

淡豆豉中异黄酮提取工艺的优化研究

牛丽颖¹, 蔡广华¹, 刘敏彦², 王鑫国¹

(1. 河北医科大学 中医学院, 河北 石家庄 050091; 2. 河北以岭医药研究院有限公司, 河北 石家庄 050035)

摘要:采用单因素和正交试验相结合的方法,以淡豆豉总异黄酮和染料木素的提取量为评价指标,优选淡豆豉中异黄酮的提取工艺。结果表明淡豆豉中提取异黄酮的最佳工艺为:淡豆豉药材8倍量70%乙醇回流提取3次,每次2 h。

关键词:淡豆豉;异黄酮;染料木素;UV;HPLC

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)01-0164-04

Research on Optimization of Isoflavone Extracting Technique from Semen Sojae Praeparatum

NIU Li-ying¹, CAI Guang-hua¹, LIU Min-yan², WANG Xin-guo¹

(1. Traditional Chinese Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091; 2. Institute of Hebei Yiling Pharmaceutical Co., Ltd, Shijiazhuang 050035, Hebei, China)

Abstract: The best extracting technique of Semen Sojae Paratum (SSP) were optimized by orthogonal test. The extracting contents of total isoflavone and genistein in SSP were determined by UV detector and HPLC, respectively. The results showed that the best technological process of isoflavone extraction was to reflux SSP by 70% ethanol 3 times and 2 hours for each time. The content of 70% ethanol was 8 times of SSP.

Key words: Semen Sojae Praeparatum; Isoflavones; Genistein UV; HPLC

淡豆豉炮制前后异黄酮成分在构成比例上发生明显变化,淡豆豉中大豆苷和染料木苷的含量较大豆降低,而大豆苷元和染料木素的含量却较大豆显著升高^[1],因此可以认为淡豆豉异黄酮与大豆异黄酮从化学本质上有着根本区别,有资料表明游离的异黄酮苷元的活性比结合型糖苷更高^[2]。前期研究表明淡豆豉具有更广泛的生物学活性^[3-9]。鉴于目前许多中药资源日益匮乏,而淡豆豉加工原料大豆资源十分丰富,因此深入开发淡豆豉资源具有广阔前景。该研究采用单因素与正交试验相结合优化淡豆豉的提取工艺,为其后续开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪及其配套工作站,检测器为 Agilent Dual λ Absorbance Detector; UV-2550 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);淡

豆豉药材(实验室自制,经河北省药检所中药室鉴定);染料木素对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号为111704-200501,供含量测定用;甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司);水为乐百氏纯净水;其它试剂均为分析纯。

1.2 淡豆豉总异黄酮的 UV 测定法

1.2.1 标准曲线的绘制 精密称取染料木素对照品 4.83 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解定容置刻度,摇匀;精密量取上述溶液 10 mL 置于 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释,制成浓度为 $38.64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

精密吸取上述溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置 25 mL 的容量瓶中,用甲醇稀释到刻度。用紫外分光光度计测定 261 nm 处吸光度,以吸收值为纵坐标,对照品浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,绘制标准曲线。得回归方程为: $y = 0.1572x + 0.0036$, $r^2 = 0.9997$,线性范围为 $0.733 \sim 7.728 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

收稿日期:2010-10-10

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2009001061)。

第一作者简介:牛丽颖(1968-),女,教授,硕士生导师,主要从事中药药效物质基础研究工作。

通讯作者:王鑫国(1966-),男,教授,硕士生导师,主要从事中药药理学研究。E-mail: wangxinguozy@163.com。

1.2.2 总黄酮测定 将待测溶液置紫外分光光度计中 261 nm 处测其吸光值,代入回归方程计算总黄酮的量。

1.3 染料木素的 HPLC 测定法

1.3.1 色谱条件 色谱柱 Agilent HC-C18 (4.6 × 250 mm, 5 μL); 检测波长 261 nm; 柱温度 30℃; 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (57:43:0.1); 体积流量 1 mL · min⁻¹, 理论板数按染料木素峰计算应不低于 3 000。色谱图见图 1。

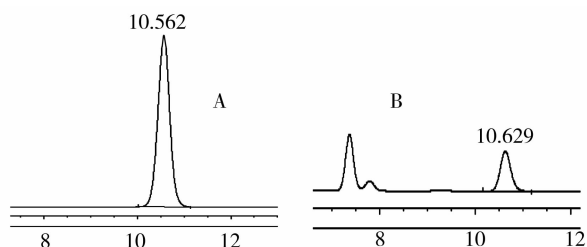


图 1 染料木素对照品与样品的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of genistein reference substance (A) and samples of in fermented soybean (B)

1.3.2 对照品溶液的制备 精密称取染料木素对照品 4.96 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解定容置刻度, 摇匀; 精密量取上述溶液 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度制得浓度为 9.92 μg · mL⁻¹ 的对照品溶液。

1.3.3 染料木素测定 将对照品溶液和待测溶液注入液相色谱仪, 测定峰面积, 按外标法计算染料木素含量。

1.4 淡豆豉提取工艺优化研究

1.4.1 单因素考察提取溶剂 取净选淡豆豉药材 7 份, 每份 30 g, 分别加入 8 倍量的水、30%、40%、50%、60%、70% 和 80% 乙醇, 加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液定容至 1 000 mL 容量瓶中, 摇匀, 测定总异黄酮及染料木素的含量。

1.4.2 正交设计优选 工艺参数以总异黄酮和染料木素的量为评价指标, 采用 L₉(3⁴) 正交表进行正交试验, 对影响醇提工艺的提取时间、溶媒用量、提取次数进行筛选。试验时取净选淡豆豉药材 9 份, 每份 30 g, 用 70% 乙醇为溶媒, 按 L₉(3⁴) 正交表进行提取, 然后将提取液合并, 定容至 1 000 mL 容量瓶中摇匀, 测定总异黄酮及染料木素的含量, 因素水平见表 1。

1.4.3 验证试验 取淡豆豉药材 6 份, 每份 30 g, 对最佳工艺和优选工艺进行重复验证对比试验, 每种工艺平行做 3 份, 测定总异黄酮和染料木素的含量。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

水平 Level	因素 Factor			
	提取时间 A Extraction time/h	溶媒用量 B Volume of solvent/times	提取次数 C Extraction times	空白 D Blank
1	1.5	8	1	1
2	2.0	10	2	2
3	2.5	12	3	3

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的确定

不同提取溶媒对总异黄酮和染料木素的提取量相差较大, 且醇浓度越高提取量越大, 70% 乙醇提取量较高, 所以选择 70% 乙醇为提取溶剂, 结果见表 2。

表 2 淡豆豉提取溶剂考察结果

Table 2 Inspection results of extraction solvent of Semen Sojae Praeparatum

溶媒 Solvent	总异黄酮 Total isflavones/mg	染料木素 Genistein/mg
H ₂ O	0.3910	0
30% 乙醇	0.5970	0.0724
40% 乙醇	1.0417	0.0859
50% 乙醇	1.2313	0.1725
60% 乙醇	1.3017	0.1987
70% 乙醇	1.5737	0.2091
80% 乙醇	1.4693	0.1967

2.2 正交设计结果

3 个因素中对提取影响最大的是提取次数, 溶剂用量和提取时间对提取的影响相差不大, 从表 3 中可得出最佳工艺为 A₃B₂C₃, 即 10 倍量 70% 乙醇, 煎煮 3 次, 每次 2.5 h。由方差分析可知, 提取次数有显著性差异, 溶剂用量和提取时间均无显著性差异。A 因素中 A₂、A₃ 差别不大, B 因素中 B₁、B₂ 的差别也不大, 从节约时间及药材的吸湿性两方面考虑确定优选工艺为 A₂B₁C₃, 即加 8 倍量 70% 乙醇提取 3 次, 每次 2 h。

2.3.3 验证试验 试验结果显示, 最佳工艺和优选工艺差别不大, 但优选工艺缩短了生产周期, 降低了生产成本, 因此确定提取工艺路线为加 70% 的乙醇 8 倍量, 提取 3 次, 每次 2 h, 结果见表 5。

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果
Table 3 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号 Test number	提取时间 A Extraction time/h	溶媒用量 B Volume of solvent/times	提取次数 C Extraction times	空白 D Blank	总异黄酮 Total isflavone /mg · g ⁻¹	染料木素 Genistein/mg · g ⁻¹
1	1.5	8	1	1	1.308	206.5
2	1.5	10	2	2	1.599	234.3
3	1.5	12	3	3	1.724	245.7
4	2.0	8	2	3	1.625	226.7
5	2.0	10	3	1	1.925	240.4
6	2.0	12	1	2	1.704	209.4
7	2.5	8	3	2	1.863	236.6
8	2.5	10	1	3	1.403	210.0
9	2.5	12	2	1	1.686	231.2
I _j (总)	1.544	1.599	1.472	1.640		
II _j (总)	1.751	1.642	1.637	1.722		
III _j (总)	1.651	1.705	1.837	1.584		
I _j (染)	228.833	223.267	208.633	226.033		
II _j (染)	225.500	228.233	230.733	226.767		
III _j (染)	225.933	228.767	240.900	227.467		
R _j (总)	0.207	0.106	0.365	0.138		
R _j (染)	3.333	5.500	32.267	1.434		

表 4 方差分析
Table 4 Analysis of variance

误差来源 Error source	平方和 SS		f	均方 MS		显著性 Significance	
	总异黄酮 Total flavone	染料木素 Genistein		总异黄酮 Total isflavone	染料木素 Genistein	总异黄酮 Total isflavone	染料木素 Genistein
A	0.053	19.709	2	4.818	6.395		
B	0.038	55.202	2	3.455	17.911		
C	0.306	1 632.909	2	27.818	529.821	*	*
D	0.011	3.082	2	1.000	1.000		
误差 Error	0.01	3.08	2				

$F_{0.05}(2,2) = 19.00$

表 5 验证试验结果

Table 5 Inspection results of verification test

试验号 Test number	试验条件 Test condition	总异黄酮 Total isflavone /mg · g ⁻¹	平均值 Mean	染料木素 Genistein /mg · g ⁻¹	平均值 Mean
1	A ₂ B ₃ C ₃	1.9543		0.2119	
2	A ₂ B ₃ C ₃	1.9237	1.9543	0.2066	0.2091
3	A ₂ B ₃ C ₃	1.9463		0.2087	
4	A ₁ B ₂ C ₃	2.0457		0.2140	
5	A ₁ B ₂ C ₃	1.9387	1.9955	0.2094	0.2142
6	A ₁ B ₂ C ₃	2.0020		0.2193	

3 讨论

淡豆豉中所含的有效成分异黄酮,是一类多酚类化合物,该类化合物在 UV 261 nm 处有最大吸收,根据此特点利用 UV 法测定总异黄酮^[10-12]。淡豆豉异黄酮既含有苷又含有苷元,苷元中染料木素

有较强的药理作用,选择 HPLC 法对其进行测定,该试验曾考察了不同的色谱柱及不同比例的甲醇-水作为流动相系统,发现 C18 色谱柱及甲醇-水(53:47),再加入 0.1% 的冰醋酸可以获得较好的分离和峰形。

淡豆豉中大豆异黄酮的提取溶剂有甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮等,该研究从毒性低、安全经济的角度选择乙醇为提取溶剂,并对乙醇的浓度进行了系统地考察,确定 70% 为最佳提取溶剂。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对影响提取的因素进行分析,选出最佳工艺和优选工艺,由验证试验确定的优选工艺可用于工业生产。

参考文献

- [1] 牛丽颖,杜红娜,刘姣,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): 672-678. (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): 672-678.)
- [2] Xu X, Harris K S, Wang H J, et al. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women[J]. Nutrition, 1995, 125(9): 2307.
- [3] 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.)
- [4] 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.)
- [5] 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.)
- [6] 牛丽颖, 田鹏娜, 李清, 等. 豆豉对早期动脉粥样硬化大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 大豆科学, 2009, 28(1): 156-159. (Niu L Y, Tian P N, Li Q, et al. Effects of Semen Sojae Preparatum on the apoptosis of aortic smooth muscle cells in rats with early atherosclerosis[J]. Soybean Science, 2009, 28(1): 156-159.)
- [7] 牛丽颖, 王鑫国, 葛喜珍, 等. 淡豆豉中降血糖活性成分研究[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(5): 21-22. (Niu L Y, Wang X G, Ge X Z, et al. Study on active components of fermented soybean in reducing blood glucose[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2004, 20(5): 21-22.)
- [8] 毛俊琴, 李铁军, 黄晓瑾. 淡豆豉异黄酮抗骨质疏松的试验研究[J]. 解放军药学报, 2006, 22(2): 136-138. (Mao J Q, Li T J, Huang X J. Empirical study on anti-osteoporosis effect of Semen Sojae Praeparatum (SSP) [J]. Pharmacy Journal Chinese People's Liberation Army, 2006, 22(2): 136-138.)
- [9] 牛丽颖, 任艳青, 王鑫国. 淡豆豉异黄酮对增殖血管平滑肌细胞 JAK2/STAT3 信号转导通路的影响[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(11): 1487-1490. (Niu L Y, Ren Y Q, Wang X G. Effect of Semen Sojae Preparatum isoflavone on JAK2/STAT3 signal transduction pathway in proliferated vascular smooth muscle cell[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2004, 20(5): 21-22.)
- [10] 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]. Journal of Shanghai University (Natural Science Edition), 2007, 13(6): 65-67.)
- [11] 崔力剑, 黄芸, 杜淑娟, 等. 紫外分光光度法测定淡豆豉中总异黄酮的含量[J]. 河北中医学报, 2004, 19(3): 32-34. (Cui L J, Huang Y, Du S J, et al. Assay isoflavonoids content in Semen Sojae Preparatum with ultraviolet spectrophotometry [J]. Journal of Hebei Traditionnal Chinese Medicine and Pharmacology, 2004, 19(3): 32-34.)
- [12] 牛丽颖, 蔡广华, 王鑫国. 利用 ADS-7 大孔树脂分离淡豆豉中异黄酮[J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 164-167. (Niu L Y, Cai G H, Wang X G, et al. Separation and purification of soybean isoflavone in Semen Sojae Praeparatum by ADS-7 macroporous adsorptive resins[J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 164-167.)

黑龙江省农业科学院编辑出版中心关于抵制学术不端行为的联合声明

近年来中国学术界有了空前的发展和繁荣。与此同时,学术界也频频出现一稿多投、抄袭剽窃、重复发表、伪造试验数据、虚假注释、不实参考文献等学术不端行为。

尽管媒体曾多次揭露报道违背学术道德、无视学术规范的不端行为,学术管理部门也相继出台了各种条例,但各种形形色色的学术不端行为依然存在。

为尊重和保护知识产权,维护正常的学术生态,促进学术事业的健康发展,黑龙江省农业科学院编辑出版中心下属三个编辑部:《大豆科学》、《北方园艺》、《黑龙江农业科学》,共同发表如下声明:

一、从本声明公布之日起,凡向以上三个编辑部投稿的文章如出现以下任何一种情况者:一稿多投、抄袭剽窃、重复发表、伪造数据、虚假注释、不实参考文献,一经发现,立即撤稿(包括已通过终审的文章);

二、三刊将相互通报行为不端者的有关情况,并在各自刊物上对其曝光,揭露其欺骗行径,清除其不良影响;

三、凡被发现有任何一种学术不端行为者,三刊将在 5 年之内拒发其任何文章。

三刊发表的声明旨在抵制学术不端行为,促进学术事业健康发展,创造良好的学术氛围。

发表声明单位:

《大豆科学》编辑部

《北方园艺》编辑部

《黑龙江农业科学》编辑部

2011 年 1 月 1 日