

紫外分光光度法测定大豆中异黄酮的含量

黄芸,崔力剑²,窦玉红²,王鑫国²,牛丽颖²

(1. 河北医科大学生药学教研室, 石家庄 050017; 2. 河北医科大学中医学院, 石家庄 050091)

摘要 建立一种测定大豆中异黄酮类成分含量的紫外分光光度法分析方法。以染料木素为对照品, 利用染料木素与氢氧化钠产生反应, 在 271 nm 波长处有最大吸收峰, 用紫外分光光度法测定大豆中总异黄酮的含量。大豆中总异黄酮的含量为 4.784 mg/g, 加样回收率为 100.9%, 相对标准偏差为 2.0%。方法简便、准确、重现性好, 可作为检查大豆中异黄酮的含量的一种手段, 适用于大豆及其保健品的日常分析和质量控制。

关键词 大豆异黄酮; 氢氧化钠; 分光光度法; 含量测定

中图分类号 TS207.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0273-03

DETERMINATION OF SOYBEAN ISOFLAVONES WITH ULTRA-VIOLET SPECTROPHOTOMETRY

HUANG Yun¹, CUI Li-jian², DOU Yu-hong², WANG Xin-guo², NIU Li-ying²

(1. Department of Pharmacognosy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091)

Abstract A UV spectrophotometry used for determination of soybean isoflavones was established. Genistein was selected as the reference substance. Based on the reaction of genistein and NaOH, which has the maximum absorption in 271 nm wavelength, ultra-violet spectrophotometry method was used for determination of isoflavones in *Glycine max* (L.) Merr.. The total content of isoflavones in soybean extracts was 4.784 mg/g with mean recovery 100.9%, and the RSD was 2.0%. The method is suitable for the routine analysis and quality control of the soybean and function food with easy-to-handle, good accuracy and reproducibility.

Key words Soybean isoflavones; NaOH; UV spectrophotometry; Quantitative determination

大豆是豆科植物大豆(*Glycine max*(L.) Merr.)的成熟种子, 大豆中含有的大豆异黄酮是一类重要的生理活性物质, 具有多种生理功能, 如抗肿瘤作用; 对血管的防护作用; 雌激素双向调节作用; 预防骨质疏松症; 较强的抗氧化活性和抗真菌活性

等^[1,2]。

现在已有不少关于大豆异黄酮含量的测定方法, 如高效液相色谱法、毛细管电泳法和酶联免疫吸附分析法等^[3,4]。这些方法需要设备昂贵, 且操作繁杂。此外还有用紫外分光光度法测定总大豆异黄

酮的报道,且含量测定时多以甲醇或乙醇作为溶剂^[5-7],而大豆异黄酮溶解性较差而使其准确性受到限制。本实验利用染料木素与氢氧化钠产生反应,溶解度增加,并在 271 nm 波长处产生最大吸收峰的特性,采用紫外分光光度法在 271 nm 波长处测定大豆中异黄酮的含量,建立一种测定大豆中总异黄酮含量的新方法。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

λ -2 紫外分光光度仪,美国 PE 公司。RE-52A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂。

正己烷(A.R),天津化学试剂厂;无水乙醇(A.R),天津化学试剂厂;氢氧化钠(A.R),河北辛集化工厂;染料木素对照品(含量约为 98%),Sigma 公司。大豆购自石家庄市乐仁堂药店,经河北医科大学严玉萍副教授鉴定为正品,留样凭证存放于河北医科大学中医学院药用植物教研室。

1.2 测定程序

1.2.1 样品溶液制备^[8] 取符合实验要求的大豆,粉碎,过 10 目筛,精密称取 5 克。加正己烷 40 mL 超声震荡脱脂 25 min,弃去正己烷,重复一次。残渣加入 50 mL 70% 乙醇溶液,85 °C 热回流提取 3 次,每次 1 h,收集提取液。减压回收溶剂至干,加 NaOH(0.01 mol/L)溶液溶解,定容为 250 mL,作为供试品液。精密移取供试品液 2 mL 置 100 mL 量瓶中,加 NaOH(0.01 mol/L)溶液定容至刻度,摇匀。平行操作三份。

1.2.2 标准曲线绘制 精密称取 120 °C 干燥至恒重的染料木素 10.2 mg,置 50 mL 容量瓶中,加 0.01 mol/L NaOH 溶液定容至刻度,摇匀。精密吸取此溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 分别置于 100

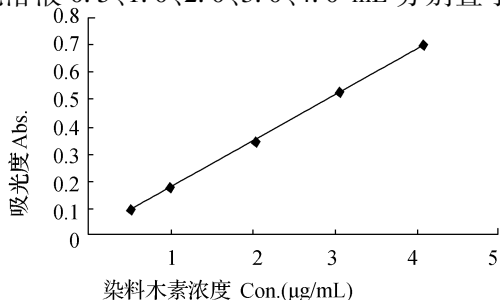


图1 染料木素标准曲线

Fig.1 Standard curve of genistein

mL 容量瓶中,加 0.01 mol/L NaOH 定容至刻度,摇匀,以 0.01 mol/L NaOH 溶液为空白溶液,在 271 nm 处测吸收度。以吸收度(Y)为纵坐标,染料木素浓度($\mu\text{g/mL}$)(X)为横坐标绘制标准曲线,结果表明染料木素浓度与吸收度呈良好线性关系。回归方程为 $Y = 0.1698X + 0.0059$, $r = 1.0000$ 。

1.2.3 样品测定 以 0.01 mol/L NaOH 溶液为空白溶液,在 271 nm 处测吸收度。每个样品重复测定 2 次。

2 结果与讨论

2.1 溶剂的选择

从染料木素的结构特点及理化性质可知,其具有强疏水性,难溶于水、稀盐酸等,微溶于甲醇、乙醇。选择上述溶液作为染料木素的溶出介质不适宜。根据染料木素及异黄酮类化合物的理化特性(结构中含有酚羟基呈现弱酸性,易溶于稀碱),选择稀氢氧化钠(0.01 mol/L)溶液溶解大豆提取物中异黄酮类化合物,是简便可行的。

2.2 波长选择

经过对照品紫外扫描图谱可得知,最大吸收峰都在 271 nm,且最大吸收峰周围干扰较小,我们就把 271 nm 作为测定波长。

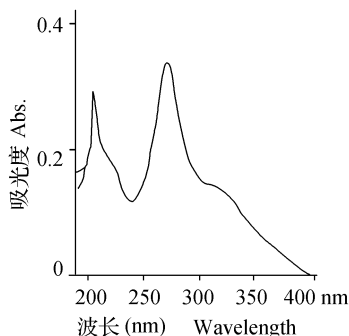


图2 染料木素紫外扫描图

Fig.2 UV spectra of genistein

2.3 线性关系考察

本法中,染料木素在 0.51 ~ 4.08 $\mu\text{g/mL}$ 范围呈良好线性关系(图 1),相关系数 $r = 1.00$,测定上限可达 8.0 $\mu\text{g/mL}$,下限为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 加样回收率

精密吸取标准品溶液 25、50、25、50、25 μL ,分别置 5 只 5 mL 容量瓶中,再分别精密加入供试液 300 μL ,0.01 mol/L NaOH 定容至刻度,摇匀,按“1.2.3”项操作,计算回收率,结果平均回收率为

100.9%,RSD 为 2.0%。

表 1 加样回收率

Table 1 Recovery test

编号	加入量(μg)	测定值(μg)	回收率(%)
No.	Added	Determined	Recovery
1	2.55	2.49	99.2
2	5.10	5.21	102.2
3	2.55	2.59	101.6
4	5.10	5.01	98.2
5	2.55	2.63	103.1
平均回收率(%)		100.9	
Average recovery(%)			
RSD(%)		2.0(n=5)	

2.5 精密度试验

精密度实验 精密吸取标准品溶液 100 μL,分别置 5 只 5 mL 容量瓶中,加 0.01 mol/L NaOH 定容至刻度,摇匀,按“1.2.3”项操作,测定吸收度,RSD 为 1.3%。

2.6 样品测定

取已制备好的三份样品溶液测定,每份样品按测定程序测定 2 次,以染料木素计量大豆异黄酮含量,所得结果如表 2。

表 2 样品中大豆异黄酮含量

Table 2 The content of isoflavones in samples

编号	吸光度	含量(mg/g)	平均值(mg/g)	RSD(%)
No.	Absorbency	Content	Average	
1	0.332	4.801	4.784	2.4(N=6)
	0.341	4.934		
2	0.321	4.639		
	0.327	4.728		
3	0.338	4.890		
	0.326	4.713		

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,适用于大豆异黄酮的质量检测和测定,尤其是生产过程的质量控制。

采用稀碱溶液溶解异黄酮,增加了异黄酮的溶解度,使得大豆异黄酮含量测定准确度大大提高。同时由于大豆异黄酮与碱发生反应,使得其自身最大吸收波长发生红移,这使得紫外吸收峰远离末端吸收,也提高了大豆异黄酮含量测定准确度。

- [1] 牛丽颖,王鑫国,葛喜珍,等. 淡豆豉提取物降糖有效部位研究[J]. 中药药理与临床,2002,20(5):21-22.
- [2] C. Lee Holder, Mona I. Churchwell, Daniel R. Doerge. Quantification of Soy Isoflavones, Genistein and Conjugates in Rat Blood Using LC/ES-MS[J]. Agriculture Food Chemistry. ,1999,47:3764-3770.
- [3] 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(2):118-120.
- [4] G S Mcleod , M J Sheperd. Determination of the ionization constants of isoflavonrs by capillary electrophoresis [J]. Czech Journrd of Food Science,1999,17(2):61-67.
- [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] 崔力剑,黄芸,杜淑娟,等. 紫外分光光度法测定淡豆豉中异黄酮的含量[J]. 河北中医药学报,2004,19(3):32-33.
- [7] 袁金斌,卢建中. 紫外分光光度法测定大豆总异黄酮的含量[J]. 大豆科学,2004,23(2):147-150.
- [8] 窦玉红,崔力剑,黄芸,等. 正交设计优选淡豆豉中总异黄酮的提取工艺[J]. 河北中医药学报,2006,21(2):33-35.