

淡豆豉中多指标成分的含量测定方法研究

崔力剑¹, 石素琴¹, 刘敏彦², 曹秀莲¹, 牛丽颖¹

(1. 河北医科大学 中医学学院 河北省实验动物重点实验室, 河北 石家庄 050091; 2. 石家庄以岭药业股份有限公司, 河北 石家庄 050035)

摘要:建立淡豆豉中多指标成分含量测定方法,采用HPLC法同时测定淡豆豉中大豆苷元和染料木素含量,UV法测定总异黄酮含量。色谱条件:Agilent HC-C₁₈色谱柱(250×4.6 mm, 5.0 μm);甲醇-0.1%冰醋酸(50:50)为流动相;流速1 mL·min⁻¹;检测波长261 nm;柱温30℃;进样量10 μL。紫外分光光度计采用261 nm波长测定淡豆豉提取液的吸光度值。结果表明:大豆苷元和染料木素色谱峰的分离度良好,淡豆豉中大豆苷元、染料木素的保留时间分别为9.79和14.87 min,峰面积积分值与进样量呈良好的线性($r > 0.9999$),平均回收率分别为98.90%和100.53%。总异黄酮含量测定线性范围为1.44~7.20 μg·mL⁻¹,平均回收率为102.26%。该法简便易行,能够用于评价淡豆豉质量。

关键词:淡豆豉;HPLC;UV;总异黄酮;大豆苷元;染料木素

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)01-0127-04

Determination Method of Multi-target Components in Semen Sojae Praeparatum

CUI li-jian¹, SHI Su-qin¹, LIU Min-yan², CAO Xiu-lian¹, NIU Li-ying¹

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

Abstract: To establish methods for the determination of Daidzein and Genistein in Semen Sojae Praeparatum by high performance liquid chromatography and total isoflavones by ultraviolet spectrophotometry. The established HPLC conditions were: an Agilent HC-C₁₈ column(250×4.6 mm, 5.0 μm) was applied; the mobile phase was MeOH: 0.1% HAc = 50: 50; the temperature of column was 30℃; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; detective wavelength was set at 261 nm. Wavelength at 261 nm of ultraviolet spectrophotometry was adopted to determine the absorbance of samples solution. The results showed that the retention time of Daidzein and Genistein was 9.79 and 14.87 min, with the average recovery 98.90% and 100.53%, respectively. The integral value of peak area has linear relationships with sample amount of Daidzein or Genistein($r > 0.9999$). Total isoflavones from 1.44 to 7.20 μg·mL⁻¹ showed a linear relationship and the average recovery was 102.26%. The methods are simple and easy to evaluate the quality of Semen Sojae Praeparatum.

Key words: Semen Sojae Praeparatum; HPLC; UV; Total isoflavones; Daidzein; Genistein

淡豆豉具有调节血脂、抑制自由基^[1]、保护主动脉内膜、抑制平滑肌细胞增殖^[2,4]等广泛的生物学活性,异黄酮类化合物是淡豆豉中主要的活性成分。课题组对淡豆豉的炮制工艺进行了系统的研究,优化及规范了炮制工艺参数^[5]。研究中发现淡豆豉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,炮制过程中实质上是由糖苷型异黄酮向游离性异黄酮苷元转化的过程^[6-7],游离的异黄酮苷元具有更广泛、更明显的生物学活性。淡豆豉的质量取决于发酵过程,而异黄酮苷元含量又直接与发酵密切相关。因此建立了以大豆苷元、染料木素及总异黄酮为检测指标的质控体系,以便更好的控制淡豆豉的质量。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent), Agilent DAD 检测器(美国 Agilent), Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(4.6×250 mm, 5.0 μm), UV-2550 紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu), BS223S 电子天平(德国 Sartorius), KQ-250 型超声波清洗器(中国 昆超), HZQ-F160 震荡培养箱(中国 东联), PWUV 超纯水系统(香港 Heal force)。

1.2 试剂及试剂

淡豆豉(课题组采用规范炮制工艺加工制备而成,经河北省药检所中药室段吉平主任药师鉴定),

收稿日期:2011-09-15

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2009001061)。

第一作者简介:崔力剑(1974-),男,讲师,主要从事中药药效物质基础研究工作。E-mail:cuilijianzy@126.com。

通讯作者:牛丽颖(1968-),女,教授,硕士生导师,研究方向为中药药效物质基础。E-mail:niuliyingy@163.com。

染料木素(中国药品生物制品检定所,批号:111704-200501),大豆苷元(四川省维克奇生物科技有限公司,纯度>98%),甲醇(美国 Fisher),实验用水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 测定条件

色谱条件:Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(250×4.6 mm,5.0 μm);甲醇-0.1%冰醋酸(50:50)为流动相;流速为1 mL·min⁻¹;检测波长261 nm;柱温30℃,进样量10 μL。理论塔板数以染料木素峰计算应不低于3 000,大豆苷元和染料木素色谱峰的分离度均>1.5。色谱实验结果根据保留时间定性、峰面积定量,根据标准曲线计算样品染料木素和大豆苷元的含量。

UV 条件:以染料木素为对照品,在其最大吸收波长261 nm处测定供试品B溶液吸光度。根据标准曲线计算样品总异黄酮的含量。

1.4 对照品溶液配制

精密称取五氧化二磷干燥12 h的染料木素和大豆苷元适量,用甲醇溶解并稀释成100 μg·mL⁻¹的溶液,作为HPLC测定单体异黄酮含量对照品溶液。精密称取染料木素适量,用乙醇溶解并稀释成70 μg·mL⁻¹的溶液,作为UV法测定总异黄酮含量对照品溶液。

1.5 供试品溶液的制备

精密称取淡豆豉粉末0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇20 mL,称重,超声提取50 min,取出,放冷,再称重,用稀乙醇补重,摇匀,滤过,取续滤液,过0.45 μm微孔滤膜,为供试品A溶液,用于HPLC测定单体异黄酮。

精密吸取供试品A溶液5.0 mL置蒸发皿中,蒸干,残渣加15 mL水使溶解移置分液漏斗,用乙酸乙酯25 mL萃取6次,合并萃取液蒸干,残渣乙醇溶解,置25 mL量瓶中定容。精密吸取3.0 mL置10 mL量瓶中,用乙醇稀释至刻度,摇匀,为供试品B溶液,用于UV法测定总异黄酮。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

2.1.1 检测波长的选择 比较了249、255和261 nm波长的检测效果,结果发现261 nm下染料木素和大豆苷元灵敏度高,峰形良好,适宜二者的检测,因此选用261 nm波长检测。

2.1.2 流动相的选择 分别以甲醇:水(60:40)、甲醇:水(50:50)、甲醇:水(40:60)、甲醇:0.05%磷酸

(60:40)、甲醇:0.05%磷酸(50:50)、甲醇:0.05%磷酸(40:60)、甲醇:0.1%冰醋酸(60:40)、甲醇:0.1%冰醋酸(50:50)、甲醇:0.1%冰醋酸(40:60)为流动相,实验结果表明甲醇:0.1%冰醋酸(50:50)条件下,供试品溶液中异黄酮类成分分离度高、峰形尖锐、保留时间恰当,分离效果好,故选择甲醇:0.1%冰醋酸(50:50)为流动相。

2.2 标准曲线的制备

分别精密吸取大豆苷元(68 μg·mL⁻¹)和染料木素(45 μg·mL⁻¹)溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL置于10 mL量瓶中,用甲醇稀释配成系列浓度,按上述色谱条件进行分析,测定其峰面积。以浓度(x)为横坐标、峰面积积分值(y)为纵坐标绘制标准曲线,结果见表1。

精密吸取染料木素(72 μg·mL⁻¹)溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL置50 mL量瓶中,用乙醇稀释到刻度,摇匀。以乙醇为空白对照。按上述UV法条件进行分析,测吸光度。以浓度(x)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标绘制标准曲线。结果见表1。

表1 大豆苷元、染料木素及总异黄酮线性关系

Table 1 Linear relation of Daidzein, Genistein and total isoflavones

组分 Constituent	线性范围 Linear range/μg·mL ⁻¹	标准曲线 Standard curve	r
大豆苷元 Daidzein	0.0680-0.6800	$y = 4.4103x - 3.7734$	0.9999
染料木素 Genistein	0.0450-0.4500	$y = 7.5614x - 8.3493$	1.0000
总异黄酮 Total isoflavones	1.4400-7.2000	$y = 0.1362x + 0.0006$	0.9999

2.3 方法的验证

2.3.1 精密度实验 分别精密吸取对照品溶液, HPLC仪重复进样,记录大豆苷元和染料木素的峰面积,计算RSD分别为0.28%和0.15%(n=6)。取染料木素溶液,在紫外可见分光光度仪重复测定吸光度值,计算RSD为0.60%(n=6)。表明机器精密度良好。

2.3.2 稳定性实验 分别在0、2、4、8、12、24 h,精密吸取供试品溶液,HPLC进样,记录大豆苷元和染料木素的峰面积,计算RSD分别为0.23%和0.19%;紫外可见分光光度仪测定吸光度值,计算RSD为0.95%。结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性实验 取同一样品按供试品溶液制备方法进行制备,平行处理9份。HPLC仪记录大豆苷元和染料木素的峰面积,计算RSD分别为1.04%和1.28%,紫外可见分光光度仪测定吸光度值,计算RSD为0.78%。说明在该测定条件下重

现性良好,方法可靠。

2.3.4 回收率实验 采用加样回收实验,取同一样品,按高、中、低 3 种剂量分别加入大豆苷元和染料木素对照品,按供试品溶液的制备方法进行制备,按 1.3 的测定条件记录大豆苷元和染料木素的峰面积及吸光度值。计算回收率结果见表 2。

表 2 大豆苷元、染料木素及总异黄酮加样回收率的测定结果

Table 2 Determination results of recovery of Daidzein, Genistein and total isoflavones							
组分 Constituent	编号 No.	样品含量 Sample content/mg	加入量 Amount/mg	测得量 Measure/mg	回收率 Recoveries/%	平均回收率 Average recovery/%	RSD /%
大豆苷元 Daidzein	1	0.1359	0.0594	0.1947	98.99	98.90	0.65
	2	0.1363	0.1188	0.2530	98.23		
	3	0.1364	0.1782	0.3137	99.49		
染料木素 Genistein	1	0.0904	0.0382	0.1290	101.05	100.53	1.52
	2	0.0907	0.0764	0.1682	101.21		
	3	0.0911	0.1140	0.2045	99.34		
总异黄酮 Total isoflavones	1	0.6960	0.3338	1.0380	102.46	102.26	1.48
	2	0.6970	0.6676	1.3730	101.26		
	3	0.6960	1.0014	1.7280	103.06		

2.4 样品测定

分别取不同产地的 10 批黑豆,采用课题组规范的炮制工艺加工制成淡豆豉,按照 1.5 节方法制备供试品溶液,按 1.3 节方法分别测定大豆苷元、染料木素和总异黄酮的含量,结果见表 3。

表 3 样品中大豆苷元、染料木素及总异黄酮测定结果 (n=2)

Table 3 Analysis of Daidzein, Genistein and total isoflavones content among samples (n = 2)

编号 No.	大豆苷元 Daidzein/mg·g ⁻¹	染料木素 Genistein/mg·g ⁻¹	总异黄酮 Total isoflavones /mg·g ⁻¹
1	0.533	0.347	2.512
2	0.802	0.527	2.855
3	0.720	0.477	2.788
4	0.602	0.415	2.652
5	0.575	0.394	2.548
6	0.648	0.456	2.698
7	0.296	0.219	2.359
8	0.538	0.363	2.486
9	0.430	0.312	2.426
10	0.387	0.260	2.397

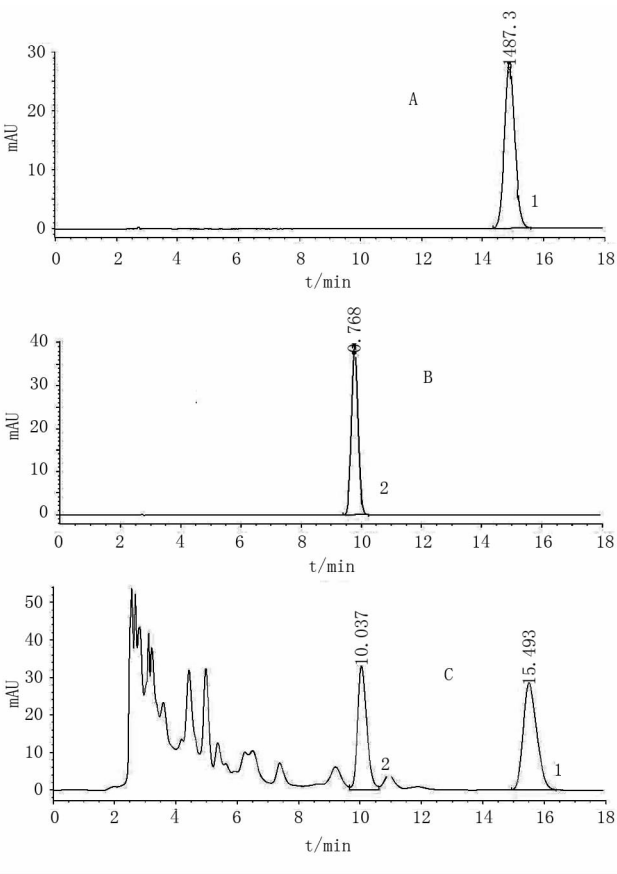


图 1 染料木素(A)、大豆苷元(B)和淡豆豉(C)的 HPLC 图

Fig.1 HPLC Chromatograms of Genistein(A), Daidzein(B) and Semen Sojae Praeparatum(C)

3 讨论

由于淡豆豉中含有大量的脂肪,样品经稀乙醇提取后溶液呈浑浊状态^[8-9],不能用紫外分光光度计直接测定。异黄酮苷及其苷元,易溶于乙醇、甲醇、乙酸乙酯等有机溶剂,所以采用乙酸乙酯萃取提取液中异黄酮类成分。通过对萃取次数的考察,优选出最佳萃取次数。取染料木素对照品和供试品溶液,分别进行了在 200 ~ 400 nm 范围紫外光谱扫描,结果二者在 261 nm 处有均最大吸收,由于淡豆豉异黄酮和染料木素有相同的基本母核,故 UV 法以染料木素为对照,以 261 nm 作为检测波长。

淡豆豉为常用中药,是历版中国药典收载的品种,但对其质量标准研究报道较少。目前,2010 年版《中国药典》一部中仍未收载淡豆豉的含量测定方法,现代研究表明^[14,9],异黄酮类成分是淡豆豉中主要活性成分,且其中大豆苷元和染料木素为异黄酮苷元类主要有效成分,故以淡豆豉中大豆苷元、染料木素和总异黄酮含量作为质量控制指标,建立定量分析方法用于评价淡豆豉的质量。从 10 批实验室自制样品的含量测定结果可知,总异黄酮含量在 $2.36 \sim 2.86 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,差异较小;其中所含大豆苷元含量在 $0.30 \sim 0.80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,染料木素含量在 $0.22 \sim 0.53 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,差异较大。在排除制备淡豆豉过程中煎煮、发酵等步骤的影响因素外,其原因是 10 批淡豆豉炮制原料黑豆的来源不同,原料差异导致淡豆豉中异黄酮类成分有较大差异。因此在炮制淡豆豉时要精心选择黑豆,黑豆的质量直接影响了淡豆豉的质量。

该文建立的 HPLC、UV 法对淡豆豉中异黄酮进行定量分析,方法的灵敏度高,重现性好。因此该法适用于淡豆豉药材的质量检验。

参考文献

- [1] 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.)
- [2] 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, 2009, 25(11): 1487-1490.)
- [3] 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.)
- [4] 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.)
- [5] 牛丽颖,石素琴,刘敏彦,等. 淡豆豉炮制工艺的优化研究[J]. 中成药,2010,32(8):1372-1376. (Niu L Y, Shi S Q, Liu M Y, et al. Processing of Semen Sojae Praeparatum[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2010,32(8):1372-1376.)
- [6] 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[J]. 大豆科学,2008,27(4):672-678. (Niu L Y, Du H N, Liu J, et al. Comparative analysis of isoflavone contents in Semen Sojae Praeparatum before and after processing[J]. Soybean Science, 2008,27(4):672-678.)
- [7] 牛丽颖,刘敏彦,王玉峰,等. 河北产淡豆豉黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 大豆科学,2009,28(2):329-331. (Niu L Y, Liu M Y, Wang Y F, et al. HPLC fingerprint analysis of flavonoids in Semen Sojae Praeparatum in Hebei province[J]. Soybean Science, 2009,28(2):329-331.)
- [8] Wardhani D H, Vázquez J A, Pandiella S S. Kinetics of daidzin and genistin transformations and water absorption during soybean soaking at different temperatures[J]. Food Chemistry, 2008,111:13-19.
- [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):528-530. (Cui L J, Huang Y, Zhan W H, et al. Effect of fermentation process on total content of isoflavones in soybean[J]. Soybean Science, 2007,26(4):528-530.)