

超高效液相色谱法测定大豆异黄酮的含量

王华林 (贵州大学化学化工学院, 贵州贵阳 550025)

摘要 采用超高效液相色谱法快速分离并测定了大豆异黄酮的含量。结果表明,大豆异黄酮的线性检测范围为 1.0~9.0 $\mu\text{g/ml}$;染料木素、大豆苷元、大豆甙、染料木甙的回收率分别为 98.7%、98.1%、97.9%、97.8%,RSD 分别为 2.1%、1.8%、1.7%、1.3%。

关键词 超高效液相色谱;大豆异黄酮;含量

中图分类号 O657.7⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)31-15104-01

Determination on Soybean Isoflavone Content by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Method

WANG Hua-lin (Chemistry and Chemical Engineering College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025)

Abstract Ultrahigh performance liquid chromatography method was taken to isolate and determine soybean isoflavone content. The results showed that the linear detection range of soybean isoflavone was 1.0~9.0 $\mu\text{g/ml}$. The recoveries of genistein, daidzein, daidzin, genistin were 98.7%, 98.1%, 97.9%, 97.8% with RSD of 2.1%, 1.8%, 1.7%, 1.3% resp.

Key words Ultrahigh performance liquid chromatography; Soybean isoflavone; Content

大豆异黄酮(soybeanisoflavones, SiF)为多酚类混合物,近年来国内外众多研究表明,大豆异黄酮具有预防癌症、防止骨质疏松和防止心血管疾病、抗炎、抗菌、抗衰老、抗氧化及防止酒精中毒等生理活性^[1]。目前,大豆异黄酮的测定方法主要有高效液相色谱法^[2]和毛细管电泳法(CE)^[3]。笔者采用超高效液相色谱法测定大豆异黄酮的含量,为大豆异黄酮含量测定提供了一个简洁、快速、精确的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料 大豆由贵州大学农场提供,粉碎备用。

仪器: ACQUITY Ultra Performance LC III 超高效液相色谱仪(Waters 公司)。试剂:染料木素(genistein)、大豆苷元(daidzein)、大豆甙(daidzin)、染料木甙(genistin)(Sigma 公司,质量分数 > 98%);甲醇、乙腈等均为色谱纯。

1.2 方 法

1.2.1 标准工作液的配制。将标准品甲醇(色谱纯)配制成 0.1 mg/ml 的标准储备液,并根据需要稀释成适当浓度的标准工作液备用。

1.2.2 样品处理。准确称取固体样品 10 g 于离心管中,定量加入 70% 乙醇,超声提取 1 h,然后放入离心机内离心 10

min,将离心上清液用定性滤纸过滤,滤液移至 100 ml 容量瓶中。用 0.32 μm 膜过滤,70% 乙醇补至相的刻度,准确吸取液体样品 10 ml 于离心管中,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮吹浓缩至干,用 5 ml 乙腈-0.2% 乙酸溶液溶解,0.32 μm 滤膜过滤后移入进样瓶中供 UPLC 分析。

1.2.3 色谱条件。色谱柱为 ACQUITY UPLC™ BEHC C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈溶液(A)和 0.2% 乙酸(体积浓度)(B),流速为 0.15 ml/min,梯度洗脱程序为:0~5 min, A 保持 15%、5~10 min, A 从 15% 递增至 35%; 10~12 min, A 保持 35%、12~15 min, A 降至 15%。柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 5 μl 。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择 因大豆异黄酮极性较弱,该试验采用中性混合溶剂体系进行一系列预试验,分离仪器响应信号较强,但拖尾现象较重,在流动相 A 和 B 中分别加入 0.2% 乙酸,分离完全,峰形尖锐。说明乙酸:0.2% 乙酸 = 15:8(体积比)混合标准工作溶液在一定梯度洗脱下的灵敏度和分辨率较高(图 1)。

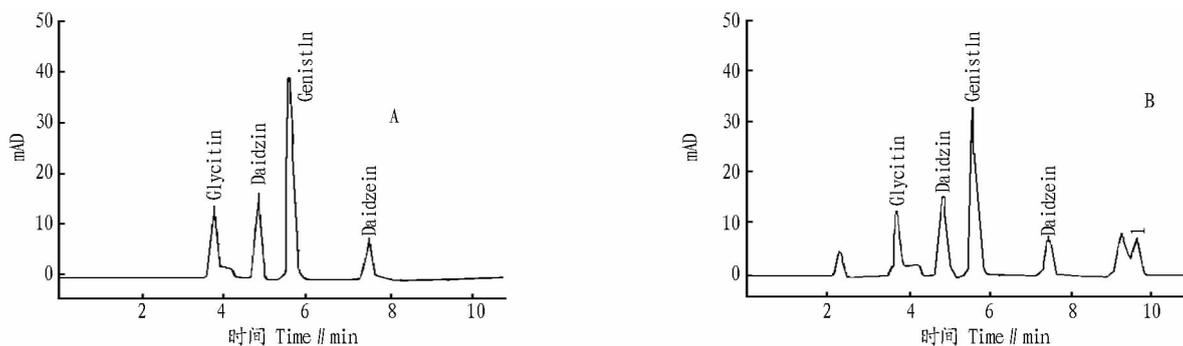


图 1 大豆异黄酮的标准(A)和样品图(B)流动相

Fig. 1 Chromatogram of standard substance and samples of soybean isoflavones

2.2 线性关系及检出限 取大豆异黄酮标准溶液配制成 0、1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液,按“1.2.2”的方法处理后测定,对浓度(Y)和吸收峰面积(X)进行线性回归,得线性方

作者简介 王华林(1965-),男,安徽安庆人,讲师,从事化学方面的教学与研究工作。

收稿日期 2009-06-30

程分别为:①染料木素(genistein): $Y = 20\ 325x + 10\ 365$ ($r = 0.998$);②大豆苷元(daidzein): $Y = 20\ 358x + 10\ 326$ ($r = 0.997$);③大豆甙(daidzin): $Y = 23\ 140x + 10\ 398$ ($r = 0.998$);④染料木甙(genistin): $Y = 20\ 348x + 10\ 964$ ($r = 0.999$),线性

(下转第 15188 页)

了净化。

综上所述,盘锦适宜的温度、充足的光照和良好的空气质量造就了盘锦的优良品质,是原产地环境十分重要的一个方面。

2.3 盘锦大米原产地的水源条件与品质形成的内在关系

水稻生长所用的水源分为自然降雨和灌溉用水,盘锦气候湿润,年平均降水量 634 mm,水稻生长季节降水量 535 mm,降水量十分充足;灌溉水以太子河上游水库和地下水为水源,水质洁净,符合国家标准。

盘锦市地处九河下梢,境内河流众多,有大小河流 21 条,绝大部分是短程河流,无污染,总长 600 余 km,主要河流有绕阳河、双台子河、大辽河,市区内另有六里河、六零河、螃蟹沟、吴家引水干渠等 4 条人工农田灌溉河渠。盘锦稻田的灌溉用水大部分来自辽河,确切的说是来自双台子河,全长 110 km,流域面积约 2 200 km²,河水流量变化大,洪水期出现过 >2 000 m³/s 的记录,枯水期仅有 0.32 m³/s。在春汛、夏汛时水量丰沛,春汛是该水系 22.89 万 km² 流域上冬季积雪融化而来,可以满足盘锦稻田泡田、插秧的全部用水。7、8 月份河水暴涨,形成夏汛,此时正是水稻生长大量需水期,可大大满足灌溉之需。为了利用好春汛、夏汛,流域内建有多个大型水库,可充分保障盘锦稻田整个生长期的用水需要。水稻中后期的生长用水主要以自然降水为主。盘锦 6 月下旬进入雨季,降水增多,7、8 月份为汛期,降水量达 320 mm,占全年降水量的 51.8%,可以保证正常灌溉。

另外,辽河水质洁净,污染很少,这也是盘锦大米品质良好的重要原因之一。根据现行国家标准《农田灌溉水质标准》(GB5084-92)以及近几年辽河的水质监测结果^[7](表 2),由表 2 可看出,虽然这 12 年的各指标在不同时期有波动,但总体上说,辽河灌溉水的各个指标都符合国家农田灌溉水质标准中的一类标准(水作),因此,用这样的水来浇灌

(上接第 15104 页)

检测范围均为 1.0~9.0 μg/ml。

2.3 精密度与回收率试验 精密吸取标准溶液,连续进样 6 次,测定大豆异黄酮的峰面积。结果表明,染料木素峰面积的 RSD 为 0.31%,大豆苷元峰面积的 RSD 为 0.21%,大豆甙峰面积的 RSD 为 0.27%,染料木甙峰面积的 RSD 为 0.25%。进行回收试验时,染料木素、大豆苷元、大豆甙、染料木甙标准品均按 5、15、20 μg/ml 梯度加入原有样品溶液中,得大豆异黄酮的回收率(n=5)和相对标准偏差(RSD)分别为:染料木素 98.7%(RSD2.1%)、大豆苷元 98.1%(RSD1.8%)、大豆甙 97.9%(RSD1.7%)、染料木甙 97.8%(RSD1.3%)。

2.4 样品分析结果 精确吸取样品溶液 5 μl,上机检测,结果染料木素、大豆苷元、大豆甙、染料木甙中大豆异黄酮的含量分别为 983、33、637、91 μg/ml,检测速度快。

盘锦大米,安全、洁净、无污染,可以保证盘锦大米的优质。

表 2 1996~2007 年辽河干流水质监测结果

Table 2 The water quality monitoring results of Liao River main stream mg/L

年份 Year	氨氮 Ammonia nitrogen	总磷 Total P	化学需氧量 Chemical oxygen demand	生化需氧量 Biochemical oxygen demand	石油 Petroleum
标准值	≤12	≤5.0	≤200	≤80	≤5.0
1996	0.63	-	37	6.0	0.15
1997	0.72	-	32	5.7	0.10
1998	2.17	-	44	5.7	0.19
1999	2.44	-	47	7.6	0.16
2000	1.20	-	38	10.3	0.15
2001	1.19	0.16	48	8.1	0.40
2002	2.91	0.33	61	11.0	0.30
2003	2.50	0.55	81	26.0	0.50
2004	2.27	0.63	62	14.0	0.20
2005	3.02	0.24	47	7.0	0.20
2006	3.40	-	80	20.0	-
2007	3.60	-	72	-	-

3 结论

综上所述,盘锦大米的优异品质与其生产地域的地理环境、土壤结构、气候条件、水源条件等有着非常密切的相关性。盘锦大米在稻米中独树一帜,其独特的产品特色是这些因素相互结合、相互作用的综合体现。

参考文献

- [1] 郭兴武,王丽娜,荣怀章,等. 盘锦稻米种植历史溯源[J]. 兰台纵横, 2008(1):50-51.
- [2] 张惠兰,车宏宇,李广. 辽宁省绿色食品生产基地土壤中有氯农药残留分析[J]. 杂粮作物,2001,21(3):44-45.
- [3] 庞海龙. 芦苇对盘锦地区环境的作用[J]. 垦殖与稻作,2002(21):77.
- [4] 程万民,钟连进. 不同气候生态条件下稻米品质性状的变异及主要影响因子分析[J]. 中国水稻科学,2001,15(3):187-191.
- [5] 唐玮玮,彭国照. 气候因素对稻米品质影响的研究进展[J]. 四川气象, 2007(2):20-21.
- [6] 熊洪,唐玉明,任道群,等. 不同土壤类型、不同气候条件与稻米品质的关系研究[J]. 西南农业学报,2007,17(4):445-449.
- [7] 王家骏,仲夏,张涤菲,等. 1996~2005 年辽河干流沈阳段水质污染状况调查[J]. 沈阳医学院学报,2008,10(4):238-240.

3 讨论

(1) 该试验选用 BEHC C₁₈ 柱,在高压和较大流量范围内保持了较高的柱效^[4]。通过增加流量可加快分离速度,同时维持较高的柱效,峰形尖锐、对称。

(2) 该研究建立了超高压液相色谱检测大豆异黄酮含量的方法,评价了不同基质的分离效应及基质中标准溶液与纯溶剂中标准溶液响应值的差异,该方法检测速度快、灵敏度高、选择性好适合大豆异黄酮含量的快速检测。

参考文献

- [1] MAO J Q, BIH M. Advanced studies of soybean isoflavones[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2000,31(1):612-641.
- [2] 石荣,王少云,姜维林. 大豆总异黄酮 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2006,37(2):202-204.
- [3] 马桂芝,高晓黎. 大豆异黄酮测定方法的研究进展[J]. 中成药,2002,24(6):461-464.
- [4] 李笃信,唐涛,王凤云. 超高压液相色谱仪的研究进展及超高压引起的相关问题[J]. 色谱,2008,26(1):105-109.