

5, 10, 20, 25 μ g/mL标准溶液 将标准溶液注入色谱仪,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,获得线性方程为 $Y = 9\ 953 + 25\ 036X$ ($r = 0.9999$)

3.2 样品的含量测定:选取 3个已知含二氧化硫的药材样本,分别用酸蒸馏碘滴定法及酸蒸馏离子色谱法测定样本中二氧化硫含量,结果见表 3

表 3 碘滴定法与离子色谱法测定结果比较 (mg/g)

药材	碘滴定法	离子色谱法
沙参	2.45	2.39
无花果	1.57	1.48
冬瓜条	2.64	2.74

4 讨论

二氧化硫是食物中常用的防腐剂,主要用于饮料和干果等类食物,作用在于保持食物的色泽和防止霉变^[3]。在检测方面,酸蒸馏是常用的提取方法^[4],而结果显示,碘滴定法和离子色谱法对提取液中二氧化硫含量测定没有显著差别。但值得注意的是,在离子色谱法中,当进行移除溶液中残留双氧水的时候,溶液必须呈阴性,否则会造成硫酸变成三氧化硫而挥发掉,导致定量结果的误差。

在西药中,二氧化硫也是容许使用的,其使用范围为 0.01% ~ 1.0%^[5]。结果显示,42个中药材样品中未发现有二氧化硫含量超出这过范围,但当中有 9个样本含二氧化硫超过 500 μ g/g,其中包括一些直接泡茶饮用的药材如人参、参须、菊花等。

显然,按总体水平来看,中药材中二氧化硫的含量并不算太高,但由于它可能会对人体健康或中药材的质量和疗效造成影响,所以有必要监管二氧化硫在中药材中的使用。经实验证明,酸蒸馏碘滴定法应用于测定中药材中二氧化硫的含量,有很高的准确性和重现性,而且此法有简单和快捷等优点,可以考虑作为监察中药材中二氧化硫含量的标准测定方法

参考文献

- 1 Branen A F, et al. Antimicrobials in Foods. Marcel Dekker Inc, 1985 191
- 2 Furia T E. Handbook of Food Additive. CRC Press, 1972 163
- 3 刘程,等.食品添加剂实用大全.北京:北京工业大学出版社, 1993 15
- 4 Manuals of Food Quality Control. Vol. 2, FAO, 1979. 7
- 5 Martindale, The Extra Pharmacopoeia. The Pharmaceutical press, 1993 1139

(1999-05-24收稿)

西洋参 DNA导入大豆实现遗传转化的研究 II. 导入后代异黄酮类成分的含量测定

湖南中医学院中药系 (长沙 410007)

湖南农业大学植物科技学院

日本名城大学生药学教研室

日本岐阜药科大学药草园研究室

刘塔斯*

麻浩 田森林

川村智子

田中俊弘

摘要 用高效液相色谱法测定了西洋参 DNA导入大豆后代的异黄酮类成分:大豆苷 (daidzin)、大豆黄素 (daidzein)、染料木苷 (genistin)、染料木素 (genistein)的含量,采用 Unisil Q C₁₈柱,4.6 mm \times 250 mm,流动相乙腈-0.003 mol/L磷酸氢二钠 (17:83),流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,结果表明,4种成分分离效果好,成分含量发生了广泛变异,从中可筛选出有效成分含量较高的新材料。

关键词 西洋参 DNA导入大豆后代 大豆苷 大豆黄素 染料木苷 染料木素 HPLC法

Genetic Transformation of Soybeans by Soaking Its Seeds with the Total DNA of American Ginseng (*Panax quinquefolium*) II. Determination of Isoflavone Content by HPLC

Department of Chinese Materia Medica, Hunan College of Traditional Chinese Medicine (Changsha 410007) Liu Tasi

College of Plant Science and Technology, Hunan Agriculture University Ma Hao and Tian Senlin

Department of Pharmacognosy, Meijo University, Meijo, Japan Tomoko Kawamura

Gifu Pharmaceutical University, Japan Toshihiro Tanaka

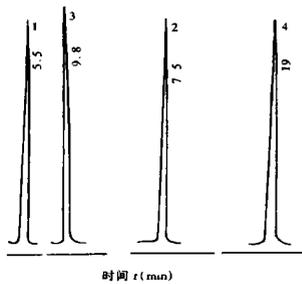
Abstract A method for the determination of isoflavone content in the transformed progenies of soybean by HPLC was reported. Using unisil Q C₁₈ column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), with a mobile

* Address: Liu Tasi, Department of Chinese Materia Medica, Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha

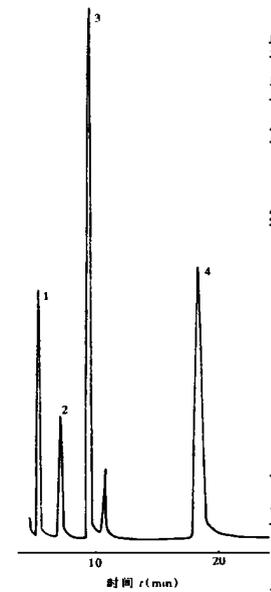
phase of CH₃CN-0.003 mol/L Na₂HPO₄ (17: 83), a detecting wavelength at 254 nm, and flow rate of 1.0 mL/min, it was found that the contents of daidzein, genistein, daidzin and genistin in the transformed progenies of soybean changed greatly and could be separated effectively, which makes it possible to cultivate and develop the best progeny for further development.

Key words the transformed progenies of soybean with the total DNA of American Ginseng daidzin daidzein genistin genistein HPLC

我们已知道了将西洋参 DNA 导入大豆后代的形态性状变化^[1], 本文主要讨论导入基因大豆后代的品质评价, 首先报道对其 4 种有效成分: 大豆苷、大豆黄素、染料木苷、染料木素的含量测定。大豆苷等成分具有降低心肌耗氧量, 增加冠脉、脑血管流量, 缓解心绞痛, 抗氧化^[2]等药效作用, 染料木苷类成分据日本癌学会和国内资料显示^[3,4], 对前列腺癌等



1 大豆黄素 2 染料木素
3 大豆苷 4 染料木苷
图 1 标准品色谱图



1 大豆黄素 2 染料木素
3 大豆苷 4 染料木苷
图 2 Y₁₀₋₁₂₋₂样品色谱图

有一定的抑制作用, 导入后代中异黄酮类成分含量如何, 我们采用高效液相法测定了 4 种成分的含量, 以期望培育出有一定药用价值或保健作用的栽培大豆新材料和新品系, 以利开发应用。

1 仪器与试剂

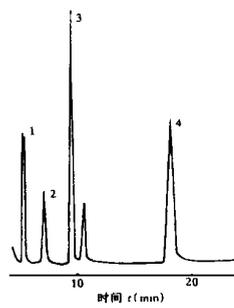
1.1 仪器: Unisil Q C₁₈ 高效液相色谱仪, Water 510 泵, 检测器: 484 可变波长紫外检测器; 712 自动注入装置。测试地点: 日本名城大学生药学教研室

1.2 试剂: 所有试剂为分析纯或色谱纯。对照品: 大豆苷 (daidzin), 大豆黄素 (daidzein), 染料木苷 (genistin), 染料木素 (genistein) 购于日本 Funakoshi Co., 西洋参 DNA 导入大豆材料来自于湖南农业大学, 由课题组麻浩提供。

以上 4 种保留时间: 大豆黄素 5.5 min, 染料木素 7.5 min, 大豆苷 9.8 min, 染料木苷 19.0 min, 色谱图见图 1~3

1.3 色谱条件: Unisil Q C₁₈

色谱柱 4.6 mm× 250 mm, 5 μm, 流动相: 乙腈-0.003 mol/L 磷酸氢二钠 (17: 83), 流速 1.0 ml/min, 柱温 35℃, 检测波长 254 nm, 灵敏度 0.020 AUFS, 进样量 10 μL



1 大豆黄素 2 染料木素
3 大豆苷 4 染料木苷
图 3 Y₁₀₋₃₀₋₁样品色谱图

2 方法与结果^[5]

2.1 线性实验: 精密称取以上 4 种对照品, 用甲醇溶解, 制成浓度为 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg/mL 的标准溶液。吸取溶液各 10 μL 分别进样, 测定峰面积, 并以峰面积

(y) 对样品浓度 (x) 进行线性回归分析, 分别得回归方程为:

大豆苷: $y = 6.2495 \times 10^5 x - 188.055$, $r = 0.9999$, 在 2.5880~33.0000 μg/mL 间呈线性关系

大豆黄素: $y = 3.4612 \times 10^6 x - 105.4767$, $r = 0.9999$, 在 6.4380~38.6270 μg/mL 间呈线性关系

染料木苷: $y = 3.4793 \times 10^6 x - 320.5476$, $r = 0.9998$, 在 3.2550~41.5000 μg/mL 间呈线性关系

染料木素: $y = 2.3891 \times 10^6 x - 911.2859$, $r = 0.9999$, 在 2.0110~17.0910 μg/mL 间呈线性关系

2.2 稳定性实验: 准确分别吸取 4 种对照品溶液 10 μL, 分别于 30, 60, 120 min 进样测定, 考察其稳定性, 结果表明 1 h 内峰面积积分值稳定。

2.3 回收率及精密度实验: 精密吸取 4 种对照品溶液, 在上述色谱条件下, 直接测得其峰面积, 重复测定 4 次, 并计算回收率, 测得结果见表 1

2.4 样品测定: 取大豆研磨粉碎, 约 200 mg, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 2 mL 密封, 35℃ 超声处理 30 min, 取出, 静置 10 min, 取上清液; 残渣加入甲醇 2 mL, 照上法重复处理, 合并滤液至刻度,

测试,进样量各为 10 μ L,分析结果见表 2

表 1 回收率实验结果

样品	进样浓度		峰面积				回收率		RSD(%)
	(mg/mL)						(%)	(n=4)	
大豆苷	0.038 6	23 894	23 869	23 919	23 892	99.74		0.085 5	
大豆黄素	0.016 5	56 530	57 006	57 489	57 008	100.01		0.686 8	
染料木苷	0.017 1	58 682	59 732	59 137	59 184	100.08	100.05	0.726 4	
染料木素	0.041 5	98 595	98 465	98 724	98 593	100.36		0.107 2	

表 2 导入基因大豆后代的异黄酮的含量 (mg/100 mg)

样品	大豆黄素	染料木素	大豆苷	染料木苷
Y ₁₀ -10-3	0.000 5	0.001 3	0.009 5	0.017 6
Y ₁₀ -12-1	0.001 2	0.001 5	0.011 7	0.010 4
Y ₁₀ -12-2	0.010 2	0.012 5	0.057 3	0.056 8
Y ₁₀ -15-3	0.001 2	0.001 9	0.007 2	0.012 0
Y ₁₀ -15-13	0.001 1	0.002 0	0.018 3	0.028 7
Y ₁₀ -30-1	0.005 7	0.008 4	0.027 9	0.030 1
Y ₁₀ -30-2	0.004 8	0.005 6	0.018 8	0.020 8
Y ₁₀ -30-3	0.002 0	0.003 8	0.019 8	0.032 4
Y ₁₀ -42-1	0.000 8	0.001 2	0.011 1	0.015 2
Y ₁₀ -43-2	0.001 5	0.002 4	0.021 5	0.031 4
Y ₁₀ -53-1	0.001 0	0.002 3	0.011 5	0.021 1
湘春豆 10号	0.001 2	0.001 7	0.015 3	0.018 5

3 小结

3.1 对 12批样品 4种异黄酮类成分含量测定结果

表明,导入西洋参 DNA 基因后的大豆异黄酮类含量发生了广泛的变异,与样本湘春豆 10号比较,就大豆黄素成分而言,高于受体亲本的样品数有 5个;染料木素成分,有 8个样品明显高于亲本,大豆苷成分,有 6个样品;染料木苷成分,有 7个样品。其中 Y₁₀-30-2, Y₁₀-30-3, Y₁₀-12-2, Y₁₀-30-1 样品的 4种成分含量大大的高于亲本湘春豆 10号。此结果也表明,西洋参 DNA 导入大豆后,提高了大豆的有效成分含量,从中可望筛选出有效成分含量较高的株系进一步栽培,培育出大豆新的种资源

3.2 经反复实验,此 HPLC 法能同时测定大豆中的 4种异黄酮类成分的含量,分离良好,方法比较简便,快速

参考文献

- 1 麻浩,等.中草药,2000,(1): 51
- 2 郭建平,等.中草药,1995,26(3): 163,(6): 298
- 3 白井智之,等.第 57回日本癌学会总会,横浜,1998,92
- 4 国家医药管理局中草药情报中心站编.植物药有效成分手册.北京:人民卫生出版社,1986 493
- 5 早川顺子,等.药学杂志,1984 104(1): 50

(1999-02-09收稿)

SFE-HPLC测定银杏叶粗提物中黄酮类化合物的含量

第二军医大学药学院药物分析教研室(上海 200433)

佳红* 柳正良

摘要 采用超临界流体萃取法提取银杏叶粗提物中总黄酮苷,确定最佳萃取条件为:压力 41 364 Pa;温度 60℃;静态萃取时间 4 min;动态萃取体积 4 mL;改性剂加入量 0.2 mL乙醇;用 HPLC测定含量,结果表明:本法简便快速,萃取完全,为银杏叶粗提物的分离、纯化、测定提供了一种有效可靠的方法。

关键词 超临界流体萃取法 银杏叶粗提物 黄酮类化合物 HPLC法

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L.的叶子,经现代药理和临床研究表明^[1],银杏叶提取物可软化血管,增加冠状动脉血流量,对心绞痛,脑血管疾病具有显著疗效,并广泛用于临床。而黄酮类化合物为其主要有效成分之一,其制剂质量通过测定黄酮含量来控制^[2,3]。传统的提取方法均采用有机溶剂提取,费时且残留有害溶剂,超临界流体萃取(SFE)因其特有的高选择性、高效性及低毒害的优点,在中草药的提取方面具有广泛应用^[4-6]。我们采用 SFE 技术萃取银杏叶粗提物中的黄酮类成分,用 HPLC 测定含量,提取效率高,杂质少,具有一定的优点

1 试剂与仪器

1.1 仪器:ISCO 100DX, 100DM 泵, SFX2-10M 超临界流体萃取仪(美国 ISCO 公司), Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters), NEC powermate 433 电子计算机(日本 NEC 公司)

1.2 试剂:槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所),山柰素对照品(Sigma 公司), CO₂(99%) (上海酒精总厂),甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱: μ BondapakTM C₁₈ (300 mm \times 3.9 mm, Waters); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸

* Address: She Jiahong, Department of Analysis Materia Medica, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai