

RP-HPLC 法测定保健食品中 五种主要黄酮类成分

吴少平, 柳小秦, 李霞, 李继, 徐长根, 刘海静
(陕西省食品药品检验所, 陕西 西安 710061)

摘要: 目的: 建立 RP-HPLC 法测定保健食品中多种黄酮类成分的含量。方法: 采用 RP-HPLC 法, 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5 μm), 以甲醇-水为流动相, 梯度洗脱, 流速: 1.0ml/min, 检测波长 260nm, 柱温: 30℃, 测定大豆甙, 染料木苷, 染料木素, 大豆甙元和芦荟苷五种黄酮类化合物的含量。结果: 五种黄酮类成分的线性范围分别为: 4.088~204.4、3.448~172.4、3.208~160.4、3.528~176.4、4.784~239.2 μg/ml, 相关系数依次为: 0.9997、0.9998、0.9998、0.9995、0.9996。加样回收率(n=9)分别为: 100.1%、97.4%、100.9%、99.5%、100.8%, RSD 分别为: 1.4%、1.1%、1.2%、1.4% 和 1.7%。保健食品样品中五种成分的平均含量(n=5)分别为: 156.81、168.42、41.98、39.84、36.55 μg/ml; RSD 分别为: 2.6%、1.3%、1.8%、2.8% 和 2.3%。结论: 该方法准确, 重现性好, 可作为此保健食品的质量控制标准。

关键词: 保健食品; RP-HPLC; 黄酮类化合物

RP-HPLC Determination of Five Main Flavones in Health Food

WU Shao-ping, LIU Xiao-qin, LI Xia, LI Ji, XU Chang-gen, LIU Hai-jing
(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective: To establish an RP-HPLC method for the determination of the contents of five main flavones in health food. Methods: contents of daidzin, genistin, daidzein, alon, genistein in health food was measured by RP-HPLC [a column of Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with mobile phase of methanol-water, eluted in gradient mode, flow rate 1.0 ml/min, detection wavelength of 260 nm, column temperature 30 °C]. Results: The calibration curves showed good linearity in the range of 4.088~204.4 (daidzin), 3.448~172.4 (genistin), 3.208~160.4 (daidzein), 3.528~176.4 (alon), 4.784~239.2 μg/ml (genistein), correlation coefficients were 0.9997, 0.9998, 0.9998, 0.9995, 0.9996. The average recoveries (n=9) were 100.1%, 97.4%, 100.9%, 99.5% and 100.8% respectively. The average contents (n=5) of the five components in health food were 156.81 μg/ml, 168.42 μg/ml, 41.98 μg/ml, 39.84 μg/ml, 36.55 μg/ml, and RSD were 2.6%, 1.3%, 1.8%, 2.8% and 2.3%. Conclusion: An accurate and reproducible method can be used for the quality control of health food.

Key words: health food; RP-HPLC; flavones

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0344-03

黄酮类化合物是广泛分布于植物界的一大类化合物。其具有诸多药理作用^[1-3], 对人类有明显的保健作用且无明显毒性, 在心脑血管的保健^[4-6]、更年期综合症的治疗^[7]、抗氧化作用^[8-11]等方面均有显著的疗效, 因此受到广泛重视^[12]。大豆异黄酮(soybean isoflavones, ISO)是一类从大豆中分离提取的具有抗氧化性、抗肿瘤、改善心血管功能的黄酮类化合物。目前测定大豆异黄酮的方法主要有紫外分光光度法^[13]、气-质联用法^[14]、高效液相色谱法^[15]、液-质联用法^[16]、毛细管电泳法^[17]和免疫检测法^[18]。紫外分光光度法仅测定总异黄酮; 气-质联用法需对样品进行衍生后测定, 步骤繁琐; 液-

质联用法、毛细管电泳法仪器昂贵, 免疫检测法抗体制备不易。

某保健食品以蜂胶、芦荟、大豆异黄酮等为主要原料, 经提取、浓缩、干燥等工艺制成具有增强免疫力、祛黄褐斑功能的软胶囊。本实验利用 RP-HPLC 法, 采用梯度洗脱同时分离测定此保健食品中大豆甙(daidzin)、染料木苷(genistin)、大豆甙元(daidzein)、芦荟苷(alon)和染料木素(genistein)五种黄酮类化合物的含量, 以期对保健食品的质量控制提供了依据, 也为进一步研究黄酮类化合物的生理功能及其分子机理提供了有效的实验手段。

收稿日期: 2007-01-25

作者简介: 吴少平(1977-), 男, 药师, 硕士, 研究方向为药品、食品分析。E-mail: shaopingw@sohu.com

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

保健食品由国内某有限公司生产(批号: 20040625、20040626、20040627)。

大豆甙($C_{21}H_{20}O_9$, 批号: 30408)、染料木苷($C_{21}H_{20}O_{10}$, 批号: 48756)、大豆甙元($C_{15}H_{10}O_4$, 批号: 30405)、染料木素($C_{15}H_{10}O_5$, 批号: G6649)对照品 Sigma 公司, 芦荟苷对照品(批号: 787-9001) 中国药品生物制品检定所; 甲醇为色谱纯; 水为高纯水。

Alliance HT 色谱系统(包括 2695 液相系统和 2996 紫外检测器) 美国 Waters 公司; Empower 色谱管理软件; Sartorius ME235S 型全自动电子天平; SCQ-200 型超声波仪; TGL-16GB 型台式离心机。

1.2 方法

1.2.1 色谱分析条件

色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, Kromasil C_{18} (250mm \times 4.6mm, 5 μ m), 流动相为甲醇(A), 水(B), 二元梯度洗脱程序(0~8min 内, 流动相 A 的浓度为 20%, 8~10min 内, A 的浓度为 20%~40%, 10~20min 内, A 的浓度为 40%~90%, 20~25min 内, A 的浓度为 90%~20%), 流速 1.0ml/min, 检测波长 260nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。

1.2.2 溶液的制备

1.2.2.1 对照品溶液

分别精密称取对照品大豆甙 5.11mg, 染料木苷 4.31mg, 染料木素 4.01mg, 大豆甙元 4.41mg 和芦荟苷 5.98mg, 用甲醇-水(20:80)溶解, 定容至同一 25ml 量瓶中, 即得混合对照品储备液。

1.2.2.2 供试品溶液

精密称取混合均匀的软胶囊内容物 2.0g, 置 100ml 量瓶中, 加入适量的甲醇和乙醇(50:50)混合液, 经超声振荡 50min, 加上述混合液补足至刻度, 待提取液略澄清后经离心分离, 取上清液用 0.45 μ m 滤膜过滤后待进样。

2 结果与分析

2.1 线性关系

分别精密量取对照品混合储备液 0.2、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml 于 10ml 量瓶中, 用甲醇定容, 进样前用 0.45 μ m 滤膜过滤, 按上述色谱条件分别测定峰面积, 以峰面积为纵坐标(Y), 进样量为横坐标(X)进行线性回归, 回归方程见表 1。

2.2 稳定性实验

取样品, 按“1.2.2.2”项制备供试品溶液, 按上述色谱条件在 0、1、2、3、6、8、12h 测定, 测得大豆甙、染料木苷、大豆甙元、芦荟苷和染料木素的 RSD 值分别为 1.9%、1.4%、1.1%、0.9%、1.3%, 结果表明: 供试品溶液在配制 12h 内稳定。

表 1 五种成分线性关系分析结果

Table 1 Experiment results of linearity of five components

成分	线性方程	r	线性范围(μ g/ml)
大豆甙(daidzin)	$Y=3.60 \times 10^7 X - 1156.01$	0.9997	4.088~204.4
染料木苷(genistin)	$Y=3.84 \times 10^7 X - 2154.05$	0.9998	3.448~172.4
染料木素(genistein)	$Y=7.54 \times 10^7 X - 1984.19$	0.9998	3.208~160.4
大豆甙元(daidzein)	$Y=5.58 \times 10^7 X - 2814.63$	0.9995	3.528~176.4
芦荟苷(aloin)	$Y=8.20 \times 10^7 X - 2398.87$	0.9996	4.784~239.2

2.3 精密度实验

取同一混合对照品溶液, 一日内连续测定 5 次, 测得大豆甙、染料木苷、染料木素、大豆甙元和芦荟苷的日内精密度(n=5)RSD 值分别为 1.5%、1.3%、0.9%、1.1%、1.4%; 另取同一混合对照品溶液, 连续测定 5d, 每天 1 次, 测得大豆甙、染料木苷、大豆甙元、芦荟苷和染料木素的日间精密度(n=5)RSD 值分别为 2.0%、1.6%、1.3%、1.2%、1.0%。

2.4 重复性实验

按样品测定方法, 对同一批次样品进行 6 次平行试验, 测得大豆甙、染料木苷、大豆甙元、芦荟苷和染料木素含量的 RSD 值分别为 0.8%、0.9%、0.4%、1.1%、0.8%(n=6), 结果表明: 此方法的重复性良好。

2.5 加样回收率实验

精密称取已知含量的样品 9 份, 每份 2.0g, 分别精密加入混合对照品储备液 0.2、2.0、5.0ml, 每个平行 3 份, 按“1.2.2.2”项制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 以外标法计算回收率, 结果大豆甙、染料木苷、染料木素、大豆甙元和芦荟苷的平均回收率(n=9), 计算结果见表 2。

表 2 五种成分加样回收率实验结果

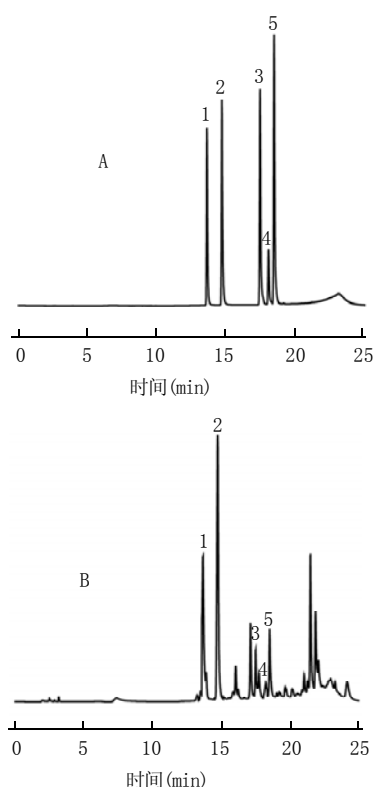
Table 2 Experiment results of recovery of five components

成分	加样回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
大豆甙(daidzin)	100.9、101.0、98.5	100.1	1.4
染料木苷(genistin)	97.6、98.4、96.3	97.4	1.1
染料木素(genistein)	99.6、101.1、102.0	100.9	1.2
大豆甙元(daidzein)	99.1、98.3、101.1	99.5	1.4
芦荟苷(aloin)	98.9、101.3、102.1	100.8	1.7

2.6 样品测定

精密称取混合均匀的样品 5 份, 每份 2.0g, 按“1.2.2.2”项制备供试品溶液, 精密移取此溶液及对照品混合溶液(其中含大豆甙 0.04088mg/ml、染料木苷 0.03448mg/ml、大豆甙元 0.03528mg/ml、芦荟苷 0.04784mg/ml 和染料木素 0.03208mg/ml), 按上述色谱条件各进样 10 μ l 进行含量测定, 记录色谱图(图 1), 结果样品中大豆甙、染料木苷、大豆甙元、芦荟苷和染料木素的含量(n=5)分别为 156.81、168.42、41.98、39.84、36.55 μ g/ml; RSD 分别为: 2.6%、1.3%、1.8%、2.8% 和 2.3%。

3 讨论



1. 大豆甙(daidzin); 2. 染料木苷(genistin); 3. 大豆甙元(daidzein); 4. 芦荟苷(aloin); 5. 染料木素(genistein)。

图1 对照品(A)和样品(B)色谱图

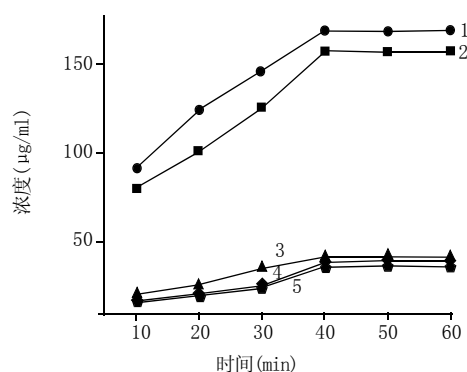
Fig.1 Chromatograms of reference substances(A) and sample(B)

3.1 供试品溶液制备方法的确定

精密称取混合均匀的软胶囊内容物 5 份, 每份 2.0g, 加入适量的甲醇和乙醇(50:50)混合液, 分别超声振荡 10、20、30、40、50、60min, 加上述混合液补足至刻度, 待提取液略澄清后经离心分离, 取上清液用 0.45 μ m 滤膜过滤后按本实验色谱条件进样测定, 并根据“2.1”项下回归方程分别计算大豆甙、染料木苷、大豆甙元、芦荟苷和染料木素的浓度(mg/ml)。以成分浓度为纵坐标, 超声提取时间为横坐标, 制作曲线(图 2), 结果表明五种成分都在 50min 提取完全。故确定供试品超声提取时间为 50min。另外, 我们同时还对提取溶剂进行了考察, 结果表明: 当提取溶剂为甲醇和乙醇(50:50)混合液时, 各组分提取效率最好, 故采用甲醇和乙醇(50:50)混合液作为提取溶剂。

3.2 色谱条件的选择

采用甲醇-水、乙腈-水等系统进行分离, 实验表明, 甲醇-水系统已完全达到所需的分离效果, 故从环保和经济角度考虑, 流动相采用甲醇-水; 采用二极管阵列检测器采集各点光谱, 五组分的最大吸收波长在 250~300nm 不等, 但在 260nm 处吸收度均较好, 故选择在该波长出检测; 实验中采用 0.8~1.5ml/min 的流速对待测组分的分离效果进行了实验, 实验表明, 在 1.0ml/min



1. 大豆甙; 2. 染料木苷; 3. 大豆甙元; 4. 芦荟苷; 5. 染料木素。

图2 五种成分的测得浓度与提取时间曲线

Fig.2 Concentration and extract time curves of five components

的流速时, 五种成分能很好的分离, 并且柱压较小。

参考文献:

- [1] 河本明彦. 葛根提取物的抗癌活性[C] // 日本药学会第30次年会论文摘要, 1992.
- [2] 景永奎, 韩锐. 大豆甙元(S86019)与乳香有效成分Bc-4或阿糖胞苷对HL-60细胞分化的联合诱导[J]. 药学报, 1993, 28(1): 11-13.
- [3] 景永奎. 大豆甙元对小鼠B16黑色素瘤细胞的分化诱导作用[J]. 中国药理学毒理学杂志, 1992, 6(4): 278-281.
- [4] 贺玉琢. 大黄的药理药效[J]. 国外医学: 中医中药分册, 1992, 14(5): 48-49.
- [5] 郭建平, 孙其荣, 周全. 葛根黄酮胶囊的制备及体外释放动力学[J]. 中草药, 1995, 26(3): 163-165.
- [6] 刘玉兰. 葛根黄豆甙元固体分散物对自发性高血压大鼠血压的影响[J]. 沈阳药学院学报, 1991, 8(2): 105-108.
- [7] 何明, 胡昌勤. 植物性雌激素的研究进展[J]. 中成药, 1999, 21(1): 42-45.
- [8] 郑高利. 大豆异黄酮的生理作用 I [J]. 中国现代应用药学, 1998, 15(1): 4-5.
- [9] STEELE V E, PEREIRA M A, SIGMA C C, et al. Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein[J]. J Nutr, 1999, 125: 713-716.
- [10] DJURIC Z, CHEN G, DOERGE D R, et al. Effect of soy isoflavone supplement on markers of oxidative stress in men and women[J]. Cancer Lett, 2001, 172: 1-6.
- [11] TIKKAUEN M J, ADLERCREUTZ H. Dietary soy - derived isoflavone phytoestrogens could they have a role in coronary heart disease prevention [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60: 1-5.
- [12] 王陶, 王辉. 植物雌激素及其对人类的作用[J]. 湖南中医药导报, 1999, 5(2): 14-15.
- [13] 张玉梅, 张学斌, 高旭年, 等. 紫外分光光度法测定大豆异黄酮的含量[J]. 食品科学, 2000, 12(4): 7-9.
- [14] LIGGINS J, BLUCK L J C. Daidzin and genistein content of fruits and nuts[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2000, 11(6): 326-331.
- [15] MULLNRE C, SONTAG G. Determination of some phytoestrogens in soybeans and their processed products with HPLC and coulometric electrode array detection[J]. Fresenius J Anal Chem, 1999, 364: 261-265.
- [16] 董怀海, 谷文英. 高效液相色谱-质谱法在大豆异黄酮测定中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2002(5): 48-50.
- [17] MCLEOD G S, SHEPERDM J. Determination of the ionization constants of isoflavones by capillary electrophoresis[J]. Phytochemical Analysis, 2000, 11(5): 322-326.
- [18] WANG G J, LAPCIK O, HAMP I R, et al. Time - resolved fluorimetric assay of plasma daidzein and genistein[J]. Steroids, 2000, 65(6): 339-348.