

紫外分光光度法测定豆渣提取物中大豆异黄酮含量的研究

何恩铭, 沈瑞池, 王伟, 常强, 管齐扬

(福建省亚热带植物研究所, 福建省植物生理生化重点公共实验室, 福建 厦门 361006)

摘要: 试验建立了一种测定豆渣提取物中大豆异黄酮含量的快速分析方法。以染料木素为标准品, 采用紫外分光光度计在 260 nm 处测定豆渣提取物中大豆异黄酮的含量, 回归方程为 $C = 8.0527A - 0.0532$, $R^2 = 0.9995$, 线性范围: $1.31 \sim 11.79 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均回收率 100.13%, 相对标准偏差 0.86%。该方法具有操作简单、快速, 测定准确率高、重现性好等特点, 适于生产上快速测定大批量豆渣提取物样品中大豆异黄酮的含量。

关键词: 大豆异黄酮; 紫外分光光度法; 豆渣

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)06-0818-03

Determination of Isoflavones in Extraction of Soybean Dregs Using Ultraviolet Spectrophotometry

HE En-ming, SHEN Rui-chi, WANG Wei, CHANG Qiang, GUAN Qi-yang

(Fujian Key Laboratory of Physiology and Biochemistry for Subtropical Plant, Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361006, China)

Abstract: A method was established for fast determination of isoflavones in extraction of soybean dregs. Genistein was selected as the reference standard and the samples of extraction of soybean dregs were determined at 260 nm using ultraviolet spectrophotometry. Regression equation was: $C = 8.0527A - 0.0532$, $R^2 = 0.9995$, the linear range was $1.31 \sim 11.79 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the average recovery was 100.13%, $RSD = 0.86\%$. The method has the virtue of simplicity and rapid of operation, high accuracy and good reproducibility, which can be used in production for the rapid determination of isoflavones in extraction of soybean dregs, and provide a reference in soybean isoflavones determination of other samples.

Key words: Soybean isoflavones; Ultraviolet spectrophotometry; Soybean dregs

大豆异黄酮(soy isoflavone)是大豆生长过程中形成的一类次级代谢产物。相关研究发现,大豆异黄酮对人体具有多种生理功能,可预防骨质疏松症,作为雌性激素替代品改善女性更年期综合症、降低绝经妇女的血脂水平,还具有抗菌、降低患乳腺癌的风险、预防前列腺癌等多种功能^[1-6],是一种很有潜力的癌症化学预防剂。

大豆异黄酮含量的测定方法较多,如:纸色谱法、薄层色谱法、气相色谱法和高效液相色谱法(HPLC)等^[7-8]。纸色谱法、薄层色谱法存在定量不准确,分离效果差等不足;气相色谱法操作较繁琐,容易受杂质干扰;HPLC法能较准确地检测几种主要类型的大豆异黄酮,但设备运行费用较高,检测时间较长,特别是在摸索提取工艺条件过程中需要多次及时地检测提取物中大豆异黄酮的含量,不利于生产上大规模操作,因此寻找一种大豆异黄酮的快速测定方法显得尤为重要。

豆渣是大豆加工中的副产物之一,产量丰富,目前主要是当作饲料用或肥料处理掉,利用率极

低。研究表明,豆渣中同样含有异黄酮^[9],作为黄酮醇类化合物,大豆异黄酮在紫外光区有较强吸收。现基于超声波辅助提取法^[10]对豆渣中的大豆异黄酮提取工艺,采用紫外分光光度法快速分析测定豆渣提取物中的大豆异黄酮含量,以期为豆渣资源的综合利用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜豆渣(厦门银祥豆制品有限公司提供);染料木素(genistein)标准品(Sigma公司);石油醚(沸程 60~90℃,分析纯);95%乙醇(分析纯)。

UV-9100 紫外可见分光光度计(上海佳胜实验设备有限公司);SB25-12DTD 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);精密电子天平;索式提取器;旋转蒸发仪;冷却浸提装置;电热恒温水溶锅;万能粉碎机;烘箱;20 目标准筛等。

1.2 试验方法

1.2.1 标准品溶液的配制 精确称取染料木素标

收稿日期:2013-09-06

基金项目:厦门市重大科技创新平台项目(3502Z20131004);福建省亚热带植物研究所科研基金(2013S004);福建省公益类科研院所基本科研专项(2011R1101022-3);国家自然科学基金(30970126)。

第一作者简介:何恩铭(1980-),男,博士,助理研究员,主要从事植物学相关研究。E-mail:heenming@gmail.com。

准品 1.31 mg,置于 10 mL 容量瓶中,以 95% 乙醇溶解,并定容至刻度,摇匀,浓度为 $131 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 样品液的制备 新鲜豆渣在 60°C 条件下鼓风干燥 48 h 至恒重,过 20 目筛,用石油醚脱脂 24 h,去除滤液,烘干滤渣。采用超声波法^[10]提取豆渣中大豆异黄酮,称取已处理豆渣粉 5.0 g(过 20 目筛),溶于 40 mL 80% 的乙醇溶液中,提取温度 60°C ,超声提取时间为 30 min,提取液过滤,置于 50 mL 容量瓶中,95% 乙醇定容至刻度。

1.2.3 测定波长的选择 分别取适量配好的标准溶液和样品液,用 95% 乙醇稀释至适宜浓度,以 95% 乙醇作空白对照,在紫外区波长为 190 ~ 400 nm 的范围内进行扫描,采样间隔 1 nm,中速,根据其紫外吸收光谱图确定样品的测定波长。

1.2.4 标准曲线的绘制 精密吸取 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 mL 标准溶液分别置于 10 mL 的容量瓶中,各加 1.0 mL 95% 乙醇,再加蒸馏水定容至刻度,摇匀。以 1.0 mL 95% 乙醇加蒸馏水定容至 10 mL 的溶液作为空白对照(下同),在 260 nm 处测量溶液

的吸光度,重复 3 次,测定结果取平均值。以吸光度 A 为横坐标,染料木素浓度 $C(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为纵坐标,绘制标准曲线,用最小二乘法线性回归得标准曲线方程。

1.2.5 样品中大豆异黄酮的测定 精密吸取待测样品液 1.0 mL,置于 10 mL 的容量瓶中,加 1.0 mL 95% 乙醇,蒸馏水定容至刻度。在 260 nm 处测量定容后溶液的吸光度,重复 3 次,测定结果取平均值。根据标准曲线的回归方程,计算出大豆异黄酮的含量。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

从 190 ~ 400 nm 之间扫描的紫外吸收光谱图可以看出,染料木素标准品溶液在 260 nm 处有最大紫外吸收;样品液在 259 nm 处有最大紫外吸收,二者的最大紫外吸收波长大体一致(图 1)。由于定量分析建立在染料木素标准品溶液的基础上,故取 260 nm 作为紫外检测波长。

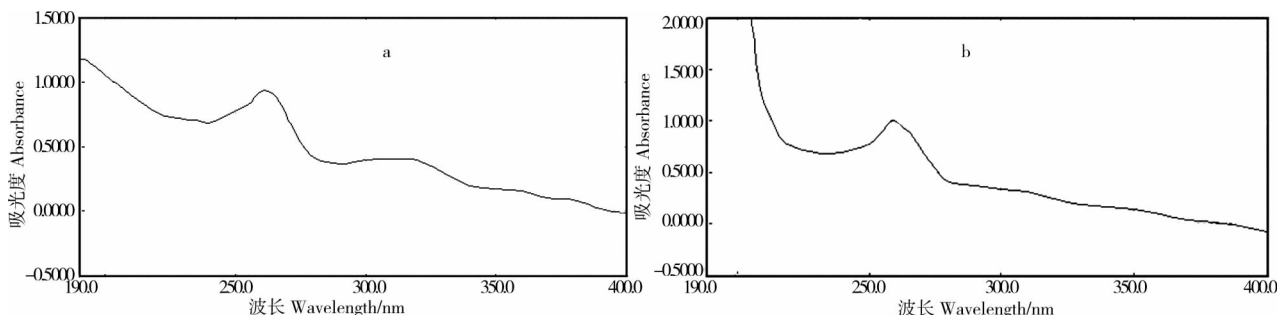


图 1 标准品溶液(a)和样品液(b)的紫外吸收光谱图

Fig. 1 UV absorption spectrum of the reference standard(a) and the sample(b)

2.2 标准曲线的绘制

以吸光度 A 为横坐标,染料木素浓度 C 为纵坐标绘制标准曲线(图 2),用最小二乘法进行线性回归,得回归方程为 $C = 8.0527A - 0.0532$, $R^2 = 0.9995$ 。

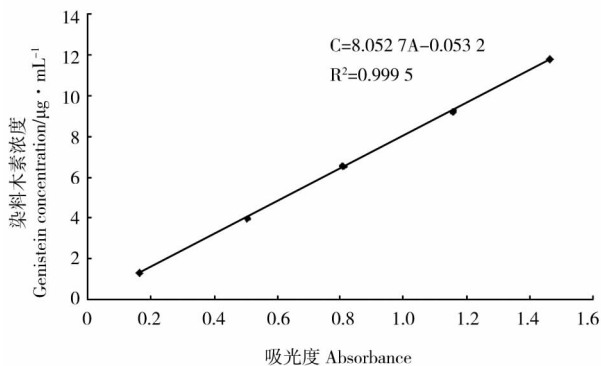


图 2 标准曲线

Fig. 2 The standard curve

2.3 精密度试验

精密吸取 0.5 mL 标准溶液于 10 mL 容量瓶中,加入 95% 乙醇 1.0 mL,蒸馏水定容;分别吸取 6 份 1 mL 定容后的溶液于石英比色皿中,连续在 260 nm 处测量其吸光度,计算吸光度的标准偏差和相对标准偏差。以测定次数为横坐标,吸光度为纵坐标绘图(图 3),在线性范围内,6 次测量结果的平均吸光度为 0.8082,标准偏差为 0.0023,相对标准偏差为 0.28%。由于上述误差在可以接受的范围内,说明试验的重现性较好,紫外分光光度法测定豆渣提取物中大豆异黄酮具有良好的精密度。

2.4 重复性试验

精密吸取 0.5 mL 样品溶液 6 份,置于 6 个 10 mL 容量瓶中,各加 95% 乙醇 1.0 mL,蒸馏水定容;在 260 nm 处测量其吸光度,以测定次数为横坐标,吸光度为纵坐标绘图,计算相对标准偏差。由图 4 可知,在线性范围内,6 次测量的平均吸光度为

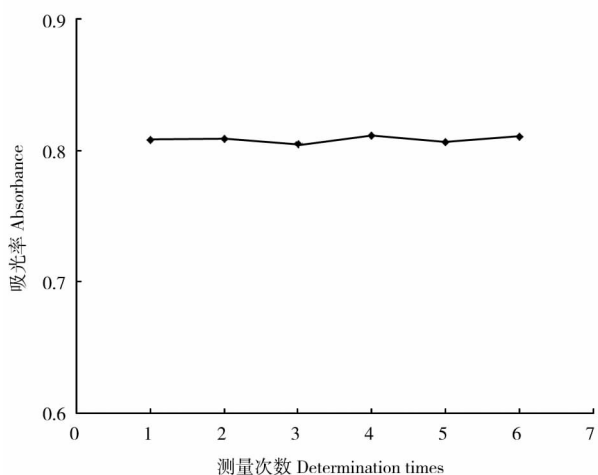


图3 标准溶液测定次数与吸光度的关系

Fig. 3 Relationship between determination times of standard solution and absorbance

0.962 4, 标准偏差为 0.003 5, 相对标准偏差为 0.36%, 试验的重现性较好。

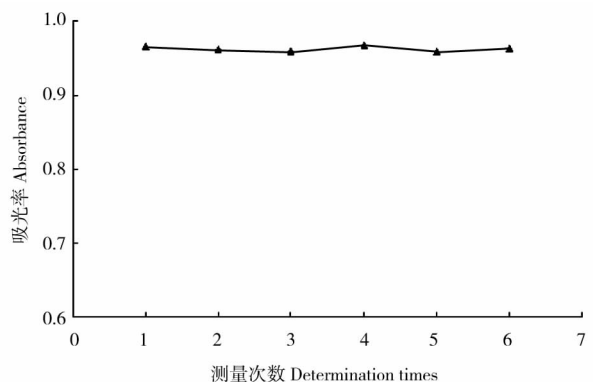


图4 样品溶液测定次数与吸光度的关系图

Fig. 4 Relationship between determination times and absorbance

2.5 稳定性试验

精密吸取 0.5 mL 新鲜配制的标准溶液和样品溶液各 6 份, 置于 12 个 10 mL 容量瓶中, 各加 95% 乙醇 1.0 mL, 蒸馏水定容至刻度; 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 在 260 nm 处测量溶液的吸光度 A, 确定其稳定性, 结果如图 5 所示。

标准溶液 6 次测量结果的平均吸光度为 0.802 2, 标准偏差为 0.007 6, 相对标准偏差为 0.95%; 样品溶液 6 次测量结果的平均吸光度为 0.962 1, 标准偏差为 0.002 8, 相对标准偏差为 0.29%; 表明标准溶液和样品溶液在 24 h 之内是稳定的, 所以 24 h 之内测定提取液的吸光度是可行的。

2.6 加样回收率试验

精密吸取 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 mL 标准品溶液, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 各加 95% 乙醇 1.0 mL, 再分别加入 1.0 mL 样品溶液, 蒸馏水定容。将

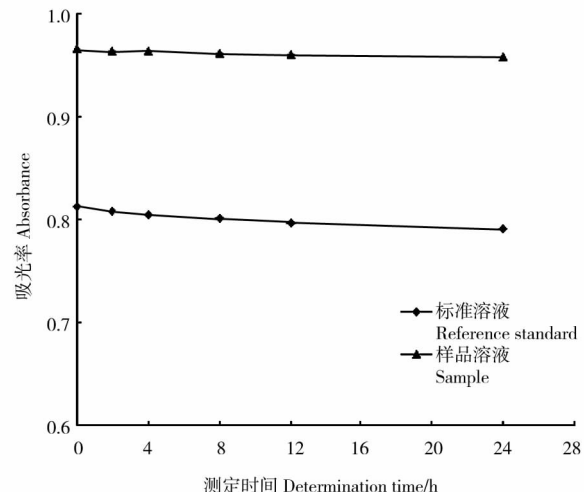


图5 测定时间与吸光度的关系图

Fig. 5 Relationship between determination time and absorbance

配好的 5 份溶液分别在 260 nm 下测量吸光度, 计算回收率。由表 1 可知, 回收率平均值为 100.13%, 相对标准偏差为 0.86%, 表明此方法的回收率良好。

表1 加样回收率的测定结果

Table 1 Determination results of recovery

样品编号 No.	样品含量 Sample content/ μg	加入量 Amount μg	测得量 Measure μg	回收率 Recovery /%
1	77.60	13.10	91.29	100.65
2	77.60	39.30	116.53	99.68
3	77.60	65.50	144.16	100.74
4	77.60	91.70	171.15	101.09
5	77.60	117.90	193.57	99.01

3 结论

试验建立了一种采用紫外分光光度快速检测豆渣提取物中大豆异黄酮含量的方法。以染料木素为标准品, 在其紫外最大吸收峰 260 nm 处测定豆渣提取物中大豆异黄酮的含量, 得回归方程为 $C = 8.052 7A - 0.053 2$, $R^2 = 0.999 5$, 线性范围 $1.31 \sim 11.79 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均回收率达 100.13%, 相对标准偏差为 0.86%。该方法具有操作简单、快速, 测定准确率高、重现性好、成本低等特点, 适于生产上快速检测大批量豆渣提取物样品中大豆异黄酮的含量, 该方法也可为其他样品中大豆异黄酮的测定提供借鉴。

(下转第 824 页)