

大豆黄卷质量控制方法研究

于密密, 傅欣彤, 郭洪祝*
(北京市药品检验所, 北京 100035)

[摘要] **目的:**建立大豆黄卷质量标准。**方法:**采用薄层色谱法,以亮氨酸、染料木苷作为对照品,对大豆黄卷进行定性鉴别;采用高效液相色谱法对大豆黄卷中大豆苷和染料木苷进行含量测定;采用 C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),以甲醇-1%乙酸溶液为流动相,进行梯度洗脱,检测波长 260 nm,流速 1 mL·min⁻¹。**结果:**薄层色谱中斑点清晰,重复性好;大豆苷在 0.042 1~1.011 μ g 呈良好的线性关系,染料木苷在 0.041 3~0.991 μ g 线性关系良好。**结论:**所建立的方法简便快速、准确度高,可作为大豆黄卷的质量控制方法。

[关键词] 大豆黄卷; 质量标准; 亮氨酸; 染料木苷; 大豆苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0103-04

Study on Quality Standards for Sojæ Semen Germinatum

YU Mi-mi, FU Xin-tong, GUO Hong-zhu*
(Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the quality standard of Sojæ Semen Germinatum. **Method:** TLC method was used to identify leucine and genistin. In the HPLC method, the separation was performed on a C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) column with methanol-1% acetic acid as the mobile phase with flow rate of 1 mL · min⁻¹. The detection wavelength was set at 260 nm. **Result:** For the HPLC quantitation method, the calibration curve of daidzin displayed ideal linearity in the range of 0.042 1-1.011 μ g. And the calibration curve of genistin displayed ideal linearity in the range of 0.041 3-0.991 μ g. **Conclusion:** The TLC identification and HPLC determination were sensitive, reliable and repeatable and can be applied for the quality evaluation and assessment of Sojæ Semen Germinatum.

[Key words] Sojæ Semen Germinatum; quality standard; leucine; genistin; daidzin

大豆黄卷是为豆科植物大豆的成熟种子经发芽干燥而得,又名大豆卷、黄豆卷,味甘性平,归脾、胃、肺经,具有解表祛暑、清热利湿的作用^[1-2]。本品以粒大、饱满、有短芽者为佳,最早见于《神农本草经》,大豆黄卷在多个成方制剂中出现,曾收录于 2008 年版《北京市中药饮片炮制规范》,但没有定性定量方法。目前关于其化学成分、药理作用研究较

少,且未见有关其质量标准研究的文献。为了更好的控制大豆黄卷质量,根据《中国药典》2010 年版中药标准科研任务书的要求,本文对其质量标准进行了研究,以主要有效成分氨基酸类成分和大豆异黄酮类成分作为指标性成分,建立了大豆黄卷定性鉴别和含量测定方法^[3-5]。

1 材料

1.1 仪器 岛津高效液相色谱仪,二极管阵列检测器;BP211D 电子天平(Sartorius 美国);甲醇为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。薄层板:烟台硅胶 G 板。

1.2 对照品 大豆苷批号 111738-200501,染料木苷批号 111709-200501,供含量测定用。亮氨酸批号 110876-200204,均购自中国药品生物制品检定所。

1.3 样品 大豆黄卷 5 批:2009012-01 号样品(同

[收稿日期] 20120727(015)

[基金项目] 药典委员会药品质量标准提高项目(文件号 [2008]99)

[第一作者] 于密密,主管药师,从事中药质量标准研究, Tel: 010-83221422, E-mail: melandy@sina.com

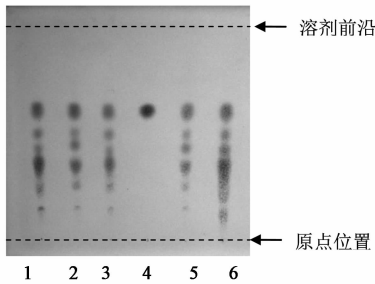
[通讯作者] *郭洪祝,主任药师,博士生导师,从事中药质量标准研究, Tel: 010-83226434, E-mail: guohz@bidc.org.cn

仁堂科技发展股份有限公司提供)、2009012-2 号样品(河北市场购买)、2009012-3 号样品(同仁堂亳州饮片厂提供)、2009012-4 号样品(河北市场购买)、2009012-5 号样品(安徽市场购买),经北京市药品检验所中药室于密密主管药师鉴定为 *Glycine max* (L) Merr。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 亮氨酸薄层色谱鉴别取本品粉末 1.0 g,加稀乙醇 30 mL,超声 30 min,离心,滤过,滤液蒸干,残渣加稀乙醇 1.0 mL 使溶解,取上清液,作为供试品溶液。另取亮氨酸对照品,加稀乙醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录 VI B)试验,吸取上述两种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 板上,以正丁醇-冰醋酸-水(19:5:5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以茚三酮试液,105 $^{\circ}$ C 加热至显红色斑点。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。见图 1。



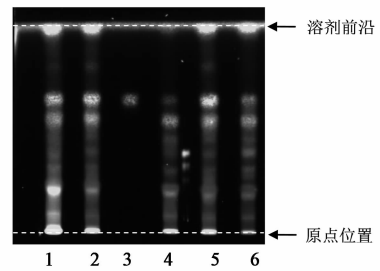
1. 2009012-01; 2. 2009012-02; 3. 2009012-03;
4. 亮氨酸对照品; 5. 2009012-04; 6. 2009012-05

图 1 亮氨酸薄层色谱

2.1.2 染料木苷薄层色谱鉴别取本品粉末 2.0 g,加 80% 乙醇 30 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加 80% 乙醇 1.0 mL 使溶解,取上清液,作为供试品溶液。另取染料木苷对照品,加 80% 乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录 VI B)试验,吸取上述供试品 5~10 μ L,对照品溶液 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 板上,以乙酸乙酯-甲醇-水(10:1.7:1.3)为展开剂,预饱和 30 min,展开,取出,晾干,喷以 2% 三氯化铝乙醇溶液,晾干,105 $^{\circ}$ C 加热数分钟,置紫外光灯 365 nm 下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。见图 2。

2.2 含量测定

2.2.1 对照品溶液制备精密称取大豆苷、染料木



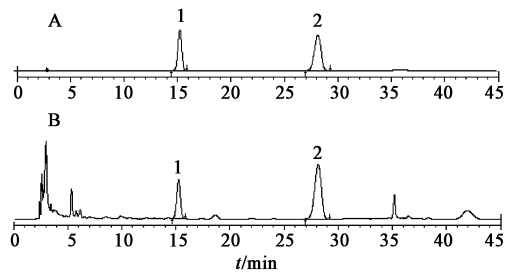
1. 2009012-01; 2. 2009012-02; 3. 染料木苷对照品;
4. 2009012-03; 5. 2009012-04; 6. 2009012-05

图 2 染料木苷薄层色谱

苷对照品适量,加 70% 甲醇制成每 1 mL 各含 20 μ g 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备取本品粉末(过四号筛)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,称定质量,加热回流 2 h,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,离心(2 000 $r \cdot \min^{-1}$)10 min,取上清液,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 色谱条件色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相以甲醇为流动相 A,以 1% 乙酸溶液为流动相 B,梯度洗脱 0~25 min (28% A),25~33 min (28~45% A),流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 260 nm,柱温 35 $^{\circ}$ C。理论板数按大豆苷峰、染料木苷峰计算应不低于 5 000。见图 3。



A. 对照品; B. 大豆黄卷药材; 1. 大豆苷; 2. 染料木苷

图 3 大豆黄卷中大豆苷和染料木苷 HPLC

2.2.4 精密度试验精密吸取上述对照品溶液,连续进样 5 次,测定大豆苷和染料木苷峰面积,计算 RSD 分别为 1.26%, 1.46%。

2.2.5 线性关系考察取大豆苷对照品溶液(精密称取大豆苷对照品适量,加 70% 甲醇制成 0.042 1 g \cdot L⁻¹的对照品溶液)和染料木苷对照品溶液(精密称取染料木苷对照品适量,加 70% 甲醇制成 0.041 3 g \cdot L⁻¹)混合液,精密吸取 1, 4, 8, 16, 20, 24 μ L,注入高效液相色谱仪,记录峰面积,以分别以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标

准曲线,大豆苷回归方程为 $Y = 3.535 \times 10^6 X + 1.075 \times 10^4$ ($r = 0.9999$);染料木苷回归方程为 $Y = 5.454 \times 10^6 X - 1.389 \times 10^4$ ($r = 0.9999$)。结果表明,大豆苷对照品在 $0.0421 \sim 1.010 \mu\text{g}$ 线性关系良好,染料木苷对照品在 $0.0413 \sim 0.991 \mu\text{g}$ 线性关系良好。

2.2.6 重复性试验 对同一批样品(1号样品,同仁堂提供)6份,分别按照2.2.2供试品溶液的制备方法,制备成供试品溶液,分别进样 $10 \mu\text{L}$,测定。计算含量。求得大豆苷和染料木苷平均含量分别为 $0.5417, 0.8320 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;RSD 分别为 $1.26\%, 1.46\%$,结果表明重复性试验良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于配制后 $0, 2, 5, 10, 30 \text{ h}$ 进样 $10 \mu\text{L}$,依法测定峰面积,求得大豆苷与染料木 RSD 分别为 $0.88\%, 0.51\%$,结果表明供试品溶液在 30 h 内基本稳定。

2.2.8 准确度及范围试验 准确度试验:取本品粉末 0.5 g ,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入大豆苷与染料木苷混合对照品溶液(大豆苷质量浓度为 $0.008704 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,染料木苷质量浓度为 $0.01840 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 25 mL ,称定质量,按2.2.2操作方法测定,结果大豆苷的平均回收率为 100.9% ,RSD 1.48% ,结果染料木苷的平均回收率为 99.41% ,RSD 1.48% ,以上结果表明本法测定大豆苷和染料木苷均具有良好的准确度。

低浓度准确度:取本品粉末 0.25 g ,精密称定,精密加入大豆苷与染料木苷对照品溶液(大豆苷质量浓度为 $0.004352 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,染料木苷质量浓度为 $0.00736 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 25 mL ,称定质量,按2.2.2操作方法测定,结果大豆苷的平均回收率为 101.9% ,RSD 0.67% ,结果染料木苷的平均回收率为 99.48% ,RSD 0.90% 。

高浓度准确度:取本品粉末 1.0 g ,精密称定,精密加入大豆苷与染料木苷对照品溶液(大豆苷质量浓度为 $0.017408 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,染料木苷质量浓度为 $0.0368 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 25 mL ,称定质量,按2.2.2方法测定,结果大豆苷的平均回收率为 95.91% ,RSD 0.68% ,结果染料木苷的平均回收率为 96.08% ,RSD 0.54% ,结果表明,低浓度和高浓度时均具有较好的回收率。结果见表1,2。

2.2.9 耐用性试验 采用①CAPCELL PAK C_{18} M.G 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),②SUPELCO Discovery 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),分别依

表1 大豆苷的回收率考察

取样量 /g	样品含量 /mg	测得总量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.5002	0.2710	0.4869	0.2176	99.22	100.9	1.48
0.5098	0.2762	0.4974	0.2176	101.7		
0.5165	0.2798	0.5016	0.2176	101.9		
0.2646	0.1433	0.2540	0.1088	101.7	101.9	0.67
0.2638	0.1429	0.2546	0.1088	102.7		
0.2613	0.1415	0.2518	0.1088	101.4		
1.0003	0.5419	0.9599	0.4352	96.05	95.91	0.68
0.9982	0.5407	0.9606	0.4352	96.48		
0.9903	0.5364	0.9507	0.4352	95.2		

表2 染料木苷的回收率考察

取样量 /g	样品含量 /mg	测得总量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.5002	0.4162	0.8688	0.4600	98.39	99.41	1.49
0.5098	0.4242	0.8784	0.4600	98.74		
0.5165	0.4297	0.8946	0.4600	101.1		
0.2646	0.2201	0.4014	0.1840	98.53	99.48	0.90
0.2638	0.2195	0.4040	0.1840	100.3		
0.2613	0.2174	0.4007	0.1840	99.62		
1.0003	0.8322	1.7214	0.9200	96.65	96.08	0.54
0.9982	0.8305	1.7131	0.9200	95.93		
0.9903	0.8239	1.7039	0.9200	95.65		

法测定同一批号样品,结果均能获得满意的分离效果,且大豆苷和染料木苷测定结果 RSD 分别为 $0.64\%, 0.74\%$ 。结果表明,不同品牌色谱柱测定结果基本一致,本方法耐用性良好。

3 含量测定

对不同产地的大豆黄卷按2.2.2供试液制备方法制备、测定,结果见表3。根据上述测定结果,暂订本品按干燥品计算,含大豆苷和染料木苷的总量不得少于 0.08% 。

表3 大豆黄卷含量测定结果(按干燥品计算) %

批号/产地	大豆苷	染料木苷	二者含量之和
2009012-01	0.0574	0.0882	0.1456
2009012-02	0.0656	0.0980	0.1636
2009012-03	0.0456	0.0576	0.1032
2009012-04	0.0682	0.100	0.1682
2009012-05	0.0366	0.0573	0.0939

4 讨论

4.1 流动相的优化 考察了甲醇-1%醋酸(35:65)、甲醇-1%醋酸(30:70)、甲醇-1%醋酸(28:72)

巴戟天及不同盐分炮制品中 糖类成分 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

刘硕¹, 马方励¹, 李养学^{2*}, 罗文汇²

(1. 无限极(中国)有限公司, 广州 510665; 2. 广东省中医研究所, 广州 510095)

[摘要] 目的: 建立巴戟天及不同盐分炮制品中糖类成分 HPLC-ELSD 指纹图谱分析方法, 为确定盐制巴戟天饮片在炮制过程中的用盐比例及其质量标准的制定提供依据。方法: 采用 HPLC, 色谱柱为 Agilent ZORBAX Carbohydrate (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-水, 流速 1.2 mL·min⁻¹, 梯度洗脱, 柱温 35 °C, 以蒸发光散射检测器 (ELSD) 检测, 漂移管温度为 105 °C, 增益值为 1, 氮气流量 2.0 L·min⁻¹; 采用国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 年 A 版) 进行评价。结果: 以耐斯糖峰为参照峰, 18 批样品标定了共有峰 16 个, 各样品相似度均 > 0.90。结论: 该方法简单、准确、重复性好, 可用于巴戟天及其盐制品糖类成分的质量控制。

[关键词] 巴戟天; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器; 指纹图谱; 糖类成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0106-05

HPLC-ELSD Fingerprint of Carbohydrate Constituents in Morindae Officinalis Radix and its Salt Processed Products

LIU Shuo¹, MA Fang-li¹, LI Yang-xue^{2*}, LUO Wen-hui²

(1. Infinitus (China) Company Limited, Guangzhou 510665, China;

2. Guangdong Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

[收稿日期] 20120817(010)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2011B030500004)

[第一作者] 刘硕, 工程师, 硕士, 从事中草药及相关保健食品的研究, E-mail: shuo_liu@infinitus.com.cn

[通讯作者] * 李养学, 中药师, 本科, 从事中药及制剂的质量评价, Tel: 020-83501292, E-mail: efongzg@126.com

以及甲醇-1% 醋酸梯度洗脱, 结果显示甲醇-1% 醋酸(28:72)分离效果较好, 但是若采用等度洗脱, 样品中的杂质峰容易影响后续样品的分析, 故在等度条件基础上, 采用上述梯度洗脱, 以保证分离度, 并避免干扰。

4.2 供试品制备方法的优化 对提取溶剂进行了考察, 比较了甲醇, 70% 甲醇, 50% 甲醇, 结果 70% 甲醇提取大豆苷和染料木苷的效率最高; 对提取方法进行了考察, 比较了超声法和回流法的效果, 结果回流提取, 大豆苷和染料木苷含量均较高; 最后考察了不同提取时间(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 h)对含量的影响, 结果表明水浴加热回流 2, 3 h, 大豆黄卷中大豆苷和染料木苷的提取率基本一致, 故选用提取时间为 2 h。

[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: 19.
- [2] 沈烈行 徐瑞军. 大豆黄卷炮制工艺改进[J]. 中药材, 1994, 17(8): 7.
- [3] 霍红, 田明, 王秀海, 等. 大豆及其生物发胶制品淡豆豉异黄酮含量研究[J]. 中医药学报, 2011, 39(3): 74.
- [4] 刘清, 徐风华, 李永生. 优化 HPLC 法测定淡豆豉中大豆异黄酮的含量[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 182.
- [5] 章军, 薛翠娟, 荆文光, 等. HPLC 测定葛根饮片中 5 个成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 108.

[责任编辑 顾雪竹]