

淡豆豉药材的高效液相指纹图谱研究

廖丽娜¹ 张明敏¹ 曹尉尉² 毛峻琴³ (1. 安徽中医学院 安徽 合肥 230038; 2. 解放军第411医院 上海 200081; 3. 解放军第85医院 上海 200053)

[摘要] 目的 建立淡豆豉药材高效液相色谱指纹图谱(HPLC-FPS) 为其质量控制提供依据。方法 应用高效液相色谱法(HPLC) 利用反相色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm 5 μm) 流动相: 乙腈-3%冰乙酸梯度洗脱 流速: 1 ml/min 柱温: 30℃ 检测波长: 261 nm 进样量: 10 μl。结果 不同产地淡豆豉在化学成分方面具有明显相似性, 可建立淡豆豉的指纹图谱。结论 建立的 HPLC 指纹图谱可用于淡豆豉的质量评价。

[关键词] 淡豆豉; 高效液相色谱法; 高效液相色谱指纹图谱

[中图分类号] R917; R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)05-0351-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.05.009

Study on HPLC fingerprint of Semen Sojae Preparatum(SSP)

LIAO Li-na¹, ZHANG Ming-min¹, CAO Wei-wei², MAO Jun-qin³ (1. Anhui Institute of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 2. 411st hospital of PLA, Shanghai 200433, China; 3. 85th hospital of PLA, Shanghai 200053, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC fingerprint method for Semen Sojae Preparatum to quality control. **Methods** HPLC analysis was performed on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm 5 μm), the mobile phase was used in gradient elution consisted of methanol-water (3% acetic acid), the flow rate was 1.0 ml/min, column temperature was 30℃ and UV detected was set at 261 nm, the sample weight: 10 μl. **Results** The compound composition of different SSP origins was obviously comparable, which could be determined by HPLC fingerprint of the SSP. **Conclusion** This method could be utilized as a quality control measurement for SSP.

[Key words] SSP; high performance liquid chromatography (HPLC); high performance liquid chromatographic fingerprint (HPLC-FPS)

淡豆豉 Semen Sojae Preparatum (SSP) 是由豆科植物黑大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的黑色成熟种子与中药青蒿、桑叶发酵加工而成, 为药食兼用的传统药物, 我国各地均可产, 具有解表、除烦、宣发郁热等功效^[1], 其活性成分主要包括大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素等^[2]。近几年研究发现淡豆豉异黄酮类成分具有抗骨质疏松、保护血管、降血糖、降血脂、抗更年期综合症等多方面的功效^[3-4]。目前淡豆豉的质量控制仅限于外观性状、化学鉴别等项检查, 缺乏行之有效的质量控制手段。因此建立有效地淡豆豉药材质量控制方法是一个亟待解决的问题。本实验通过对不同省份的淡豆豉进行了指纹图谱研究, 为淡豆豉的质量控制提供可行性依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 型高效液相色谱仪配有二元泵、DAD 检测器, Agilent 工作站。CPA225D Sartorius 电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(上海云飞生物科技有限公司); SHB-HIA 循环水式多用真空泵(上海豫康科教仪器设备有限公司); R-1001N 旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司); 所用统计软件为 SPSS 18.0。

1.2 试剂及药品 大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素对照品均由中国食品药品检验所上海分所提供(批号依次为: 111738-200501, 111709-200501, 111502-200101, 111704-200501); 乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司), 冰醋酸为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司), 双蒸水, 其它试剂为分析纯。

1.3 实验药材 淡豆豉药材样品 11 批, 其中 10 批来源不同的省份, 一份为自制药材(根据 2010 版《中国药典》炮制而成)。样品来源见表 1。

[基金项目] 上海市卫生局项目(2010Y006A)。

[作者简介] 廖丽娜(1984-), 女, 硕士研究生。Tel: 13636656045, E-mail: lina3428@126.com。

[通讯作者] 曹尉尉。Tel: (021) 65407620, E-mail: cwwhoep@126.com。

表 1 11 批淡豆豉药材来源

编号	来源	备注
S1	自制	经鉴别为合格药材
S2	浙江	批号 100628
S3	云南	批号 YP20110501
S4	山东	批号 090608
S5	江西	批号 091111
S6	江苏	批号 10020833
S7	河南	批号 100921
S8	河北	批号 110220
S9	福建	批号 110914
S10	东北	批号 110901
S11	安徽	批号 080711

峰。特征峰的选取原则为 11 批淡豆豉都含有的 21 个峰和 4 个主要有效成分峰。在相同条件下测定对照品溶液,通过与对照品图谱的比较,可知大豆苷元、大豆苷、染料木素、染料木苷的出峰时间分别为 22.066、28.891、38.62、43.352。

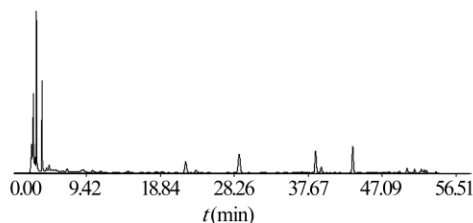


图 1 淡豆豉样品 HPLC 指纹图谱中共有色谱峰

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 将淡豆豉药材粉碎,过 40 目筛,精密称取 3.0 g,置圆底烧瓶中。加入甲醇 100 ml 回流提取,抽滤,滤液减压浓缩,加甲醇定容至 10 ml。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取大豆苷元、大豆苷、染料木素、染料木苷 2 mg,置于 20 ml 容量瓶中,加甲醇定容。

2.3 色谱分析条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相为 3% 冰乙酸(A)-乙腈(B) 梯度洗脱,0 ~ 50 min,92% ~ 90% A; 流速 1 ml/min; 柱温为 30 °C,检测波长为 261 nm,进样量为 10 μl。

2.4 方法学考察 (方法学考察均采用编号 S4 药材)

2.4.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μl,按以上色谱条件连续进样 5 次,记录色谱图,计算其共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均小于 1.0% (n=5),表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取样品 5 份,分别照“2.1”方法制备供试品溶液,按 2.3 色谱条件进样,记录色谱图,计算其共有峰相对峰面积及相对保留时间 RSD 均小于 1.0% (n=5),表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性实验 精密吸取样品溶液 10 μl,每隔 2 h 进样,记录色谱图,计算其共有峰相对峰面积及相对保留时间 RSD 均小于 1% (n=5),说明供试品在 12 h 内稳定。

2.5 淡豆豉药材的指纹图谱的建立 按“2.3”项下色谱条件,对 11 批供试品进样分析,记录色谱图,并利用 SPSS 18.0 进行数据处理,以 S1 为参照谱,选取时间窗宽度为 0.1 min,以平均法生成淡豆豉指纹图谱,见图 1,确定 25 个峰为共有特征

2.5.1 不同产地淡豆豉药材的 HPLC 图谱及对照图谱的相似度比较 按“2.3”项下色谱条件,分别将不同产地的淡豆豉供试品进行分析,记录色谱图,见图 2。利用中国药典“中药指纹图谱相似度评价系统”将 11 批淡豆豉药材的 HPLC 图与特征指纹图谱峰比较,其相似度评价计算结果表明,11 批供试品的相似度分别为 0.788、0.822、0.811、0.601、0.820、0.857、0.793、0.734、0.792、0.954、0.777,均在 0.70 以上。从图可见,原药材的主要特征峰相同,说明不同产地的淡豆豉药材的主要化学成分相同。

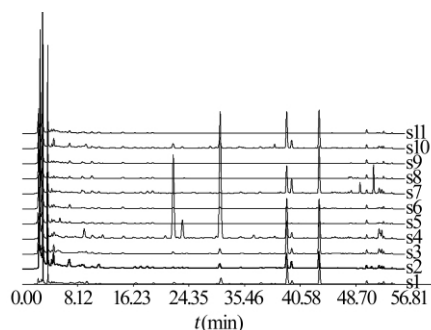


图 2 11 批淡豆豉药材 HPLC 指纹图谱

2.5.2 黄酮类化合物的 HPLC 及与对照品的相似度 现在研究证明,淡豆豉药材的黄酮类化合物是其主要的有效成分,11 批淡豆豉药材中 4 种黄酮成分的峰面积见表 2。在计算相似度时,本实验采用以对照品的出峰时间为对照(20 ~ 50min)进行比较,对 11 批淡豆豉药材进行图谱处理,见图 3,并与对照品图谱进行相似度计算,其相似度评价计算结果表明,11 批供试品的相似度分别为 0.895、0.873、0.808、0.821、0.581、0.759、0.779、0.431、0.072、0.906、0.381。
(下转第 386 页)

民卫生出版社 2007: 56-87.

- [3] 赵敏. 门诊处方点评中常见问题解析[J]. 中国现代药物应用 2010, 10(4): 19257.
- [4] 张芳, 徐建军. 引起不良理化变化的药物相互作用(二)[J]. 中国临床医生 2010, 29(4): 59.

[5] 张强, 邓智建. 我院门诊处方点评及用药合理性分析[J]. 中国药师 2009, 12(8): 1162.

[收稿日期]2012-02-10

[修回日期]2012-06-29

(上接第 352 页)

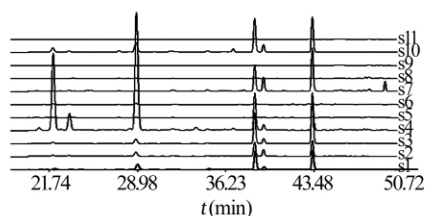


图 3 11 批淡豆豉药材 HPLC(20~50 min) 指纹图谱

表 2 11 批淡豆豉药材中 4 种黄酮成分的峰面积

样品	大豆苷元	大豆苷	染料木苷	染料木素
S1	736.41	2 654.432 4	6 612.517	6 380.49
S2	268.486	693.506	1 817.413	1 881.228
S3	243.231	719.802	3 656.952	5 764.778
S4	11 890.54	18 939.07	4 505.515	3 759.466
S5	0	36.452	266.073	153.569
S6	162.86	232.02	358.539	225.45
S7	233.736	371.541	3 387.844	5 151.594
S8	0	123.784	157.266	165.525
S9	0	0	0	0
S10	775.383	1 537.83	4 026.985	3 976.886
S11	0	0	119.705	64.803

2.5.3 不同产地淡豆豉药材的聚类分析 对 11 批淡豆豉样品的 HPLC 图谱进行分析,以各色谱峰的峰面积,利用欧氏距离,对样品进行聚类。11 批淡豆豉药材聚类树状图见图 4。结合 11 批淡豆豉黄酮类的 HPLC 图谱分析可分为 3 类:浙江、山东、自制、河南一类;云南、东北一类;河北、江西、福建、安徽、江苏一类。

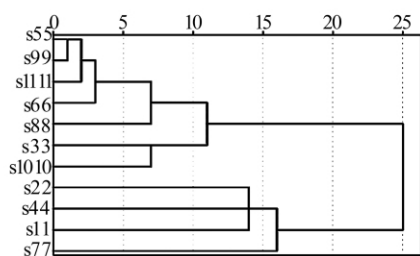


图 4 11 批淡豆豉药材的系统聚类分析图

3 讨论

3.1 提取方法及色谱条件的筛选 本实验优化提取

条件,从溶剂(甲醇、乙醇)、溶剂浓度(60%、70%、80%、90%、100%)、提取方法(回流、超声和冷浸)、提取时间(30 min、1 h、1.5 h、2 h)和提取次数进行考察,采用 HPLC 进行测定,综合考虑确定优化提取条件为:淡豆豉药材粉末(过 40 目筛) 3.0 g 置圆底烧瓶中,加入 80% 甲醇 100 ml 回流提取 1.5 h,抽滤后减压蒸干,加甲醇溶解并定容至 10 ml。本实验分别以乙腈-水、乙腈-3% 醋酸、甲醇-水和甲醇-3% 醋酸为流动相进行比较,优选乙腈-3% 醋酸为色谱条件。

3.2 参照物的选择 相似度在一定程度上可以体现药材的优劣与真假,现已成为一种科学的评价方法,为中药材的质量控制提供依据。据文献报道淡豆豉的主要活性成分为异黄酮类,本研究以异黄酮大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素为指标,综合 11 批淡豆豉药材的指纹图谱信息分析。由于淡豆豉的发酵的原料,发酵中菌种的复杂性,发酵条件温度、湿度等原因,使淡豆豉的成分有明显的区别,并且经 HPLC 图谱可知,淡豆豉水溶性成分和极性较小的脂溶性成分很难达到分离,并且峰面积占总峰面积比例较大,致使其色谱峰的相似度差异不大,依此来评价淡豆豉质量的优劣并不准确,本实验建立了对淡豆豉黄酮类有效成分的指纹图谱相似度考察(20~50 min)和 SPSS 软件进行聚类分析,并结合种黄酮类成分峰面积可知:浙江、山东、河南和自制质量较好,云南、东北次之,江西、江苏、福建、安徽、河北质量最差。其聚类结果与指纹图谱相似度研究结果最为一致,说明本实验所建立的淡豆豉黄酮类化合物的指纹图谱能为更快速鉴别不同产地的淡豆豉药材的质量,更全面地对其进行质量评价和控制提供参考。

【参考文献】

- [1] 中国药典 2010 版.一部[S]. 2010: 625.
- [2] 李娜,黄庆柏. 淡豆豉中的异黄酮成分及药理作用与临床应用[J]. 中国现代中药 2008, 10(7): 18.
- [3] 陈玉胜,张李阳. 大豆异黄酮的药理功效研究进展[J]. 四川生理科学杂志 2011, 33(1): 26.
- [4] 袁珊,于能江,赵毅民,等. 淡豆豉中的化学成分[J]. 中药材 2008, 31(8): 1172.

[收稿日期]2012-03-04

[修回日期]2012-05-09