

高效液相色谱法测定豆粕中染料木素和大豆苷元的含量^{*}

阮洪生 葛文中 安红波

(黑龙江八一农垦大学生命科技学院, 大庆 163319)

摘要 采用高效液相色谱法测定豆粕中染料木素和大豆苷元的含量。色谱条件: 十八烷基键合硅胶柱; 流动相: 甲醇—水(6:4); 流速: 0.80 mL/min; 检测波长: 260 nm。结果本方法操作简便、快速、准确, 可用于豆粕中染料木素和大豆苷元的质量控制方法。

关键词 豆粕; 染料木素; 大豆苷元; 高效液相色谱法

中图分类号 S565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)04-0461-03

大豆异黄酮(soybean isoflavones)是存在于大豆中的生物活性成分。目前发现的大豆异黄酮共有 12 种, 分为游离型苷元(Aglycon)和结合型糖苷(Glucosides)两类^[1]。游离型苷元以染料木素、大豆苷元和黄豆黄素为主。现代药理学研究表明: 大豆异黄酮除具有抗氧化作用外, 还可作为雌性激素治疗的替代品, 改善妇女更年期综合症, 并具有降低血液胆固醇、防止骨质疏松及抑制癌细胞生长的作用^[2]。还具有防止心血管疾病、抗菌等多种功能^[3~6]。现在已经广泛应用于食品、医药等行业。其药效物质基础为染料木素、大豆苷元和黄豆黄素。本实验采用高效液相色谱法建立豆粕中染料木素、大豆苷元的含量测定方法, 以确定豆粕中大豆异黄酮的质量控制方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Shimadzu LC2010HT 高效液相色谱仪(日本岛津)、Shimadzu LC Solution 色谱工作站、RE-85Z 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、HS3120 超声波清洗器(天津市恒奥科技发展有限公司)、电子调温电热套 1000 mL(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂与原料

95%乙醇(哈尔滨新春化工厂)、色谱甲醇(天津市福晨化学试剂厂); 豆粕(哈尔滨吉庆豆业有限公司)、染料木素、大豆苷元(含量测定用, 纯度大于 98%, 成都思科华生物技术有限公司)。水为娃哈哈纯净水。

1.3 色谱条件

采用 RP-HPLC 测定豆粕中染料木素和大豆苷元的含量。色谱柱: Shim-pack VP-ODS 柱(4.6mm×150mm, 5μm); 柱温: 30℃; 流动相: 甲醇—水(6:4); 流速为 0.80 mL/min; 检测波长: 260 nm; 进样量: 20μL。

2 实验方法

2.1 对照品溶液制备

精密称取染料木素对照品 1.5mg 置于 10mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45μm 微孔滤膜过滤, 滤液作为对照品溶液。大豆苷元对照品 1.2mg 置于 10mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45μm 微孔滤膜过滤, 滤液作为对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取豆粕 20 g, 精密称定, 加至 500mL 磨口锥形瓶中, 准确加入 75%乙醇 200 mL, 回流提取 2 次,

* 收稿日期: 2006-05-18

课题来源: 黑龙江省大庆市科研课题: 200294

作者简介: 阮洪生(1973-), 男, 硕士, 讲师, 主要从事中药学的科研和教学工作。

致谢: 黑龙江八一农垦大学生命科技学院 2002 级毛越、王海燕、马丽红同学参加了部分实验工作, 在此表示感谢!

每次 2h, 提取液趁热过滤, 减压浓缩, 浓缩物合并, 醋酸乙脂萃取 4 次, 50 mL/次, 萃取液减压浓缩, 残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL。经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 滤液作为供试品溶液。

2.3 标准曲线制备

精密称取染料木素对照品溶液和大豆苷元对照品溶液各 0.5 mL 摇匀, 作为混合标准品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液 2.00 μ L、4.00 μ L、6.00 μ L、8.00 μ L、10.00 μ L 注入液相色谱仪中, 按上述条件测定峰面积。以对照品溶液微克数 X 为横坐标, 峰面积积分值 Y 为纵坐标绘制标准曲线, 计算回归方程。(标准曲线相关数据见表 1)。

表 1 标准曲线相关数据

组分	标准曲线	线性范围	相关系数
Constituent	Standard curve	Linear range	Correlation coefficient
染料木素	$Y=6509000X-83054$	0.30~1.50 μ g	0.9995
Genistein			
大豆苷元	$Y=5447800X-55873$	0.24~1.20 μ g	0.9995
Daidzein			

2.4 精密度考察

对同一对照品溶液, 连续 6 次进样, 峰面积积分值 $RSD=0.26\%$ ($n=6$)。表明精密度符合要求。

2.5 重现性考察

对同一供试品溶液, 连续 6 次进样, 峰面积积分值 $RSD=0.79\%$ ($n=6$)。表明重现性符合要求。

2.6 稳定性考察

取同批供试品溶液, 按含量测定方法, 连续进样测定 6 次, 每次间隔 2h, 结果 6 次测得峰面积积分值的 $RSD=0.35\%$ ($n=6$), 表明样品在 12 h 内稳定。

2.7 样品测定

测定 3 批样品中染料木素、大豆苷元含量, 吸取供试液 20 μ L, 注入高效液相色谱仪, 用外标法测定并计算含量。结果豆粕中染料木素、大豆苷元含量每克分别不低于 14.50 μ g 和 17.00 μ g ($n=5$) 见表 2。

表 2 豆粕中的染料木素、大豆苷元含量测定 ($n=5$)

豆粕	染料木素 μ g/g	大豆苷元 μ g/g
Soybean residue	Genistein	Daidzein
样品 1 sample 1	15.680	18.772
样品 2 sample 2	15.044	21.254
样品 3 sample 3	14.754	17.356

2.8 样品与标准品色谱图

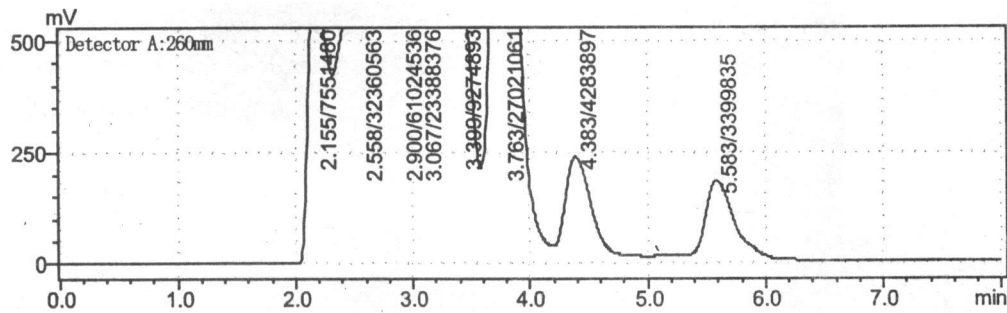


图 1 样品图谱

Fig. 1 Sample gram

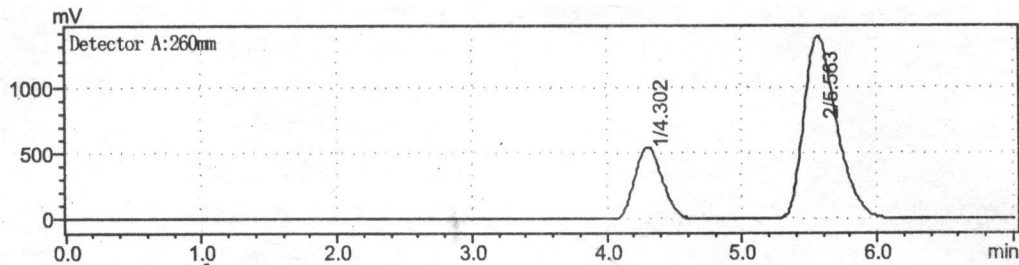


图 2 标准品图谱

Fig. 2 Standard Gram

峰 1 为大豆苷元标准品色谱, 峰 2 为染料木素标准品色谱

Peak one daidzein standard peak peak two genistein standard peak

从色谱图可以看出豆粕中染料木素和大豆苷元的保留时间和峰型与标准品染料木素和大豆苷元的

保留时间和峰型完全一致。色谱图见图 1 和 2。

2.8 回收率试验

采用加样回收法试验。取已知含量的供试品 20g, 分别加入一定量的染料木素、大豆苷元对照品, 按上述色谱条件测定, 其平均回收率为 99.82%, RSD 为 0.98%($n=5$)。

3 讨论

3.1 流动相的选择

为了使染料木素和大豆苷元标准品同时出峰且很好的分离, 我们分别选择了甲醇—乙腈—1%磷酸(16:24:60)^[7]、甲醇—水—冰乙酸(40:60:0.50)^[8]、甲醇—水(47:53)^[9]、甲醇—冰醋酸水溶液(40:60)^[10]等流动相, 结果甲醇—水(60:40)的比例可以达到最佳的分离效果。

3.2 纯化路线的确定

醇提取液减压回收后的溶液采取醋酸乙酯萃取后样品中大豆异黄酮的含量要高于醇提取液不采取萃取的含量。

参 考 文 献

- 1 崔洪斌. 大豆生物活性物质的开发与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- 2 Song T T, Gendrich S, Murphy P A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone[J]. J. Agric Food Chem., 1999, 47: 1607-1610.
- 3 唐传核, 彭志英. 抗过敏以及低过敏食品的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(4): 44-50.
- 4 Tetsu Akiyama, Junko Ishida. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine specific protein Kinases[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(12): 5592-5595.
- 5 韩祖斌, 林华, 邓思清, 等. 异黄酮类植物雌激素依拉芳对骨代谢的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5(3): 47.
- 6 李晓霞, 王宏雁, 金华丽, 等. 大豆异黄酮、大豆皂甙的提取工艺研究[J]. 中国油脂, 2002, 27(6): 41-44.
- 7 张立. RP-HPLC 法测定大豆提取物中大豆苷元、染料木素、大豆苷、染料木苷的含量[J]. 中草药, 2001, 32(2): 118-120.
- 8 王哲, 白志明, 宋宏哲, 等. 高效液相色谱法测定大豆异黄酮含量的研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(11): 82-84.
- 9 王帆, 胡小钟, 匡建军, 等. 高效液相色谱法检测保健食品中大豆异黄酮的含量[J]. 分析测试学报, 2003, 22(6): 142-145.
- 10 苏菊, 肖白曼, 刘宁, 等. 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.

DETERMINATION OF GENISTEIN AND DAIDZEIN IN SOYBEAN RESIDUE BY HPLC

Ruan Hongsheng Ge Wenzhong An Hongbo

(Life Science and Technology College, HLJ August First Land Reclamation University,
Daqing 163319)

Abstract To establish the determination method of Genistein and Daidzein in soybean residue, HPLC was adopted. In this method ODS C18 column was used, methanol water (6:4) was used as a mobile phase. The detection wave length was at 260nm. This method is simple and the result is reliable.

Key words Soybean residue; Genistein; Daidzein; HPLC