

21种不同产地中药淡豆豉中5种活性成分的对比

王鹏娇, 吴运莉, 张敏, 高秀丽*
(贵阳医学院药学院, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**对不同产地市售淡豆豉中总异黄酮、大豆皂苷、多糖、总蛋白、纤溶酶的含量进行测定,并进行聚类分析,为淡豆豉的工艺研究和质量评价应用提供科学依据。**方法:**采用紫外分光光度法,以染料木素为对照品,测定总异黄酮的含量,测定波长为260 nm,染料木素在 $0.9964 \sim 14.946 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系;采用香草醛-高氯酸比色法,以齐墩果酸为对照品,测定大豆皂苷的含量,测定波长520 nm,齐墩果酸在 $2.2 \sim 11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系;采用苯酚-硫酸比色法,以葡萄糖为对照品,测定多糖的含量,测定波长490 nm,葡萄糖在 $0.0025 \sim 0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系;采用考马斯亮蓝法测定总蛋白的含量,测定波长595 nm;采用纤维蛋白平板法测定豆豉纤溶酶活力,以尿激酶为对照品,尿激酶在 $100 \sim 10000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈良好线性关系。使用SPSS 16.0以淡豆豉中5种有效成分的含量为参数组合对市售淡豆豉进行聚类分析。**结果:**各地市售淡豆豉主要活性成分含量有明显差异,这21种淡豆豉中总异黄酮的质量分数最低为 $0.518 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,最高为 $4.511 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;大豆皂苷的质量分数最低为 $0.873 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,最高为 $8.623 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;多糖的质量分数最低为0.28%,最高为1.81%;总蛋白的质量分数最低为4.675%,最高为36.133%;7号样品中淡豆豉无纤溶酶活性,其他有活性的产品,纤溶酶活性最低为 $15.49 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,活性最高为 $1752.08 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。聚类分析的树状图结果与地理位置有明显的对应关系。**结论:**21批不同产地淡豆豉中活性成分存在明显差异。

[关键词] 淡豆豉; 活性成分; 总异黄酮; 大豆皂苷; 多糖; 蛋白; 纤溶酶

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0064-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190064

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140819.0917.004.html>

[网络出版时间] 2014-08-19 9:17

Analysis of Five Active Ingredients in 21 Semen Sojae Praeparatum of Traditional Chinese Medicine from Different Regions

WANG Peng-jiao, WU Yun-li, ZHANG Min, GAO Xiu-li*
(Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** The study aimed to determine the contents of the total isoflavones, soy saponins, polysaccharide, protein, and fibrinolytic enzyme of Semen Sojae Praeparatum (SSP) from different regions. And clustering analysis was performed, to provide scientific basis for the study and evaluation of the SSP quality. **Method:** Genistein was used as a reference to determine the content of total isoflavones using UV spectrophotometry, with measurement wavelength at 260 nm, which showed a good linear relationship in the range of $0.9964 \sim 14.946 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. By using vanillin-perchloric acid colorimetric France, oleanolic acid was used as reference to determine the content of soybean saponin with measurement wavelength at 520 nm, and oleanolic acid showed a good linear relationship in the range of $2.2 \sim 11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. By using Phenol-sulfuric acid method glucose was used as reference to determine the content of polysaccharides with measurement wavelength at 490 nm, and glucose showed a good linear relationship in the range of $0.0025 \sim 0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Determination of content of total

[收稿日期] 20140408(002)

[基金项目] 贵州省科学技术厅(黔科合中药字[2012]5044号)

[第一作者] 王鹏娇, 硕士, 讲师, 从事新药研发及体内药物分析研究, Tel:18985419011, E-mail:25209728@qq.com

[通讯作者] *高秀丽, 硕士, 教授, 从事中药药效物质基础及质量研究和体内药物分析, Tel:0851-6908783, E-mail:xiuligao@hotmail.com

protein was performed through Coomassie brilliant blue method with the detection wavelength at 595 nm. The fibrinolytic activity was determined by fibrin plate method, using urokinase as control, which showed a good linear relationship in the range of 100-10 000 U · mL⁻¹. The cluster analysis of five active ingredients in SSP was performed by using SPSS16.0. **Result:** There was significant difference in the contents of main active components in commercially available SSP from different areas, with the lowest isoflavones content of 0.518 mg · g⁻¹, and the highest of 4.511 mg · g⁻¹; the lowest soybean saponin content was 0.873 mg · g⁻¹, while the highest was 8.623 mg · g⁻¹; the lowest polysaccharide content was 0.28% and the highest was 1.81%; the lowest content of total protein was 4.675%, while the highest was 36.133%. Seven SSP had no plasmin activity, however, among the other SSP with active products, the minimum of plasmin activity was 15.49 U · g⁻¹, and the highest activity was 1 752.08 U · g⁻¹. Cluster analysis showed good correspondence with locations. **Conclusion:** There are significant differences in the composition of active compounds in SSP from 21 different origins.

[**Key words**] Semen Sojae Prapreatum; active component; total isoflavones; soy saponins; polysaccharide; protein; fibrinolytic enzyme

淡豆豉是以豆科植物大豆的成熟种子为主要原料,配以桑叶、青蒿等中药发酵而成的炮制品,具有解除烦、宣发郁热等功效,临床上用于治疗感冒、头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠等^[1]。淡豆豉主要活性成分为大豆异黄酮、大豆皂苷、大豆蛋白、多糖、酶等化合物。其中,大豆异黄酮具有明显的抗肿瘤、降血糖、调节血脂、防治心血管疾病、抗氧化等作用^[2-6]。淡豆豉多糖对化学体系产生的羟自由基和超氧阴离子有清除作用^[7]。大豆皂苷具有抗氧化、抗肿瘤的作用^[8-9]。豆豉纤溶酶具有较强的纤溶活性和良好的体外溶栓效果^[10]。文献可见^[4-7,11]淡豆豉中单一成分的测定研究,本研究同时测定21批不同产地市售淡豆豉中5种活性成分的含量,并进行质量评价研究,以期对中药淡豆豉的质量评价与研究提供科学依据。

1 材料

116型摇摆式高速中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司),SG8200H型超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司),TGL-16C型离心机(上海安亭科学仪器厂),DHP9162型电热恒温培养箱(天津市实验仪器厂),UV-2401PC型紫外-可见分光光度计(日本岛津)。

染料木素(111704-200501)、齐墩果酸(1107090-200904)均购自中国食品药品检定研究院,蛋白定量测试盒(南京建成生物工程研究所),尿激酶(丽珠药业生产,活性单位10万IU),生理盐水(天津大茂化学试剂公司),凝血酶(500 U, sigma公司进口分装),纤维蛋白原(100 mg, sigma公司进口分装),琼脂(上海中科昆虫实验室);淡豆豉购于广东、广西、云南、湖北、北京、河北、河南省的不同药

店;经贵阳医学院药学院中药室主任龙庆德教授鉴定为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merve. 的成熟种子的发酵加工品。

2 方法及结果

2.1 淡豆豉中总异黄酮含量的测定^[12]

2.1.1 样品溶液的制备 精密称取淡豆豉药材1 g,加石油醚10 mL浸泡3 h脱脂,过滤,滤渣加80%乙醇10 mL超声提取10 min,3 000 r · min⁻¹离心10 min,滤渣重复提取3次,合并上清液,浓缩,用80%乙醇定容至500 mL。

2.1.2 线性关系考察 精密称取染料木素对照品24.91 mg,加80%乙醇定容至25 mL为贮备液。精密吸取贮备液1 mL,用80%乙醇稀释至10 mL作为对照品溶液,得到染料木素为99.64 mg · L⁻¹。精密吸取0.1,0.3,0.6,0.9,1.2,1.5 mL于10 mL量瓶中,用80%乙醇定容至刻度,260 nm处测定吸光度。以染料木素质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $A = 0.1528C + 0.0157$ ($r = 0.9996$),线性范围0.9964 ~ 14.946 mg · L⁻¹。

2.2 淡豆豉中大豆皂苷含量的测定^[13]

2.2.1 样品溶液的制备 样品处理方法同2.1.1项下。

2.2.2 线性关系考察 精密称取齐墩果酸对照品6.6 mg,加甲醇定容至50 mL,得到齐墩果酸为0.132 g · L⁻¹,精密吸取0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL于10 mL具塞试管中,挥干,加5%香草醛冰醋酸溶液(临用现配)0.4 mL,高氯酸1.6 mL,于70 °C水浴中加热15 min,取出后迅速用冰水冷却,加入乙酸乙酯4 mL稀释,于紫外分光光度计520 nm处测定吸光度。以齐墩果酸浓度为横坐标,测得吸光度为纵坐标进行

线性回归,得回归方程 $A = 0.020\ 5C + 0.047\ 0$ ($r = 0.999\ 7$),线性范围 $2.2 \sim 11\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 淡豆豉中多糖含量的测定^[11]

2.3.1 样品溶液的制备 精密称取淡豆豉药材 1 g,加石油醚 10 mL 浸泡 3 h 脱脂,过滤,滤渣加 80% 乙醇 10 mL,60 °C 温浸 24 h,过滤,取滤渣,加蒸馏水 10 mL,70 °C 超声提取 3 次,每次 30 min,过滤,合并滤液,得粗多糖浓缩液,定容至 10 mL。精密量取粗多糖提取液 2 mL,加入 3% 胃蛋白酶 1 mL,pH 7.0,60 °C 恒温水浴,水解 1 h 后,水浴升温至 90 °C,维持 6 min 使酶失活。再加入 80% 乙醇 5 mL,50 °C 下放置 30 min 后温浸过夜,次日 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清液,得到多糖沉淀,沉淀用水溶解,定容至 10 mL。

2.3.2 线性关系考察 精密称取葡萄糖对照品 5.0 mg,加水定容至 50 mL,得到葡萄糖为 $0.1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。精密吸取 1,2,3,4,5 mL 于 10 mL 量瓶中,用水定容至刻度。各取 2 mL,加入 5% 苯酚 1 mL,浓硫酸 5 mL,涡旋震荡 10 s,充分混匀后放置 10 min,沸水浴 15 min,冰水浴 30 min,于紫外分光光度计 490 nm 处测定吸光度。以葡糖糖质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $A = 54.941C + 0.010\ 9$ ($r = 0.999\ 6$),线性范围 $0.002\ 5 \sim 0.02\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 淡豆豉中总蛋白含量的测定^[14]

2.4.1 样品溶液的制备 精密称取淡豆豉药材 0.2 g,加石油醚 10 mL 浸泡 3 h 脱脂,滤过,滤渣加超纯水 10 mL 超声辅助 40 °C,碱提(pH 11)40 min,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,滤渣如此提取 2 次,合并提取液,用超纯水定容至 100 mL。

2.4.2 测定方法 取待测液 50 μL ,加入试剂盒提供的考马斯亮蓝显色剂 3 mL,充分混合,静置 10 min,于紫外分光光度计 595 nm 处测定其 A 。

2.5 淡豆豉中纤溶酶活力的测定

2.5.1 样品溶液的制备 精密称取淡豆豉粉末 1 g,加无菌生理盐水 3 mL,溶解 2 h,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液。

2.5.2 标准曲线的绘制 精密吸取 10 000,8 000,6 000,4 000,2 000,1 000,500,100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 尿激酶对照品溶液各 10 μL ,分别加入纤维蛋白平板 10 μL 孔中,37 °C 恒温放置 9 h,测定溶解圈直径,以溶解圈的面积(X)为横坐标,尿激酶浓度梯度(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.002X^{2.8176}$ ($r = 0.995\ 1$),在 $100 \sim 10\ 000\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 呈良好线性

关系。

2.5.3 测定方法 取琼脂粉 0.3 g,加生理盐水 16 ~ 18 mL,反复煮沸至溶液澄清,待温度降至约 55 °C,加入纤维蛋白原及的凝血酶,放置 1 h。在凝固后的纤维蛋白平板上打直径为 2 mm 的小孔,分别加入样品 10 μL ,于 37 °C 培养箱放置 9 h。用游标卡尺横向和纵向量取溶圈直径,依据回归方程计算样品中纤溶酶活力。

2.6 样品含量测定 取 21 批市售不同产地淡豆豉,按照 2.1 项下的方法处理、测定,结果见表 1。

表 1 21 批市售淡豆豉中总异黄酮、大豆皂苷、多糖、总蛋白、纤溶酶的含量

No.	样品	总异黄酮 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	大豆皂苷 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	多糖 /%	总蛋白 /%	纤溶酶 / $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$
1	广东 1	3.004	5.606	0.550	28.160	不明显
2	广东 2	4.511	8.623	0.410	31.203	不明显
3	广东 3	4.321	4.057	1.330	28.200	844.050
4	广东 4	4.060	5.125	1.350	22.713	1 168.750
5	广西 1	2.522	5.478	0.700	25.245	不明显
6	广西 2	3.997	8.213	0.680	29.036	不明显
7	广西 3	3.606	4.075	1.810	23.115	1 752.080
8	云南 1	1.138	1.045	0.640	10.755	不明显
9	云南 2	0.847	1.174	0.280	6.930	不明显
10	武汉 1	0.692	0.971	1.130	4.675	1 530.210
11	武汉 2	0.654	1.163	0.680	8.244	不明显
12	北京 1	3.549	3.347	1.640	31.020	18.590
13	北京 2	2.660	2.696	1.610	19.342	49.910
14	北京 3	2.510	3.126	1.570	20.548	80.810
15	河北 1	2.786	4.064	0.710	30.093	413.540
16	河北 2	2.801	4.565	0.690	36.133	559.820
17	河北 3	2.892	4.682	0.670	29.576	859.590
18	河南 1	0.518	0.873	0.450	7.122	15.490
19	河南 2	0.650	0.897	0.540	8.591	22.190
20	河南 3	0.873	1.138	1.120	5.674	73.620
21	河南 4	2.266	2.272	1.060	20.240	227.510

2.7 聚类分析 使用 SPSS 16.0 统计软件对 21 个不同来源淡豆豉进行聚类分析,结果如图 1。

3 讨论

淡豆豉自古药食同用,历代医籍均有其防治疾病的记载,也是《中国药典》的收录品种。现代常用感冒药,如维 C 银翘片、银翘解毒胶囊、羚羊感冒软胶囊等均含有淡豆豉。本研究结果表明,不同产地淡豆豉中总异黄酮、大豆皂苷、多糖、总蛋白、纤溶酶

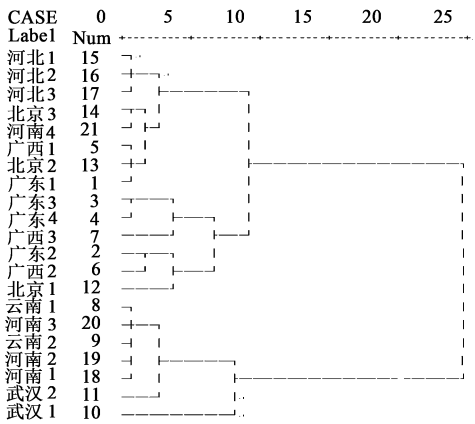


图1 21批不同来源淡豆豉的聚类分析

含量均存在明显差异。我国淡豆豉主要是自然发酵,各地发酵工艺受到多方面主客观因素影响。首先原料大豆和辅料的来源有很大差异,除了产地差异,还与品种、采收季节、生长环境以及发酵前大豆蒸煮程度有关;其次发酵过程中受环境中的真菌、温度、湿度、酸碱度、发酵时间等因素影响;最后,成品的贮存方式不同也会直接影响淡豆豉的质量。

淡豆豉中总异黄酮、大豆皂苷、总蛋白的含量主要来源于原料大豆,这3种活性成分的含量成正相关关系。其中广东、广西、北京、河北产地的淡豆豉的总异黄酮、大豆皂苷、总蛋白的含量较高,提示这4个产地的原料大豆的质量较好。相关文献报道^[15],大豆通过发酵后会产生一种溶栓酶,为纤维蛋白溶解酶(简称纤溶酶)。然而,选择活性成分较高的原料大豆,其发酵而成的淡豆豉纤溶酶活力并不一定高,主要还与炮制工艺各个因素相关。葛喜珍等^[16]研究发现,淡豆豉中多糖含量比原料大豆的要高,其中淡豆豉中多糖质量分数为0.91%,黑大豆和黄大豆中多糖质量分数分别为0.14%,0.23%,说明大豆通过发酵,经过微生物的作用合成更多低聚糖。因此,淡豆豉中多糖含量与纤溶酶有相关性,多糖含量高的淡豆豉,其纤溶酶活力也比较高。而有的淡豆豉中纤溶酶活性不明显,观察其外观形状为脆硬、表面光滑,考虑该淡豆豉发酵不透彻。

使用统计软件SPSS 16.0以淡豆豉中5种有效成分的含量为参数组合对市售不同产地淡豆豉进行聚类分析,结果表明,树状图结果与地理位置有明显的对应关系。当距离系数为10时,总体可以分成两大类,第一类为河北、广东、广西、北京产地淡豆豉样品,第二类为云南、河南、武汉样品。

本研究同时测定了21批不同产地淡豆豉中5种活性成分的含量并进行质量评价,旨在为淡豆豉质量的可控性以及各地炮制工艺规范性生产提供科学可靠的依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:308.
- [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] 白霞,牛丽颖,刘姣. 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.
- [4] 葛喜珍,王鑫围,力提甫·斯拉木,等. 中药淡豆豉有效成分大豆异黄酮调节血脂的研究进展[J]. 河北中医药学报. 2002,17(3):41.
- [5] 王爱梅,周建辉,欧阳静萍. 大豆异黄酮对更年期大鼠抗氧化作用及提高学习记忆能力的研究[J]. 现代医药卫生,2008,24(7):954.
- [6] 牛丽颖,王鑫围,葛喜珍,等. 淡豆豉降糖提取物降糖有效部位研究[J]. 中药药理与临床,2004(5):21.
- [7] 劳风云,刘正猛,王烘波. 淡豆豉多糖的提取及其清除自由基的活性研究[J]. 现代预防医学,2008,35(10):1909.
- [8] 王海波. 大豆皂甙的抗氧化研究[J]. 营养学报,2008,29(3):3.
- [9] 黄国清,肖俊霞,杜德红,等. 大豆皂甙对H22荷瘤小鼠抗肿瘤研究[J]. 食品研究与开发,2009,21(12):270.
- [10] 范晓丹,郭勇,刘柳. 产生纤溶酶菌种的鉴定及纤溶酶的分离纯化[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,2007,35(4):91.
- [11] 张静,葛喜珍,田平芳,等. 淡豆豉中豆豉多糖、大豆异黄酮的超声提取及含量检测[J]. 中药材,2007,30(12):1532.
- [12] 崔力剑,黄芸,窦玉红,等. 大豆发酵制品中总异黄酮的含量测定[J]. 时珍国医国药,2008,19(2):316.
- [13] 徐启红,樊军浩. 大豆皂苷不同提取方法比较研究[J]. 荆楚理工学院学报,2010,25(11):10.
- [14] 周红霞. 大豆蛋白质的提取工艺研究[J]. 中国饲料,2009,6:40.
- [15] 侯静,赵敏,杨福明,等. 豆豉纤溶酶的研究现状及发展前景[J]. 中国调味品,2009,34(1):22.
- [16] 葛喜珍,张静,林强,等. 淡豆豉、黑大豆和黄大豆中多糖含量研究[C]. 石家庄:2008中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集,2008.

[责任编辑 顾雪竹]