

RP-HPLC 法测定大豆异黄酮的含量

王晓娟 杨明仁 (临沂山松药业 山东临沂 276036)

摘要 目的: 采用反相高效液相色谱法,建立大豆提取物中6种大豆异黄酮—大豆苷,黄豆黄苷,染料木苷,大豆苷元,黄豆黄素,染料木素的含量测定方法。**方法:** 色谱柱:welchrom-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm;5 μm),流动相:甲醇-水-乙腈=35:65:8(磷酸调节pH到2.6-3.0);流速:0.8 ml·min⁻¹;检测波长:254 nm,柱温:35℃。**结果:** 线性范围:大豆苷1.48~29.54 mg·L⁻¹(*r*=0.999 8),黄豆黄苷1.58~31.64 mg·L⁻¹(*r*=0.999 8),染料木苷1.09~21.84 mg·L⁻¹(*r*=0.999 8),大豆苷元0.97~19.46 mg·L⁻¹(*r*=0.999 8),黄豆黄素1.20~23.96 mg·L⁻¹(*r*=0.999 9),染料木素1.31~26.26 mg·L⁻¹(*r*=0.999 9)。大豆苷,黄豆黄苷,染料木苷,大豆苷元,黄豆黄素,染料木素平均回收率分别为101.56%,100.45%,102.75%,100.83%,100.92%,101.53%,*RSD*分别为1.66%,1.10%,1.89%,1.10%,1.52%,1.35%(*n*=6)。**结论:** 本方法便捷、灵敏、准确、重复性好,适用于大豆产品中大豆异黄酮含量检测。

关键词 反相高效液相色谱; 大豆异黄酮; 大豆提取物

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2010)07-0995-03

Determination the Content of the Soybean Isoflavone by RP-HPLC

Wang Xiaojuan, Yang Mingren (Linyi Shansong Pharmaceutical Co. Ltd. Shandong Linyi 276036, China)

ABSTRACT Objective: To establish a RP-HPLC method for determination of the six main isoflavone constituents, daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein and genistein from extract of soybean. **Method:** The welchrom-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm;5 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol-water-acetonitrile (35:65:8) (adjust pH to 2.6-3.0 with phosphoric acid). The flow rate was 0.8 ml·min⁻¹; The detective wavelength was 254 nm. **Result:** There was a good linear relationship within the range of 1.48-29.54 mg·L⁻¹ of daidzin (*r*=0.999 8), 1.58-31.64 mg·L⁻¹ of glycitin (*r*=0.999 8), 1.09-21.84 mg·L⁻¹ of genistin (*r*=0.999 8), 0.97-19.46 mg·L⁻¹ of daidzein (*r*=0.999 8), 1.20-23.96 mg·L⁻¹ of glycitein (*r*=0.999 9), 1.31-26.26 mg·L⁻¹ of genistein (*r*=0.999 9). The recoveries of daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein and genistein were 101.56%, 100.45%, 102.75%, 100.92%, 101.53%, and *RSD* were 1.66%, 1.10%, 1.89%, 1.10%, 1.52%, 1.35% (*n*=6), respectively. **Conclusion:** The method is proved to be simple, accurate and reproducible for the determination of isoflavone in extract of soybean.

KEY WORDS RP-HPLC; Isoflavone; Extract of soybean

大豆异黄酮是一种新兴的备受人们青睐的天然植物雌激素,可广泛应用食品、医药等行业。近年来,大豆异黄酮的生理活性如抗氧化、抗肿瘤、改善心血管功能、抗骨质疏松等功效已越来越引起社会和研究界的普遍重视,以大豆异黄酮作为食品添加剂的食品和保健食品逐渐增多。大豆异黄酮是属于黄酮类化合物中的异黄酮类成分。其母核为3-苯吡喃酮,目前发现的大豆中异黄酮分为游离型的苷元和结合型的糖苷两类。其中游离型的苷元占异黄酮总量的2%~3%,主要包括大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷。结合型的糖苷占异黄酮总量的97%~98%,主要以大豆苷元、黄豆黄素、染料木素形式存在^[1,4]。用高效液相色谱法分离测定大豆异黄酮已有标准^[2,3],但是一般采用梯度洗脱^[5],或苷元和苷分开两步检测的手段,方法复杂,较为繁琐,同时采用的洗脱剂多为毒性较大的乙腈,不利于日常检测工作需要。本

文采用等度洗脱液相条件对大豆提取物中6种异黄酮成份进行含量检测,方法简便、快速、灵敏、准确,检测成本低。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱仪, VWD 检测器。对照品:大豆苷(含量99.1%)、黄豆黄苷(含量99.3%)、染料木苷(含量99.1%)、大豆苷元(含量99.4%)、黄豆黄素(含量98.9%)、染料木素(含量99.0%)对照品均为北京北化恒信生物技术公司分装的Sigma对照品,批号为2190X。大豆提取物样品由山松生物制品有限公司提供。乙腈、甲醇为色谱纯。磷酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:welchrom-C₁₈分析柱(250 mm×4.6 mm;5 μm),

通讯作者:王晓娟 Tel:(0539)2977609 E-mail:wxf197667@163.com

干扰测定。

3.2 曾参考文献^[2]中采用异丙醇作为提取溶剂,但是在试验过程中发现如果用异丙醇作为提取溶剂在色谱图中出现了倒峰。考虑到可能会影响到主药的含量测定,将提取溶剂换为流动相后,避免了上述现象的出现。

参 考 文 献

- 1 王培光,张学军. 特比萘芬的临床应用研究进展[J]. 国外医学皮肤病学分册,2002,28(5):271-273
- 2 国家药品标准[S]. WS1-(X-115)-2004Z (2009-12-02 收稿 2010-04-28 修回)

流速:0.8 ml·min⁻¹;进样量:20 μl;柱温:35 ℃;流动相:甲醇-水-乙腈=35:65:8,磷酸调节 pH 到 2.6-3.0;检测波长:254 nm。

2.2 线性关系

分别精密称取对照品大豆苷 14.77 mg, 黄豆黄苷 15.82 mg, 染料木苷 10.92 mg, 大豆苷元 9.73 mg, 黄豆黄素 11.98 mg, 染料木素对照品 13.13 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 用乙腈-甲醇(1:2)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成对照品储备溶液。分别吸取 1 ml 各对照品储备溶液至 10 ml 量瓶中, 用流动相定容至刻度, 摇匀, 配制成混和对照品储备溶液。

分别取混和对照品储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 2.0 ml 稀释至 10 ml, 得系列混和对照品工作液。

取配制好的系列对照品工作液, 在本文的色谱条件下进行测定。大豆苷, 黄豆黄苷, 染料木苷, 大豆苷元, 黄豆黄素, 染料木素的浓度 X(mg·L⁻¹) 分别和相应峰面积 Y 绘制标准曲线, 结果见表 1。在表 1 所示各线性范围内, 以上各组分的峰面积与浓度呈良好的线性关系。

表 1 线性与线性范围

组分	回归方程	r	线性范围(mg·L ⁻¹)
大豆苷	$Y=9.43 \times 10^4 X + 23.26$	0.999 8	1.48 ~ 29.54
黄豆黄苷	$Y=9.54 \times 10^4 X + 19.68$	0.999 8	1.58 ~ 31.64
染料木苷	$Y=1.30 \times 10^5 X + 19.17$	0.999 8	1.09 ~ 21.84
大豆苷元	$Y=1.53 \times 10^5 X + 17.11$	0.999 8	0.97 ~ 19.46
黄豆黄素	$Y=1.35 \times 10^5 X + 18.85$	0.999 9	1.20 ~ 23.96
染料木素	$Y=1.68 \times 10^5 X + 23.17$	0.999 9	1.31 ~ 26.26

2.3 精密度试验

将混和对照品溶液重复进样 6 次测定色谱峰面积, 结果求得大豆苷, 黄豆黄苷, 染料木苷, 大豆苷元, 黄豆黄素, 染料木素的峰面积 RSD 分别为 1.34%, 1.19%, 1.18%, 1.26%, 1.20%, 1.06%。

2.4 稳定性试验

取同一批样品溶液, 在 0, 1, 5, 12, 24 h 分别进样, 记录峰面积, 结果大豆苷, 黄豆黄苷, 染料木苷, 大豆苷元, 黄豆黄素, 染料木素的峰面积 RSD 分别为 0.33%, 0.51%, 0.62%, 0.42%, 1.51%, 0.49%, 表明样品溶液稳定性良好。

2.5 检测限、定量限

将混合标准溶液适当稀释后制得一系列不同浓度的对照品溶液, 进样分析, 测定信噪比, 以 s/n 为 3:1 和 10:1, 分别作为检出限和定量限。大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄苷元、染料木素的检出限分别为 0.3, 0.3, 0.2, 0.2, 0.2, 0.3 ng; 定量限分别为 1.0, 1.0, 0.7, 0.7, 0.8, 0.9 ng。

2.6 供试品溶液制备

取同一批次大豆提取物样品约 20 mg, 精密称定, 置于 10 ml 量瓶中, 加入乙腈-甲醇(1:2), 超声(250 W, 40 kHz) 15 min 使溶解, 待冷却到室温后, 用乙腈-甲醇(1:2)定容。精密量取 1 ml 放入 10 ml 量瓶中, 流动相定容至刻度, 溶液经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 去掉初滤液, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.7 加样回收试验

精密称取同一已知含量的大豆异黄酮样品适量共 6 份, 分别置 10 ml 量瓶中, 精密加入混和对照溶液储备液 1 ml,

按照“2.6”中供试品制备方法处理后依法测定, 计算平均加样回收率, 结果见表 2。

表 2 平均回收率测定结果(n=6)

成分名称	平均回收率(%)	RSD(%)	成分名称	平均回收率(%)	RSD(%)
大豆苷	101.56	1.56	大豆苷元	100.83	1.44
黄豆黄苷	100.45	1.01	黄豆黄素	100.92	1.39
染料木苷	102.75	1.54	染料木素	100.61	1.31

2.8 重复性试验

取同一批次大豆提取物(约 20 mg)5 份, 按照含量测定方法制备供试品溶液, 测定, 用外标法定量, 大豆提取物中大豆异黄酮六种组分平均含量及 RSD 结果见表 3。

2.9 样品含量测定

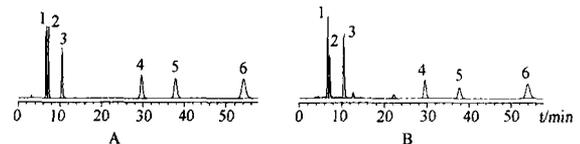
按照本文方法测定, 6 批样品测定结果见表 4, 色谱图见图 1。

表 3 重复性试验结果(n=5)

名称	平均含量(%)	RSD(%)	名称	平均含量(%)	RSD(%)
大豆苷	7.37	0.83	大豆苷元	2.065	0.70
黄豆黄苷	1.661	1.81	黄豆黄素	0.456	1.26
染料木苷	7.365	0.82	染料木素	2.248	1.02

表 4 样品含量测定结果

编号	大豆苷(%)	黄豆黄苷(%)	染料木苷(%)	大豆苷元(%)	黄豆黄素(%)	染料木素(%)
1	7.39	1.58	7.36	2.05	0.46	2.24
2	7.37	1.67	7.33	2.07	0.45	2.23
3	7.42	1.66	7.36	2.09	0.46	2.27
4	7.39	1.68	7.38	2.04	0.45	2.26
5	7.40	1.59	7.34	2.06	0.47	2.28
6	7.45	1.64	7.37	2.07	0.44	2.24



A. 对照品 B. 供试品 1. 大豆苷 2. 黄豆黄苷
3. 染料木苷 4. 大豆苷元 5. 黄豆黄苷元 6. 染料木苷元

图 1 HPLC 色谱图

3 讨论

大豆异黄酮国家标准^[2]和农业部标准^[3]中都有含量检测的高效液相方法, 但是国标中对含量检测采用梯度洗脱, 对仪器的配置要求比较高。农业部标准中采取苷和苷元分开进行两次检测的方法, 操作烦琐, 重复性不好。

目前, 其他文献报道中^[5-8]大豆异黄酮类提取物和产品的质量控制在多采用梯度高效液相色谱法和毛细管电泳法等测定, 但是对 6 种成分采用等度洗脱的高效液相同时测定的报道很少。本方法在运用于大豆异黄酮检测时, 在精密度、准确度及检出限等方面都能满足日常检测需要, 同文献报道的高效液相色谱法相比, 采用了等度洗脱, 简化了操作步骤, 洗脱剂中采用甲醇代替乙腈, 毒性和成本降低, 方法稳定, 重复性良好, 适合在日常检测工作中推广。

参考文献

- 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. 12-17
- 国家标准[S]. 保健食品中大豆异黄酮的检测方法. GB/T 23788-2009

洛美沙星、哌拉西林/他唑巴坦在转化糖电解质注射液中的配伍稳定性考察

朱大胜 付秀娟 (吉林大学第二医院 长春 130041) 师要辉 (吉林大学药学院 2009 届本科毕业生)

摘要 目的:考察门冬氨酸洛美沙星、哌拉西林钠/他唑巴坦钠分别与转化糖电解质注射液配伍的稳定性,为临床合理用药提供科学依据。**方法:**在室温条件下,将这两种注射用抗生素分别与转化糖电解质注射液配伍,在8 h内,观察各配伍溶液的pH和外观变化,并采用HPLC法测定各配伍溶液中主药成分的相对含量。**结果:**门冬氨酸洛美沙星、哌拉西林钠/他唑巴坦钠分别与转化糖电解质注射液配伍后,pH、外观无明显变化,相对含量分别在96%及99%/96%以上。**结论:**门冬氨酸洛美沙星、哌拉西林钠/他唑巴坦钠在室温下与转化糖电解质注射液的配伍液在8 h内稳定。

关键词 洛美沙星;哌拉西林/他唑巴坦;转化糖电解质注射液;高效液相色谱法;配伍;稳定性

中图分类号:R942 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-049X(2010)07-0997-02

Stability Study of Lomefloxacin Aspartate, Piperacillin Sodium and Tazobactam Sodium with Multiple Electrolytes and Invert Sugar Injection

Zhu Dasheng, Fu Xiujian (Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China) Shi Yaohui (Pharmacy College of Jilin University)

ABSTRACT Objective: To investigate the stability of lomefloxacin aspartate, piperacillin sodium and tazobactam sodium, which two kinds of antibiotics for injection in multiple electrolytes and invert sugar injection and to provide a scientific basis for rational use of drug in clinical practice. **Method:** The changes of pH values and external appearances of the two kinds of antibiotics respectively mixed with multiple electrolytes and invert sugar injection were observed and their relative contents were determined by HPLC within 8 h after mixing at room temperature. **Result:** No marked change were noted in the relative contents, appearance and pH values of lomefloxacin aspartate, piperacillin sodium/tazobactam sodium mixed with multiple electrolytes and invert sugar injection. **Conclusion:** Lomefloxacin aspartate, piperacillin sodium/tazobactam sodium can be used within 8 h after mixing with multiple electrolytes and invert sugar injection at room temperature.

KEY WORDS Lomefloxacin aspartate; Piperacillin sodium/tazobactam sodium; Multiple electrolytes and invert sugar injection; HPLC; Compatibility; Stability

转化糖电解质注射液是由葡萄糖与果糖等分子混合制成的同时含有电解质的复方制剂,本品输入体内后,果糖的代谢比葡萄糖快,可迅速为机体提供能量;由于果糖代谢不受胰岛素影响,绕过了胰岛素抵抗环节,可有效提供能量;除提供能量外,果糖还能转化为糖原储存,成为血糖缓释库,并以缓慢速度释放以保证血糖的稳定;此外本品还可以做部分电解质的补充。国外已广泛应用,国内已有品种在临床使用。与单纯的葡萄糖输液相比具有更好的临床应用价值。它不仅适用于术后、烧创伤和感染等胰岛素抵抗患者以及糖尿病患者的能量补充,同时还可作为静脉给药的载体,与抗菌药、维生素等药物配伍。但配伍后的稳定性考察报道较少。本文对未见报道的注射用门冬氨酸洛美沙星、哌拉西林钠/他唑巴坦钠与

转化糖电解质注射液配伍稳定性进行了考察。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Waters510 型高效液相色谱仪(美国);Waters486 紫外检测器;N2000 色谱工作站;KQ-100E 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);pHS-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。乙腈、甲醇为色谱纯;三乙胺、枸橼酸、四丁基氢氧化铵、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠为分析纯;;磷酸为优级纯;水为纯化水。

1.2 药品与对照品

洛美沙星对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0452-200001,含量 90.0%);哌拉西林对照品(中国药品生物制品

通讯作者:朱大胜 Tel:(0431)88796822 E-mail:ds_zh2007@163.com

3 农业部标准[S].大豆异黄酮. NY/T. 1252-2006

4 徐颖. 高效液相色谱法检测大豆异黄酮含量[J]. 油脂开发, 2006, 6(14): 33-35.

5 魏峰. 中药和保健食品中黄豆黄苷和黄豆黄素的含量测定[J]. 中医药信息杂志, 2007, 12(14): 13

6 孙梅君, 骆炼, 史长颖, 等. 中国大豆制品中异黄酮含量测定分析研究[J]. 食品与发酵工业, 1999, 26(5): 14-18

7 Nakamura Y, Tsuji S, Tonogai Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake[J]. *J AOAC Int*, 2000, 83(3): 635-650

8 Mellenthin O, Galensa R. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(2): 594-602

(2009-12-02 收稿 2010-03-18 修回)