

淡豆豉不同制法其成品性状及异黄酮类化学成分含量的比较[△]

李刚^{1*}, 梁永红¹, 杨安金², 苏明声¹, 朱海针¹, 谢小梅^{1#} (1.江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 2.江西中医药大学姚荷生研究室, 南昌 330004)

中图分类号 R927.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4461-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.15

摘要 目的:比较古法炮制与现今药典制法的淡豆豉其成品性状及异黄酮类化学成分的含量。方法:采用紫外-可见分光光度法对淡豆豉提取物中的总异黄酮进行含量测定;采用高效液相色谱法对淡豆豉提取物中异黄酮游离苷元(大豆素、染料木素)的含量进行测定。色谱柱为 Prevail-C₁₈(250 mm×10.0 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水-乙酸(35:64:1, V/V/V), 检测波长为 260 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 25 ℃, 进样量为 15 μl。结果:古法炮制的淡豆豉气香, 质地柔软, 断面为棕褐色, 表皮皱缩, 总异黄酮含量为 4.140 mg/g, 大豆素含量为 1.263 0 mg/g, 染料木素含量为 1.254 mg/g; 现今药典制法的淡豆豉气味微弱, 质地稍硬, 断面为棕黄色, 表皮皱缩, 总异黄酮含量为 3.530 mg/g, 大豆素含量为 0.349 mg/g, 染料木素含量为 0.335 mg/g。结论:古法炮制淡豆豉与现今药典制法淡豆豉相比, 前者成品性状好、大豆异黄酮类含量高, 古法炮制有明显优势。

关键词 淡豆豉; 古法炮制; 药典制法; 总异黄酮; 大豆素; 染料木素; 含量测定

Comparison of the Property of Fermented *Glycine max* Processed by Different Processing Methods and the Content of Isoflavonoid

LI Gang¹, LIANG Yong-hong¹, YANG An-jin², SU Ming-sheng¹, ZHU Hai-zhen¹, XIE Xiao-mei¹ (1.Key Lab of Modern TCM Preparation, Jiangxi University of TCM, Ministry of Education, Nanchang 330004, China; 2.Yao Hesheng Research Center, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the property of fermented *Glycine max* processed by ancient processing vs. pharmacopoeia method stated in pharmacopoeia and the content of isoflavonoid. METHODS: The content of total isoflavonoid in fermented *G. max* extract was determined by UV visible spectrometry. The content of free isoflavonoid aglycones (glycitein, genistein) was determined by HPLC. The determination was performed on Prevail-C₁₈ (250 mm×10.0 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water-acetic acid (35:64:1, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 260 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 15 μl. RESULTS: The fermented *G. max* made through ancient processing was fragrant and soft, sepi in cross-section and shrinking in appearance; the contents of total isoflavonoid, daidzein and genistein were 4.140 mg/g, 1.263 mg/g and 1.254 mg/g. The fermented *G. max* made through pharmacopoeia method was faint smell and little hard, claybank in cross-section and shrinking in appearance; the contents of total isoflavonoid, daidzein and genistein were 3.530 mg/g, 0.349 mg/g and 0.335 mg/g. CONCLUSIONS: Compared with fermented *G. max* made by pharmacopoeia method, the fermented *G. max* made by ancient processing showed good property, high content of isoflavone and obvious advantage.

KEYWORDS Fermented *Glycine max*; Ancient processing; Pharmacopoeia method; Isoflavonoid; Daidzein; Genistein; Content determination

淡豆豉是一味常用的传统中药,应用历史悠久,是我国特有的经固态发酵制备的中药之一^[1]。淡豆豉为豆科植物大豆的成熟种子的发酵加工品,以黑色种皮品系大豆为其主要原料,桑叶、青蒿等药材配以其中经发酵加工而成,为历版《中国药典》的收录品种。淡豆豉主治解表、除烦、宣发郁热,临床一般用于感冒、寒热头痛,烦躁胸闷,虚烦不眠等^[2]。淡豆豉中所含的主要成分大豆异黄酮类具有很高的生物活性,尤其是其中的苷元类组分染料木素和大豆苷元^[3]。目前,淡豆豉的生

产多沿用历版《中国药典》制法,而《中国药典》中对于淡豆豉的炮制工艺并未给出详细的参数,导致市场销售的淡豆豉发酵程度不一、有的甚至未发酵,成品质量差而不稳、伪劣混杂等,达不到药用功效,直接影响了临床用药的安全性和有效性。应江西中医学院姚荷生研究室门诊部的要求,本课题组按古法制作淡豆豉,近3年来一直为其提供质优、稳定的产品用于临床,疗效显著。本试验对古法炮制、药典制法及市场购买的淡豆豉的成品性状及主要活性成分异黄酮类化学成分的含量进行了比较,旨在为淡豆豉的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

SK5200LH型超声波提取器(上海科导超声仪器有限公司);UV-2102C型紫外-可见分光光度(UV)计(尤尼科上海仪器有限公司);1200型高效液相色谱(HPLC)仪(美国安捷

△基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目(No.13615)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理学。E-mail: ligangjeff@sina.com

通信作者:教授,硕士研究生导师。研究方向:微生物学。电话:0791-87118707。E-mail: jxmm1964@sina.com

伦公司)。

1.2 药品与试剂

自制淡豆豉样本(本课题组自制,经江西中医药大学范崔生教授鉴定为真品);染料木素、大豆素标准品(中国食品药品检验研究院,批号分别为111704-200501,1502-200101);黑大豆的成熟种子、青蒿、桑叶、市购淡豆豉(经江西中医药大学杨安金教授鉴定)均购自安国冷背药材公司(标本保存于江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室);甲醇及其余试剂均为分析纯。

1.2.1 药典方法制备淡豆豉^[4-6] 取桑叶、青蒿各100 g,分别加入约生药量的10.8倍水浸泡2 h,后煎煮2次,每次1.5 h,滤过,合并两次煎液,浓缩至约1 000 ml,药渣晾干,留用。将煎液拌入净大豆1 000 g中,俟吸尽(约6 h)后(以豆粒充分饱胀为度),将豆粒置于蒸锅内,隔水蒸1.5 h,取出,摊晾,置容器中,用煎过的桑叶、青蒿渣覆盖,放入温度为(30±2)℃的培养箱内进行自然发酵,定时翻动,使之发酵均匀,至黄衣上遍时终止发酵(时间为6 d),取出,低温干燥,即为淡豆豉成品。

1.2.2 古法炮制淡豆豉 参照李时珍《本草纲目》所记载的方法:每年6~9月(农历)间,取新鲜桑叶、青蒿各100 g,加水煎煮约30 min,滤过,药渣备用。煎液放凉,拌入净大豆1 000 g中,浸泡3~4 h,大豆明显发胀后捞出,置饭甑中,用大火蒸至九成熟时取出(约1.5~2 h),平铺在竹匾内摊晾,用桑叶、青蒿渣覆盖,使之发酵,待黄衣上遍时(约3~5 d),取出,用清水冲洗,稍滤干,置密闭容器内,用药渣封口,于日中晒7 d,取出,曝一时,又以水拌入瓮。如此7次,至充分发酵、香气溢出时,取出,置饭甑中,用大火蒸30~40 min,倒出,晒干,即得。

2 方法与结果

2.1 两种制法淡豆豉成品的性状比较

古法炮制的淡豆豉气味有酒香,质地柔软,断面为棕褐色,表皮皱缩,稍有光泽;现今药典制法的淡豆豉气味有微弱豆香,质地稍硬,断面为棕黄色,表皮皱缩,无光泽;市购淡豆粒无香味,质地较硬,断面为黄白色,表皮微皱缩,无光泽。淡豆豉的成品外观性状见图1。

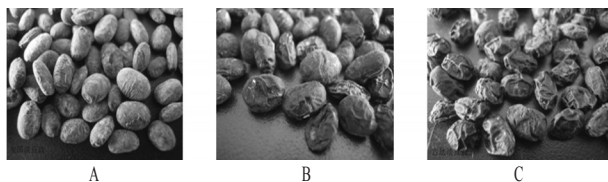


图1 淡豆豉的成品外观性状

A.市购;B.药典制法;C.古法炮制

Fig 1 The appearance and property of fermented *G. max*

A. on the market; B. pharmacopoeia method; C. ancient processing

2.2 UV法测定淡豆豉中总异黄酮的含量^[7]

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取染料木素对照品2.28 mg,加甲醇溶解并定容至5 ml,即得质量浓度为0.456 mg/ml的对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液0.5 ml,置10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取淡豆豉细粉约0.25 g,加甲醇25 ml使溶解,称定质量,超声(功率:160 W,频率:25 kHz)提取15 min,放冷,再次精密称定,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液2.0 ml,用甲醇稀释至10 ml,作为供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 分别精密吸取对照品贮备液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、10.0 ml,置25 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,按UV法在260 nm波长处测定吸光度。以质量浓度($c, \mu\text{g/ml}$)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得染料木素的回归方程为 $A=0.0921c+0.0017$ ($r=0.9989$)。结果表明,染料木素的质量浓度在0.912~9.12 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与 A 呈良好线性关系。

2.2.4 精密密度试验 取质量浓度为1.824 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液,按上述条件连续测定6次。结果, $\text{RSD}=0.5\%$ ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12 h按上述条件测定 A 。结果, $\text{RSD}=0.5\%$ ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.2.6 重复性试验 取同一批淡豆豉6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别测定其 A ,计算样品含量。结果, $\text{RSD}=3.9\%$ ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 取同一批淡豆豉样品6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,分别精密加入对照品溶液(质量浓度:1.824 $\mu\text{g/ml}$)1.0 ml,再按上述方法测定 A ,计算加样回收率。结果,平均加样回收率为99.8%, $\text{RSD}=3.2\%$ ($n=6$)。

2.2.8 淡豆豉中总异黄酮的含量测定 分别取原料黑大豆和各种淡豆豉各5个批次,按“2.2.2”项下方法制备淡豆豉供试品溶液,以甲醇作为空白,测定各供试品溶液在波长260 nm处的 A (若测定结果超出线性范围,可先浓缩或稀释后进行测定)。将 A 值代入回归方程,计算样品中总异黄酮的含量,结果见表1。

表1 不同制法的淡豆豉中总异黄酮的含量测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the content of total isoflavonoid in fermented *G. max* processed by different processing methods ($\bar{x} \pm s$)

样品	平均取样量,g	总异黄酮含量,mg/g
原料黑大豆	0.2513	1.53±0.18
市购淡豆豉	0.2525	2.70±0.05*
药典制法淡豆豉	0.2489	3.53±0.16*
古法炮制淡豆豉	0.2520	4.14±0.24**

与淡豆豉比较:* $P<0.05$;与药典制法和市购淡豆豉比较:** $P<0.05$

vs. *G. max*:* $P<0.05$;vs. *G. max* by pharmacopoeia method and ancient processing:** $P<0.05$

2.3 HPLC法测定淡豆豉中大豆素、染料木素的含量^[8]

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Prevail C_{18} (250 mm×10.0 mm,5 μm);流动相:乙腈-水-乙酸(35:64:1, $V/V/V$);检测波长:260 nm;流速:1.0 ml/min;进样量:15 μl ;柱温:25℃。色谱见图2。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取大豆素对照品2.20 mg,置10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得大豆素对照品溶液。精密称取染料木素对照品4.60 mg,置10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得染料木素对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 分别取不同品种的淡豆豉样品,粉碎成细粉,精密称取1.0 g置烧瓶中,加70%乙醇50 ml,摇匀,水浴回流1 h,滤过,滤渣用70%乙醇10 ml洗涤,与滤液合并,用旋转蒸发器蒸干,残渣加甲醇定容至10 ml,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液0.25、0.50、

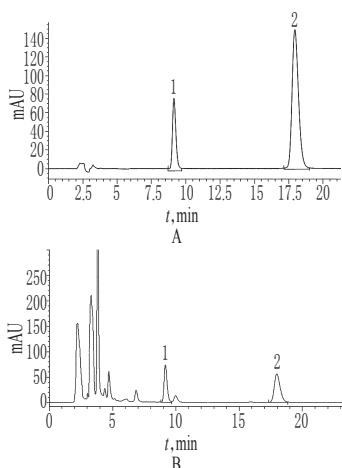


图2 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.古法炮制淡豆豉;1.大豆素;2.染料木素

Fig 2 HPLC chromatograms

A.mixed control;G. max by ancient processing;1.daidzein;2.genistein

1.00、1.50、2.00、2.50 ml,置10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得大豆素的回归方程为 $y=30.284x+42.958$ ($r=0.9992$),线性范围为 $5.5\sim 55 \mu\text{g/ml}$;染料木素的回归方程为 $y=55.172x-288$ ($r=0.9991$),线性范围为 $11.5\sim 115 \mu\text{g/ml}$ 。结果表明,大豆素和染料木素的质量浓度分别在各自线性范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.3.5 精密度的试验 取质量浓度为 $11 \mu\text{g/ml}$ 的大豆素对照品溶液以及质量浓度为 $23 \mu\text{g/ml}$ 的染料木素对照品溶液各适量,按上述色谱条件连续测定6次,记录峰面积。结果,大豆素和染料木素峰面积的RSD分别为1.3%和1.9%(n 均为6),表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于0、2、4、6、8、12 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.8%($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 取同一批次的淡豆豉样品适量,按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,大豆素和染料木素峰面积的RSD分别为3.2%和3.9%,表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取同一批次的淡豆豉样品6份,分别精密加入质量浓度为 $11 \mu\text{g/ml}$ 的大豆素及 $23 \mu\text{g/ml}$ 的染料木素对照品溶液各1.0 ml,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果,大豆素和染料木素的平均加样回收率分别为98.4%和97.8%,其峰面积的RSD分别为1.6%和1.4%(n 均为6)。

2.3.9 大豆素和染料木素的含量测定 分别取原料黑大豆和各种淡豆豉各5个批次,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,用外标法计算样品含量,结果见表2。

表2 不同制法的大豆素和染料木素的含量测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of the content of free isoflavonoid aglycones in fermented *G. max* processed by different processing methods($\bar{x} \pm s$)

样品	平均取样量,g	大豆素,mg/g	染料木素,mg/g
原料黑大豆	1.010	0.050 ± 0.006	0.097 ± 0.011
安国市购淡豆豉	1.005	0.393 ± 0.021	0.371 ± 0.022
药典制法淡豆豉	1.006	0.349 ± 0.017	0.335 ± 0.019
古法炮制淡豆豉	1.007	1.263 ± 0.072	1.254 ± 0.083

3 讨论

研究表明,淡豆豉炮制过程中其化学成分的变化主要是由苷向苷元转化的过程^[9],有可能是发酵过程中微生物产生的 β -葡萄糖苷酶使大豆异黄酮糖苷转化为游离苷元^[10]。本试验中的古法炮制方法参照了李时珍《本草纲目》所记载的方法;而药典制法则在参考2010年版《中国药典》(一部)的基础上结合文献^[5-6]的方法,省略了药典中的再闷过程。由表1、表2可见,黑大豆在经过了发酵炮制成为淡豆豉后,其总异黄酮及游离苷元的含量有了显著的提高;且古法炮制的淡豆豉中总异黄酮及游离苷元的含量显著高于药典制法以及市购淡豆豉。

本研究结果表明,古法炮制淡豆豉在成品性状和异黄酮类含量上较现今药典制法淡豆豉、市购淡豆豉具有明显优势。由此可见,再闷过程对淡豆豉的成品性状和生物活性物质的影响起了至关重要的作用。市购淡豆豉的成品性状最差,其异黄酮类含量与现今药典制法的淡豆豉相似,推测目前市场销售的部分淡豆豉省略了再闷过程,产品质量较差。

参考文献

- [1] 牛广财,贾亭亭,魏文毅,等.淡豆豉的研究进展[J].中国酿造,2013,32(9):1.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:308.
- [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.
- [6] 郭文勇.中药淡豆豉的质量评价方法及其“解表除烦”作用机制研究[D].上海:第二军医大学,2004.
- [7] 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.
- [8] 黄燕萍.HPLC法同时测定红花注射液中腺苷和羟基红花黄色素A的含量[J].中国药房,2013,24(43):4092.
- [9] 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):741.
- [10] 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.

(收稿日期:2013-09-24 修回日期:2014-03-10)