

RP-HPLC 法测定大豆提取物中金雀异黄素^{*}

李文亮¹ 韩继福¹ 崔洪斌²

(1. 解放军军需大学军工系, 长春 130062; 2. 哈尔滨医科大学, 哈尔滨 150086)

摘要 建立 RP-HPLC (反相高效液相色谱法) 法分离检测大豆提取物中金雀异黄素含量的方法。色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ (250mm×4.6mm, 5 μ m), 流动相乙腈-0.003mol/L 磷酸氢二钠, 流速 1.0ml/min, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 检测波长 259nm。金雀异黄素的加样回收率为 99.67%, 精密度 RSD (相对标准偏差) 为 0.056%。方法简便, 准确、重复性好。

关键词 大豆; 金雀异黄素; RP-HPLC

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2002)02-0106-03

异黄酮类成分是植物药提取领域公认的一类重要物质, 具有广泛的药理作用^[1]。此类成分在植物界主要分布在豆科蝶形药亚科中。其中大豆提取物中的异黄酮成分因其明确的雌激素样作用等, 用于治疗妇女更年期综合症和骨质疏松等症^[2], 有广阔的开发前景。目前测定金雀异黄素仅仅是 RP-HPLC 法^[3], 按照文献报道^[4] 去重复, 重复性小, 峰形差, 保留时间较长。本文对大豆异黄酮成分中的金雀异黄素进行 RP-HPLC 测定进行改进, 流动相采用二元梯度洗脱。该方法的提出对此类成分的进一步研究及开发提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters2690 高效液相色谱: 美国 Waters 公司;
金雀异黄素标准品 (98%): 美国 Sigma 公司;
甲醇: 色谱纯, 山东省禹王实业总公司禹城化工厂;
乙腈: 色谱纯, 山东省禹王实业总公司禹城化工厂;
磷酸氢二钠: 分析纯, 哈尔滨市新春化工农药厂。

1.2 测定样品

样品 1: 经乙醇提取出的大豆异黄酮, 棕黄色粉

末。

样品 2: 采用极性大孔树脂吸附法纯化的大豆异黄酮, 黄色粉末。

样品 3: 采用盐酸水解制得的大豆异黄酮, 棕黄色粉末。

以上三组样品均为本研究室自制所得。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ (250mm×4.6mm, 5 μ m); 流速: 1.0ml/min; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 检测波长: 259nm; 进样量 10 μ l; 流动相: 乙腈-0.003mol/L 磷酸氢二钠, 进行二元梯度洗脱。流动相及梯度曲线见表 1。

表 1 流动相及梯度曲线

Table 1 Mobile phase and grade curve

时间 Time T/min	流速 Flow rate V/ml \cdot min ⁻¹	乙腈 CH ₃ CN (%)	Na ₂ HPO ₄ (%)	梯度曲线 Grade curve
0	1	5	95	
14	1	10	90	6
15	1	5	95	1

1.4 标准溶液的配制

精确称取金雀异黄素标准品 2.4mg, 加甲醇溶解, 定容至 10ml, 得浓度为 0.24mg/ml 的标准溶液。

1.5 标准曲线的制备

精密吸取金雀异黄素标准溶液 0.5、1、1.5、

* 收稿日期: 2001-07-26

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 39970637)。

作者简介: 李文亮 (1968-), 男, 硕士, 解放军军需大学教员。

2.0、2.5ml 于 10ml 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制成浓度为 0.012、0.024、0.036、0.048、0.06mg/ml 的标准溶液。用 0.45 μ m 微孔膜过滤, 放入测定瓶中, 每次 10 μ l 仪器自动进样, 按上述色谱条件进行分析, 测定峰面积。以标准品浓度 (μ g/ml) 为横坐标(X), 标准品峰面积为纵坐标(Y), 将结果作统计分析得出回归方程。

1.6 精密度和重复性实验

取标准溶液浓度为 24 μ g/ml, 连续进样 5 次, 得出相对标准偏差 (RSD)。

1.7 样品溶液的制备

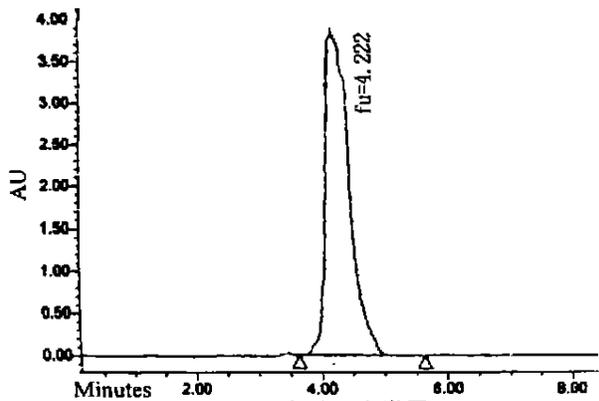


图 1 标准品色谱图
金雀异黄素的保留时间在 4.222min

精密称取样品 1、样品 2 及样品 3, 分别为 28mg、25.5mg、27.4mg, 甲醇溶解后分别定容于 50ml 容量瓶中, 既得浓度分别为 0.56mg/ml、0.51mg/ml、0.548mg/ml 的样品溶液, 以下操作同标准曲线的制备。

1.8 加样回收率实验

精密吸取样品 1 号 6ml 6 份于 6 支具塞试管中, 分别精密加入标准溶液 0.2、0.2、0.2、0.4、0.4 和 0.4ml, 按标准曲线制备项下操作, 测得在 259nm 波长处的峰面积值, 计算回收率及相对标准偏差 (RSD)。

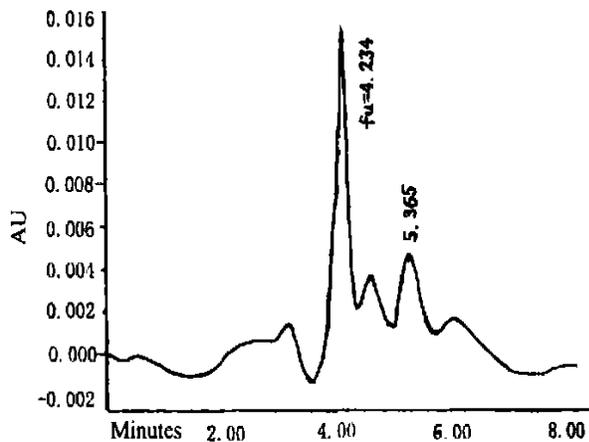


图 2 样品色谱图
回归方程为: $Y = 1.37 \times 10^5 X - 4.44 \times 10^5$

回归系数为: $R = 0.99349$

2 结果

2.1 金雀异黄素标准曲线的测定, 测定结果见表 2。

2.2 精密度试验结果, 试验结果 RSD 为 0.056%。
2.3 三组样品中金雀异黄素含量的测定, 测定结果见表 3。

表 2 金雀异黄素标准曲线的测定结果

Table 2 Mensuration result of genistin standard curve

编号 Number	0	1	2	3	4	5
金雀异黄素(μ g/ml)(X) Genistein	0	12	24	36	48	60
峰面积(Y) Apex area	0	1116657	2389938	4275678	6054927	8177668

表 3 样品中金雀异黄素含量的测定结果

Table 3 Mensuration result of genistein quantity in sample

	样品 1 Sample 1			样品 2 Sample 2			样品 3 Sample 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
峰面积 Apex area	98253	97362	95471	4012560	4027412	4011422	5.08×10^6	5.32×10^6	5.44×10^6
峰面积平均值 Apex area mean	97028.7			4017131.3			5.28×10^6		
金雀异黄素量(%) Genistein	0.705			5.95			8.19		

由表 3 结果可以看出, 采用盐酸水解制得的大豆异黄酮, 金雀异黄素的含量最高; 而经乙醇提取出的大豆异黄酮中的金雀异黄素的含量最低。

2.4 加样回收率试验, 试验结果见表 4

$$\text{回收率} = \frac{\text{测得金雀异黄素量} - \text{样品 1 金雀异黄素量}}{\text{添加金雀异黄素标准品的量}} \times 100\%$$

表4 加样回收率结果
Table 4 Reclaiming rate of adding sample

编号 Number	1	2	3	4	5	6
样品 1(mg)Sample 1	2.37×10^{-2}	2.37×10^{-2}	2.37×10^{-2}	2.73×10^{-2}	2.73×10^{-2}	2.73×10^{-2}
标准品(mg)Standard article	4.80×10^{-2}	4.8×10^{-2}	4.80×10^{-2}	9.60×10^{-2}	9.60×10^{-2}	9.60×10^{-2}
峰面积 Apex area	1.11×10^6	1.13×10^6	1.14×10^6	2.18×10^6	2.14×10^6	2.07×10^6
测得的量(mg)Mensuration	7.03×10^{-2}	7.12×10^{-2}	7.17×10^{-2}	12.3×10^{-2}	12.1×10^{-2}	11.7×10^{-2}
回收率(%)Reclaiming rate	97.08	98.96	100	103.44	101.35	97.19
平均值(%)Mean	99.67					
RSD(%)	0.025					

由表4结果可以看出,平均回收率为99.67%,相对标准偏差为0.025%。表明加样回收效果很好。

3 讨论

3.1 比较不同系统和比例的流动相,如甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.003mol/L磷酸氢二钠系统,结果表明以乙腈-0.003mol/L磷酸氢二钠为流动相,分离效果较好。

3.2 液相条件的考察:大豆异黄酮中的成分对流动相极性的变化敏感,随乙腈比例增加,保留时间均提前。当乙腈比例有5%变为8%时,金雀异黄酮的保留时间均提前约1min。当乙腈比例达到15%时,大豆异黄酮样品中的组分已无法分开,为了保证待测组分短时间内出峰且无干扰,经过反复考察确定了二元梯度(如表1)洗脱条件进行定性,定量。比文献报道^[4]的分别测定异黄酮的方法大大缩短了保留时间。

3.3 流动相使用前要抽滤脱气,使流动相的组分保持恒定,以保证保留时间的重现性和定量结果的准确性。为了延长色谱柱以及整个仪器的寿命,样品

液在进样前用0.45 μ m微孔滤膜过滤。

3.4 本方法将样品直接进样,无须预处理。方法简便,测定结果准确,重现性好,分析时间较短,样品用量小,检测灵敏。适用于大豆提取物中金雀异黄酮的定量分析。

3.5 从三组样品测定结果来看,盐酸水解液经极性大孔树脂吸附法纯化的大豆异黄酮中金雀异黄酮含量最高,乙醇提取物中金雀异黄酮中的含量最低,结果表明:盐酸水解异黄酮能提高金雀异黄酮的含量。

参 考 文 献

- 肖志艳,陈迪华.异黄酮类成分在植物界的分布、药理作用及应用研究概况[J].国外医学-植物药学分册,1998,13(4):157-163.
- 毛峻琴,宓鹤鸣.大豆异黄酮的研究进展[J].中草药,2000,31(1):61-64.
- 渠桂荣,郭海明.黄豆苷类化合物分离鉴定的研究进展[J].中草药,1999,30(2):75-77.
- 刘塔斯,麻浩,田森林,等.西洋参DNA导入大豆实现遗传转化的研究II,导入后代异黄酮类成分的含量测定[J].中草药,2000,31(2):99-101.

RP-HPLC DETERMINATION OF GENISTEIN IN SOYBEAN EXTRACT

Li Wenliang¹ Han Jufu¹ Cui Hongbin²

(1. The Quartermaster University of PLA, Changchun, 130062;

2. Harbin Medical University, Harbin 150086)

Abstract A method for the determination of genistein in soybean extract by RP-HPLC was established. The separating process was performed on Hypersil BDS C18 Colum (250mm \times 4.6mm, 5 μ m), with a mobile phase of CH₃CN-0.003mol/L Na₂HPO₄, flow rate of 1.0ml/min and detecting wavelength at 259nm. The recovery of genistein is 99.67%, RSD is 0.056%.

Key words Soybean ; Genistein ; RP-HPLC