

## 复杂发酵产物中黄豆苷元和雌马酚的定量分析

马宇昊, 赵力超, 方祥, 梁文欧, 吴雪娇, 王丽\*

(华南农业大学食品学院 广州 510630)

**摘要** 为解决复杂发酵液背景下非目的代谢物干扰问题,建立一种适用于体外发酵条件下,黄豆苷元及其生物转化物雌马酚的高效液相色谱法分析方法。粪便菌群在脑心浸液肉汤培养基中转化黄豆苷元 48 h,经乙酸乙酯提取,C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)分离,流速为 0.8 mL/min,柱温 25 °C,进样量 20 μL,以水-甲醇-乙腈(体积比 5:3:2)为流动相,在 230 nm 和 260 nm 双波长处检测。结果表明:方法快速、准确,在 6.25 ~ 100 μg/mL 范围黄豆苷元和雌马酚的线性相关系数( $R^2$ )分别为 0.9999 和 0.9996,平均回收率为 92.12% ~ 104.34%,相对标准偏差为 0.15% ~ 0.24%,检出限分别为 0.07 μg/mL 和 0.05 μg/mL,定量限分别为 0.23 μg/mL 和 0.16 μg/mL。本研究所建方法具有较高的精确度且方法简便,可应用于粪便菌群发酵液中黄豆苷元和雌马酚的定量检测。

**关键词** 高效液相色谱; 粪便菌群发酵液; 黄豆苷元; 雌马酚; 检测

**文章编号** 1009-7848(2022)11-0390-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.11.040

大豆异黄酮(Soy isoflavones)是包括黄豆苷元、染料木素等一类具有雌激素活性的多酚类物质,存在于大豆及其加工制品中<sup>[1]</sup>。流行病学研究表明,摄入高水平的大豆异黄酮可以减少与激素依赖和衰老相关疾病的发病率,如骨质疏松症、心血管疾病和癌症<sup>[2-3]</sup>,而大豆异黄酮的功能取决于其生物利用度及肠道活性代谢物<sup>[4]</sup>。大量研究证实,黄豆苷元(Daidzein)在人体内最终代谢产物之一雌马酚(Equol)比其本身更具生物活性<sup>[5-6]</sup>。大豆异黄酮的生物学作用在一定程度上可归因于雌马酚<sup>[7]</sup>。然而,只有 20%~50%的人能在体内产生雌马酚<sup>[8]</sup>,影响雌马酚微生物转化的因素至今不明。如何提高雌马酚的产量并使更多的人和动物具有产雌马酚的能力,成为大豆异黄酮相关益生作用研究的热点<sup>[9]</sup>。利用粪便菌群体外厌氧发酵是目前研究雌马酚转化机制和雌马酚产生菌的有效手段<sup>[10-11]</sup>。研究发现,在体外模拟肠道环境条件下培养的雌马酚产生者的粪便菌群能够代谢黄豆苷元产生雌马酚<sup>[12]</sup>。精确定量代谢过程中前体物质黄豆苷元和代谢转化为雌马酚,是判断粪菌群代谢

能力的重要参数。在用粪菌群模型模拟人体肠道菌群生物转化大豆异黄酮过程中,需要一种用于精准定性和定量检测发酵液中黄豆苷元和雌马酚的方法,这是研究肠道菌群生物转化黄豆苷元为雌马酚,提高大豆异黄酮生物学作用的试验基础。

目前已报道检测雌马酚的主要方法包括紫外法<sup>[13-14]</sup>、液相色谱法<sup>[15-17]</sup>、气相色谱法(GC)<sup>[18]</sup>、气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[19]</sup>和超高效液相色谱法(UHPLC)<sup>[20]</sup>等。紫外法虽可定量计算样品中异黄酮的含量,但无法判断样品中各组分的构成情况。此外,该方法检测前需对样品进行纯化处理,操作要求较高,消耗时间长<sup>[21]</sup>。气相色谱法需制备黄豆苷元和雌马酚的衍生物,步骤较为复杂。液相色谱法、液相色谱-质谱法和超高效液相色谱法具有应用范围广、分离效率和灵敏度高、分析速度快、自动化程度高、样品制备步骤少等优点<sup>[22-24]</sup>。然而,相比于价格昂贵的 GC-MS 和 UHPLC,HPLC 更广泛地应用于大豆异黄酮及其代谢产物的定量检测。目前建立的高效液相色谱法检测雌马酚的方法主要适用于尿液样本。李岩等<sup>[25]</sup>虽建立了 HPLC 检测人体尿样中雌马酚的方法,但没有同时检测到黄豆苷元的消耗情况,不能用 lg(S-雌马酚/黄豆苷元)的指标来判断受试者是否为雌马酚产生者<sup>[4]</sup>。王安易等<sup>[26]</sup>利用 TLC 和 HPLC 结合的方法定性检测尿液中的雌马酚。王路等<sup>[27]</sup>应用 HPLC UV 双波长方法分析人尿中的 6 种大豆异黄酮代谢产物,

**收稿日期:** 2021-11-07

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(31771940);广州市基础与应用基础研究项目(202002030264);广东省自然科学基金面上项目(2020A1515011561)

**第一作者:** 马宇昊,男,硕士生

**通信作者:** 王丽 E-mail: wangli\_scau@scau.edu.cn

然而,该方法存在检测时间较长,流动相消耗较大,不适合于大规模样本检测的问题。以上方法适用于尿液的检测,而尿液中排出的黄豆苷元及其代谢物,是经过黄豆苷元的第 2 条代谢途径,即游离苷元经肠内循环和肠肝循环,最终在尿液中被检测到,所得数据并不能反映肠道微生物转化黄豆苷元的真正能力。同时,结合参考文献[28]和实际工作经验,发现在黄豆苷元的粪菌群发酵液或雌马酚产生菌的培养液中,存在与目标物结构相似或者分子质量相近的小分子物质干扰的情况,使得现有检测方法不适用于体外粪菌群发酵液中黄豆苷元和雌马酚的定性和定量检测。鉴于此,本研究拟在现有高效液相色谱检测技术的基础上,优化检测条件,使其更适用于复杂体外粪菌群发酵液的代谢物检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黄豆苷元、雌马酚标准品,上海源叶生物科技有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯级,BCR 国际贸易有限公司;乙酸乙酯,天津市富宇精细化工有限公司;1 mL 无菌注射器,湖南平安医械科技有限公司;0.22  $\mu\text{m}$  尼龙滤膜,天津市津腾实验设备有限公司。

高效液相色谱仪,配有 Waters e2695 separations module, Waters 2489 荧光检测器,Empower-3 软件,美国 Waters 公司;R-1001 漩涡振荡器,广州市叁科仪器有限公司;H2050R 高速冷冻离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;AW400SG/TC 厌氧工作站,英国 Electrotek 公司;ME204E 分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 色谱方法建立 色谱柱:Agilent HC-C<sub>18</sub> 柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相经初步筛选选用水、甲醇和乙腈;柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

分别对检测波长、流动相比和流速进行优化。检测波长选择 230、260 和 280 nm;流动相比选择  $V_{(\text{水})}:V_{(\text{甲醇})}:V_{(\text{乙腈})}=5:4:1, 5:3:2, 5:2:3$ ;流速选择 1 mL/min 和 0.8 mL/min。

#### 1.2.2 标准储备液的配制及标准曲线的建立

##### 1.2.2.1 黄豆苷元和雌马酚的标准储备液 (1 mg/

mL) 分别准确称量 1 mg 黄豆苷元和雌马酚标准品,用 1 mL 甲醇溶解,配置成标准储备液,20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.2.2.2 黄豆苷元和雌马酚标准工作液 准确吸取黄豆苷元和雌马酚标准储备液各 200  $\mu\text{L}$ ,以甲醇稀释至 2 mL,使其质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,再倍比稀释配制 50, 25, 12.5, 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,即得黄豆苷元和雌马酚标准工作液。

1.2.2.3 标准曲线的建立 将混合标准工作液依次进行 HPLC 分析,记录各组分色谱图上的峰面积。以混合标准品质量浓度  $X(\mu\text{g}/\text{mL})$  为横坐标,色谱峰面积值  $Y(\text{mV}\cdot\text{min})$  为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。

1.2.3 方法学验证 在选择色谱条件下,以 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  不同质量浓度的雌马酚标准品重复进样 3 次,以被测物的色谱峰面积  $A(\text{mV}\cdot\text{min})$  为纵坐标、其进样质量浓度  $C(\mu\text{g}/\text{mL})$  为横坐标绘制标准曲线,确定检测限。分别对仪器精密度、方法精密度、样品回收率进行验证:1)通过吸取黄豆苷元和雌马酚标准品,重复进样 5 次,对仪器精密度进行验证;2)通过检测同一样品 6 份,测定方法精密度;3)在样品中准确加入一定量的标准溶液,摇匀,重复上述试验 6 次,测定方法的回收率。

1.2.4 粪便菌群发酵液样品的分析 在厌氧工作站内将 6 名新鲜雌马酚产生者的粪便样品(1 g)用磷酸缓冲盐溶液 PBS(pH 7.4, 0.2 mol/L)振荡稀释为悬浊液,从中吸取 1 mL 悬液到含黄豆苷元(200  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )的脑心浸液肉汤培养基(100 mL)中,37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧条件下发酵 48 h。取 2 mL 发酵液与 6 mL 乙酸乙酯混合,涡旋振荡 60 s, 4 000 r/min 离心 10 min,上清液用旋转蒸发器蒸干(常温, 80 r/min),加入 1 mL 甲醇溶解,0.22  $\mu\text{m}$  尼龙滤膜过滤到进样瓶<sup>[29]</sup>。在相同的色谱分析条件下,测定各组分色谱峰面积,与标准曲线比较确定进样液中黄豆苷元和雌马酚含量。

### 1.3 数据处理

数据统计和作图软件为 Origin 6.0(OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA)。除仪器精密度、方法精密度、样品回收率试验外,其余每个样品平行测定 3 次,结果表示为平均值 $\pm$ 标准偏

差。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测波长的确定

选择波长为 230, 260, 280 nm 对黄豆苷元和雌马酚进行标准品和样品的检测, 结果见图 1。在波长 230 nm 处黄豆苷元、雌马酚标品和样品具有较大的吸收峰(图 1a 和 b)。在波长 260 nm 处黄豆苷元具有较大的吸收峰, 而雌马酚在此波长下的

吸收峰较小(图 1c 和 d)。在波长 280 nm 处黄豆苷元和雌马酚的峰面积比波长 230 nm 处的吸收峰小。结合图 1b 和 d, 在雌马酚后面有一个未知物质, 且此物质在波长 260 nm 处的峰面积大于 230 nm 处的峰面积, 而雌马酚在波长 230 nm 处的峰面积比 260 nm 处的大, 根据这个特点, 本文选择 230 nm 和 260 nm 作为测定波长, 更加有利于辨别雌马酚吸收峰。

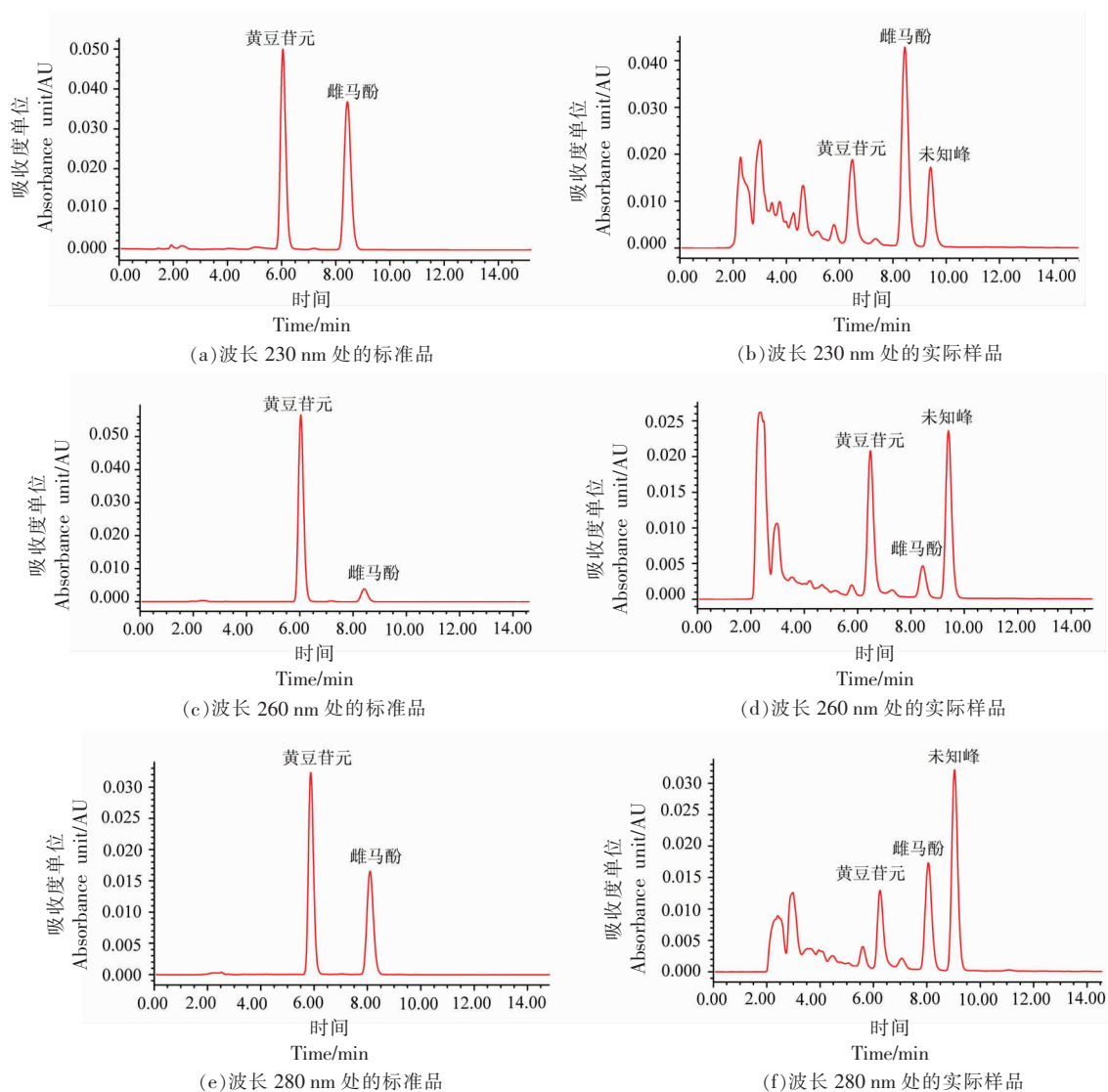


图 1 不同波长下的黄豆苷元和雌马酚标准品与实际样品色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatograms of daidzein and equol standards and actual samples at different wave lengths

### 2.2 流动相配比的确定

为了利于色谱峰的分离, 通过流动相的初步筛选, 选用乙腈、甲醇和水的混合液做为流动相,

并对其配比进行优化。分别进行  $V_{\text{水}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}=5:4:1, 5:3:2, 5:2:3$  的优化, 结果见图 2。如图 2a、c 和 e 所示, 随着乙腈含量的增加, 黄豆苷元和雌

马酚出峰时间增加,从而有利于黄豆苷元与其它物质分离。然而,出峰时间过早,不利于黄豆苷元与其它物质分离,如图 2b。乙腈含量过高,不利于

雌马酚与未知峰的分离(图 2f)。综上,选择  $V_{\text{水}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}} = 5:3:2$  作为最佳流动相比。

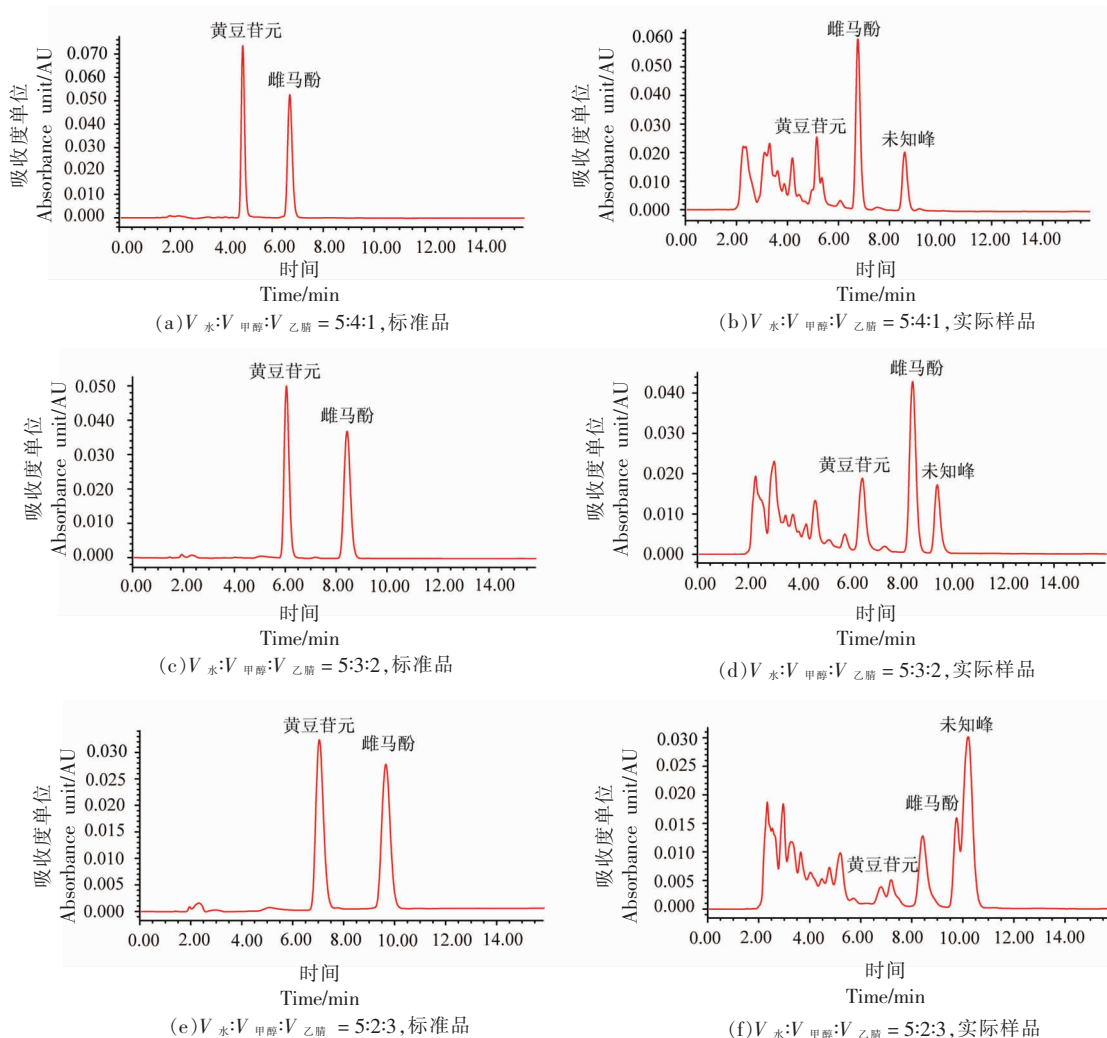


图 2 不同流动相比的黄豆苷元和雌马酚标准品与实际样品色谱图

Fig.2 High performance liquid chromatograms of daidzein and equol standards and actual samples with different flow ratios

### 2.3 流速的确定

优化流速降低发酵液中其它物质对目标峰的影响。试验中,1 mL/min 和 0.8 mL/min 分离标准品的效果几乎一致,然而,若以 1 mL/min 流速进行分离,雌马酚和未知峰の出峰时间相隔较近,有重叠的风险,而以 0.8 mL/min 流速进行分离,雌马酚和未知峰の出峰时间相隔了 1.3 min 左右,降低吸收峰重叠风险,综合考虑后以 0.8 mL/min 的流速为分析流速。

### 2.4 方法学评价

2.4.1 HPLC 测定黄豆苷元和雌马酚的线性范围、检出限和定量限 按照优化的色谱条件,对黄豆苷元和雌马酚的标准工作液重复分析(重复 3 次)。以被测物的色谱峰面积  $Y(\text{mV}\times\text{min})$  为纵坐标、其进样质量浓度  $X(\mu\text{g}/\text{mL})$  为横坐标绘制标准曲线。结果如图 3 所示,得到黄豆苷元的线性回归方程为  $Y=102908X-170303$ , 相关系数  $R^2$  为 0.9999; 雌马酚的线性回归方程为  $Y=991163X-$

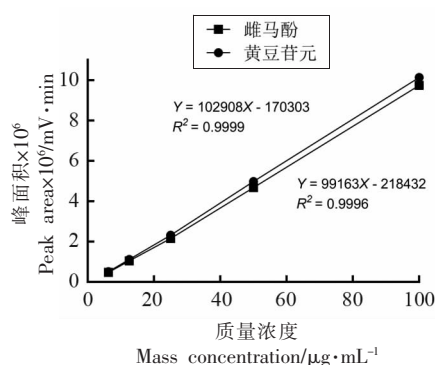


图3 黄豆苷元和雌马酚的标准曲线

Fig.3 The standard curves of daidzein and equol

218432, 相关系数  $R^2$  为 0.9996。结果表明在 6.25~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度范围内, 黄豆苷元和雌马酚的峰面积与质量浓度的线性关系良好。

检出限以 3 倍信噪比( $S/N$ )计算, 黄豆苷元和

雌马酚的检出限分别为 0.07  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。定量限以 10 倍信噪比( $S/N$ )计算, 得出黄豆苷元和雌马酚的定量限分别为 0.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。表明该方法灵敏度高, 能够满足检测需要。

2.4.2 精密度 吸取黄豆苷元和雌马酚浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准品, HPLC 重复进样 5 次, 得到黄豆苷元和雌马酚峰面积。如表 1 所示, 黄豆苷元和雌马酚的相对标准偏差 RSD 分为 0.21% 和 0.26%。结果表明仪器的精密度良好。

取同一样品 6 份, 在优化后的色谱条件下进样, 测定黄豆苷元和雌马酚的峰面积, 如表 2 所示, 黄豆苷元和雌马酚的相对标准偏差 RSD ( $n=6$ ) 分别为 0.71% 和 0.10%, 表明本方法具有良好的精密度。

表 1 仪器精密度

Table 1 The precision of the instrument

物质	峰面积/ $\text{mV}\cdot\text{min}$					RSD/%
	1	2	3	4	5	
黄豆苷元	964 664	959 806	958 622	960 618	960 578	0.21
雌马酚	819 977	816 632	813 749	817 393	815 289	0.26

表 2 方法精密度

Table 2 The precision of the method

物质	样品含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
黄豆苷元	5.98	5.98	5.97	6.09	5.99	5.98	0.71
雌马酚	11.96	11.96	11.96	11.98	11.97	11.94	0.10

2.4.3 回收率 取上述含量测定后的样品, 再取同一批样品 6 份, 每 3 份为 1 组, 按两个水平分别加入对照品定量, 制成 6 份回收样品, 测定其黄豆苷元和雌马酚含量。根据 2.4.1 节得到的线性回归方程, 进行实测标准量的计算。如表 3 所示, 黄豆苷元和雌马酚的平均回收率分别为 94.01%, 104.34% 和 92.12%, 94.96%, 相对标准偏差 RSD 分别为 0.15%, 0.19% 和 0.21%, 0.24%。说明了该方法的准确性较高, 重现性好, 适用于定量检测实际粪便发酵液样本中的黄豆苷元和雌马酚含量。

## 2.5 改进后方法与原有方法测定比较

根据已报道的检测方法<sup>[25]</sup>, 进行黄豆苷元和

雌马酚标准品及粪菌发酵液样品的检测。如图 5a 所示, 原有方法出峰时间较早, 黄豆苷元和雌马酚出峰时间分别为 4.65 min 和 6.35 min。通过图 5c 粪菌发酵液样品液相图可以发现, 原方法并没有将黄豆苷元完全分离, 在 4.67 min 出现的峰与左边出现的位置峰重叠在一起。原方法选择的检测波长为 205 nm, 根据图 5c 可知, 此吸光度更利于 8.46 min 出现的未知峰的检测, 而雌马酚峰面积较小。方法改进后, 如图 5b 和 d, 黄豆苷元和雌马酚出峰时间分别为 6.95 min 和 9.53 min, 发酵液样品中的黄豆苷元被完全分离, 检测波长设定为 230 nm, 使雌马酚获得较大的吸收峰, 改进后的方

表 3 黄豆苷元和雌马酚回收率测定

Table 3 The determination of recovery rate of daidzein and equol

物质	样品质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	实测标准物添加量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	实测标准量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
黄豆苷元	6.00	7.87	13.39	93.98	94.01	0.15
	6.00	7.87	13.38	93.85		
	6.00	7.87	13.41	94.19		
	6.00	13.04	19.58	104.14		
	6.00	13.04	19.59	104.27		
	6.00	13.04	19.64	104.62		
雌马酚	11.98	9.48	20.69	91.86	92.12	0.21
	11.98	9.48	20.72	92.20		
	11.98	9.48	20.73	92.30		
	11.98	13.81	25.05	94.70		
	11.98	13.81	25.08	94.93		
	11.98	13.81	25.13	95.26		

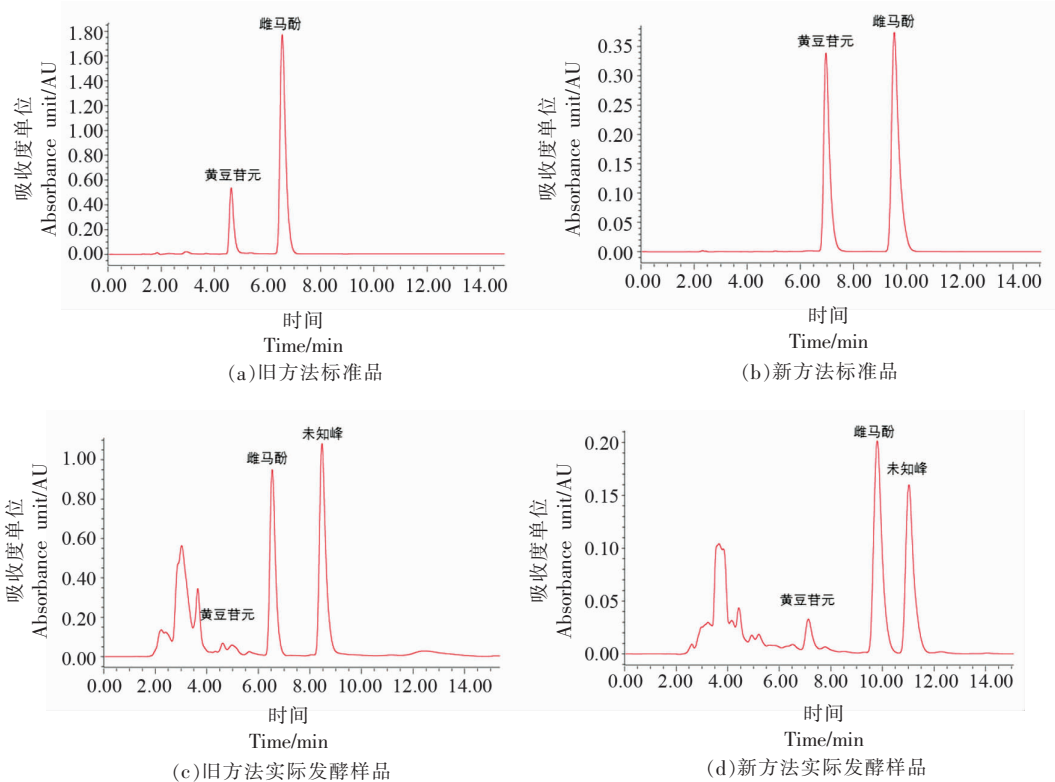


图 4 原方法和改进后方法检测标准品和实际样品色谱图

Fig.4 High performance liquid chromatograms of the original method and the improved method to detect standard and actual samples

法更利于目标物的分离和鉴别。

## 2.6 雌马酚产生者粪便菌群产雌马酚能力的分析

对 6 名受试者进行 3 d 豆粉干预 (大豆异黄酮含量为 1 472  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 其中黄豆苷 658  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 染料

木苷 712  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 黄豆黄苷 101  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 其它苷元 1  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) 及尿液收集, 酶解后使用乙酸乙酯萃取, 甲醇溶解后, 进行 HPLC 检测。结果如表 4。根据 Setchell 等<sup>[30]</sup>对于雌马酚产生者的定义, 即 Ig(S-

雌马酚/黄豆苷元)大于-1.75,就被认为是雌马酚产生者。受试者的尿液数据表明,6位受试者均可以转化黄豆苷元。黄豆苷元质量浓度在4.946~21.860  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,雌马酚质量浓度在3.12~4.855  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间。

按以上优化的试验方法对6名雌马酚产生者的粪便样品进行体外转化,以保留时间定性,以峰面积定量,如表5所示,以外标法分别计算黄豆苷元和雌马酚的含量,受试者的体外发酵数据表明,6位受试者的转化能力与尿液数据存在较大差异,3号及5号受试者的 $\lg(S\text{-雌马酚}/\text{黄豆苷元})$ 有所升高,而其它受试者略有下降。黄豆苷元质量浓度在2.825~82.833  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,雌马酚质量浓度在2.139~55.902  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,质量浓度差异大于尿液样本。通过表4与表5数据的对比,发现尿液样本数据和体外发酵数据对于黄豆苷元转化为S-雌马酚的评价有明显区别,这可能是由于尿液中排出的黄豆苷元及其代谢物,是经过黄豆苷元的第二条代谢途径,即游离苷元经肠内循环和肠肝循环,最终以尿液的形式被检测到,并不能反映肠道微生物转化黄豆苷元的真正能力<sup>[19,31-33]</sup>。

### 3 讨论

在实际样本检测中,本实验室发现在粪菌群发酵液中黄豆苷元与其它未知峰有重叠现象,且检测波长并不适用于雌马酚的检测。为了解决此问题,通过优化波长,流速和流动相比,使得液相检测方法更适用于检测粪菌群发酵液中的黄豆苷元和雌马酚。通过优化波长,选择230 nm和260 nm双波长,利用雌马酚与未知峰在不同波长下的吸收程度不同,准确快速分辨出雌马酚;选择流动相比为 $V_{\text{水}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}=5:3:2$ 的比例,将黄豆苷元和雌马酚从众多代谢物中分离出来;选择0.8 mL/min的流速,使得黄豆苷元与未知峰分离得更远,进一步降低黄豆苷元与未知峰重叠的机率。

不仅粪菌群发酵液会出现物质峰重叠的情况,在某些已分离出代谢黄豆苷元的菌株中也发现了这种情况。于飞等<sup>[28]</sup>采用C18-ODS分析柱,流动相为乙腈和水,检测波长为270 nm的HPLC方法鉴定出兼性肠球菌AUH-HM195(EU919863)

表4 尿液样品测定

Table 4 The determination of urine samples

粪便菌群 样品编号	黄豆苷元含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	雌马酚含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\lg(S\text{-雌马酚}/$ 黄豆苷元)
1	4.946	3.120	-0.200
2	9.571	4.279	-0.350
3	10.370	3.649	-0.453
4	19.284	4.855	-0.560
5	12.272	2.848	-0.634
6	21.860	4.208	-0.716

表5 粪便发酵样品测定

Table 5 The determination of fecal fermentation sample

粪便菌群 样品编号	黄豆苷元含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	雌马酚含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\lg(S\text{-雌马酚}/$ 黄豆苷元)
1	60.123	2.139	-1.449
2	82.833	9.246	-0.957
3	2.925	47.234	1.208
4	29.777	2.203	-1.131
5	2.825	55.902	1.296
6	57.244	2.284	-1.399

能将黄豆苷元的代谢为去氧甲基安哥拉紫檀素(*O*-Desmethylangolensin, *O*-Dma),除此之外,在与*O*-Dma相距1.1 min后面有一种未知的代谢产物,这与本文得到的雌马酚与未知峰的保留时间间隔相似。在加入底物黄豆苷元的菌株发酵液中,此物质的峰面积并不会随着黄豆苷元的减少或*O*-Dma的增加而增加,因此将此物质确定为菌株本身代谢产生的未知峰,并且此物质在波长271 nm和267 nm具有最大紫外吸收峰,这与本文所用的波长260 nm处未知峰的峰面积最高一致,推测这两种未知物质是同种物质。在李岩<sup>[34]</sup>的研究中,采用水、甲醇、乙腈作为流动相,配比为 $V_{\text{水}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}=5:3:2$ ,流速为1.0 mL/min,波长为205 nm的色谱条件检测分离的产雌马酚菌株*Slackia isoflawniconvertens*和粪肠球菌的代谢产物<sup>[35-36]</sup>,结果显示在距离雌马酚峰后1 min的位置有一个未知峰,且其峰面积远远大于雌马酚峰面积,这表明在该色谱条件下,存在雌马酚峰与未知峰重叠从而导致雌马酚浓度偏高的试验误差,而本方法则能很好消除粪菌群发酵液中黄豆苷元其它代谢

产物的干扰,实现了黄豆苷元和雌马酚的有效定性和定量检测。

#### 4 结论

本研究采用 230 nm 和 260 nm 双波长作为检测波长,0.8 mL/min 为流速,体积比为 5:3:2 的水-甲醇-乙腈溶液作为流动相,柱温 25 °C,进样量为 20  $\mu$ L 的方法将粪菌群发酵液中的黄豆苷元和雌马酚很好的分离出来,峰型很好无拖尾现象,黄豆苷元和雌马酚的出峰时间分别 7.5 min 和 10.5 min,为该方法精密度好,RSD 均小于 0.8%,在 6.25 ~ 100  $\mu$ g/mL 的质量浓度范围内线性关系良好,具有较高的灵敏度。采用本方法对实际发酵液样品样品作了加标回收率测定,平均回收率为 92.12% ~ 104.34%,方法准确性高。本文针对与大豆苷元结构相似或者分子质量相近的小分子物质干扰造成的干扰问题,对检测色谱条件进行了优化,实现了大豆苷元在较短时间内的完全分离,且峰形良好,减少杂质峰的干扰,该方法具有前处理简单、灵敏度高、速度快等优点,有利于精准定性和定量检测发酵液中的黄豆苷元和雌马酚,从而促进今后阐明肠道菌群生物转化黄豆苷元为雌马酚机制以提高大豆异黄酮生物学作用的研究。

#### 参 考 文 献

- [1] ZHOU T J, MENG C Z, HE P L. Soy isoflavones and their effects on xenobiotic metabolism[J]. *Current Drug Metabolism*, 2019, 20(1): 46–53.
- [2] YANG J, WU N N, PENG J, et al. Prevention of retinoic acid -induced osteoporosis in mice by isoflavone-enriched soy protein[J]. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(1): 331–338.
- [3] RIENKS J, BARBARESKO J, NÖTHLINGS U. Association of isoflavone biomarkers with risk of chronic disease and mortality: A systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. *Nutrition Reviews*, 2017, 75(8): 616–641.
- [4] SETCHELL K D, CLERICI C. Equol: History, chemistry, and formation[J]. *Journal of Nutrition*, 2010, 140(7): 1355S–1362S.
- [5] BARNES S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products[J]. *Lymphat Res Biol*, 2010, 8(1): 89–98.
- [6] SÁNCHEZ -CALVO J M, RODRÍGUEZ -IGLESIAS M A, MOLINILLO J M G, et al. Soy isoflavones and their relationship with microflora: Beneficial effects on human health in equol producers[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2013, 12(4): 979–1000.
- [7] 范红玲, 刘肖南, 刘达, 等. 产雌马酚菌与肠杆菌混合发酵的研究[J]. *食品科技*, 2011, 36(11): 2–6. FAN H L, LIU X N, LIU D, et al. The production of equol by mixed culture fermentation of *Streptococcus faecium* and *Enterobacter*[J]. *Food Science and Technology*, 2011, 36(11): 2–6.
- [8] BRAUNE A, BLAUT M. Evaluation of inter-individual differences in gut bacterial isoflavone bioactivation in humans by PCR-based targeting of genes involved in equol formation[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(1): 220–231.
- [9] 郑卫江, 侯艳君, 姚文. 肠道微生物代谢产物雌马酚的生成及其主要影响因素[J]. *微生物学报*, 2013, 53(12): 1251–1257. ZHENG W J, HOU Y J, YAO W. Equol: A metabolite of soy isoflavones by intestinal microflora - A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(12): 1251–1257.
- [10] PHAM V T, MOHAJERI M H. The application of *in vitro* human intestinal models on the screening and development of pre- and probiotics[J]. *Beneficial Microbes*, 2018, 9(5): 725–742.
- [11] GUADAMURO L, DOHRMANN A B, TEBBE C C, et al. Bacterial communities and metabolic activity of faecal cultures from equol producer and non-producer menopausal women under treatment with soy isoflavones[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17: 93.
- [12] ATKINSON C, BERMAN S, HUMBERT O, et al. *In vitro* incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production[J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 134(3): 596–599.
- [13] 李笑梅, 张娜, 贾冰心. 测定雌马酚的紫外法建立与应用[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(24): 52–54. LI X M, ZHANG N, JIA B X. Establishment and application of equol determination by ultraviolet spectrophotometry method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(24): 52–54.
- [14] 李笑梅, 蒋梦涵, 贾尧. 肠道菌株单独及复合培养产雌马酚能力的评价[J]. *食品工业科技*, 2017, 38



- (1): 156–159.
- LI X M, JIANG M H, JIA Y. An assessment on the individual & collective equol cultivating productivity of intestinal bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(1): 156–159.
- [15] LIU B H, QIN L Q, LIU A P, et al. Prevalence of the equol–producer phenotype and its relationship with dietary isoflavone and serum lipids in healthy Chinese adults[J]. Journal of Epidemiology, 2010, 20(5): 377–384.
- [16] IDENO Y, HAYASHI K, NAKAJIMA–SHIMADA J, et al. Optimal cut–off value for equol–producing status in women: The Japan Nurses’ Health Study urinary isoflavone concentration survey [J]. Plos one, 2018, 13(7): e201318.
- [17] WANG J, HAN L H, ZHU L F, et al. Determination of isoflavones in human urine by high performance liquid chromatograph [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(4): 569–572.
- [18] BOLCA S, POSSEMIERS S, HERREGAT A, et al. Microbial and dietary factors are associated with the equol producer phenotype in healthy postmenopausal women[J]. The Journal of Nutrition, 2007, 137(10): 2242–2246.
- [19] SUZUKI Y, HISADA A, YOSHINAGA J. Inter – and intra–individual variation in urinary excretion of daidzein and equol in female Japanese[J]. Biomarkers, 2014, 19(5): 407–410.
- [20] REDRUELLO B, GUADAMURO L, CUESTA I, et al. A novel UHPLC method for the rapid and simultaneous determination of daidzein, genistein and equol in human urine[J]. Journal of Chromatography B, 2015, 1005: 1–8.
- [21] 王芳, 曹健, 蒋学文. 紫外分光光度法测定大豆异黄酮胶囊中大豆异黄酮含量[J]. 中国药业, 2006, 15(4): 9.
- WANG F, CAO J, JIANG X W. Determination of soybean isoflavones in soybean isoflavones capsules by UV–spectrophotometry[J]. China Pharmaceuticals, 2006, 15(4): 9.
- [22] 高荣海, 李长彪, 孟宪文, 等. 大豆异黄酮分离及其检测方法的研究进展[J]. 中国调味品, 2006(7): 4–8.
- GAO R H, LI C B, MENG X W, et al. Research advance on the method of separation and detection for soybean isoflavone [J]. China Condiment, 2006(7): 4–8.
- [23] 管建军, 方希修. 大豆异黄酮测定方法概述[J]. 西部粮油科技, 2003(6): 59–60, 65.
- GUAN J J, FANG X X. Summary of the determination method of soybean isoflavones [J]. China Western Cereal & Oils Technology, 2003(6): 59–60, 65.
- [24] 张海军, 王英, 王庆钰. 大豆异黄酮检测方法研究概述[J]. 粮食与油脂, 2011(3): 39–42.
- ZHANG H J, WANG Y, WANG Q Y. Survey on methods of detection for soybean isoflavone[J]. Cereals & Oils, 2011(3): 39–42.
- [25] 李岩, 迟玉杰, 许岩, 等. 高效液相色谱法检测人体尿样中的雌马酚[J]. 营养学报, 2012, 34(5): 488–491.
- LI Y, CHI Y J, XU Y, et al. Determination of equol in human urine by high performance liquid chromatography [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2012, 34(5): 488–491.
- [26] 王安易, 程永强, 欧小群, 等. 利用 TLC 和 HPLC 结合的方法定性检测尿液中的雌马酚[J]. 食品工业科技, 2014, 35(4): 79–82.
- WANG A Y, CHENG Y Q, OU X Q, et al. Qualitative detection of urinary equol by thin–layer chromatography and high performance liquid chromatography[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(4): 79–82.
- [27] 王路, 卢卫红, 程翠琳, 等. 同时检测人尿中六种大豆异黄酮代谢产物的 HPLC 法[J]. 营养学报, 2009, 31(2): 181–184.
- WANG L, LU W H, CHENG C L, et al. The simultaneous analysis of six isoflavone metabolites in human urine by HPLC[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2009, 31(2): 181–184.
- [28] 于飞, 王世英, 李佳, 等. 兼性肠球菌 *Enterococcus hirae* AUH–HM195 对黄豆苷原的开环转化[J]. 微生物学报, 2009, 49(4): 479–484.
- YU F, WANG S Y, LI J, et al. C – ring cleavage of isoflavone daidzein by a newly – isolated facultative *Enterococcus hirae* AUH–HM195 from *Crossophilum manchuricum* feces[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(4): 479–484.
- [29] 周博, 孟建青, 王秀伶. 兔肠道大豆异黄酮还原菌株的分离鉴定及其转化特性[J]. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2301–2309.
- ZHOU B, MENG J Q, WANG X L. Isolation, identification and biotransforming property of an

- isoflavone reducing bacterium isolated from rabbit intestinal microflora[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(11): 2301–2309.
- [30] SETCHELL K D, BROWN N M, SUMMER S, et al. Dietary factors influence production of the soy isoflavone metabolite *s*-(–)equol in healthy adults[J]. *The Journal of Nutrition*, 2013, 143(12): 1950–1958.
- [31] RAFII F. The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol [J]. *Metabolites*, 2015, 5(1): 56–73.
- [32] GUADAMURO L, DELGADO S, REDRUELLO B, et al. Equol status and changes in fecal microbiota in menopausal women receiving long-term treatment for menopause symptoms with a soy-isoflavone concentrate[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(777): 1–10.
- [33] GUADAMURO L, DOHRMANN A B, TEBBE C, et al. Bacterial communities and metabolic activity of faecal cultures from equol producer and non-producer menopausal women under treatment with soy isoflavones[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 93.
- [34] 李岩. 人体肠道内产雌马酚菌的分离及其性质的研究[D]. 东北农业大学, 2012.
- LI Y. Isolation and characterization of the equol-producing bacteria from human feces [D]. Northeast Agricultural University, 2012.
- [35] RAFII F. The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol [J]. *Metabolites*, 2015, 5(1): 56–73.
- [36] PHAM V T, MOHAJERI M H. The application of *in vitro* human intestinal models on the screening and development of pre- and probiotics[J]. *Beneficial Microbes*, 2018, 9(5): 725–742.

### Quantitative Analysis of Daidzein and Equol in Complex Fermentation Products

Ma Yuhao, Zhao Lichao, Fang Xiang, Liang Wenou, Wu Xuejiao, Wang Li\*  
(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510630)

**Abstract** To solve the interference problem of undesired metabolites with complex background fermentation liquid, high performance liquid chromatography method for analyzing suitable for *in vitro* fermentation conditions, the measurement daidzein and equol. The fecal microbiota was transformed into daidzein in Brain Heart infusion (BHI) broth medium for 48 hours. After extracted by ethyl acetate, the samples were analyzed on a C18 column (250 mm × 4.6 μm, 5 μm). The flow rate was 0.8 mL/min, the column temperature was 25 °C, the injection volume was 20 μL, and the mobile phase was water-methanol-acetonitrile (volume ratio, 5:3:2). The detection was carried out at UV 230 nm and 260 nm. The linear correlation coefficients of daidzein and equol were  $R^2 = 0.9999$ ,  $0.9996$ , respectively, the average recovery were 92.12%–104.34%, the relative standard deviation were 0.15%–0.24%, the limit of detection were 0.07 μg/mL and 0.05 μg/mL, and the limits of quantification were 0.23 μg/mL and 0.16 μg/mL, respectively. The method established in this study had high accuracy and precision and was simple. It has been applied to determine daidzein and equol in fecal microbiota fermentation.

**Keywords** high performance liquid chromatograph (HPLC); fecal microbiota fermentation; daidzein; equol; determination