

淡豆豉炮制前后异黄酮组分含量的比较

牛丽颖, 杜红娜, 刘 姣, 曹秀莲, 王鑫国

(河北医科大学中医学院, 河北 石家庄 050091)

摘 要:采用 HPLC 法对淡豆豉炮制前后大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素含量进行测定, 以探讨淡豆豉炮制前后异黄酮组分含量的变化。结果表明: 炮制对淡豆豉中异黄酮组分含量有明显影响, 炮制后大豆苷、染料木苷含量降低, 大豆苷元、染料木素含量升高。淡豆豉炮制后苷类成分含量降低, 苷元类成分含量升高, 提示淡豆豉的炮制存在由苷向苷元转化的过程。

关键词:淡豆豉; 高效液相色谱法; 大豆苷; 染料木苷; 大豆苷元; 染料木素

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)04-0672-03

Comparative Analysis of Isoflavone Contents in Semen Sojae Praeparatum Before and After Processing

NIU Li-ying, DU Hong-na, LIU Jiao, CAO Xiu-lian, WANG Xin-guo

(Traditional Chinese Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, Hebei, China)

Abstract: HPLC was adopted to determine the contents of daidzin, genistin, daidzein and genistein in Semen Sojae Praeparatum (SSP) before and after processing so as to explore the changes of isoflavone content. The results showed that processing had significant effect on isoflavone content, daidzin and genistin decreased while daidzein and genistein increased after processing. The decreasing of glucoside and increasing of aglycon indicated a conversion from glucoside to aglycon in SSP processing.

Key words: Semen sojae praeparatum (SSP); HPLC; Daidzin; Genistin; Daidzein; Genistein

淡豆豉 (Semen Sojae Praeparatum) 是由豆科植物大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 的成熟种子和青蒿、桑叶等中药经发酵加工而成的制品, 是我国特有的经固态发酵制备的中药之一。该品具有解表除烦, 宣发郁热等功效, 临床用于感冒、寒热、头痛, 烦躁、胸闷, 虚烦不眠等症的治疗^[1]。淡豆豉含有大豆中的 12 种异黄酮类组分, 分为游离型的苷元和结合型的糖苷两类, 其中含量较高的两种苷元成分为染料木素和大豆素, 含量较高的两种糖苷类成分为染料木苷和大豆苷。前期的研究表明, 淡豆豉中的异黄酮类成分具有明显的降血脂、降血糖、抗氧化、抗肿瘤的作用^[2-6], 其中游离型大豆异黄酮较之结合型的大豆异黄酮具有更强的生物活性。为探讨炮制对淡豆豉中异黄酮类组分含量的影响, 对淡豆豉炮制前后 4 种主要异黄酮类成分的含量进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司); Sartorius 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 101-1 电热鼓风干燥箱 (江苏海门县实验仪器厂); 电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司)。乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 试剂公司), 水为纯净水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 对照品及药材

大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素对照品, 均由中国药品生物制品检定所提供; 黑豆样品共 10 批, 来源河北省, 经河北省药品检验所鉴定为豆科植物大豆的成熟种子, 并按 2005 版《中国药典》(一部) 炮制方法制成淡豆豉。

收稿日期: 2008-02-28

作者简介: 牛丽颖 (1968-), 女, 教授, 主要从事中药物质基础研究工作。

通讯作者: 王鑫国, 教授。E-mail: wangxinguozy@163.com。

1.3 对照品与供试品溶液的制备

精密称取大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素对照品适量,用甲醇溶解,制成浓度分别为51.92、26.10、28.64、21.47 μg·mL⁻¹的溶液,作为对照品贮备液。精密量取贮备液5 mL,加甲醇稀释至10 mL,作为对照品溶液。

取淡豆豉药材粉末(过80目筛)0.5 g,精密称定,置50 mL量瓶中,精密加入石油醚(60~90℃)50 mL,回流提取1.5 h,滤过,弃去滤液,残渣挥干溶剂,精密加入70%乙醇50 mL,摇匀,称定重量,超声提取2 h,取出,放冷,用70%乙醇补足重量,摇匀,过滤,滤液蒸干,残渣加20 mL水溶解,上样于8 mL处理好的AB-8大孔吸附树脂,先用60 mL水洗脱,弃去水洗液,然后用80 mL 70%乙醇洗脱,收集醇洗液,蒸干,用70%乙醇溶解并定量转移至10 mL容量瓶中,定容至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得供试品溶液。

1.4 标准曲线的制备

精密量取对照品贮备液1、2、3、4、5 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液及储备液各10 μL,注入色谱仪,测定峰面积积分值。

1.5 加样回收率

精密称取已知含量的淡豆豉粉末,按高、中、低3个含量分别准确加入已知含量的大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素混合标样,各平行3份,按2.3项进行提取,并测定4个成分的含量。

2 结果与分析

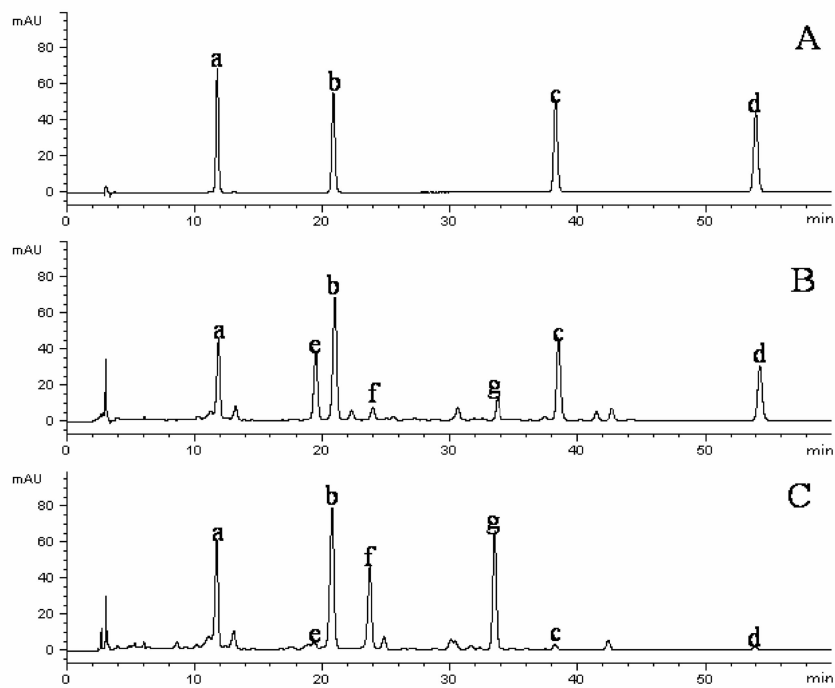
2.1 色谱条件的确定

色谱柱为HC-C18柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-3%冰醋酸,流动相A为乙腈,流动相B为3%冰醋酸水溶液,线性梯度表见表1。检测波长261 nm,柱温25℃,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量10 μL。所有组分均在60 min内检测完,对照品及样品分离良好。分离情况见图1。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution process

时间 Time/min	流动相 A Mobile phase A/%	流动相 B Mobile phase B/%
0	13	87
10	15	85
40	25	75
55	30	70
60	30	70



A. 对照品;B. 淡豆豉;C. 黑豆

a. 大豆苷;b. 染料木苷;c. 大豆苷元;d. 染料木素;e,f,g. 未知成分

A. Reference substances;B. Semen Sojae Praeparatum;C. Black bean

a. daidzin;b. genistin;c. daidzein;d. genistein;e,f,g. unaware ingredients

图1 对照品、黑豆和淡豆豉的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances, Semen sojae praeparatum and black bean

2.2 线性回归结果

以进样量(μg)为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,进行线性回归,得各组分的回归方程、相关系数及线性范围见表2。

表2 各组分的线性回归结果
Table 2 Results of linear relationship

对照品 Reference substances	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient/r	线性范围 Linear range/μg
大豆苷 Daidzin	$Y = 26.059X + 10.462$	0.9999	10.38 – 103.80
染料木苷 Genistin	$Y = 35.181X - 10.905$	0.9999	2.32 – 23.20
大豆苷元 Daidzein	$Y = 89.756X - 7.2494$	0.9999	6.40 – 64.00
染料木素 Genistein	$Y = 90.618X + 57.825$	0.9999	2.98 – 29.82

2.3 加样回收率结果

计算得大豆苷平均回收率为 100.03% ,RSD 为 1.03% (n = 9) ,染料木苷平均回收率为 99.57% ,RSD 为 0.68% (n = 9) ,大豆苷元平均回收率为

表3 淡豆豉及黑豆样品含量测定结果

Table 3 Quantitative analysis results of samples of Semen sojae praeparatum and black bean(μg·g⁻¹, n=3)

	淡豆豉样品 Semen sojae praeparatum				黑豆样品 Black bean			
	大豆苷 Daidzin	染料木苷 Genistin	大豆苷元 Daidzein	染料木素 Genistein	大豆苷 Daidzin	染料木苷 Genistin	大豆苷元 Daidzein	染料木素 Genistein
\bar{X}	439.7	388.7	255.7	142.5	569.4	475.5	18.7	11.7
RSD	13.48	12.61	8.15	7.06	33.34	26.39	4.12	3.23

3 讨论

黑豆,向有豆中之王的美称,为豆科植物大豆的黑色种子,并且是中药淡豆豉的原料。淡豆豉作为常用中药,历版《中国药典》均有记载。淡豆豉中异黄酮类组分具有抗氧化、抗肿瘤、改善心血管功能、抗骨质疏松等作用。近年来,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。研究表明,糖苷型异黄酮是由游离型异黄酮与一分子的葡萄糖以7—位氧苷键结合的产物,β-葡萄糖苷酶可作用于糖苷型异黄酮分子中的氧苷键,使其葡萄糖基团脱掉,供微生物代谢利用,从而使糖苷型异黄酮转化为生物活性更高的游离型异黄酮^[6-8]。研究亦表明,大豆异黄酮的生物活性主要体现在4种主要单体组分上,即染料木苷、大豆苷、染料木素和大豆苷元,尤其是其中的苷元类组分染料木素和大豆苷元具有更强的生理活性^[9-10]。为此,有必要考查炮制后4种异黄酮成分的含量变化,对淡豆豉的炮制工艺进行研究,以确定最佳发酵温度及发酵时间等工艺指标,使4种异黄酮成分含量均维持较高水平,从

99.52% ,RSD 为 1.38% (n = 9) ,染料木素平均回收率为 101.39% ,RSD 为 1.20% (n = 9) 。

2.4 样品测定

将制得供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按外标法计算供试品中大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素的含量。

由表3可见,不同产地的黑豆及其炮制的淡豆豉中4种异黄酮成分的含量相差不大,但黑豆经过炮制成为淡豆豉后,大豆苷、染料木苷含量降低,大豆苷元、染料木素含量升高,从图谱中还可以发现炮制后f号峰和g号峰峰面积减小,e号峰峰面积增大,由此可知,在炮制过程中,除部分苷转化成对应的苷元:大豆苷转化成大豆苷元,染料木苷转化成染料木素,还存在着f号峰、g号峰和e号峰的变化。

而使淡豆豉的价值得以充分体现。

通过对河北不同产地黑豆炮制前后四种异黄酮类组分含量的比较研究发现,炮制后大豆苷和染料木苷的含量降低,大豆苷元和染料木素的含量显著升高。可以认为炮制过程存在多种化学成分的相互作用,总体上来讲主要是由苷向转化苷元的过程。但各成分间具体如何变化,还有待于进行进一步的研究。

参考文献

[1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2005:230. (Chinese Pharmacopoeia Committee. China pharmacopoeia version(part one) [M]. Beijing: Chemical Industrial Press,2005:230.)
[2] 王鑫国,葛喜珍,白霞,等. 淡豆豉对去卵巢大鼠脂代谢的影响[J]. 中药材,2003,26(9):652-654. (Wang X G, Ge X Z, Bai X, et al. Effects of Semen sojae praeparatum on lipid metabolism in ovariectomized rat [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003,26(9):652-654.)
[3] 高淑丽,牛丽颖,曹秀莲,等. 淡豆豉提取物抗心肌缺血作用的研究[J]. 河北医药,2007,29(9):923-924. (Gao S L, Niu L Y, Cao X L, et al. Protective effect of fermented soybean extraction on myocardial ischemia in mice [J]. Hebei Medical Journal, 2007, 29 (9):923-924.)

(下转第 678 页)

为 10 μL 。

通过液相色谱检测,精确的分析了不同类型的8个大豆品种的大豆异黄酮含量,以及各单体组分的具体含量。结果表明大豆异黄酮含量在品种间有显著差异,其中吉农 17 和绿皮豆吉农 D4008 含量较高,分别达到了 6.6‰和 4.9‰,其中吉农 17 比已报道的日本品种 Suzuyutaka (3.6‰) 和美国品种 Lee (4.9‰) 都要高许多^[10],结果为以后大豆的综合开发利用提供了有效的参考依据。

参考文献

- [1] Kudou S, Fleury Y, Welti D, et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill) [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55(9): 2227-2233.
 - [2] 史琳娜, 苏宜香. 大豆异黄酮类对去卵巢大鼠骨丢失的影响 [J]. *营养学报*, 2000, 22(2): 113-118. (Shi L N, Su Y X. The influence of soybean isoflavones on bone loss in ovariectomized female rats [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2000, 22(2): 113-118.)
 - [3] Coward L, Barnes N C, Setchell K D R. Genistein, daidzein and their β -glucosidase conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41: 1961-1967.
 - [4] Messins M, Barnes S. The role of soy products in reducing cancer risk [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1991, 83: 541-546.
 - [5] Aedin C, Bryn H, Rosa M. Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80: 1044-1047.
 - [6] Holder C L, Churchwell M I, Doerge D R. Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 47: 3764-3700.
 - [7] Zhuo X G, Melby M K, Watanabe S. Soy Isoflavone intake lowers serum LDL cholesterol: a meta-analysis of randomized controlled trials in humans [J]. *American Society for Nutritional Sciences*, 2004, 6: 2395-2400.
 - [8] 李辉, 戴常军, 兰静, 等. 黑龙江省栽培大豆异黄酮含量的初步分析 [J]. *中国粮油学报*, 2007, 22(1): 38-40. (Li H, Dai C J, Lan J, et al. Primary analyse of isoflavones contents in Heilongjiang province soybean cultivars [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2007, 22(1): 38-40.)
 - [9] 刘延敏, 张援月. 大豆异黄酮提取方法的探讨 [J]. *中华实用中西医结合杂志*, 2004, 17: 2682-2683. (Liu Y M, Zhang Y Y. Discuss means of pick-up of soybean isoflavones [J]. *Chinese Journal of the Practical Chinese with Modern Medicine*, 2004, 17: 2682-2683.)
 - [10] 孙军明, 丁安林, 常汝镇, 等. 中国大豆异黄酮含量的初步分析 [J]. *中国粮油学报*, 1995, 10(4): 51-53. (Sun J M, Ding A L, Chang R Z, et al. Elementary analysis on isoflavone content in China soybean [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 1995, 10(4): 51-53.)
-
- (上接第 674 页)
- [4] 牛丽颖, 刘娇, 崔力剑, 等. 淡豆豉对早期动脉粥样硬化大鼠血管内皮损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(5): 120-122. (Niu L Y, Liu J, Cui L J, et al. Effects and mechanisms of semen sojae preparatum extracts on rats injury at the early stage of atherosclerosis [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2007, 23(5): 120-122.)
 - [5] 葛喜珍, 林强, 霍清, 等. 淡豆豉煎剂对高脂血症大鼠主动脉晚期糖化终末产物的抑制作用 [J]. *中药药理与临床*, 2006, 22(3): 101-103. (Ge X Z, Lin Q, Huo Q, et al. Effects of sojae semen praeparatum on advanced glycosylation end products (AGEs) in aortae and serum levels of lipid peroxide in hyperlipemia rats [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2006, 22(3): 101-103.)
 - [6] 顾建明, 潘春云. 大豆异黄酮的测定方法及其评价 [J]. *上海大学学报 (自然科学版)*, 2007, 13(6): 65-67. (Gu J M, Pan C Y. Analytical approach of soybean isoflavones and its evaluation [J]. *Jorunal of Shanghai University (Natural Scienence Edition)*, 2007, 13(6): 65-67.)
 - [7] 毛跟年, 李彦军, 张俊涛, 等. 黑曲霉发酵法制备大豆异黄酮苷元工艺初探 [J]. *食品工业科技*, 2006, 26(11): 129-131. (Mao G N, Li Y J, Zhang J T, et al. Study on production soybean isoflavone aglycon through aspergillus niger fermentaation [J]. *Scinence and Technology of Food Industry*, 2006, 26(11): 129-131.)
 - [8] 张炳文, 宋永生, 郝征红, 等. 发酵处理对大豆制品中异黄酮含量与组分影响的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(7): 6-9. (Zhang B W, Song Y S, Hao Z H, et al. The effects of fermentation process on total content and type of isoflavones in soybean food [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2002, 28(7): 6-9.)
 - [9] 崔力剑, 黄芸, 詹文红, 等. 发酵处理对大豆中总异黄酮含量的影响 [J]. *大豆科学*, 2007, 26(4): 588-590, 596. (Cui L J, Huang Y, Zhan W H, et al. effect of ferment tation process on total content of isoflavones in soybean [J]. *Soybean Science*, 2007, 26(4): 588-590, 596.)
 - [10] 蔡琨, 冯华, 田维毅. 纯种发酵对淡豆豉主要有效成分的影响 [J]. *甘肃中医学院学报*, 2006, 18(5): 43-44. (Cai K, Feng H, Tian W Y. Effects of pure breed fermentation on major effective component in semen sojae praeparatum [J]. *Jorunal of Gansu College of Traditional Chinese Medicine*, 2006, 18(5): 43-44.)