

文章编号:1671-6833(2009)04-0062-03

# 大豆废料中金雀异黄素含量测定方法的比较

李 华, 李 丹

(郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001)

**摘 要:** 采用乙醇-水溶液从大豆废料中提取大豆异黄酮, 初步纯化后, 用 AB-8 大孔吸附树脂进行梯度洗脱得到纯度较高的金雀异黄素养液. 样品通过薄层色谱法、紫外分光光度法和高效液相色谱法 3 种方法测定并做了比较. 结果表明: 薄层色谱法方法简单, 分离效果好; 通过紫外分光光度法绘制了标准曲线, 可计算样品浓度. 该方法准确度高, 精密度高, 重现性好. 加标回收率实验的相对平均偏差 RSD 为 1.04%, 精密度实验的相对平均偏差为 0.24%, 重复性实验的相对平均偏差为 0.09%; 高效液相色谱法分辨率高、灵敏度高等优点, 测得样品纯度为 90.1%.

**关键词:** 大豆异黄酮; 薄层色谱法; 紫外分光光度法; 高效液相色谱法; 测定

**中图分类号:** TQ 041<sup>+</sup>.7

**文献标识码:** A

## 0 引言

大豆异黄酮是存在于大豆中的生物活性物质, 是多酚类混合物. 大豆异黄酮的组成和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)<sup>[1]</sup>及 9 种结合型葡萄糖苷. 研究发现大豆异黄酮中最主要的活性成分为金雀异黄素, 它对人体具有多种生理功能.

实验利用豆渣提取大豆异黄酮<sup>[2-3]</sup>. 粗提液初步除杂后, 用 AB-8 大孔吸附树脂进一步纯化<sup>[4]</sup>得到纯度较高的金雀异黄素养液. 分别采用薄层色谱法<sup>[5]</sup>、紫外分光光度法<sup>[6]</sup>和 HPLC<sup>[7]</sup>来测定金雀异黄素, 并对 3 种方法的测定情况进行了比较, 以期检测实践提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

金雀异黄素标准品: SIGMA 公司, AB-8 大孔吸附树脂: 南开化工厂, 脱脂新鲜豆渣, 无水乙醇、环己烷、乙酸乙酯和氯仿均为分析纯, 甲醇为色谱纯, 5%  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液, 5% 盐酸, 5% 氢氧化钠, 6 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 盐酸, 浓硫酸等.

### 1.2 主要仪器与设备

WFZUV-2102 型紫外可见分光光度计, 尤尼柯仪器有限公司; HH-601 恒温水浴, 天津市泰斯特仪器有限公司; 101A-2 电热干燥箱, 上海申光仪表有限公司; 800 型离心沉淀器, R20 旋转蒸发器, 上海申生科技有限公司; P200 型高效液相色谱, 色谱柱 C<sub>18</sub> (4.6 m  $\times$  120 mm, 5  $\mu$ m), 大连依利特分析仪器有限公司; 玻璃层析柱:  $\Phi$ 15  $\times$  300 mm.

### 1.3 样品的制备

将湿豆渣干燥至恒重, 过筛得到约 420  $\mu$ m 大小的颗粒, 用环己烷脱脂. 称取豆渣 5.0 g, 加入 100 mL 体积分数为 70% 的乙醇溶液(下同), 提取 2 h, 提取两次. 合并提取液, 减压浓缩即得粗提液. 为得到较纯样品, 将粗提液脱脂、脱蛋白以后, 再去除色素和可溶性糖. 得到的液体浓缩后, 用 AB-8 大孔吸附树脂进行柱层析分离, 用不同浓度的乙醇-水溶液梯度洗脱, 收集 70% 乙醇洗脱液, 浓缩后即为例液.

## 2 结果与分析

### 2.1 薄层色谱法测定

将样液和金雀异黄素标准品分别定容至 10 mL, 各吸取 2  $\mu$ L 分别点于同一块硅胶 GF254 薄层板上, 以 V(氯仿): V(甲醇) = 9:1 为展开剂.

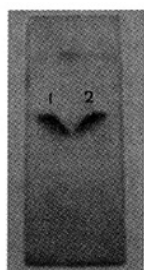
收稿日期: 2009-04-20; 修订日期: 2009-07-20

基金项目: 河南省教育厅自然科学基金资助项目(2006530004)

作者简介: 李 华(1967-), 女, 河南郑州人, 郑州大学副教授, 博士, 主要从事应用化学及天然产物分离的研究, E

- mail: Lihua@zzu.edu.cn.

挥干溶剂后,在碘蒸气中显色,如图1所示。



1:标准品 2:样液

图1 金雀异黄素的薄层色谱图

Fig.1 The TLC chromatograph of genistein

从薄层色谱图可以看出,收集的样液与金雀异黄素的标准品出现的斑点位置是一致的,说明样液中杂质较少.该方法测定方法操作简单方便,分离效果好。

## 2.2 紫外分光光度法测定

### 2.2.1 波长的确定

金雀异黄素结构中羟基和芳环形成较强的共轭体系,对紫外光有较强的特征吸收,故用紫外分光光度法对金雀异黄素进行含量测定.提取金雀异黄素的过程中,色素和醇溶性蛋白等杂质也被提取,提取液属多组分混合体系<sup>[8]</sup>.为了消除这些干扰,对粗提液进行了纯化.配制浓度为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的标准溶液,以体积分数为 75% 乙醇作空白对照在紫外区 (190 ~ 400 nm) 进行扫描,确定最佳吸收波长,结果如图2所示。

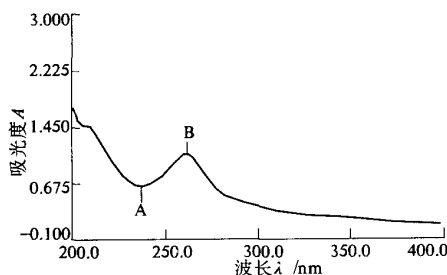


图2 标准品的紫外吸收光谱图

Fig.2 The ultraviolet absorption spectrum of standard genistein

扫描结果表明:图中A为金雀异黄素的最小吸收波长,B为金雀异黄素的最大吸收波长,最大吸收波长为 260 nm,所以此后测定均在 260 nm 波长下进行。

### 2.2.2 标准曲线的绘制

精密称取金雀异黄素标准品 5.0 mg 于

100 mL容量瓶中,然后用体积分数为 75% 乙醇溶解并定容,作为标准溶液。依次精密吸取 1,2,3,4,5,6,7 mL 标准溶液于 7 个 50 mL 容量瓶中,并用 75% 乙醇定容至 50 mL,摇匀.以 75% 乙醇作空白对照,在 260 nm 下测量各自的吸光度值 A.以 A 为横坐标,标准溶液浓度 C 为纵坐标绘制标准曲线,结果见图3。

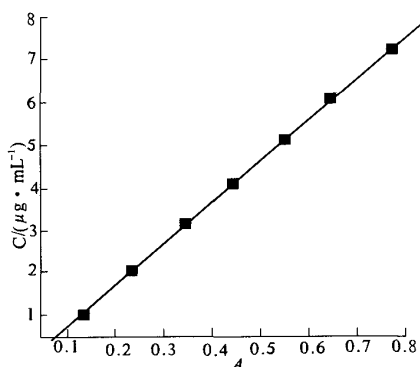


图3 标准品浓度 C 与吸光度 A 关系图

Fig.3 The relationship of standard sample concentration and absorbency

回归得方程:  $C = 9.7318 \times A - 0.2539$ . 其中  $R^2 = 0.9978$ , 在  $1.02 \sim 7.04 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性关系良好。

### 2.2.3 精密度实验

精密吸取 2 mL 标准溶液 6 份于 50 mL 容量瓶中,并用 75% 乙醇定容至 50 mL;然后将以上 6 份标准溶液在 260 nm 波长下测量其吸光度,计算平均偏差和相对平均偏差。

在实验范围内,标准溶液及光度的 6 次测量结果分别为 0.234, 0.233, 0.234, 0.234, 0.233, 0.234. 由测量结果可以看出,6 次吸光度值都在 0.23 附近,计算得到平均吸光度为 0.2337,平均偏差为 0.00055,相对平均偏差为 0.24%. 由以上结果可以得出,本实验中所采用的操作方法的误差在可以接受的范围内,实验的重现性较好,紫外分光光度法测定大豆异黄酮具有良好的精密度。

### 2.2.4 稳定性实验

精密吸取 3 mL 标准溶液 6 份于 25 mL 容量瓶中,定容至 50 mL 后在分别在 2,4,8,12,20,24 h 下依次在 260 nm 波长下测量其吸光度. 吸光度测量结果分别为 0.639, 0.639, 0.640, 0.639, 0.639, 0.639. 结果表明,大豆异黄酮的稳定性很好,这也与大豆异黄酮的性质相符合。

### 2.2.5 重复性实验

精密吸取 0.5 mL 样品溶液 6 份于 25 mL 容量瓶中,并用 75% 乙醇定容至 50 mL.

在 260 nm 波长下测量其吸光度,计算相对平均偏差.样品溶液的 6 次测量结果均在 0.44 左右,计算平均吸光度  $A$  为 0.440 3,平均偏差为 0.000 4,相对平均偏差为 0.09%.由以上结果可以得出本实验的重现性较好.

### 2.2.6 加标回收率实验

精密吸取 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL 标准溶液于 100 mL 容量瓶中,再分别精密加入 1 mL 样品溶液,将混合液在一定条件下用乙醇提取.所得溶液通过紫外分光光度法测量其吸光度,并计算回收率,结果如表 1 所示.

表 1 加标回收率

Tab.1 The recovery test

实验 序号	样品量 $m_0/\text{mg}$	加入量 $m_s/\text{mg}$	测出量 $m_x/\text{mg}$	回收率 $R/\%$	平均回 收率/%	相对标准 偏差 RSD/%
1	0.403	0.051	0.459	101.26		
2	0.403	0.101	0.503	99.86		
3	0.403	0.152	0.547	98.67	99.87	1.04
4	0.403	0.202	0.599	99.07		
5	0.403	0.253	0.659	101.47		

从表 1 可以看出:1~5 个样品的回收率  $R$  在 98.67%~101.47% 之间,其平均加标回收率为 99.87%,相对标准偏差 RSD 为 1.04%,该方法准确度较好.

### 2.3 高效液相色谱法测定

将样液配制成一定比例与标准品对照,用 HPLC 法来测定样液纯度.色谱条件:色谱柱  $C_{18}$  (4.6 mm  $\times$  120 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),采用  $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=50:50$ ,为流动相,室温,流速 0.6 mL  $\cdot$  min $^{-1}$ ,检测波长 260 nm.通过与标准品的对比得图 4 和图 5.

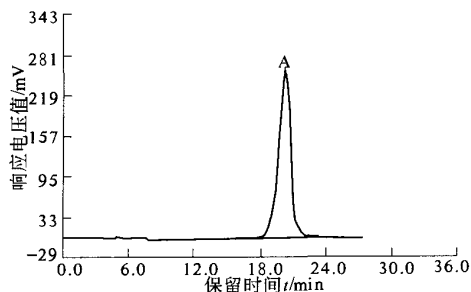


图 4 金雀异黄素标准品的 HPLC 色谱分析图

Fig.4 The HPLC chromatograph of genistein

黄素,与图 4 中的金雀异黄素标准品对照明显看出,高效液相色谱法可以将金雀异黄素与其他异黄酮分离开,并且可以得到纯度为 90.1% 的金雀异黄素.高效液相色谱法检测速度快、分辨率和灵敏度高,也是分离和提纯生物活性物质的有效手段.

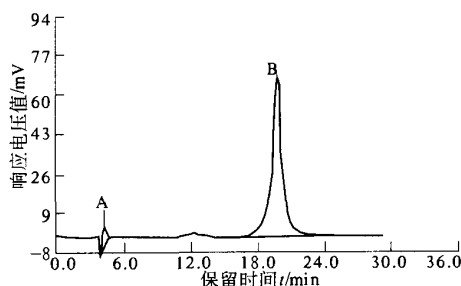


图 5 豆渣纯化液的 HPLC 色谱分析图

Fig.5 The HPLC chromatograph of purified solution from the waste residue of the soybean

## 3 结论

有机溶剂提取出来的大豆提取物成分复杂,每种成分的理化性质有一定程度交叉重叠而难以区分,所以样液先进行纯化.笔者用 SIGMA 公司金雀异黄素作为标准品,用薄层色谱法、紫外分光光度法和高效液相色谱法对金雀异黄素含量分别进行测定,并对 3 种测定方法做了比较.结果表明:薄层色谱法简单;紫外分光光度法准确度高,精密度高,重现性好,加标回收率实验的相对平均偏差为 1.04%,精密度实验和重复性实验的相对平均偏差分别为 0.24% 和 0.09%;高效液相色谱法分辨率高,灵敏度高.从比较结果可以看出,这些方法都具有检测方法简单、快速、准确度高和重现性好等优点,特别适于对提取分离工艺条件的试验研究,无需专用试剂,即可测定提取效率、流出曲线等指标,还可考察工艺条件的优劣.故这些方法均可作为检测金雀异黄素含量的有效手段,为工业生产提供一定的依据.

## 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 李 华.超声辅助法提取分离大豆皂苷的实验研究[J].食品工业科技,2007,29(5):168-171.
- [3] 李 华.微波辅助法从大豆废料中提取分离大豆皂苷的实验研究[J].食品科技,2007,33(4):230-233.

结果表明:图 5 中 A 为各种糖苷,B 为金雀异

(下转第 102 页)

(6):59-62.

Journal of Southeast University: English Edition. 2003,

- [8] YANG J. Study on low temperature performance of Gussasphalt on steel decks with hard bitumen [J].

19(2):210-214.

## Experimental Study on the Performance of High Modulus of Asphalt Mixture

LIU Qiang<sup>2</sup>, QIN Jian-jun<sup>2</sup>, WENG Xiao-lin<sup>1</sup>, DAI Jing-liang<sup>1</sup>, JIANG Yang-jun<sup>1</sup>

(1. Department of Highway, Chang'an University, Xi'an 710064, China; 2. Henan Zhongyuan Expressway Co., Ltd, Zhengzhou 450007, China)

**Abstract:** Aim to the hard asphalt mixture, 70 # asphalt mixture, SBS modified asphalt mixture were heat-stable (for the 0.7 MPa under 50 °C、60 °C、70 °C three temperature conditions of the rutting test), low temperature crack resistance (trabecular low temperature bending test), water stability (freeze-thaw fracturing tests, residual stability test), fatigue performance (APA fatigue test). the results show that, High modulus asphalt mixtures have better resistance to rutting performance. as the limit load is about 14 000 N. at -5 °C the high modulus asphalt mixture still has a good low-temperature anti-cracking performance. Freeze-thaw splitting results showed that AC-20C (30 #) asphalt mixture with a high intensity ratio of the freeze-thaw cleavage, with good water stability.

**Key words:** high modulus; asphalt mixture; performance; experimental study

(上接第 64 页)

- [4] 许永兴, 瞿海斌, 陈 赟, 等. 葛根素大孔吸附树脂层析分离动力学[J]. 高校化学工程学报, 2005, 19(6):751-752.
- [5] 赵胜利, 冀亚兰, 黄正云, 等. 愈风宁心片的薄层扫描定量法[J]. 中草药通报, 1979, 8(8):8-9.

- [6] 魏福华, 张永忠, 井乐刚, 等. 紫外分光光度法测定大豆中大豆异黄酮[J]. 理化检验-化学分册, 2006, 42(6):462.
- [7] 何莉萍, 沈 钧, 郝 俊, 等. HPLC 法测定豆制品中游离异黄酮的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2006, 42(4):255-299.

## Comparison of the Determination Methods for Genistein from the Waste Residue of the Soybeans

LI Hua, LI Dan

(School of Chemical and Energy Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** using ethanol-aqueous solution to extract soybean isoflaron from the waste residue of the soybean. After preliminary purification, high-purity genistein was obtained with AB-8 macroporous resin by gradient elution. Samples were determined method and compared with the TLC, UV and HPLC. The results showed that: The TLC method is simple and the separation is effective; the UV method was high accuracy, high precision and good reproducibility. The relative average deviation for the recovery test was 1.04%, the relative average deviation for the tests of precision was 0.24% and the relative average deviation for the repeatability test was 0.09%; the HPLC method was high resolution, high sensitivity, etc. The sample purity was 90.1%.

**Key words:** genistein; TLC; UV; HPLC; determination