

紫外分光光度法测定大豆总异黄酮的含量*

张玉梅¹ 孙学斌¹ 高旭年² 崔洪斌¹

(1. 哈尔滨医科大学, 黑龙江 哈尔滨 150001;

2. 黑龙江中医药大学中医药研究部, 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要: 为建立一种检测食物中大豆异黄酮含量的快速分析方法, 以大豆中的活性成分金雀异黄酮为标准品, 在其紫外最大吸收峰 259 nm 处测定大孔吸附树脂法配合溶剂法提取制得的大豆异黄酮试样的含量, 大豆异黄酮试样中总异黄酮的含量以金雀异黄酮计算为 38.7%。平均加样回收率为 99.86%, 相对标准偏差为 2.6%, 方法简便, 重现性好, 可作为检测大豆异黄酮含量的一种手段。

关键词: 分光光度法, 紫外线 大豆 异黄酮类 食品分析

中图分类号: R15, O657.32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2000)04-0007-03

大豆异黄酮(soybean isoflavones, 简称 ISO) 是一类从大豆中分离提取的主要活性成分, 具有异黄酮类化合物的典型结构。目前发现的大豆异黄酮共有 12 种, 分为游离型的甙元(aglycon) 和结合型的糖甙(glucoside) 两类, 主要活性成分为两种含量较高的甙元成分: 金雀异黄酮(genistein) 和大豆素(daidzein)。^[1] 生物活性研究表明, ISO 特别是其中的金雀异黄酮和大豆素, 具有抗氧化、抗肿瘤、改善心血管功能、抗骨质疏松等功效。大豆及其豆制品一直为东方人的传统食物, 膳食中的大豆异黄酮与东方人(日本、中国) 癌症和心血管疾病的低发直接相关。^[2,3] 近年来, 大豆异黄酮的生理活性已越来越引起社会和研究界的普遍重视, 以大豆异黄酮作为食品添加剂的食品和制品在日本比较普遍, 有些已走向欧美市场。国内关于大豆异黄酮的研究近些年来逐渐增多, 出现了一些以大豆异黄酮为食品添加剂的食品及保健食品、保健药品。Hendrich S 等甚至建议将大豆异黄酮作为一种新的营养素。^[4] 国外文献上关于大豆异黄酮的含量测定多采用 HPLC 法^[5] 或气相色谱-质谱(GC-MS) 联用方法,^[6] 分别测定大豆或其制品以及食用含大豆异黄酮食物的受试者血浆、尿液、粪便中异黄酮各种甙元的含量。这两种方法需要较多种类的单体标准品, 且操作不便。本文采用金雀异黄酮作为标准品, 采用紫外分光光度法测定大豆异黄酮的含量, 拟建立一种测定大豆异黄酮含量的新方法。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 DU-600 型光谱仪, 美国 BECKMAN 公司; 金雀异黄酮标准品, 含量为 99.999%, Sigma 公司; 95% 乙醇(AR), 天津化学试剂厂。

试样 大孔吸附树脂吸附纯化后提取制得的大豆异黄酮提取物, 浅黄棕色粉末, 味苦。

标准品溶液的配制 精密称取金雀异黄酮标准品 5.2 mg, 置入 25 mL 容量瓶中, 以 95% 乙醇溶解, 并定容至刻度, 摇匀。

试样溶液的配制 精密称取大豆异黄酮纯化物 10.4 mg, 置入 50 mL 容量瓶中, 以 95% 乙醇溶解, 并定容至刻度, 摇匀。

1.2 标准品及试样紫外吸收峰的扫描比较 将标准品及试样溶液在 BECKMAN 光谱仪上扫描 200~400 nm 处的吸收情况, 结果发现标准品及试样的最大吸收峰都在 259 nm, 且最大吸收峰周围干扰较少。

1.3 校正曲线的制备 精密吸取 0.05、0.10、0.15、0.20、0.30、0.40 mL 标准品溶液分别置于 10 mL 容量瓶中, 并各加 95% 乙醇 1.0 mL, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀。以 1 mL 95% 乙醇加水到 10 mL 作空白对照, 在 259 nm 处测得吸光度, 以测得的吸光度与纯品量得出校正曲线方程, 见表 1。

回归方程 $y = 0.2006 + 7.8118x$, $r = 0.9996$

* 本研究是国家自然科学基金项目“Genistein 对 iNOS 基因表达影响及其与抑制胃癌作用关系研究”的一部分

1.4 试样中大豆总异黄酮含量的测定 分别精密吸取试样液 0.3 mL 于 3 只 10 mL 容量瓶中, 以下照校正曲线制备项下操作, 在 259 nm 处测定吸光度, 计算平均值, 按校正曲线方程计算含量, 并计算试样的大豆异黄酮百分含量, 结果见表 2。

表 1 校正曲线与回归方程

编号	1	2	3	4	5	6	μg
纯品	0.52	1.04	1.56	2.08	3.12	4.16	y
A	0.0432	0.1080	0.1763	0.2735	0.3654	0.5131	x

表 2 试样中的大豆异黄酮含量

编号	1	2	3	平均值	含量 $\mu\text{g}/0.3 \text{ mL}$
A	0.2837	0.2873	0.2795	0.2835	2.4149

因此, 试样中大豆异黄酮的百分含量(以金雀异黄素计算)为 38.7%。

2 结果

精密度试验 精密吸取标准品溶液 0.2 mL, 分别置 5 只 10 mL 容量瓶中, 照校正曲线项下操作, 测定吸光度, RSD 为 2.6%。

回收率试验
精密吸取 0.1、0.2、0.1、0.2、0.2 mL 标准品溶液于 5 只 10 mL 容量瓶中, 再

表 3 加样回收率试验

	1	2	3	4	5	平均 RSD
加标准品质量	1.04	2.08	1.04	2.08	2.08	
0.3 mL 试样中相当金雀异黄素的质量	2.4149	2.4149	2.4149	2.4149	2.4149	
A	0.3665	0.4965	0.4932	0.4988	0.3625	
测得相当金雀异黄素的质量	3.4679	4.4921	4.4663	4.5046	3.4489	
回收率 %	101.25	99.87	98.63	100.47	99.08	
平均回收率 %	99.86					1.06%

分别精密加入试样液 0.3 mL, 照校正曲线制备项下操作, 计算加样回收率, 结果见表 3。

3 讨论 金雀异黄素为 5, 7, 4- 三羟基异黄酮, 含有多个共轭结构。^[1] 分析推测其可能具有紫外吸收, 经测定, 其在 259 nm 处有最大吸收, 与标准品紫外吸收峰比较, 试样液也在此波长处有最大吸收, 因此确定含量测定波长为 259 nm。

本测定方法参照中国药典 1995 年版一部葛根项下葛根及其制剂中异黄酮含量测定的方法, 因为葛根和大豆均为豆科植物, 其中的黄酮类成分均属于异黄酮成分, 且结构相似, 中药葛根中含有大豆素、黄豆黄素、大豆甙, 大豆中也含此类成分。因此参照葛根中异黄酮测定方法^[7] 选用紫外分光光度法测定大豆异黄酮的含量, 该方法简单、快速, 适用于所有含大豆异黄酮的保健食品和保健药品的质量检测和测定。

如果测定试样为保健食品, 参照文献方法,^[8] 可低温真空或冷冻干燥后, 精密称取一定量的干燥试样, 置于索氏提取器中, 以甲醇回流提取, 提取物浓缩、干燥后, 以 95% 乙醇定容即可。

参考文献:

- [1] Wang H J, Murphy P A. Isoflavone content in commercial soybean foods[J]. Agric Food Chem, 1994, 42(8): 1666~ 1743
- [2] Elaine W, Raines, et al. Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy[J]. J Nutr, 1995, 125: 624~ 630
- [3] Herman C, Adlercreutz T, et al. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk[J]. J Nutr, 1995, 125: 757~ 770
- [4] Hendrich S, Lee K W, et al. Defining food components as new nutrients[J]. J Nutr, 1994, 124: 1789~ 1792
- [5] Wang G, Kuan, et al. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products [J]. J Agric Food Chem, 1990, 38: 185~ 190
- [6] Xu X, Wang H J, et al. Daidzein is more bioavailable isoflavone than is genistein in adult women[J]. J Nutr, 1994, 124: 825~

[7] 孟宪抒主编. 中成药分析[M]. 北京, 人民卫生出版社, 1990

[8] Kudou S, et al. Isoflavone glycosides in soybean seeds(*Glycine max* Merrill)[J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55: 2227~ 2233

Detection of soybean isoflavones by the method of ultraviolet spectrophotometry / Zhang Yumei, Sun Xuebin, Gao Xunian, et al. // Chinese Journal of Food Hygiene. – 2000, 12(4):~

A method was developed for rapid determination of isoflavone in soybean, based on: extraction of amberlyst-solvent; genistein as reference standard; and determination by ultraviolet spectrophotometry. The results was that the isoflavones content in samples was 38.7 percent calculated by genistein, the recovery rate was 99.86% and the relative standard deviation was 2.6%. It is concluded that this method is suitable for rapid and accurate analysis of isoflavones in soybean.

Author's address Zhang Yumei, Harbin Medical University, 150001 PRC

Key words Spectrophotometry– Ultraviolet GLYCINE MAX Isoflavones Food Analysis

卫生部司(局)文件 卫法监食发[2000]第7号

卫生部法监司关于制止非法生产经营 “御芝堂清脂素”的紧急通知

各省、自治区、直辖市卫生厅(局):

最近, 我司接到消费者关于使用“御芝堂清脂素”出现不良反应的投诉。经查实, 该产品标签上标注的“湘卫食准字(1997)第062号”批准文号已于1998年被湖南省卫生厅宣布作废;“粤卫食健申(1998)第44号”为无效的申请号。该产品生产企业未取得卫生许可证, 非法从事食品生产经营活动, 其产品未经卫生部审批, 擅自进行预防疾病、减肥等功效宣传, 误导消费者, 严重违反《中华人民共和国食品卫生法》和《保健食品管理办法》。为保证广大群众的健康、规范保健食品生产经营活动, 根据《中华人民共和国食品卫生法》和《保健食品管理办法》的有关规定, 要求各地对“御芝堂清脂素”的非法生产经营活动立即进行查处, 特通知如下:

一、各级卫生行政部门要认真贯彻《卫生部关于严厉制止保健食品夸大宣传的紧急通知》的精神, 做好开展保健食品的监督检查工作。对检查中发现的非法生产经营“御芝堂清脂素”的有关单位要依法查处, 并责令立即公告收回已售出的食品。

二、各地要严肃查处违法食品生产经营活动, 并及时将本地食品卫生监督检查的情况及时向社会通报。

卫生部卫生法制与监督司

二〇〇〇年一月十三日