

染料木素纯度标准物质定值及不确定度评估

Determination of purity certified reference material of genistein and the evaluation of its uncertainty

李全发¹ 于寒松^{1,2} 王 敏³ 周 剑³

LI Quan-fa¹ YU Han-song^{1,2} WANG Min³ ZHOU Jian³

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118; 2. 国家大豆产业技术体系研发中心加工实验室, 吉林 长春 130118; 3. 中国农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 北京 100081)

(1. College of Food Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2. Division of Soybean Processing, Soybean Research & Development Center, Chinese Agricultural Research

System, Changchun, Jilin 130118, China; 3. China Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products of CAAS, Beijing 100081, China)

摘要:建立染料木素纯度标准物质的准确定值方法,并对标准物质定值过程中产生的不确定度进行评估。通过质谱法、傅里叶红外光谱法和核磁氢谱法 3 种方法对染料木素样品进行定性分析,然后利用两种不同原理的定值方法对其主成分进行定值。同时评估了均匀性、稳定性及整个定值过程中引入的不确定度。最终确定染料木素纯度标准物质纯度为 99.6%,拓展不确定度为 0.4% ($k=2$)。

关键词:染料木素;纯度标准物质;质量平衡法;定量核磁法;不确定度评估

Abstract: The purity characterization method for genistein certified reference material was established, and the its uncertainty generated during characterization was evaluated. In this study, we qualitatively analyzed genistein samples by Fourier transform infrared spectroscopy, mass spectrometry, and nuclear magnetic hydrogen spectrometry. Thereafter, two independent methods were used in the purity measurement of certified reference material (CRM) of main components. Moreover, the uniformity, stability and the uncertainty introduced in the whole setting were evaluated. Finally, the purity of the genistein CRM was confirmed to be 99.6%, and the expanded uncertainty was 0.4% ($k=2$).

Keywords: genistein; purity certified reference material; mass balance method; quantitative nuclear magnetic method; uncertainty study

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-04);国家重点研发计划(编号:2016YFF0201105)

作者简介:李全发,男,吉林农业大学在读硕士研究生。

通信作者:于寒松(1979—),男,吉林农业大学教授,博士。

E-mail: yuhansong@163.com

收稿日期:2020-03-05

大豆异黄酮(soybean isoflavone, SI)是大豆生长过程中形成的次级代谢产物,又称植物雌激素,它是多酚类混合物,具有多种生物活性^[1]。大豆异黄酮在常温下的性质稳定,易溶于醇类、酯类、酮类溶剂和稀碱中,不溶于水,难溶于石油、乙醚、苯等非极性有机溶剂。大豆异黄酮作为异黄酮类化合物,具有异黄酮类化合物所共有的理化性质。其中染料木素呈长方形或六边形棒状结晶(60%乙醇)、树枝状结晶(乙醚),溶于 DMSO 和 Meth,几乎不溶于水,改变溶液 pH 对染料木素没有明显影响。染料木素结构式如图 1 所示。

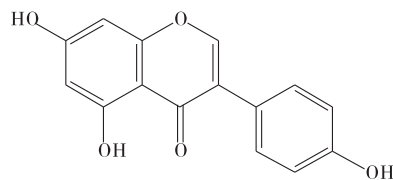


图 1 染料木素分子结构式

Figure 1 Molecular structure of Genistein

随着研究的深入,科学家们发现大豆异黄酮具有多种生物活性,如抗氧化活性^[2]、抗癌活性^[3-4]、类雌激素^[5]及抗雌激素活性^[6],还可以预防心血管疾病^[7]、改善更年期综合征^[8]等,不同组分的大豆异黄酮生物活性也不相同^[9-10]。同时,许多学者也建立了很多分析大豆异黄酮含量的方法,例如高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)^[11-12]、高效液相色谱质谱联用法(High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS)^[13-15]、气相色谱法(Gas Chromatography, GC)^[16]、气相色谱质谱联用

法 (Gas Chromatographic-Mass Spectrometric, GC-MS)^[17-18] 等,这些方法的建立可为相关大豆异黄酮的定量测定提供参考依据^[19]。杨得志等^[20]采用 DSC 法和 CT 法两种不同原理的定量方法研制了染料木素的标准物质,笔者在对染料木素原料采用 DSC 法进行纯度初测时,发现染料木素在检测温度接近 270 ℃ 时,会变为焦糊状,造成 DSC 基线大幅度变化,不利于积分,从而降低了定值的准确度;同时库伦滴定法(CT)在配置电解液时比较繁琐,且不易判断滴定终点。

为了提高定值的准确性及简化定值过程,试验拟采用质量平衡法(Mass Balance Method, MB)及定量核磁共振法(Quantitative Nuclear Magnetic Resonance, q-NMR)对染料木素展开定值研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要仪器设备

高效液相色谱仪: Waters 2695 型,配有可变波长紫外检测器和 Empower 工作站,美国 Waters 公司;

质谱仪: AB SCIEX Triple Quad 3500 型,配电喷雾离子源(ESI),美国 AB SCIEX 公司;

傅立叶变换红外光谱仪: IRT racer-100 型,美国 Agilent 公司;

核磁共振仪器: Avance III 400 MHz 型,德国 Bruker 公司;

气相色谱仪: Agilent 7890A 型,配氢火焰离子化检测器 FID、HS-10 型顶空进样器,美国 Agilent 公司;

卡尔费休水分测定仪: DO DL32 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

紫外/可见分光光度计: VAVODROP 2000c 型,美国 Thermo Fisher 公司;

分析天平: XS105 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

电子天平: UMX2 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

电感耦合等离子体质谱仪: X series 2 型,美国 Thermo Fisher 公司;

核磁管: 5 mm 经济型,美国 Wilmad 公司。

1.1.2 材料与试剂

染料木素: 纯度>98%, 美国 Chroma Dex 公司;

乙腈、甲醇、异丙醇、二氯甲烷、二甲苯: 色谱纯, 德国 Merck 公司;

氘代甲醇: 99.8%, 美国 Sigma 公司;

乙酸乙酯(GBW 06114)、丙酮(GBW 06115)、正己烷(GBW 06116)、一级标准物质苯甲酸(GBW 06117): 中国计量科学院;

DMSO-*d*6: 北京百灵威科技有限公司。

1.2 定性分析

根据文献[21], 对市售的染料木素纯品原料进行定

性分析, 主要包括质谱法、红外光谱法和核磁共振法。

1.3 样品分装

称取染料木素原料 3 g, 采用加热及冷冻干燥的方法去除水分。将干燥的样品与研钵中搅拌混合约 2 h 后, 进行分装。每个包装分装量 20.0~22.0 mg, 分装不少于 100 瓶。将其密封并保存于干燥室温(20 ℃)下。

1.4 均匀性和稳定性考察

1.4.1 均匀性 根据文献[21]中的方法, 考察染料木素原料分装的均匀性, 检测方法与液相色谱法测定原料的主成分纯度方法相同。

1.4.2 稳定性 根据文献[21]中的方法, 考察染料木素的长期稳定性及短期稳定性, 分别检验其在储存条件及运输过程中量值的变化。检测方法与液相色谱法测定原料的主成分纯度方法相同。

1.5 定值

1.5.1 高效液相色谱条件优化

(1) 色谱柱的选择: 比较 ZORBAX Agilent SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), Eclipse Agilent Plus-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), Thermo ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), Eclipse Agilent SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 4 种不同色谱柱对于染料木素及其杂质的分离情况。

(2) 流动相比比例优化: 以 0.15% 磷酸水溶液为水相, 乙腈为有机相, 考察 3 种不同流动相比比例条件下染料木素及其杂质的分离情况。

(3) 定值波长的选择: 根据标准物质的定值原则, 要求杂质响应最充分的波长为定值波长。选取 220, 230, 260, 290, 320, 350 nm 6 个不同的波长进行优化。

(4) 样品浓度的选择: 针对杂质响应程度, 考察 100, 500, 1 000, 3 000 mg/L 4 种不同浓度的染料木素甲醇溶液中杂质出峰情况。

1.5.2 质量平衡法定值 采用液相色谱法测定原料的主成分纯度, 分别取 6 支分装的样品配制浓度为 500 mg/mL 的检测溶液, 每支样品配制 3 次, 分别检验。

根据文献[21]对染料木素中的杂质进行分析, 主要包括卡尔费休法测定水分, 微波消解—电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定无机金属元素杂质, 顶空气相色谱法测定挥发性杂质。

1.5.3 定量峰选择 选择积分范围内无干扰峰, 含有多个氢的单峰作为定量峰^[22], 以减少定值误差。

1.5.4 核磁共振氢谱法定值 样品配制方法: 分别准确称量约 22.000 mg 样品和 10.000 mg 内标物于同一透明玻璃瓶, 用 1 mL DMSO-*d*6 完全溶解后, 转移至核磁管中待测。根据文献[23]中的方法, 将激发中心设置为 δ 8.15 进行检测。

2 结果与讨论

2.1 主成分定性分析

2.1.1 傅里叶红外光谱法 采用 SHIMADZU IRT racer-100 红外光谱仪测定染料木素的红外光谱图,结果如图 2 所示。其中 3410 cm^{-1} 为 O—H 键的伸缩振动; 1652.51 cm^{-1} 为 C=O 双键的伸缩振动; 1615.38 , 1519.91 cm^{-1} 为苯环的骨架震动; 1309.67 cm^{-1} 为 O—H 键的弯曲震动; 1202.13 cm^{-1} 为 C—O 键的伸缩振动; 840.48 cm^{-1} 为苯环上 C—H 的弯曲振动。与文献[24]报道的染料木素红外谱图比较,峰的位置一一对应,因此可以初步判断染料木素样品的结构准确。

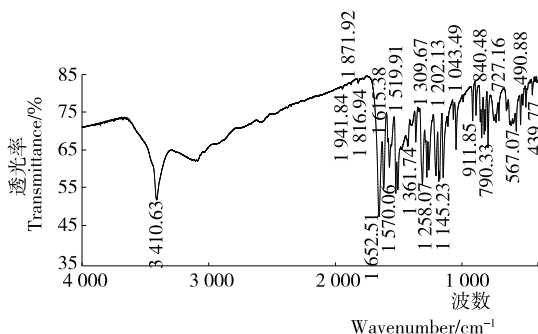


图 2 染料木素的红外光谱图

Figure 2 Infrared spectrum of Genistein

2.1.2 质谱法 采用质谱法测定化合物的母离子、子离子,可以为化合物准确定性提供依据。将染料木素纯品溶于甲醇溶剂中,配成 1 mg/L 的溶液,采用 AB SCIEX Triple Quad 3500 质谱仪在正离子模式下全扫分析,质谱图如图 3 所示,质荷比分别为 271.0, 215.1, 153.0, 与文献[13]记载的定性离子对相符合。由此认为,纯品原料主要成分为染料木素。

2.1.3 核磁氢谱法 如图 4(a) 所示,化学位移值在 $\delta\ 6.21, 6.37, 6.81, 7.37$ 的峰分别归属于苯环上所连接 8、11、15、16 号位置的氢,化学位移为 $\delta\ 12.95$ 的峰为 18 号

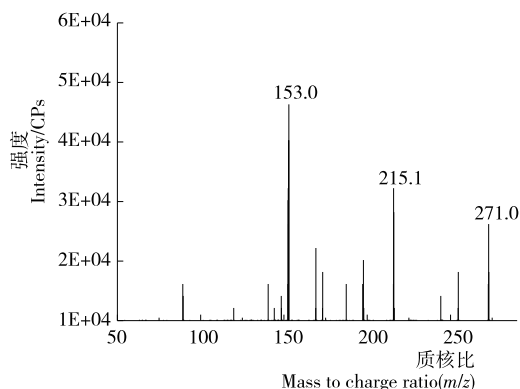


图 3 染料木素的质谱图

Figure 3 Mass spectrum of Genistein

位羟基上的氢。且测得的样品中氢原子的化学位移值与通过 Chemdraw 模拟的染料木素的核磁氢谱图[图 4(b)]的化学位移值均一一对应。综合以上 3 种定性方法的结果,最后判断原料的主成分为染料木素。

2.2 均匀性考察

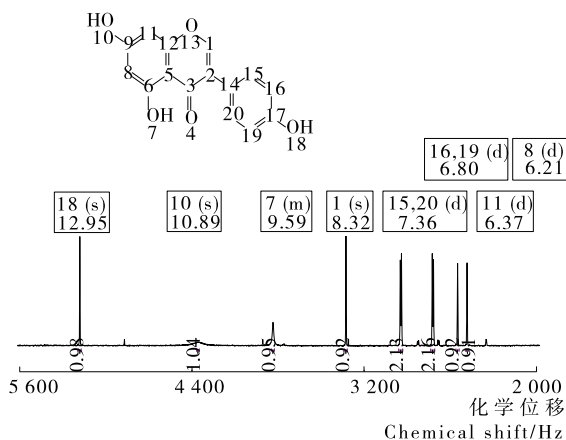
根据标准物质研制的相关技术要求^{[25][26]1-3},研究从整个封装过程的前、中、后 3 个时间段分别随机抽取样品,共 11 个包装单位进行均匀性检验。采用单因素方差分析法检验测量的数据,均匀性检验结果如表 1 所示。由表 1 可知, $F < F_{0.05(10,22)}$,原料均匀染料木素分装样品均匀,符合相关技术规范要求。

2.3 稳定性考察

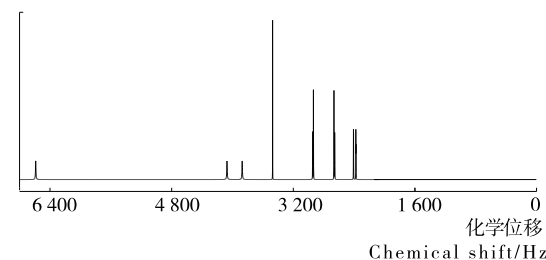
稳定性考察主要为检验标准物质在长期储存条件和不同运输环境温度下,标准物质的理化性质和量值保持不变的能力。对染料木素纯度标准物质进行了长期和短期的稳定性考察,并采用直线拟合法考察稳定性结果。

2.3.1 长期稳定性考察 长期稳定性考察及监测结果如表 2 所示,由拟合直线的线性方程可知,斜率 $\beta_1 = 0.002$ 和截距 $\beta_0 = 99.634$,且 $|\beta_1| < t_{0.95,3} \cdot s(\beta_1)$,所以稳定性检验通过。

2.3.2 短期稳定性考察 采用趋势分析对监测数据进行考察,结果(如表 3 所示)显示,3 种温度条件下 $|\beta_1| < t_{(0.95,2)} \cdot s(\beta_1)$,说明染料木素在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下的温度条件下 7 d 内可保证纯度量值稳定。



(a) 料木素的核磁氢谱图



(b) 染料木素的模拟核磁氢谱图

图 4 染料木素的核磁氢谱图

Figure 4 ^1H -NMR spectrum of Genistein

表 1 染料木素均匀性检验结果[†]

Table 1 The results of uniformity of Genistein %

样品	1	2	3	平均
1	99.62	99.67	99.64	99.64
2	99.63	99.64	99.65	99.64
3	99.64	99.66	99.64	99.64
4	99.63	99.64	99.65	99.64
5	99.63	99.60	99.63	99.62
6	99.65	99.62	99.63	99.63
7	99.66	99.65	99.66	99.66
8	99.67	99.65	99.66	99.66
9	99.67	99.65	99.64	99.65
10	99.64	99.68	99.67	99.66
11	99.67	99.65	99.64	99.65
平均	99.64	99.64	99.65	99.64

[†] 总标准偏差为 $1.765\text{E}-02$, 总平均为 99.65 , s_1^2 为 $4.897\text{E}-04$, s_2^2 为 $2.303\text{E}-04$, F 为 2.12 , $F_{0.05(10,22)}$ 为 2.30 。

表 2 染料木素长期稳定性考察结果[†]

Table 2 The results of long-term stability of Genistein %

样品瓶号	2018.8	2018.9	2019.1	2019.4	2019.10
#1	99.62	99.63	99.64	99.66	99.66
	99.63	99.64	99.65	99.67	99.66
	99.64	99.66	99.64	99.67	99.64
#2	99.63	99.64	99.65	99.64	99.67
	99.63	99.60	99.63	99.67	99.64
	99.65	99.62	99.63	99.64	99.65
平均	99.63	99.63	99.64	99.66	99.65

[†] β_1 为 $2.00\text{E}-03$, β_0 为 99.634 , s^2 为 $9.611\text{E}-05$, $s(\beta_1)$ 为 $1.016\text{E}-03$, $t_{0.95,3}$ 为 3.180 。

表 3 染料木素短期稳定性考察结果[†]

Table 3 The results of short-term stability of Genistein %

时间/d	20 °C	40 °C	60 °C
1	99.64	99.63	99.62
3	99.64	99.62	99.62
5	99.60	99.61	99.62
7	99.62	99.62	99.61
平均值	99.62	99.62	99.62

[†] 20 °C: β_1 为 $-5.00\text{E}-03$, β_0 为 99.65 , s^2 为 $3.00\text{E}-04$, $s(\beta_1)$ 为 $2.89\text{E}-03$, $t_{0.95,2}$ 为 4.30 ; 40 °C: β_1 为 $-2.00\text{E}-03$, β_0 为 99.63 , s^2 为 $6.00\text{E}-05$, $s(\beta_1)$ 为 $1.29\text{E}-03$, $t_{0.95,2}$ 为 4.30 ; 60 °C: β_1 为 $-1.50\text{E}-03$, β_0 为 99.62 , s^2 为 $1.55\text{E}-05$, $s(\beta_1)$ 为 $6.60\text{E}-04$, $t_{0.95,3}$ 为 4.30 。

2.4 质量平衡法定值

2.4.1 高效液相色谱条件优化 研究考察 HPLC 在不同色谱柱、流动相比比例、检测波长和样品浓度条件下,染料木素液相色谱谱图的变化,结果如图 5 所示。使用 Plus-C₁₈ 色谱柱时,主峰的峰形较好,主峰后出现其余色谱柱上未出现的杂质峰,见图 5(a);当流动相比比例为 74 : 26 时,杂质与主峰完全分离,其余杂质分离效果较好,见图 5(b);在 261 nm 的紫外吸收波长下,6.5 min 和 12.5 min 的杂质响应最充分,杂质的峰面积最大,见图 5(c);当样品浓度为 500 mg/L 及以上时,杂质 1、2、3 出峰明显,响应充分,见图 5(d)。最后确定染料木素的液相色谱条件为:定值波长 261 nm,色谱柱 Eclipse Agilent Plus-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm),流动相比比例 74 : 26,样品浓度 500 mg/L。

2.4.2 质量平衡法定值结果 样品实际纯度等于 HPLC-UV 法测得的纯度减去水分含量、挥发性杂质含量、以及无机元素含量等,最终质量平衡法定值结果如表 4 所示,其中无机元素含量较少可以忽略。所以由质量平衡法 (MB)测定的染料木素纯度为 99.58%。

2.5 核磁共振氢谱法定值

2.5.1 定量峰选择 通过分析苯甲酸和染料木素混标的核磁氢谱图,可以确定苯甲酸与染料木素混合样品中的各个质子峰的归属,并且可以确定每个质子峰对应的质子数。染料木素 A 位的质子峰与苯甲酸 B 位的质子峰,化学位移值接近,耦合裂分简单,不受其他质子峰干扰,可以当作定量峰(图 6)进行定值研究。

2.5.2 核磁氢谱法定值结果 核磁氢谱法定值检测结果如表 5 所示。

2.6 纯度定值结果

纯度定值的结果取质量平衡法与定量核磁法测量结果的平均值,计算公式如式(1)所示,计算结果保留一位有效数字,为 99.6%。

$$\bar{x} = \frac{P_{\text{MB}} + P_{\text{NMR}}}{2} \quad (1)$$

2.7 不确定度评定

染料木素纯度标准物质研制过程中的不确定度评估根据标准物质定值通用原则^{[26]17-23}进行,主要由均匀性检验、稳定性检验和定值过程 3 部分组成^[27]。

2.7.1 均匀性引入的不确定度 均匀性标准偏差计算公式如式(2)所示。

$$S_{\text{H}} = \sqrt{\frac{S_2^2}{n}} \times \sqrt{\frac{2}{v_2}} \quad (2)$$

式中:

S_{H} ——均匀性标准偏差;

S_2^2 ——组内方差;

n ——组内测量次数;

v_2 ——组间自由度。

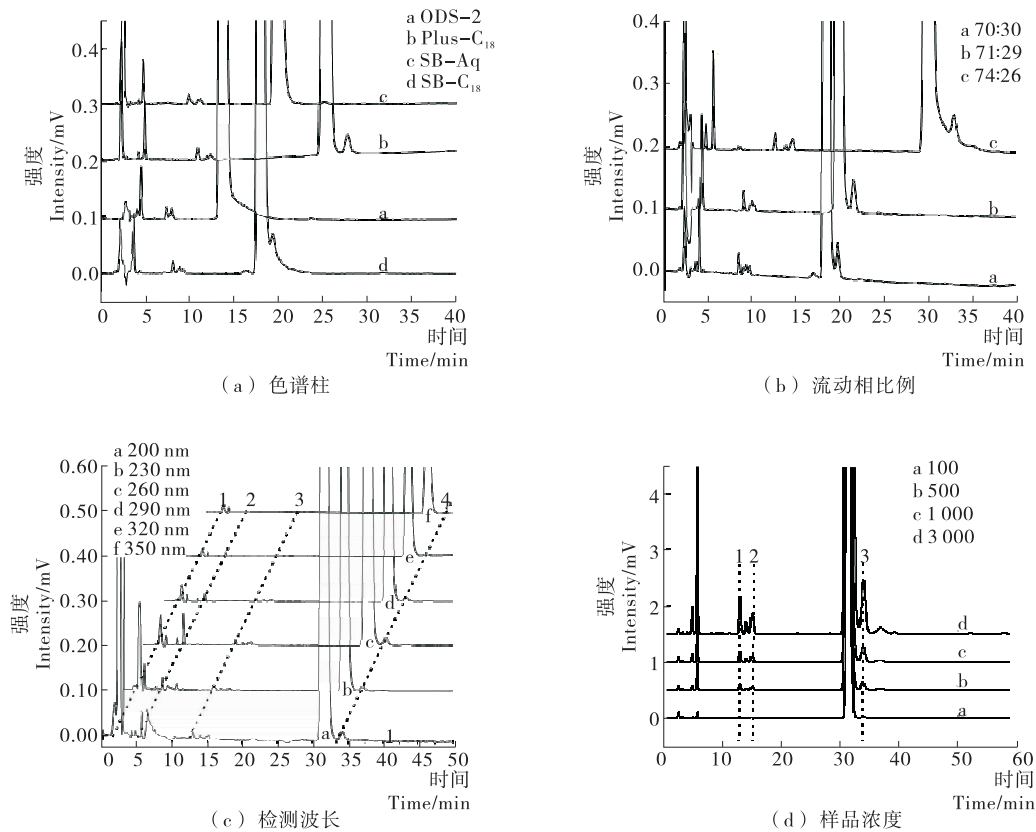


图5 染料木素液相条件优化图
Figure 5 The optimal conditions of HPLC of Genistein

表4 染料木素的质量平衡法定值结果

Table 4 The results of MB of Genistein %				
样品 编号	HPLC 主 成分测定	卡尔费休 水分测定	有机挥发性 杂质测定	定值 结果
1	99.62	0.042 8	7.490E-06	99.58
2	99.63	0.084 7		99.55
3	99.64	0.090 2		99.55
4	99.63	0.035 1		99.59
5	99.63	0.010 2		99.62
6	99.65	0.052 8		99.60
平均值	99.63	0.052 6		99.58
标准偏差	0.010 33	0.030 48		0.029 06

在采用单因素方差分析法的情况下,均匀性引入的相对不确定度 u_{bb} 等于均匀性标准偏差 S_H 与检测纯度值 $\bar{x}$ 的比,计算公式如式(3)所示,计算结果为0.002 2%。

$$u_{bb,rel} = \frac{u_{bb}}{\bar{x}} \quad (3)$$

2.7.2 稳定性引入的不确定度 长期稳定性的相对不确定度 $u_{lts,rel}$ 根据表2的数据进行计算,计算公式如式(4)所示,结算结果为0.000 8%。

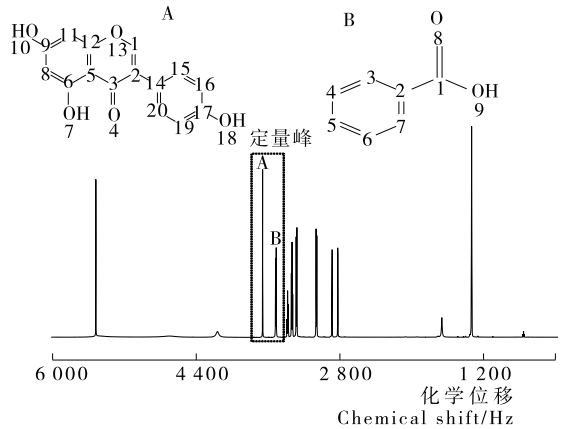


图6 苯甲酸及染料木素的¹H-NMR谱图
Figure 6 ¹H-NMR spectrum of benzoic acid and genistein

$$u_{lts,rel} = \frac{s(b_1) \times X}{\bar{x}} \quad (4)$$

短期稳定性引入的相对不确定度 $u_{sts,rel}$ 根据表3的数据进行计算,计算公式:

$$u_{sts,rel} = \frac{s(b_1) \times X}{\bar{x}} \quad (5)$$

表 5 染料木素纯度标准物质质量分数核磁结果

Table 5 Nuclear magnetic resonance results of genistein purity reference materials

样品	$\frac{I_x}{I_{std}}$	$\frac{n_{std}}{n_x}$	$\frac{M_x}{M_{std}}$	$\frac{m_{std}}{m_x}$	P_{NMR}
1	0.491 0	2.000 0	2.212 9	0.451 9	99.50
2	0.497 3	2.000 0	2.212 9	0.452 0	99.77
3	0.495 0	2.000 0	2.212 9	0.452 3	99.67
4	0.499 2	2.000 0	2.212 9	0.452 1	99.67
5	0.505 2	2.000 0	2.212 9	0.451 9	99.62
6	0.506 2	2.000 0	2.212 9	0.452 1	99.56
平均值					99.63
标准偏差					0.094

研究选择不同温度条件下不确定度最大的作为短期稳定性的不确定度,所以应选温度条件为 20 ℃ 下检测引入的不确定度为短期稳定性的不确定度,计算公式如式(6)所示,计算结果为 0.022 5%。

$$u_{sts,rel} = \sqrt{u_{stsl,rel}^2} \quad (6)$$

2.7.3 定值引入的不确定度 定值引入的不确定度由质量平衡法和定量核磁法两部分构成,计算公式如式(7)所示,计算结果为 0.11%。

$$u_{char,rel} = \sqrt{u_{MB,rel}^2 + u_{NMR,rel}^2} \quad (7)$$

(1) 质量平衡法引入的不确定度:质量平衡法引入的相对标准不确定度计算公式如式(8)所示,计算结果为

$$u(P_{NMR,rel}) = \sqrt{\left[\frac{u(I_x/I_{std})}{I_x/I_{std}}\right]^2 + \left[\frac{u(M_x)}{M_x}\right]^2 + \left[\frac{u(M_{std})}{M_{std}}\right]^2 + \left[\frac{u(m_x)}{m_x}\right]^2 + \left[\frac{u(m_{std})}{m_{std}}\right]^2 + \left[\frac{u(P_{std})}{P_{std}}\right]^2} \quad (9)$$

式中:

- $u(I_x/I_{std})$ ——积分面积测定引入的不确定度,%;
- $u(M_x)$ ——染料木素分子量引入的不确定度,%;
- $u(M_{std})$ ——苯甲酸分子量引入的不确定度,%;

表 7 定量核磁法测定染料木素引入的相对标准不确定度

Table 7 Relevant standard uncertainty results of the determination of Genistein by qNMR

名称	计算结果/%
$u(I_x/I_{std})$	0.054
$u(M_x)$	0.006 99
$u(M_{std})$	0.003 26
$u(m_x)$	0.000 6
$u(m_{std})$	0.000 6
$u(P_{std})$	0.01

0.053%。

$$u(P_{MB,rel}) =$$

$$\sqrt{\left[\frac{u(P_0)}{P_0}\right]^2 + \left[\frac{u^2(X_w + u^2(X_n) + u^2(X_v))}{(1 - X_w - X_n - X_v)}\right]^2} \quad (8)$$

式中:

- $u(P_0)$ ——HPLC 法测定合成不确定度,%;
- $u(X_w)$ ——微量水分测定引入的不确定度,%;
- $u(X_n)$ ——非挥发性杂质测定引入的不确定度,%;
- $u(X_v)$ ——挥发性杂质测定引入的不确定度,%。

质量平衡法测定染料木素引入的相对标准不确定度见表 6。

表 6 质量平衡法测定染料木素引入的相对标准不确定度

Table 6 Relevant standard uncertainty results of the determination of Genistein by mass balance

名称	计算结果/%
$u(P_0)$	0.05
$u(X_w)$	0.018
$u(X_n)$	ND
$u(X_v)$	ND

(2) 定量核磁法引入的不确定度:定量核磁法引入的相对不确定度计算公式如式(9)所示,计算结果为 0.086%。

- $u(m_x)$ ——样品天平称量引入的不确定度,%;
- $u(m_{std})$ ——内标物天平称量引入的不确定度,%;
- $u(P_{std})$ ——内标物纯度引入的不确定度,%。

定量核磁法测定染料木素引入的相对标准不确定度见表 7。

2.7.4 合成及拓展不确定度 染料木素纯度标准物质的相对不确定度计算公式如式(10)所示,计算结果为 0.018 3%。

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{char,rel}^2 + u_{bb,rel}^2 + u_{ls,rel}^2 + u_{sts,rel}^2} \quad (10)$$

扩展不确定度为: $U_{CRM} = k \times p \times u_{c,rel} \approx 0.4\% (k=2)$ 。

3 结论

研究对市售的染料木素样品进行了定性分析,并对样品进行了均匀性检验和稳定性考察,建立了一种以液相色谱法(HPLC)为基础的染料木素的定值方法,同时用定量核磁法进行纯度验证,最终确定该染料木素纯度标准物质的纯度为 99.6%,拓展不确定度为 0.4%。

参考文献

- [1] 董李平. 大豆异黄酮代谢机理的研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2003: 6-9.
- [2] 唐思颖, 涂传海, 胡文秀, 等. 红茶菌发酵黄浆水的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 1-6.
- [3] 巫波, 郭辉, 王宗岭, 等. 大豆异黄酮的抗肿瘤作用研究进展[J]. 四川解剖学杂志, 2019, 27(3): 184-187.
- [4] 田笑, 金梅花, 刘莉园, 等. 大豆异黄酮诱导小鼠肝癌移植瘤细胞凋亡的机制[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 122-126.
- [5] HUA P, TSAI W J, KUO S M. Estrogen response element-independent regulation of gene expression by genistein in intestinal cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2003, 1 627(2): 63-70.
- [6] 李恋曲, 王晓钰, 贾志荣, 等. 异黄酮类植物雌激素防治过敏性疾病研究进展[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(4): 453-456.
- [7] 张翠芬. 大豆异黄酮对心血管疾病的研究综述[J]. 中国食品添加剂, 2018(9): 210-213.
- [8] 王莹, 田蜜, 贺红, 等. 大豆异黄酮对围绝经期和绝经后妇女安全性的 Meta 分析[J]. 毒理学杂志, 2018, 32(4): 277-286.
- [9] VAHID D M, ESLAMI B, ALSADAT S M, et al. Effect of soy isoflavone on hot flushes, endometrial thickness, and breast clinical as well as sonographic features[J]. *Iran J Public Health*, 2018, 47(3): 382-389.
- [10] WADA K, TSUJI M, TAMURA T, et al. Soy isoflavone intake and bladder cancer risk in Japan: From the takayama study[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018, 27(11): 1 371-1 375.
- [11] 王路, 卢卫红, 程翠琳, 等. 同时检测人尿中六种大豆异黄酮代谢产物的 HPLC 法[J]. 营养学报, 2009, 31(2): 181-184.
- [12] PORTER P M, BANWART W L, HASSETT J J. HPLC isolation and GC-MS identification of genistein, daidzein, and coumestrol from unhydrolyzed soybean root extracts[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1985, 25(3): 229-232.
- [13] ZHAO Xin, MA Fei, LI Pei-wu, et al. Simultaneous determination of isoflavones and resveratrols for adulteration detection of soybean and peanut oils by mixed-mode SPE LC-MS/MS[J]. *Food Chem*, 2015, 176: 465-471.
- [14] XU Hai-yan, ZHENG Hua-chuan, ZHANG Hui-wen, et al. Comparison of antioxidant constituents of agriophyllum squarrosum seed with conventional crop seeds[J]. *J Food Sci*, 2018, 83(7): 1 823-1 831.
- [15] GOMEZ J D, VITAL C E, OLIVEIRA M G A, et al. Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205010.
- [16] 孙艳梅. β -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮糖苷的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003: 29-32.
- [17] FERRER I, BARBER L B, THURMAN E M. Gas chromatographic-mass spectrometric fragmentation study of phytoestrogens as their trimethylsilyl derivatives: Identification in soy milk and wastewater samples[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1 216(32): 6 024-6 032.
- [18] ROSTAGNO M A, VILLARES A, GUILLAMON E, et al. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1 216(1): 2-29.
- [19] GONG Ning-bo, WANG Xiao-ying, ZHANG Bao-xi, et al. Characterization and uncertainty evaluation of a new certified reference material of baicalein[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 89: 106-110.
- [20] YANG De-zhi, YANG Shi-ying, ZHANG Bao-xi, et al. Certification of reference materials for analysis of isoflavones genistin and genistein in soy products[J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(1): 89-96.
- [21] 周剑, 齐鑫, 杨梦瑞, 等. 甲醇中克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇 3 种溶液标准物质的定值及不确定度评估[J]. 化学试剂, 2019, 41(5): 462-468.
- [22] RACKHAM D M. Recent applications of quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy in pharmaceutical research[J]. *Talanta*, 1976, 23(4): 269-274.
- [23] 李珍柱. 三类黄酮纯度标准物质的研制[D]. 重庆: 西南大学, 2018: 20-24.
- [24] 文瑞芝, 李水芳, 曾栋. 染料木素和大豆素的结构分析[J]. 大豆科学, 2008(1): 128-133.
- [25] 韩永志, 余遼, 刘清贤. JJF 1006—1994 一级标准物质技术规范[S]. 北京: 国家标准物质研究中心, 1994: 14.
- [26] 阙盈, 李红梅, 孟凡敏, 等. JJF 1343—2012 标准物质定值的通用原则及统计学原理[M]. 北京: 中国计量科学研究院, 2012.
- [27] TANGPAISARNKUL N, TUCHINDA P, WILAIRAT P, et al. Development of pure certified reference material of stevioside[J]. *Food Chem*, 2018, 255: 75-80.