

紫外分光光度法测定大豆总异黄酮的含量^{*}

袁金斌¹ 卢建中²

(1. 江西中医学院中药制药研究中心, 南昌 330006; 2. 江中制药集团技术部, 南昌 330077)

摘要 建立了测定大豆提取物及以大豆展品黄酮为原料的保健食品中大豆总异黄酮的紫外分光光度法。以染料木素为标准品, 优选出 325nm 为测量波长, 以染料木素计量试样中的大豆总异黄酮。大豆提取物中大豆总异黄酮的含量为 38.1%, 加标回收率为 102.3%; 某保健品中大豆总异黄酮的含量为 4.76%, 加标回收率为 99.8%。方法简便、准确、重现性好, 适用于保健食品的日常分析和质量控制。

关键词 大豆异黄酮; 分光光度法; 测定

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2004)02-0147-04

大豆及豆制品中含有大量的异黄酮, 大豆异黄酮是多酚类混合物, 大豆异黄酮的组成、存在形式主要包括染料木素(金雀异黄素, Genistein)、大豆黄素(Daidzein)和黄豆黄素(Glycitein)。天然情况下它们大多以 β -葡萄糖甙的形式存在, 具有生物活性的主要是染料木素, 大豆黄素及它们的糖甙。主要的药理作用包括: 抗氧化、抗肿瘤、雌激素样作用、降血脂、抑制动脉粥样硬化、改善骨代谢等。

已有不少关于大豆异黄酮含量的测定方法, 如 HPLC 法^[1]、GC 法、HPTLC 法^[2]、毛细管电泳法(CE)^[3]、免疫分析法^[4]和酶联免疫吸附分析法等。这些方法要么需要昂贵设备, 要么需要专用试剂, 且操作繁杂。大豆异黄酮为黄酮醇类化合物, 在紫外光区有较强吸收, 因此, 在采用适当的对照品后, 可以用紫外分光光度法来估测大豆总异黄酮的含量。目前, 已经有关于用紫外分光光度法测定总大豆异黄酮的报道^[5,6]。

本实验考察了染料木素、大豆异黄酮提取物及其它试样的紫外吸收情况, 在此基础上提出了不同于前人^[5,6]的总大豆异黄酮的紫外测定方法, 并用于大豆异黄酮提取物和某保健品中总大豆异黄酮的测定, 结果令人满意。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

U-3000 紫外分光光度计, 日本 HITACHI 公司。

无水乙醇, 分析纯; 染料木素, 购自深圳同田生化试剂公司, 纯度不低于 99%; 大豆异黄酮提取物, 华北制药集团提供; 保健品制成品及其阴性对照品由江中制药厂技术部提供, 阴性对照品系以淀粉(化学纯)代替大豆异黄酮提取物按成品配方及工艺制成。

1.2 测定程序

1.2.1 溶液的制备: 随机取保健品制成品 10 片, 研成粉末, 于 105℃下干燥 1 小时, 精密称取 25mg。以 75%乙醇溶解并定容至 50ml 充分摇匀, 静置 1 小时, 吸取上清液进行测定。对染料木素和大豆异黄酮提取物, 直接以 75%乙醇溶解, 即得分析溶液。成品阴性对照品溶液的制备方法同成品分析溶液。

1.2.2 标准曲线的绘制: 精密称取染料木素标准品 5.0mg, 以 75%乙醇配成 25ml, 此标准品溶液的浓度为 200 μ g/ml。精密吸取 0.0、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0ml 标准溶液分别加入 8 个 10ml 容量瓶中, 以 75%乙醇稀释至刻度, 以零浓度溶液为参比, 在 325nm 处测吸光度。仪器自动求出回归方程并做出标准曲线图如图 1。

* 收稿日期: 2003-09-8

作者简介: 袁金斌(1971-), 男, 理学硕士, 讲师, 现从事天然产物活性成分的研究。

E-mail: kins008@yahoo.com.cn

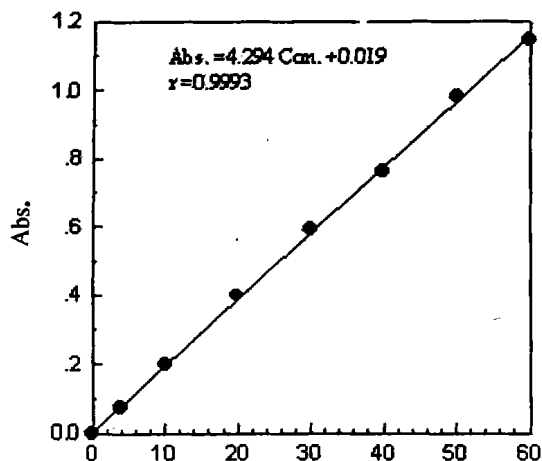


图1 标准曲线

Fig 1 Standard curve

1. 2. 3 样品测定: 以75%乙醇为参比, 在325nm处测量吸光率, 分析物浓度值由仪器根据相应的标准曲线直接给出。每个样品平行测定3次。

2 结果与讨论

2.1 溶剂的选择

染料木素在无水乙醇中的溶解度良好。大豆总异黄酮提取物在纯水中会析出胶状物, 在无水乙醇中会析出少量杂质。保健食品制成品及其阴性对照

品在各种有机溶剂及水中均有部分不溶物。本方法对无水乙醇、75%乙醇、75%乙醇和50%乙醇做了比较, 最后选定75%乙醇作为样品制备及紫外测定中的溶剂。

2.2 波长选择

本法选用染料木素为对照品。染料木素、大豆异黄酮提取物、保健品制成品及成品阴性对照品在紫外区都有两个吸收带(参见图2), 而且其吸收峰位置比较接近, 其中, 成品阴性对照品在400—300nm无吸收, 而其它三者在这一波段均有适当的吸收。由此, 可以选定两个波段进行研究: 一为最大吸收位置, 该处干扰同时达到或接近最大, 可以用分离纯化样品的办法或扣除干扰的方法建立分析方法; 二为干扰物无吸收而待测物有适当吸收的波段。文献方法多采用前者^[5,6], 但我们在研究中发现, 采用后一方法, 除了灵敏度稍低, 其余各指标均优于前者, 且操作简便, 更适用于日常分析。对于以大豆异黄酮作为功能性成分的保健食品, 大豆异黄酮的含量测定属于常量分析, 灵敏度不是问题。本法中, 325nm处即避开了干扰物的吸收, 又获得一个比较稳定的吸收波段。

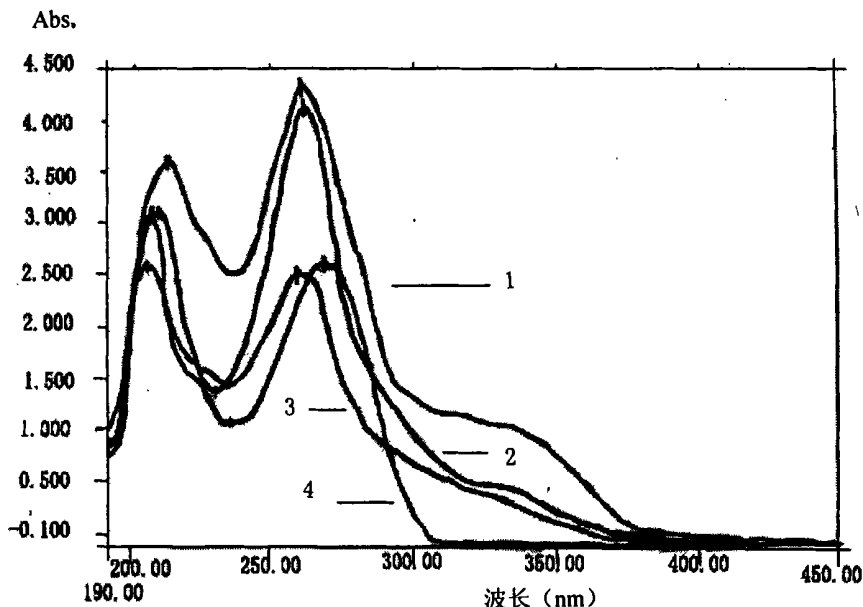


图2 分析物的吸收曲线

1. 保健品制成品 2. 染料木素 3. 大豆异黄酮原料 4. 保健品成品的阴性对照品

Fig. 2 The absorbance characteristics of the analytes

1. function foods 2. genstein 3. soybean isoflavoned extracts 4. the function foods free of isoflavones

2.3 线性范围

本法中, 染料木素在2.0—60.0 μg/ml范围呈良好线性关系(见图1), 相关系数 $r = 0.9993$, 测定上

限可达100 μg/ml, 下限为2 μg/ml。

2.4 加标回收率

精密称取已知含量的样品两份, 配成两个浓度

的样品溶液各三份共 6 份, 向同浓度的三个样品依次精密加入约相当于试样量 50%, 100%, 150%。的标准溶液, 按测定程序进行测定, 计算回收率。所

得结果如表 1, 保健食品制成品试样的平均加标回收率为 99. 8%(n= 6); 对大豆异黄酮提取物只配了一个浓度四个样, 其平均加标回收率为 102. 3%。

表 1 加标回收率
Table Recovery test

	保健品制成品 Function foods			大豆异黄酮提取物 Soybean isoflavone extracts		
	加入量 ^a	测得值 ^b	回收率(%)	加入量 ^a	测得值 ^b	回收率(%)
	Added ^a	Determined ^b	Recovery(%)	Added ^a	Determined ^b	Recovery(%)
1	3. 796	3. 684	97. 0	10. 10	10. 29	101. 9
2	5. 695	5. 754	101. 0	20. 20	20. 88	103. 4
3	9. 490	9. 259	97. 6	30. 30	31. 04	102. 4
4	9. 490	9. 302	98. 0	10. 10	10. 24	101. 4
5	18. 98	19. 38	102. 1			
6	28. 47	29. 29	102. 9			
平均回收		99. 8			102. 3	
Average recovery(%)						
RSD(%)		2. 5(n=6)			1. 0(n= 4)	

注: 为加入标准溶液后测试的理论浓度的增加值; ^b 为加入标准溶液后测得的溶液浓度增加值(单位: $\mu\text{g}/\text{ml}$)
^aThe real increment after the standard solution was added into the sample solution; ^b the determined increment after the standard solution was added into the sample solution (unit: $\mu\text{g}/\text{ml}$)

2. 5 精密度

在线性范围内, 同一样品 6 次平行测量的相对标准偏差 $\text{RSD}< 2. 6\%$ 。

同一样品不同时间段的测定数据的相对标准偏差: 保健品制成品, $\text{RSD}= 2. 9\%$ (n= 7); 大豆异黄酮提取物, $\text{RSD}= 2. 4\%$ (n= 3)。

表 2 样品中大豆异黄酮的含量

No.	保健品 Function foods			大豆异黄酮提取物 Soybean isoflavones extracts		
	含量	平均值	RSD	含量	平均值	RSD
	(%)	(%)		(%)	(%)	
	Content	Average		Content	Average	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	4. 80			38. 1		
2	4. 80			38. 4		
3	4. 60	4. 76 \pm 0. 96	2. 0	37. 7	38. 1 \pm 0. 3	0. 7
4	4. 78			38. 2		
5	4. 87			38. 3		
6	4. 69			37. 9		

2. 6 样品测定

精密称取约 20mg 样品, 以 75%乙醇配成适当浓度的待试液, 按测定程序进行测定, 以染料木素计量大豆异黄酮含量, 所得结果如表 2。本法对大豆异黄酮提取物的测定结果与 HPLC 法测定(该分析报告由华北制药集团提供)结果无显著差异, 对保健食品

制成品的测定数据与投料比吻合。值得指出的是, 本法所得大豆异黄酮含量是相对值, 而非绝对含量, 但其与来自 HPLC 法的绝对值十分接近, 因而比较全面地反映了样品中大豆异黄酮的总含量。

3 结论

本法简便、快速、选择性好、线性范围宽、重现性好、能全面反映样品中大豆异黄酮的总含量, 适用于含大豆异黄酮的保健品的质量检测和测定, 尤其是生产过程的质量控制。

参 考 文 献

1 张立. RP-HPLC 法测定大豆提取物中大豆苷元、染料木素、大豆苷、染料木苷的含量[J]. 中草药, 2001, 32(1): 118—120.
2 赵世萍, 章育中. 异黄酮含量的薄层光密度法测定[J]. 药学报, 1985, 20(3): 203—208.
3 G. S. Mcleod, M. J. Sheperd. Detemiration of the ionization constants of isoflavones by capillary electrophoresis[J]. Czech. J. Food Sci., 1999, 17(2): 61—67.
4 G. J. Wang O. Lapcik, R. Hampk, et al. Time-resolved fluoroimmunoassay of plasma daidzein and genistein[J]. Steroids, 2000, 65(6): 339—348.
5 张玉梅, 孙学斌, 高旭年, 等. 紫外分光光度法测定大豆总异黄酮的含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(4): 7—8.

6 鞠兴荣, 袁建, 汪海峰. 三波长紫外分光光度法测定大豆异黄酮

含量的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(5): 46—48.

DETERMINATION OF SOYBEAN ISOFLAVONE WITH ULTRA—VIOLET SPECTROPHOTOMETRY

Yuan Jinbin¹ Lu Jianzhong²

(1. *Pharmacy Research Centre for TCM, Jiangxi University of Traditional
Chinese Medicine, Nanchang 330006; 2. Technology Department, Jiangzhong
Pharmacy Group, Nanchang 330077*)

Abstract A UV spectrophotometry used for determination of soybean isoflavone was established. Genistein was selected as the reference material, and the samples were determined at 325 nm. Influencing factors were discussed and optimized. The total content of soybean isoflavones in soybean extracts is 38.1 % with mean recovery 102.3 %, and the result for the function food is 4.76 % with mean recovery 99.9 %. This method is suitable for the routine analysis and quality control of the function food with easy—to—handle, good accuracy and reproducibility.

Key words Soybean isoflavone; UV spectrophotometry; Determination