

# RP-HPLC 测定大豆异黄酮缓释微丸胶囊的含量

任彦荣<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>重庆大学生物工程学院,重庆 400044;<sup>2</sup>重庆教育学院生化系,重庆 400067)

**摘要:**为有效控制大豆异黄酮缓释微丸胶囊的质量,建立其中一种有效成分金雀异黄酮含量的测定方法。采用 RP-HPLC 法测定大豆异黄酮缓释微丸胶囊中金雀异黄酮的含量,固定柱:ZOBAX SB-C18 (5 μm,250 mm × 4.6 mm);流动相:乙腈 - 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液 (40:60);检测波长:262 nm;柱温:35℃;流速:1.0 mL · min<sup>-1</sup>;进样量 5 μL,应用外标一点法以峰面积定量。金雀异黄酮在 20.88 ~ 208.8 ng 之间线性关系良好,回归方程为  $Y = 4.38X - 2.69$ ,  $R = 0.999$  ( $n = 6$ ),平均回收率为 99.97%,RSD 为 0.87% ( $n = 9$ )。此法操作简便,结果准确可靠,精密度好,可用于大豆异黄酮缓释微丸胶囊中金雀异黄酮的含量测定。

**关键词:**大豆异黄酮缓释微丸胶囊;金雀异黄酮;RP-HPLC

**中图分类号:**R286.2      **文献标识码:**A      **文章编号:**1000-9841(2009)04-0727-04

## Determination of Genistein in Soybean Isoflavone Sustained-release Pellet Capsules by RP-HPLC

REN Yan-rong<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044; <sup>2</sup> Department of Life Science and Chemistry, Chongqing Education College, Chongqing 400067, China)

**Abstract:** In order to validly control the quality of soybean isoflavone sustained-release pellet capsules, a method for determination of genistein in it was established using the method of RP-HPLC for determination. Chromatographic conditions include: column: ZOBAX SB-C18 (5 μm, 250 mm × 4.6 mm); mobile phase: acetonitrile - 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution (40:60); detection: UV 262 nm; temperature: 35℃; flow rate: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; sample size: 5 μL. Using one point external standard method to quantitate. Genistein had a good linear relationship in the range of 20.88-208.2 ng, regression equation was  $Y = 4.38X - 2.69$ ,  $R = 0.999$  ( $n = 6$ ). The average recovery of genistein was 99.97%, RSD = 0.87% ( $n = 9$ ). The method is rapid, accurate, reliable and can be used to determine genistein in the soybean isoflavone sustained-release pellet capsules.

**Key words:** Soybean isoflavone sustained-release pellet capsules; Genistein; RP-HPLC

大豆异黄酮 (soybean isoflavone) 是异黄酮类混合物,其母核结构为 3 - 苯并呋喃酮,是存在于大豆等豆科植物中一类重要的生物活性物质。近年来,对大豆化学成份及药理研究表明,大豆异黄酮类化合物中的大豆黄素 (Daidzein, 又名大豆苷元) 和金雀异黄酮 (Genistein, 又名染料木素) 含量最高,这些异黄酮类化合物能降低乳腺癌、前列腺癌等疾病的发病率,缓解更年期因雌激素分泌减少而引起的停经期综合症和骨质疏松症,同时具有调节血脂、降低胆固醇和预防心血管疾病等功能<sup>[1-3]</sup>。但其口服生物利用度仅为 10% ~ 40%,药理研究发现结肠是决

定大豆异黄酮生物利用率的主要部位<sup>[4]</sup>。现已经证明,以壳聚糖为载体时能使包裹的药物具有较好的结肠定位释药作用<sup>[5-6]</sup>。因此将大豆异黄酮制备成混合型骨架型的缓释制剂,装入具有 HPMC 包裹的壳聚糖胶囊中,体外研究发现具有一定的缓释作用。该制剂目前没有制定检测指标,不能很好地控制产品质量。大豆异黄酮的含量测定已有报道<sup>[4-8]</sup>,借鉴《中国药典》2005 年版一部中金雀异黄酮的含量测定方法,建立了用高效液相法测定大豆异黄酮缓释微丸胶囊中金雀异黄酮的含量的方法,具有专属性好、操作简便,重复性、回收率和精密度

收稿日期:2009-04-09

基金项目:重庆市教育委员会资助项目 (No. KJ071505);重庆市科委自然科学基金项目 (CSCT,2007BB1196);重庆市科委自然科学基金项目 (CSCT,2007BB1198)。

作者简介:任彦荣 (1980-),女,讲师,博士,现主要从事制药工程的科研与教学工作。E-mail: cquyrr@126.com。

均较好的特点,可用于该制剂的质量控制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);G1379A 脱气机,G1311A 四元泵,G1313A 自动进样仪,G1316A 柱温箱,Chemstation 色谱工作站;TU-1901 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用公司);AG285 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多);SIGMA HSK1-18K 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);USC-512 超声器振荡器(上海波龙);六孔不锈钢水浴锅;YB-1A 真空恒温干燥箱(天津金州科仪厂)。

染料木苷元对照品(Sigma 公司,编号:G-6055),大豆异黄酮缓释微丸胶囊自制(三批 08110501、08110502、08110503);乙腈为色谱纯,水为过 0.45 μm 滤膜的重蒸水;其余试剂均为分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件与系统适用性 ZOBAX SB-C18 (5 μm,250 mm×4.6 mm);流动相:乙腈-0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>水溶液(40:60);检测波长:262 nm;柱温:35℃;流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量 5 μL。金雀异黄素与相邻组分分离完全(R≥1.5),理论塔板数以金雀异黄素峰计不低于 4 000。

1.2.2 对照品的制备 精密称取金雀异黄素对照品 10 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 中含金雀异黄素 80 μg)。

1.2.3 供试品的制备 取本品微丸约 0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL。称定重量,超声处理 30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.2.4 阴性对照品的制备 按大豆异黄酮缓释微丸胶囊的处方工艺,去除大豆异黄酮外的所有辅料同法制备。取大豆异黄酮阴性样品,按供试品溶液制备法制备。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取条件的选择

对其不同的提取方法(超声 30 min 和回流 2 h)、不同的提取溶剂(甲醇、30%乙醇和 50%乙醇)、

超声时间(20、30、40 min)、取样量做了比较,结果见表 1~4。结果显示取样量对本品的含量影响不大,选用取样量 0.25g。最后选用 50%乙醇超声 30 min。

表 1 不同提取方法的比较

Table 1 Comparison of different abstraction methods

提取方法	溶剂体积	时间	含量
Abstraction method	Solvent volume/mL	Time/min	Content/mg·g <sup>-1</sup>
超声 Hypersound	25	30	1.7744
回流 Refluence	25	30	1.7506

表 2 不同提取溶剂的比较

Table 2 Comparison of different extraction solvent

溶剂名称	溶剂体积	超声时间	称样量	含量
Solvent name	Solvent volume /mL	Hypersound time/min	Sample weight/g	Content /mg·g <sup>-1</sup>
甲醇 Methanol	25	30	0.2486	1.6674
30%乙醇 Ethanol	25	30	0.2576	1.7323
50%乙醇 Ethanol	25	30	0.2489	1.7422

表 3 不同超声时间的比较

Table 3 Comparison of different hypersound time

溶剂体积	超声时间	称样量	含量
Solvent volume /mL	Hypersound time/min	Sample weight/g	Content /mg·g <sup>-1</sup>
25	20	0.2475	1.7346
25	30	0.2488	1.7744
25	40	0.2524	1.7551

表 4 不同取样量的比较

Table 4 Comparison of different sample

溶剂体积	超声时间	称样量	含量
Solvent volume/mL	Hypersound time/min	Sample weight/g	Content /mg·g <sup>-1</sup>
25	30	0.1277	1.7042
25	30	0.2570	1.7231
25	30	0.3672	1.7133

### 2.2 色谱条件的建立

2.2.1 波长的选择 用甲醇溶解对照品,做紫外吸收扫描,在 262nm 处有最大的吸收峰,故选此波长为检测波长。

2.2.2 空白试验 按照含量测定方法同法制备后,进样量同供试品(5 μL),可见阴性对照图谱在金雀异黄素峰处无吸收峰并且无干扰。结果见图 1、2、3。

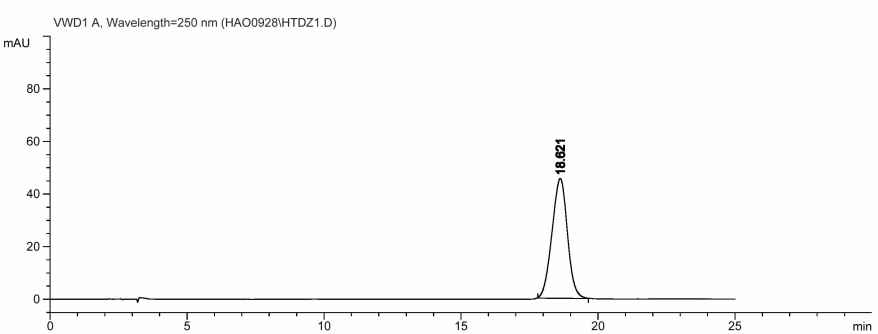


图1 对照品  
Fig.1 Control article

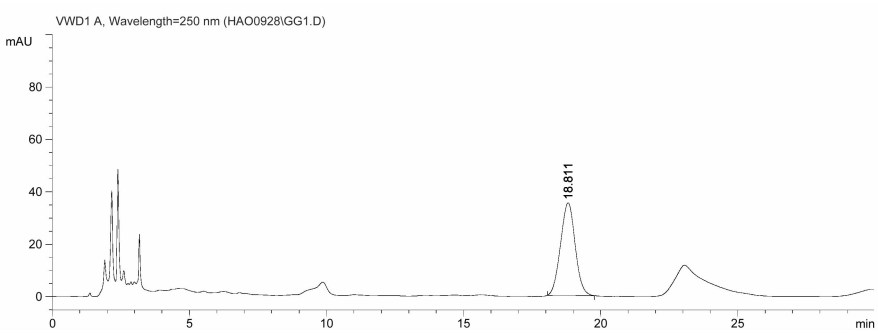


图2 样品组  
Fig.2 Sample product

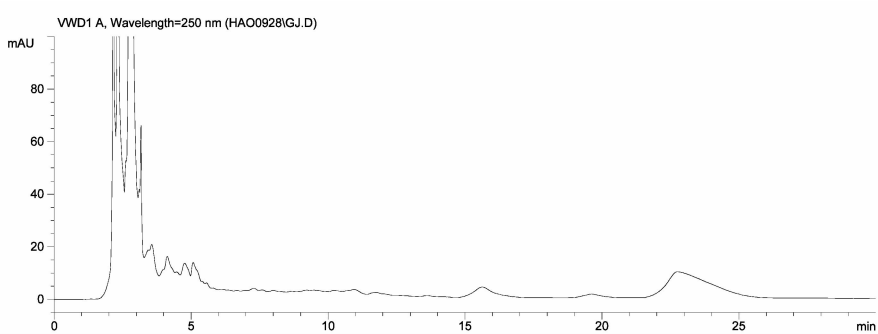


图3 阴性组  
Fig.3 Negative product

2.2.3 稳定性 精密吸取同一份供试品溶液,间隔一定时间进样一次,进样体积为 20  $\mu\text{L}$ ,结果峰面积 RSD 为 0.8% ( $n=5$ ),表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.2.4 精密度 精密吸取同一份供试品在同一仪器连续进样 6 次,RSD 为 0.61%。

2.2.5 重复性 取同一批供试品 6 份,按供试品溶液制备法,结果测得平均含量为  $1.4128\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD 为 1.4%。

2.2.6 线性关系 按对照品溶液制备方法制得每 1 mL 金雀异黄素 20.88  $\mu\text{g}$  的对照品溶液,分别精密吸取对照品溶液 1、2、3、5、7、10  $\mu\text{L}$ ,注入高效液

相色谱仪,按上述色谱条件进行测定。注入高效液

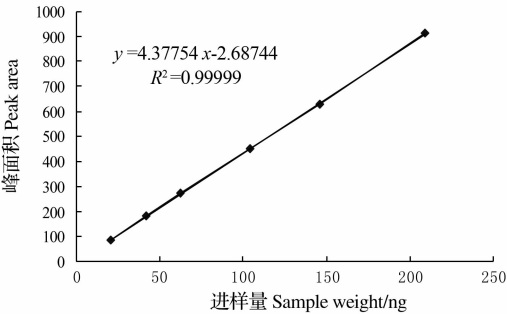


图4 金雀异黄素标准曲线  
Fig.4 Standard curve of genistein

相色谱仪,金雀异黄素在 20.88 ~ 208.8ng 之间线性关系良好,回归方程为  $Y = 4.38X - 2.69$ ,  $R = 0.999$  ( $n = 6$ ),见图 4。

2.2.7 回收率 精密称取供试品 0.10、0.12、0.15 g 各 3 份,各精密加入金雀异黄素对照 0.1879、0.2297、0.2923 mg,按供试品制备法制备,并依法测定,结果为:平均回收率为 99.97%,RSD 为 0.87%。

2.3 样品测定

共测定 2 批样品,结果见表 5。

表 5 样品测定结果

Table 5 Results of sample product determination				
批号	称样量	测定值	平均	RSD
Batch	Sample	Measured	Average	/%
nmubeer	weight/g	value/mg · g <sup>-1</sup>		
08110501	0.25	18.22	18.2	0.0
	0.25	18.24		
08110502	0.25	18.47	18.4	0.5
	0.25	18.30		

3 结论与讨论

3.1 样品前处理工艺的考察。分别考察了加热回流和超声提取两种提取方法,结果两种方法供试液金雀异黄素峰面积相近,而超声提取杂质少,且提取时间短,故采用超声提取法制备样品。并考察了不同提取时间(20 min,30 min,40 min)与不同的溶剂(甲醇、30%乙醇、50%乙醇),结果表明,选用 50%的乙醇超声提取 30 min 最佳,取样量对本品的含量影响不大,选用取样量 0.25 g。

3.2 用紫外分光光度计在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行扫描,结果显示金雀异黄素 262 nm 处有最大吸收,与文献报道一致,此波长下检测灵敏度较高,因此采用 262 nm 为测定波长。

参考文献

[1] Lee C H, Yang L, Xu J Z, et al. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides[J]. Food Chemistry, 2005, 90 (4): 735-741.

[2] Messina M J, Persky V, Setchell K R, et al. Soy intake and cancer risk: A review of the in vitro and in vivo data[J]. Nutrition and Cancer, 1994, 21: 113-131.

[3] 杨震玲, 栗海峰, 常彦忠, 等. 大豆异黄酮与疾病防治研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(1): 85-87. ( Yang Z L, Li H F, Chang Y Z. The research development of soybean isoflavones and disease prevention[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2007, 27 (1): 85-87. )

[4] 张玉梅. 大豆异黄酮的生物利用度[J]. 国外医学卫生学分册, 2001, 28(2): 104-107. ( Zhang Y M. The biological availability of soybean isoflavones[J]. Foreign Medical Sciences-hygiene, 2001, 28 (2): 104-107. )

[5] 李国锋, 陈建海, 江力宣, 等. 结肠用 5-氨基水杨酸壳聚糖胶囊的体外释药研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(8): 601-604. ( Li G F, Chen J H, Jiang L X, et al. Study on colon-specific delivery of HPMCP-coated mesalazine chitosan capsules in vitro[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2003, 38(8): 601-604. )

[6] 李国锋, 陈建海, 刘立捷, 等. 结肠菌群触发型 5-氨基水杨酸壳聚糖胶囊大鼠体内的吸收与分布研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 431-434. ( Li G F, Chen J H, Liu L J, et al. Absorption and distribution of 5-aminosalicylic acid from its chitosan capsule degraded by colon bacteria-released enzymes in rats[J]. Journal of First Military Medical University, 2003, 23(5): 431-434. )

[7] 马桂芝, 云琦, 高晓黎. 大豆中大豆异黄酮提取工艺的研究[J]. 中成药, 2002, 24(11): 828-831. ( Ma G Z, Yun Q, Gao X L. Study on the extraction of soybean isoflavone[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2002, 24(11): 828-831. )

[8] 刘延敏, 潘海宇, 吴振刚. 紫外分光光度法检测保健食品中大豆异黄酮的含量[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(2): 185-187. ( Liu Y M, Pan H Y, Wu Z G. Determination of soybean isoflavone in health food by UV spectrophotometry[J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2006, 27(2): 185-187. )

《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊,为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、全国优秀农业期刊。

报道内容为大田、园艺作物,观赏、药用植物,林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如,种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新,信息学、管理学等;起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊,大 16 开本,128 页。定价 20 元,全年 120 元。各地邮局发行,邮发代号:82-643。国内刊号 CN11-4996/S,国际统一刊号 ISSN1672-1810。

本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加 3 元。

地址:北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部

邮编:100081 电话:010-82105794 010-82105796(兼传真)

E-mail:zwyczyxb2003@163.com;zwyczyxb2003@sina.com