

等度高效液相色谱测定大豆异黄酮中大豆甙元和金雀异黄酮

林 疆 杨兰钦 唐根源

(福州福龙生物制品有限公司, 福建 福州 350015)

摘 要: 本文介绍了等度高效液相色谱 (HPLC) 测定大豆异黄酮中二种主要成份: 大豆甙元 (Daidzein) 和金雀异黄酮 (Genistein) 的方法。采用 Atlantis C₁₈ 色谱柱和 EasyGuard C₁₈ 保护柱; 以甲醇: 0.1% 醋酸 (pH 3.11) = 51.5: 48.5 (v/v) 为流动相; 检测波长 $\lambda = 254\text{nm}$; 流速 $1\text{mL}/\text{min}$ 。在测定范围内 (10–200ng) 峰面积与质量浓度线性关系良好。大豆甙元和金雀异黄酮的相关系数分别为 0.9984 和 0.9997。两组份回收率为 97.0–102.9%。

关键词: 高效液相色谱; 大豆异黄酮; 大豆甙元; 金雀异黄酮

中图分类号: O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1009–8143(2006)02–0015–02

Determination of the Daidzein and the Genistein in the Soy Bean Isoflavones by Isocratic Elution High Performance Liquid Chromatography

Lin Jiang Yang Lanqin Tang Genyuan

(Fuzhou Fulong Biological Products Co., LTD. Fuzhou, Fujian, 350015, China)

Abstract An analytical approach has been developed for isocratic elution high performance liquid chromatographic determination of Daidzein and Genistein in the soy bean isoflavones. They were measured using Atlantis C₁₈ for analytical column and EasyGuard column C₁₈ for guard column, and UV detector (at 254nm). The mobile phase was methanol: 0.1% acetic acid (pH 3.11) = 51.5: 48.5 (v/v). there was a good linear relationship between the content of Daidzein, Genistein and its peak area with the correlation coefficients of 0.9984 and 0.9997 respectively. Average recoveries were 97.0% – 103.0%.

Key words High performance liquid chromatography; Soy bean isoflavones; Daidzein; Genistein

大豆异黄酮对心脑血管具有保护作用, 可降低胆固醇, 防止骨质疏松^[1-3], 同时大豆异黄酮具有极强的抗氧化能力^[4], 有保护皮肤, 美容养颜之功效^[5], 市场上有的化妆品中就添加了大豆异黄酮。我们利用高效液相色谱对两种进口的大豆异黄酮 (法国 CRODAROM 公司, 日本 ICHUMULU 公司) 中的二种主要成份大豆甙元和金雀异黄酮进行定量测定, 为监控进口大豆异黄酮的质量提供了有力保障。

大豆异黄酮的测定以高效液相色谱为主^[6-8], 分光光度法只能测定异黄酮总量^[9], 大豆异黄酮组份结构极其相似, 再加上杂质的干扰, 增加了测定难度。因而在高效液相色谱方法中, 一般需要梯度洗脱方式。我们建立了等度反相高效液相色谱方法, 能达到定量分析要求, 又简化了分析方法, 缩短了分析时间。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

Waters 650E 高效液相色谱仪 (486 可调波长检测器, 746 数据处理机, U6K 进样阀), 510 泵 (Waters), Milli-Q50 水纯化系统 (Millipore), 酸度计 (上海雷磁)。

大豆甙元 (含量 99% (HPLC)) (sigma), 金雀异黄酮 (含量 99% (HPLC)) (sigma), 水 (Milli-Q50), 大豆异黄酮 (固体) (法国 CRODAROM 公司), 大豆异黄酮 (液体) (日本 ICHUMULU 公司), 甲醇 (A.R.), 醋酸 (A.R.)。

1.2 标准样品溶液配制

分别准确称取大豆甙元和金雀异黄酮各 12.5mg, 用少量流动相溶解后移入同一 25mL 容量瓶中, 用流动相定容, 摇匀, 静止片刻后取 1mL 混合

标样溶液置于 100mL 容量瓶中,用流动相定容。混合标样浓度:大豆甙元和金雀异黄酮都为 5 μ g/mL。作为 HPLC 标准溶液,用前经 0.45 μ m 滤膜过滤。

1.3 色谱分离条件

色谱柱: Atlantis C₁₈, 5 μ m, 4.6 \times 150mm (Waters), 保护柱: EasyGuard C₁₈, 5 μ , 8 \times 4mm (Dkma); 流动相: 甲醇: 0.1% 醋酸 (pH 3.11) = 51.5: 48.5 (v/v); 检测波长: λ = 254nm (6); 流速: 1.0mL/分; 室温。

1.4 样品制备

1.4.1 法国 CRODAROM 公司样品 (固体), 简称 F-FNV。

精确称取 F-FNV 样品 26.6mg 用流动相溶液

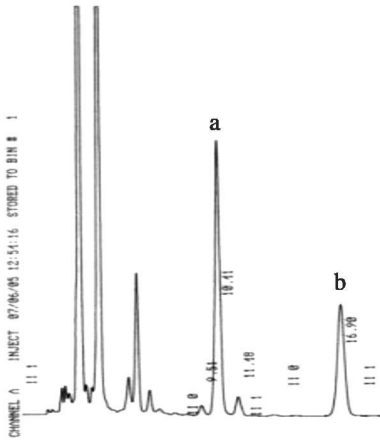


图 1 F-FNV 色谱图
a 10.41 大豆甙元
b 16.90 金雀异黄酮

溶解后置 100mL 容量瓶中,用流动相定容,则浓度为 0.266mg/mL。用前经 0.45 μ m 滤膜过滤。

1.4.2 日本 ICHUMULU 公司样品 (液体), 简称 J-FNV。

在 25mL 容量瓶中精确称取 J-FNV 样品 1.7378 克,用流动相定容,则浓度为 69.512mg/mL,用前经 0.45 μ m 滤过。

2 结果和讨论

2.1 样品分析

2.1.1 用绝对保留时间法和样品加标样重叠法定性, F-FNV 和 J-FNV 样品谱图如图 1、2。

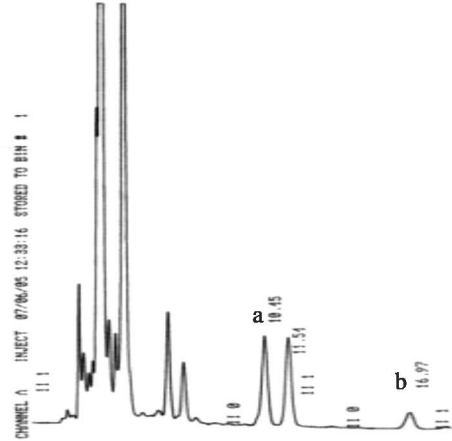


图 2 J-FNV 色谱图
a 10.45 大豆甙元
b 16.97 金雀异黄酮

2.1.2 定量分析

用峰面积外标法定量, 标样和样品采用等体积

进样, 结果如下表 (表 1)

表 1 样品测定结果

测定内容	大豆甙元			金雀异黄酮		
样品名称	平均 (n=5)	标准偏差 (S)	变异系数 (RSD%)	平均 (n=5)	标准偏差 (S)	变异系数 (RSD%)
F-FNV	3.73%	0.06062	1.62	1.50%	0.05244	3.50
J-FNV	2.25mg/100g	0.04301	1.91	0.68mg/100g	0.02598	3.82

2.2 回收率

取 F-FNV, J-FNV 样品各一份, 1份进行含量测定 (作为本底), 另一份加入精确称重的大豆甙

元、金雀异黄酮标样, 经同样方法处理后进行加标回收率的测定 (表 2)

表 2 方法回收率

样品名称	大豆甙元				金雀异黄酮			
	本底 (μ g)	加入量 (μ g)	测定值 (μ g)	回收率 (%)	本底 (μ g)	加入量 (μ g)	测定值 (μ g)	回收率 (%)
F-FNV	101.71	25.0	127.02	101.12	41.65	25.0	66.58	99.72
J-FNV	17.31	25.0	43.04	102.92	8.65	25.0	32.90	97.00

(下转第 20 页)

受污染的可能性小,自动化程度高的特点,在多目标样品 54 个分析项目中,它可承担大约 25 个分析项目的检测。

数万万个样品的测试证明, F 值的主要影响因素是:基体、标准物质的数量、标准物质的含量。样品的基体、待测元素的含量愈接近参与回归曲线的标准物质,分析的精确度就愈高。如果参与回归曲线的标准物质的数量不够多,测定的准确度就会降低;如果参与的标准物质数量足够多,但其含量无法涵盖样品的含量,分析的准确度将受到影响,势必也影响到 F 检验值。

2.5 测试质量警告限的系数不是 $1/\sqrt{2}$ 而是对数偏差 0.05

多目标生态地球化学样品成图的等值线的差值为对数的 0.1Q 根据此类样品分析的特性,地矿部门实施多年的规范第 2 页述及的有关要求,即测试质量警告限为分析误差允许值的 $1/\sqrt{2}$ (即 0.7071),适应性不强,而应采用对数偏差允许值 0.10 的一半,即对数偏差 0.05 作为警告限。其理论依据:一是系统误差的 + 0.05 与 - 0.05 的绝对值

是 0.1Q 0.10 不仅是地质成图的等值线的差值,又是样品测定值大于 3 倍检出限的对数偏差允许值。

3 结语

外部标准控制样代表了全部检测样的分析质量状况。因此说以上论述的方法,不仅控制了外部的标准控制样分析质量,而且控制了按《暂行规定》要求内部密码插入 8% 国家一级标准物质监控样、5% 的内检样,直至全部检测样品的分析质量。

以上论述的方法不仅可应用于多目标地球化学样品测试中,而且可适用于不同实验室间的样品比对,或能力验证中。尤其当前准备与国际间互相认可的实验室,以上论述的各质量监控法,可做借鉴。

参考文献

- [1] 叶家瑜. 地质实验工作 50 周年文集 [M]. 北京: 地质出版社, 2003: 280.
- [2] 中华人民共和国地质矿产部, 地质矿产实验室测试质量管理规范 [M]. 西安: 西安交通大学出版社, 1994: 55-60.
- [4] 郑用熙. 分析化学中的数理统计方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1991: 120.

(上接第 16 页)

2.3 线性回归和相关系数

取大豆甙元、金雀异黄酮的混合溶液 (浓度都为 $5\mu\text{g}/\text{mL}$), 取 $2.5\mu\text{L}$ 、 $5\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $15\mu\text{L}$ 、 $20\mu\text{L}$ 、 $25\mu\text{L}$ 分析, 结果以峰面积 Y 为纵坐标, 待测物大豆甙元、金雀异黄酮质量浓度 X ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, 进行回归计算; 大豆甙元和金雀异黄酮的回归方程和相关系数分别为 $Y = 3.26 + 1.36X$, $r = 0.9984$ 和 $Y = 7.08X - 0.06$, $r = 0.9997$ 。

2.4 我们用 $20\mu\text{L}/\text{mL}$ 的溶液进样 $20\mu\text{L}$ 大豆甙元的峰形既宽又不对称, 但样品中的大豆甙元的峰形正常, 我们一度怀疑标样纯度不够。我们改用 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液分析, 大豆甙元的峰形正常, 说明我们使用的色谱柱 Atlantis 柱容量不大, 原来的峰形不好是柱子过载所致。

2.5 大豆异黄酮成份复杂, 一般采用浓度梯度洗脱, 我们根据自己工作条件和具体分析对象, 建立了等度洗脱方法, 完全能满足定量要求。

2.6 从谱图分析, 大豆异黄酮中的几个主要成份分离良好, 因受标样限制, 我们只对二个主要成份 (大豆甙元、金雀异黄酮) 定量, 我们的体会是在定量分析中尽量避免梯度洗脱, 以免带来不必要的麻烦。

2.7 F- FNV 和 J- FNV, 一个是固体样品, 另一个是液体样品, 二个样品的优劣很难比较, 单从大豆甙元和金雀异黄酮二个主要组份, 尤其是金雀异黄酮, F- FNV 优于 J- FNV, 即法国 CRODAROM 公司产品优于日本 ICHUMULU 公司产品。

参考文献

- [1] 姜浩奎. 大豆与健康 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2003: 6.
- [2] 肖立中, 江志平, 徐新等. 大豆异黄酮对冠心病患者血脂达标率的影响 [J]. 临床内科杂志, 2003, 20(6): 393-394.
- [3] 刘飞. 大豆异黄酮抗癌与预防心血管病的研究进展 [J]. 解放军预防医学, 2003, 21(4): 304-306.
- [4] 刘丽, 金宏. 大豆异黄酮抗氧化作用的研究进展 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2003, 23(2): 132-135.
- [5] 刘刚, 刘东. 大豆异黄酮对皮肤保水性的研究 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2003, 29(4): 429-330.
- [6] 李桂华, 姜延超. 高效液相色谱测定大豆异黄酮含量 [J]. 粮食与油脂, 2004, (10): 40-44.
- [7] 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, 32(6): 340-343.
- [8] 王哲, 白志明. 紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量 [J]. 中国油脂, 2005, 30(1): 52-53.