

河北产淡豆豉黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究

牛丽颖¹, 刘敏彦², 王玉峰², 杜红娜², 王鑫国¹

(¹河北医科大学中医学院, 河北 石家庄 050091; ²河北医科大学医药研究院, 河北 石家庄 050035)

摘要:建立河北产淡豆豉黄酮类成分 HPLC 指纹图谱, 控制淡豆豉的质量。采用 3% 冰乙酸-乙腈, 梯度洗脱的方法进行色谱分离, 对各色谱峰进行数据处理, 得出淡豆豉的指纹图谱。标定了淡豆豉 13 个共有峰, 且共有峰重现性良好。采用 HPLC 方法制定的淡豆豉的指纹图谱, 可用于淡豆豉的质量评价。

关键词:淡豆豉; 黄酮类成分; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R25

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2009)02-0329-03

HPLC Fingerprint Analysis of Flavonoids in Semen Sojae Praeparatum in Hebei Province

NIU Li-ying¹, LIU Min-yan², WANG Yu-feng², DU Hong-na², WANG Xin-guo¹

(¹College of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, Hebei; ²Academy of Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050035, Hebei, China)

Abstract: To establish fingerprint chromatographic of flavonoids components in Semen Sojae Praeparatum in Hebei Province by HPLC and control its quality. Gradient elution of 3% acetic acid - acetonitril was applied to chromatographic peaks separation and data were analyzed to develop HPLC fingerprint analysis of Semen Sojae Praeparatum. Thirteen peaks were demarcated in Semen Sojae Praeparatum and they were all repeatable. The HPLC fingerprint can be used to evaluate the quality of Semen Sojae Praeparatum.

Key words: Semen Sojae Praeparatum; Flavonoids; HPLC; Fingerprint

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, 具有解表除烦, 宣发郁热等功效^[1]。淡豆豉可药食两用, 主要含有黄酮类成分, 现代研究表明其黄酮类成分具有抗心肌缺血、抗动脉粥样硬化、降血糖等广泛的药理作用^[2-8], 具有广阔的开发前景。指纹图谱可全面反映产品的化学成分, 有效表征产品的质量, 近年来被广泛的应用于中药材及其制剂的质量控制^[9]。采用高效液相法对淡豆豉黄酮类成分进行了研究, 初步建立了淡豆豉药材黄酮类成分 HPLC 指纹图谱, 并对 10 批样品进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

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, 批号依次为: 111738-200501、111704-200501、1502-200101、111709-200501); 黑豆样品共 10 批, 来源河北各地市, 按《中国药典》(2005) 版炮制方法制成淡豆豉。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 主要仪器与设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司); METTLER AE240 电子分析天平 (海特勒-托利多仪器上海有限公司); KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent HC C18 4.6 × 250 mm, 5 μm; 流动相: 乙腈-3% 冰乙酸梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 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 65 min 内检

收稿日期: 2008-12-05

作者简介: 牛丽颖 (1968-), 女, 教授, 硕士生导师, 现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。

测完。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Process of gradient elution

时间 Time/min	乙腈 Acetonitrile/%	3% 冰乙酸 3% acetic acid/%
0	13	87
10	15	85
40	25	75
55	30	70
65	30	70

1.4 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,加甲醇溶解制成浓度分别为 $51.92 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $26.10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $28.64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $21.47 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液。

精密称取淡豆豉药材粉末(过 80 目筛)约 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入石油醚(60 ~ 90℃)50 mL,回流处理 1.5 h,滤过,弃去滤液,残渣挥干溶剂,精密加入 70% 乙醇 50 mL,密塞,超声处理 2 h,放冷,摇匀,滤过,滤液蒸干,残渣用 20 mL 蒸馏水溶解,上样于 8 mL AB-8 大孔吸附树脂,先用 60 mL 水洗脱除去杂质,再用 80 mL 70% 乙醇洗脱,收集醇洗液,蒸干,残渣用 70% 乙醇溶解并定量转移至 10 mL 容量瓶中,定容至刻度,摇匀,临用前用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,作为供试品溶液^[10]。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 精密度 取同一批次供试品,连续进样 6 次,记录指纹图谱,考察各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性,结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD 分别为 0.01% ~ 0.58% 和 0.10% ~ 2.21%,说明精密度良好。

2.1.2 稳定性 取同一批次供试品,室温下放置,分别于 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 检测指纹图谱,考察各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性,结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD 分别为 0.02% ~ 1.06% 和 0.07% ~ 1.30%,说明样品溶液在检测的 48 h 内稳定性良好。

2.1.3 重现性 取 6 份样品,按供试品溶液的制备方法分别制备,检测,考察各共有指纹峰的相对保留

时间和相对峰面积的一致性,结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD 分别为 0.02% ~ 0.53% 和 0.10% ~ 2.02%,说明方法重现性良好。

2.2 指纹图谱及技术参数

2.2.1 共有指纹峰标定 按供试品溶液的制备方法制备 10 批淡豆豉药材供试品溶液,依次进样检测,记录高效液相色谱图,标定共有指纹峰。结果在淡豆豉 HPLC 指纹图谱中,共有指纹峰 13 个(见图 1),其中 1、4、10、13 号峰分别为大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素色谱峰。

2.2.2 共有指纹峰特征 1 号峰前有一杂质峰并分裂有 2 个小峰,1 号峰和 2 号峰之间有 1 个小峰,2 号峰和 3 号峰之间有 1 个小峰,3、4、5、6 号峰为相连峰,6 号峰和 7 号峰之间有 4 个小峰,7 号峰和 8 号峰之间有 2 个小峰,8 号峰和 9 号峰之间有 1 个小峰,10 号峰和 11 号峰之间有 1 个小峰,11 号峰和 12 号峰为相连峰,12 号峰和 13 号峰之间有 1 个小峰和一段平滑线,13 号峰以后有一段平滑线。

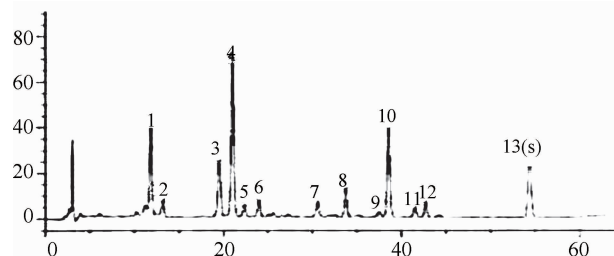


图 1 淡豆豉药材指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint chromatogram of Semen Sojae Praeparatum

2.2.3 非共有峰面积的比值 计算各样品中非共有峰占总峰面积的比值,结果表明,其比值均小于 5%,符合指纹图谱的技术要求。

3 讨论

在供试品溶液制备过程中,为了使黄酮类成分提取完全,同时除去干扰性成分,曾对是否脱脂、提取溶剂、提取方式、提取时间及纯化树脂进行了考察,结果为淡豆豉药材粉末(过 80 目筛)先用石油醚(60 ~ 90℃)脱脂后,再用甲醇超声处理 2 h,AB-8 大孔吸附树脂除杂后,获得干扰小、分离度好的供试品色谱峰。

对于色谱条件的选择,曾考察了甲醇-水、乙腈-3% 冰乙酸、乙腈-0.05% 磷酸等不同的流动相系统,

并考察了各系统等度和梯度洗脱,结果表明,用乙腈-3%冰乙酸梯度洗脱,基线较平稳,各峰的保留时间适中,色谱峰对称性及分离度均较好,所有色谱峰在 65 min 内检测完成。

研究首次较全面地建立了河北省不同地区产大豆炮制的淡豆豉中黄酮类化合物的 HPLC 指纹图谱研究方法,为更好地控制淡豆豉的内在质量,保证淡豆豉的炮制工艺稳定提供了科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005. (Chinese Pharmacopoeia Committee. China pharmacopoeia version(part one)[S]. Beijing: Chemical Industrial Press, 2005.)
- [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 Preparatum 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.)
- [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): 923-924. (Niu L Y, Liu J, Cui L J, et al. Effects and mechanisms of Semen Sojae Preparatum extracts on rat's injury at the early stage of atherosclerosis[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2007, 23(5): 923-924.)
- [5] 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, 2004, 23(5): 21-22. (Niu L Y, Wang X G, Ge X Z, et al. Study on hypoglycemic effective part of Semen Sojae Preparatum extracts[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2004, 23(5): 21-22.)
- [6] 白霞, 牛丽颖, 刘娇, 等. 淡豆豉防治早期动脉粥样硬化大鼠血管损伤的机制研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 170-171. (Bai X, Niu L Y, Liu J, et al. Mechanisms of Semen Sojae Preparatum extracts on rat's injury at the early stage of atherosclerosis[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008, 19(1): 170-171.)
- [7] 曹秀莲, 牛丽颖, 窦玉红, 等. 淡豆豉对心肌缺血小鼠心肌一氧化氮合酶表达的影响[J]. 河北中医学报, 2007, 22(4): 3-4. (Cao X L, Niu L Y, Dou L H, et al. Effects of Semen Sojae Preparatum on the NOS expression of myocardial ischemia in mice[J]. Hebei Medical Journals, 2007, 22(4): 3-4.)
- [8] 王鑫国, 郭秋红, 白霞, 等. 乌鸡白凤丸对去卵巢大鼠雌激素分泌的影响[J]. 中成药, 2003, 25(1): 67-68. (Wang X G, Guo Q H, Bai X. The effect of white phoenix bolus of black-bone chicken on oestrogen level in ovariectomized Ra[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003, 25(1): 67-68.)
- [9] 张娟, 卿德刚, 倪慧, 等. 红花黄色素 HPLC 指纹图谱研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 257-259. (Zhang J, Qing D G, Ni H, et al. Study on HPLC fingerprint analysis of saffron yellow. [J]. Food Science, 2008, 29(1): 257-259.)
- [10] 牛丽颖, 杜红娜, 刘娇, 等. 淡豆豉炮制前后异黄酮组分含量的比较研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(4): 672-674, 678. (Niu L Y, Du H N, Liu J, et al. The comparative study on the content of isoflavone in Sojae Preparatum extracts before and after processing [J]. Soybean Science, 2008, 27(4): 672-674, 678.)

About Agronomy Journal

Articles relating to original research in soil – plant relationships; crop science; soil science; biometry; crop, soil, pasture, and range management; crop, forage, and pasture production and utilization; turfgrass; agroclimatology; agro-economic modeling; statistics; production agriculture; and computer software are published in *Agronomy Journal* subsequent to review and approval by the editorial board. Articles should make a significant contribution to the advancement of knowledge or toward a better understanding of existing agronomic concepts. The study reported must be of potential interest to a significant number of scientists and, if specific to a local situation, must be relevant to a wide body of knowledge in agronomy. Additional details on requirements for articles are published in *Agronomy Journal* each year.

Review papers that are either volunteered or invited by the editorial board may be printed in the journal. Invitational papers from nonmembers may be published on approval by the president if found acceptable by the editorial board.