

保健品原料中大豆异黄酮的 HPLC 法测定

胡晓娟^① 苏惠

(河南农业大学理学院 郑州市 450002)

摘要 建立了一种同时测定保健品原料中大豆异黄酮 6 种成分的高效液相色谱测定方法, 该方法可以使常见的大豆异黄酮 6 种主要成分大豆甙、黄豆黄甙、染料木甙、大豆甙元、黄豆黄素、染料木素得以分离和检测。采用甲醇-水作流动相, 梯度洗脱, Nucleosil-C₁₈ 色谱柱 (250mm × 4.6 mm; 5 μm), 流速为 1.0 mL/min, 紫外检测器, 检测波长 254 nm。结果表明各组分线性关系良好, 相关系数 ($r = 0.9872 - 0.9998$), 加标回收率在 93%—113.6%, 相对标准偏差在 1.36%—3.89%。该方法简便、准确, 可作为同时测定 6 种大豆异黄酮含量的方法。

关键词 大豆异黄酮, 高效液相色谱, 保健食品原料。

中图分类号: O657.7²

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2007)02-0268-03

1 前言

大豆异黄酮是大豆中的一种非营养成分, 具有生理活性, 能产生类似雌激素效应, 被称之为“植物雌激素”。1987 年, Akiyama^[1] 等研究发现大豆中的染料木素是酪氨酸激酶抑制剂, 而化学合成的酪氨酸激酶抑制剂一直用于癌症的治疗。研究表明对与激素有关的癌症 (乳腺癌、前列腺癌)、心血管疾病、骨质疏松症、妇女更年期综合症等有广泛的预防作用^[2, 3]。由于大豆异黄酮具有显著的医疗保健作用, 近年来在食品、医药等行业被广泛应用。大豆异黄酮还具有抗氧化活性, 是中老年女性喜欢的保健品之一。

大豆异黄酮开发的产品在我国保健品行业中逐渐增多, 对于大豆异黄酮的检测, 国家目前尚未制定统一的标准。但由于加工和提取方法的不同, 对总含量的认定有很大差别, 高效液相色谱法是目前被广泛认可的检测方法^[4-7]。把好原料关, 产品质量才有保证, 我们对同时测定 6 种主要成分进行了研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

SUMMIT 高效液相色谱仪 (美国戴安公司), UVD170V 紫外检测器, Nucleosil-C₁₈ 色谱柱 (250mm × 4.6 mm; 5 μm), 7725i 型手动进样器, 变色龙 (Chromleon) 色谱工作站, HY-4 型振荡器 (常州国华)。甲醇 (色谱纯, 天津四友); 标准品: 大豆甙 (daiazin)、黄豆黄甙 (glycitin)、染料木甙 (genistin)、大豆甙元 (daiazein)、黄豆黄素 (glycitein)、染料木素 (genistein) 均为上海同田生化公司产品。实验用水为娃哈哈纯净水。

^① 联系人, 手机: (0) 13838023668; E-mail: huxjx@163.com

作者简介: 胡晓娟 (1966—), 女, 郑州市人, 副教授, 主要从事天然产物的提取和检测研究。

收稿日期: 2007-01-12; 接受日期: 2007-01-24

2.2 色谱条件

色谱柱: Nucleosil-C₁₈ 色谱柱 (250mm × 4.6 mm; 5 μ m)。流动相: 甲醇/水, 梯度洗脱。流速:

1.0 mL/min; 检测波长: 254nm; 柱温: 20 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.3 样品处理

准确称取大豆异黄酮保健品原料样品 4.8mg 用甲醇溶于小烧杯中, 定容 10mL。超声提取 30min。稀释 5 倍后经 0.45 μ m 滤膜过滤。待测。

2.4 标准溶液配制

大豆甙、黄豆黄甙、染料木甙、大豆甙元、黄豆黄素、染料木素 6 种标准品各 10.0mg, 用甲醇溶解并定容至 10.0 mL, 此溶液浓度均为 1.0mg/mL 的标准溶液, 作为储备液。

3 结果与讨论

3.1 实验条件的选择

流动相的选择要在可以使样品分离的基础上, 选择能保护色谱柱, 延长仪器寿命, 价格经济易得。对于多通道的低压泵柱前混合, 采用甲醇和水作流动相, 梯度洗脱, 0—15min 甲醇: 水(体积比)为 35:65, 15—20min 甲醇从 35 上升到 65, 20—40min 甲醇从 65 下降到 55, 40—41min 甲醇从 55 下降到 45。在线脱气可以将甲醇和水混合产生的气泡脱出, 避免基线不稳, 实验效果较好。实验表明, 甲醇量提高, 保留时间缩短, 影响大豆甙和黄豆黄甙的分离, 一味地提高甲醇量, 大豆甙和黄豆黄甙会完全重合一起, 影响分析结果; 检测波长在 245nm、252nm、254nm、260nm 等几个波长作了比较, 发现 254nm 和 260nm 两个波长下各峰的吸收值均较好, 254nm 大豆甙、黄豆黄甙的吸收值比 260nm 略高, 260nm 染料木甙的吸收值比 254nm 略高, 最后确定检测波长为 254nm。

3.2 校准曲线

分别准确移取不同体积的大豆甙、黄豆黄甙、染料木甙、大豆甙元、黄豆黄素、染料木素 6 种标准溶液 (1.0mg/mL), 配制成 10、20、40、60、100 μ g/mL 混合标准系列溶液。溶液经 0.45 μ m 滤膜过滤后, 分别用微量进样器 10 μ L 测定后, 以峰面积 y (mAU · min) 作因变量, 分别以 6 种标准品系列浓度 x (μ g/mL) 作自变量进行线性回归, 得线性回归方程见表 1。标准品色谱图见图 1。

表 1 6 种大豆异黄酮线性方程

名称	线性回归方程	相关系数 r
大豆甙	$y = 0.8318x - 0.9193$	0.9995
黄豆黄甙	$y = 0.7249x - 1.1506$	0.9997
染料木甙	$y = 0.7614x - 0.3219$	0.9996
大豆甙元	$y = 0.9773x - 1.3970$	0.9998
黄豆黄素	$y = 0.4035x + 3.9031$	0.9872
染料木素	$y = 1.1848x - 1.5657$	0.9996

3.3 方法的精密度、准确度及检出限

在样品中加入一定量已知浓度的混合标准溶液, 按本实验的色谱条件, 进样量 10 μ L, 平行实验 5 次测定, 以峰面积定量, 分别计算 6 种大豆异黄酮的相对标准偏差为 1.36%—3.89%, 6 种成分的回收率为 93%—113.6%。结果见表 2。检出限按 $S/N = 3$, 最小为 1 μ g/mL。

表 2 方法的精密度和回收率测定结果

大豆异黄酮	本底值	加标量						(μ g/mL)		
			1	2	3	4	5	测定值	RSD (%) 回收率 (%)	
大豆甙	20	30	45.72	48.71	48.86	48.30	47.92	47.90	2.67	93
黄豆黄甙	20	30	46.83	49.18	49.08	48.48	48.06	48.32	1.97	94.4
染料木甙	20	30	47.47	48.96	48.60	47.54	47.23	47.96	1.60	93.2
大豆甙元	20	30	47.78	49.73	49.35	48.61	48.28	48.76	1.64	95.9
黄豆黄素	20	30	53.40	56.76	55.69	52.81	51.67	54.07	3.89	113.6
染料木素	20	30	47.96	49.44	49.17	48.38	48.07	48.61	1.36	95.4

3.4 样品测定结果

取大豆异黄酮保健品原料样品待测样, 进样 $10\mu\text{L}$ 。测得 6 种成分大豆甙为 $33.32\mu\text{g}/\text{mL}$ 、黄豆甙为 $21.17\mu\text{g}/\text{mL}$ 、染料木甙为 $12.85\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大豆甙元为 $1.69\mu\text{g}/\text{mL}$ 、黄豆黄素为 $1.3\mu\text{g}/\text{mL}$ 、染料木素为 $2.07\mu\text{g}/\text{mL}$ 。总黄酮含量(6 种成分总和)为 $72.4\mu\text{g}/\text{mL}$, 色谱图见图 2。

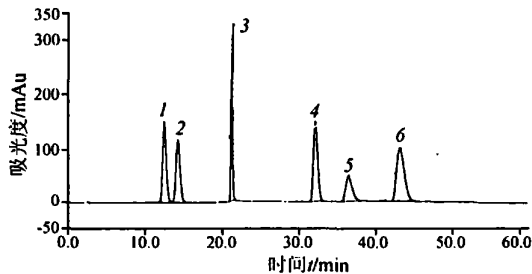


图 1 标准品色谱图

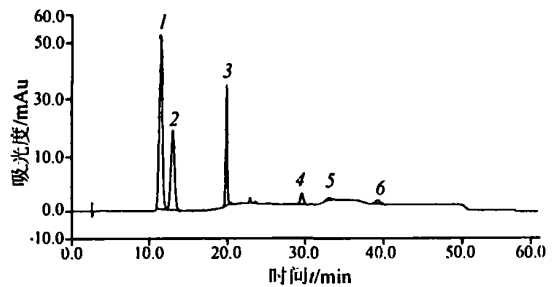


图 2 样品色谱图

4 结论

校准曲线的相关系数为 $0.9872-0.9998$, 说明线性关系良好。从表 2 中可以看出本实验所建立的液相色谱法测定保健品原料中大豆异黄酮的含量, 重复性和再现性都比较好。适用于多通道的低压泵系统。但浓度不要太低, 否则基线漂移较大。本方法简单, 易于掌握。

参考文献

- [1] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S *et al.* Genistein, A Specific Inhibitor of Tyrosine Specific Protein Kinases[J]. *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**(12): 5592—5595.
- [2] Messina M, Hughes C. Efficacy of Soyfoods and Soybean Isoflavone Supplements for Alleviating Menopausal Symptoms is Positively Related to Initial Hot Flash frequency[J]. *J. Med. Food*, 2003, **6**(1): 1—11.
- [3] Hermansen K, Dinesen B, Hoie L H *et al.* Effects of Soy and Other Natural Products on LDL/HDL Ratio and Other Lipid Parameters: A Literature Review[J]. *A dv. Ther.*, 2003, **20**(1): 50—78.
- [4] 常凤启, 秦振顺, 韩会新. 保健食品中大豆异黄酮的测定方法研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2004, **14**(4): 430—432.
- [5] 李辉. 大豆异黄酮检测技术的研究[J]. *黑龙江农业科学*, 2005, (5): 6—8.
- [6] 苏菊, 肖白曼, 刘宁. 高效液相色谱法测定保健食品中的大豆异黄酮[J]. *生物技术*, 2005, **15**(4): 54—56.
- [7] 苗虹, 赵云峰. 高效液相色谱测定食品中大豆异黄酮含量[J]. *中国食品添加剂*, 2004, (5): 92—96.

Determination of Soybean Isoflavones in Health Food by HPLC

HU Xiao-Juan SU Hui

(Natural Science College Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, P. R. China)

Abstract A method for analysis of soybean isoflavones in health food by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. The method was separated daiazin glycitin genistin daiazein glycitein and genistein. The samples were separated on a C18 column ($250\text{mm} \times 4.6\text{mm}; 5\mu\text{m}$) using methanol/water as mobile phase at a flow rate of $1.0\text{mL}/\text{min}$ and with UV detection at 254nm . The method is simple and useful, and has good linearity with correlation coefficients $0.9872-0.9998$ and relative standard deviation $1.36\%-3.89\%$. The recoveries of Soybean isoflavones in the samples were between $93\%-113.6\%$. The method is suitable for the determination of soybean isoflavones in health food.

Key words Soybean Isoflavones, High Performance Liquid Chromatography, Health Food.