糊精添加过少,在95℃条件下处理10 min后,豆浆异黄酮苷原热稳定性提高效果不是很明显,如添加0.5%时,豆浆中黄豆苷原含量比未添加的豆浆增加2.11%,大豆黄素7.66%,染料木黄酮4.78%;若添加过多,如4%时,冷藏时会有β-环糊精晶体析出。根据预实验,选择β-环糊精的添加量为1%。

表1 纯冻干基料中异黄酮苷原的含量 (μg/g)

Table 1 Content of the three isoflavone aglycones in freeze-drying matrixes(μg/g)

| 样品 | 生豆浆 | 95℃,10 min | | 121℃,1 min | | 140℃,10 s | |
|-----|--------|------------|--------|------------|--------|-----------|--------|
| | A | B | C | D | E | F | G |
| Da | 279.17 | 175.67 | 200.50 | 215.83 | 242.60 | 220.67 | 245.52 |
| Gly | 245.52 | 89.83 | 108.08 | 106.50 | 123.44 | 108.67 | 124.42 |
| Ge | 357.67 | 156.17 | 191.03 | 270.83 | 279.60 | 266.17 | 290.11 |

注: C、E、G为含1%β-CD的样品。

图2为各样品提取溶液的HPLC图谱。从图谱中得到各色谱峰面积,根据回归方程便可得20 μL样品液中异黄酮苷原的含量,再根据公式①计算得各样品对应的纯冻干基料中异黄酮苷原的含量,其结果见表1。再根据公式②,得三种异黄酮苷原热稳定性提高百分比。添加1%β-环糊精,热处理条件为95℃、10 min时,豆浆中黄豆苷原稳定性提高8.89%,大豆黄素13.81%,染料木黄酮9.75%;热处理条件为121℃、1 min时,各异黄酮苷原稳定性分别提高9.59%、8.77%、2.45%;热处理条件为140℃、10 s时,各异黄酮苷原稳定性分别提高8.90%、11.92%、6.69%。

3 结论

3.1 用HPLC分析时,流动相的配比为甲醇:5%冰乙酸=40:60(V/V)时其色谱分离效果最好。在此条件下,各异黄酮苷原中的黄豆苷原、大豆黄素和染料木黄酮的保留时间分别为24.6 min、27.1 min、39.4 min。

3.2 添加1%β-环糊精能提高豆浆($m_{\text{黄豆}}:V_{\text{水}}=1:10$)中异黄酮苷原的热稳定性。热处理条件为95℃、10 min时,添加β-环糊精的豆浆中黄豆苷原含量比未添加的豆浆增加8.89%,大豆黄素13.81%,染料木黄酮9.75%;热处理条件为121℃、1 min时,各异黄酮苷原稳定性分别提高9.59%、8.77%、2.45%;热处理条件为140℃、10 s时,各异黄酮苷原稳定性分别提高8.90%、11.92%、6.69%。

参考文献

(下转第187页)

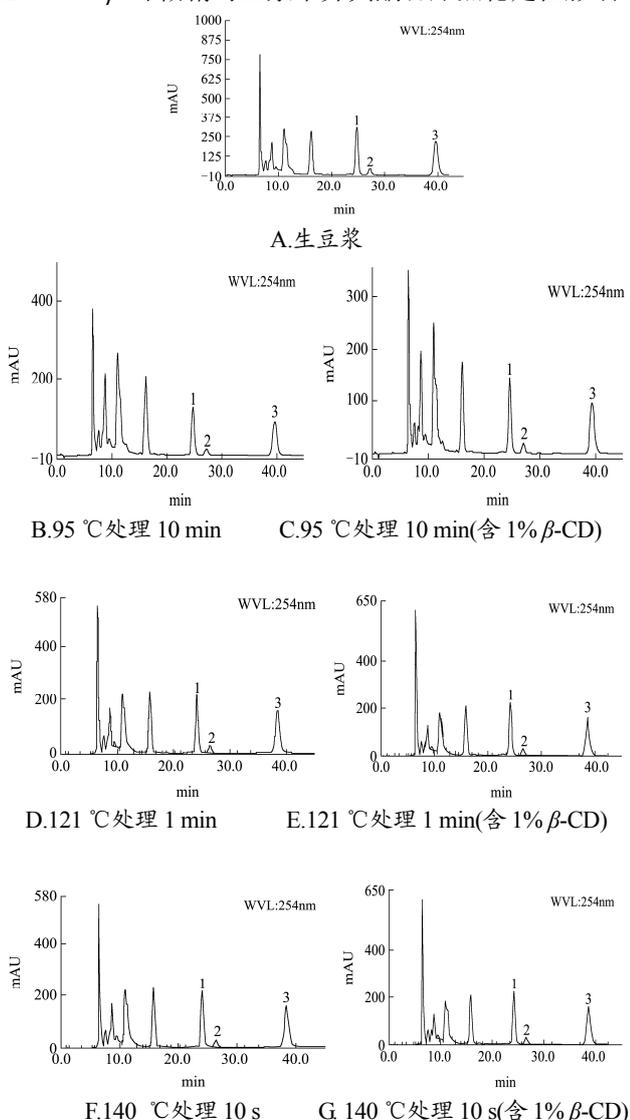


图2 样品提取溶液的HPLC图谱

Fig.2 Chromatogram of samples