

# 淡豆豉、黄大豆及黑大豆中异黄酮苷元的提取与含量比较

张 静<sup>1,2</sup>, 田平芳<sup>1</sup>, 葛喜珍<sup>2,\*</sup>, 胡静远<sup>2</sup>, 李 申<sup>2</sup>, 王 鑫<sup>1</sup>

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

2. 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

**摘 要:** 为探讨淡豆豉、黄大豆及黑大豆中异黄酮苷元的提取与含量, 本研究采用超声提取, 用 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶解大豆异黄酮中的糖苷键。以聚酰胺薄膜层析定性、HPLC 定量检测不同原料中异黄酮苷元含量。实验结果表明, HPLC 最佳流动相为甲醇-乙酸-水(12:1:10), 染料木苷、大豆苷元和染料木素在 20min 内分离良好。大豆异黄酮苷元含量依次为: 淡豆豉>黄大豆>黑大豆。精密度实验 RSD 分别为 1.45 % 和 1.6 %, 平均加样回收率 100.93 %, 证明实验所建立的检测方法准确、可靠。

**关键词:** 超声提取; 聚酰胺; 酶解; 染料木素; 大豆苷元; 高效液相色谱

Extraction and Comparison of Isoflavone Aglycones in *Seme Sojae Preparatum*, Soybean and Black soybean

ZHANG Jing<sup>1,2</sup>, TIAN Ping-fang<sup>1</sup>, GE Xi-zhen<sup>2,\*</sup>, HU Jing-yuan<sup>2</sup>, LI Shen<sup>2</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. Biochemical Engineering College, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

**Abstract:** To explore the extraction and content of isoflavone aglycones in *Seme Sojae Preparatum*, soybean and black soybean, ultrasonic wave was used in the experiments. Besides, soybean isoflavone glucosides were transformed to aglycones by  $\beta$ -glucosidase. Soybean isoflavones in different materials were identified by the method of polyamide TLC, while quantified by HPLC. The experiments results indicated that genistin, daidzein and genistein could be separated perfectly within twenty minutes under the mobile phase of methanol:acetic acid:water (12:1:10). The content of isoflavone aglycones was the most in *Seme sojae Preparatum*, and black soybean had the lest content. The precision RSD were 1.45 % and 1.6 % respectively, and the average recovery was 100.93 %, which proved that the method of experiments was both veracious and credible.

**Key words:** ultrasonic extraction; polyamide; hydrolyze; genistein; daidzein; HPLC

中图分类号: 0623.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0214-04

大豆异黄酮是大豆生长过程中形成的一类次生代谢产物, 主要分布于大豆种子的子叶和胚轴中。它具有多种药理活性<sup>[1-2]</sup>, 如防治糖尿病及减轻糖尿病并发症, 抗氧化作用, 雌激素样作用, 抗肿瘤作用, 防治心血管疾病以及预防骨质疏松症等。大豆异黄酮分为游离型苷元(aglycone)和结合型糖苷(gluconside)两大类。苷元由于脱去糖基, 极性减小, 脂溶性增加, 因而在人体内的吸收比糖苷快, 摄入人体后能迅速通过小肠吸收, 进入血液循环, 较快达到所需血药浓度, 发挥药效作

用<sup>[3]</sup>。然而游离苷元仅占总异黄酮含量的 2%~3%, 大量糖苷型大豆异黄酮需经水解转化为游离苷元, 才能够有效发挥药理活性作用。

大豆异黄酮存在于各色种皮大豆中, 由大豆发酵而来的中药淡豆豉也含有此成分。目前已有大量关于各色种皮豆类异黄酮含量的相关研究<sup>[4-5]</sup>, 但研究报道的含量差异较大, 且缺乏系统比较。本实验旨在通过比较黑大豆和黄大豆中总异黄酮的含量差异, 期望能对淡豆豉炮制原理加以阐述。并利用 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解大豆异

收稿日期: 2007-03-23

基金项目: 北京市教育委员会科技发展计划资助项目(KM200611417013);

北京联合大学生化学院生物化工重点建设学科项目(0650411; 0660415)

作者简介: 张静(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: jingbuct@sina.com

\* 通讯作者: 葛喜珍(1968-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为中药药理。E-mail: gexizhen@163.com

黄酮糖苷, 比较三者异黄酮苷元含量差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

黄大豆、黑大豆、淡豆豉均购自安国中药材市场, 经北京联合大学生化学院制药工程教研组鉴定为正品。

### 1.2 试剂

胃蛋白酶(1:12000, 20060602) 北京奥博星生物技术有限公司;  $\beta$ -葡萄糖苷酶(50U, 6017041104) Sigma 公司; 染料木苷、大豆苷元、染料木素标准品 中国药品生物制品检定所; 色谱甲醇; 乙醇、乙酸、醋酸钠、石油醚、浓硫酸、苯酚等均为分析纯。

### 1.3 仪器与设备

高效液相色谱仪(包括 LC-10AT 泵、SPD-10A 检测器、SCL-10A 控制器、CTO-10AS 柱温箱) 岛津公司; 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜; KQ-250B 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; RE-3000 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-95B 型循环水式多用真空泵 河南巩义市英峪予华仪器厂; 6002 型高速粉碎机; METTLER AE100 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司; 聚酰胺薄膜(8 $\times$ 8cm) 浙江台州市; ZF7 三用紫外分析仪 上海康华生化仪器制造厂; 恒温水浴箱。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 总异黄酮提取

将淡豆豉、黄大豆、黑大豆粉碎, 过 40 目筛, 石油醚脱脂, 烘干。三种原料各称量 20 g, 80% 乙醇温浸 24h(料液比 1:10), 超声提取 30min/次, 3 次, 提取温度 60 $^{\circ}$ C, 过滤。弃去滤饼, 合并滤液, 挥发溶剂, 采用 80% 乙醇反复冷浸法除去少量杂蛋白, 得总异黄酮浓缩液。

#### 1.4.2 聚酰胺薄膜层析定性检测

分别配制染料木苷、大豆苷元、染料木素标准品溶液以及混合标准品溶液, 以甲醇-醋酸-水(18:1:1)为展开剂系统, 用 1.5% 的  $AlCl_3$  乙醇溶液显色, 吹干, 254nm 紫外灯下观察, 结果见表 1。结果表明三种标准品分离良好, 混合标准品中三者的  $R_f$  值分别为: 染料木苷 0.664, 大豆苷元 0.455, 染料木素 0.345。将提取的异黄酮样品分别点样于聚酰胺薄膜, 展开约 30min, 有效成分分离良好。

表 1 标准品显色反应

Table 1 Color reaction of standard substance

| 标准品  | 未喷显色剂时    | 喷显色剂后  | 荧光斑点 |
|------|-----------|--------|------|
| 大豆苷元 | 蓝紫色荧光     | 显蓝紫色荧光 | 明亮   |
| 染料木苷 | 不显荧光, 为黑斑 | 亮绿色荧光  | 较明亮  |
| 染料木素 | 不显荧光, 为黑斑 | 绿色荧光   | 较暗   |

#### 1.4.3 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮

将  $\beta$ -葡萄糖苷酶(50U)溶解于 pH5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液, 定容至 30ml。依据  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶学性质<sup>[6]</sup>, 本实验酶解条件为: 恒温水浴 45 $^{\circ}$ C, pH5.0, 水解时间 2.5h。

#### 1.4.4 HPLC 检测大豆异黄酮含量

##### 1.4.4.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil  $C_{18}$ (250 $\times$ 4.6mm, 5 $\mu$ m); 流动相: 甲醇-乙酸-水(12:1:10); 流速: 1.0ml/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 20  $\mu$ l; 检测波长: 260nm。

##### 1.4.4.2 标准储备液的配制

将三种标准品减压干燥 12h。准确称量染料木苷 2.5mg、大豆苷元 2.5mg、染料木素 1mg, 分别用色谱甲醇定容, 得三种不同浓度标准储备液: 0.1mg/ml 染料木苷, 0.05mg/ml 大豆苷元、0.01mg/ml 染料木素。

##### 1.4.4.3 标准方程

按照表 2 配制混合标准浓度梯度溶液, 分别用色谱甲醇定容至 10ml。0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, HPLC 检测, 三者保留时间分别为: 染料木苷约 4.6min、大豆苷元约 10.5min、染料木素约 16min(图 1), 可见此色谱条件下三种有效成分分离较好。得到以下三条标准曲线方程(横坐标 x: 浓度  $\mu$ g/ml, 纵坐标 y: 峰面积 $\times 10^{-5}$ )。

染料木苷:  $y=2.8856x+4.3912$   $R^2=0.9993$ (线性范围 10~35 $\mu$ g/ml) (1)

大豆苷元:  $y=2.6713x+0.0955$   $R^2=0.9997$ (线性范围 0.5~10 $\mu$ g/ml) (2)

染料木素:  $y=5.3054x+0.28$   $R^2=0.9994$ (线性范围 0.1~6.0 $\mu$ g/ml) (3)

表 2 混合标准浓度梯度溶液的配制方法

Table 2 Preparation method of mixed gradient concentration - standard solution

| 标准储备液    | 浓度<br>梯度 1 | 浓度<br>梯度 2 | 浓度<br>梯度 3 | 浓度<br>梯度 4 | 浓度<br>梯度 5 | 浓度<br>梯度 6 | 浓度<br>梯度 7 |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 染料木苷(ml) | 1.0        | 1.5        | 2.0        | 2.5        | 3.0        | 3.5        | ×          |
| 大豆苷元(ml) | 0.1        | 0.5        | 1.0        | 1.5        | 2.0        | ×          | ×          |
| 染料木素(ml) | 0.1        | 1.0        | 2.0        | 3.0        | 4.0        | 5.0        | 6.0        |

注: “ $\times$ ”表示该浓度梯度混合溶液不含有相对应的标准物质。

## 2 结果与分析

### 2.1 水解前后样品色谱图对照

### 2.2 水解前总异黄酮含量

将提取所得总异黄酮用色谱甲醇溶解并定容至一定体积, 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, HPLC 进行检测, 换算得异黄酮含量(表 3)。

### 2.3 水解后异黄酮苷元含量

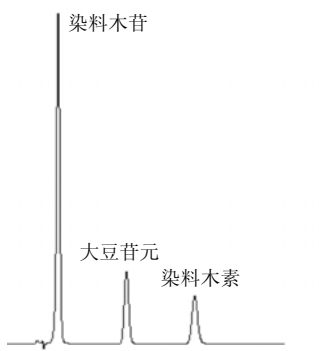
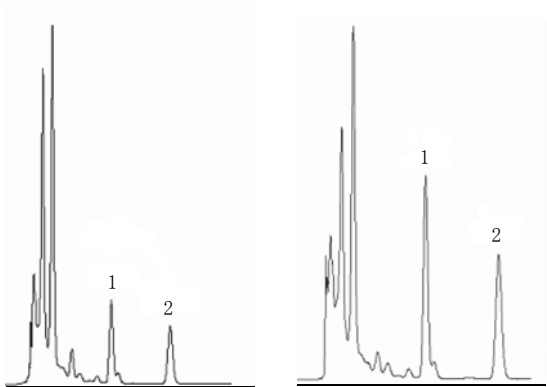


图1 混合标准品的色谱图  
Fig.1 Chromatogram of mix-standard substance



1. 大豆苷元; 2. 染料木素。  
图2 淡豆豉水解前后苷元含量的变化  
Fig.2 Changes of aglycones contents in hydrolyzed seme sojae preparatum

表3 总异黄酮含量  
Table 3 Content of total isoflavones

| 样品含量(μg/g) | 染料木苷   | 大豆苷元   | 染料木素   |
|------------|--------|--------|--------|
| 淡豆豉        | 1076.8 | 310.48 | 141.93 |
| 黄大豆        | 580.23 | 27.43  | 14.99  |
| 黑大豆        | 603.42 | 13.48  | 5.26   |

将水解后的大豆异黄酮在相同色谱条件下进行检测,由检测结果换算得到异黄酮苷元在三种不同原料中的含量(表4)。

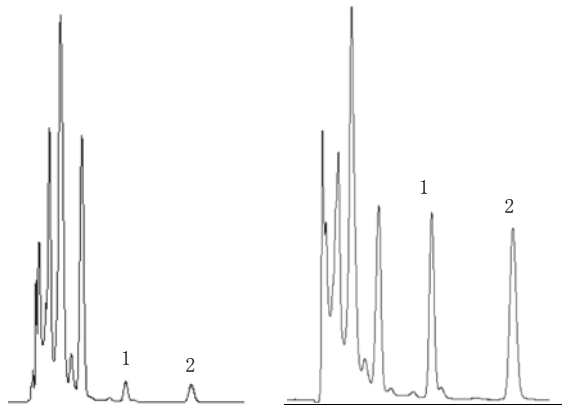
2.4 水解转化率

依据水解前后染料木素的含量变化计算三种不同原料的水解转化率,计算结果表明三者的水解转化率分别为:淡豆豉 19.27%,黄大豆 28.58%,黑大豆 21.20%。

$$\text{水解转化率(\%)} = \frac{\text{水解后染料木素的转化量}}{\text{水解前染料木苷含量}} \times 100$$

2.5 精密度实验

精密移取淡豆豉样品溶液 1ml, 分别置于五支 10ml



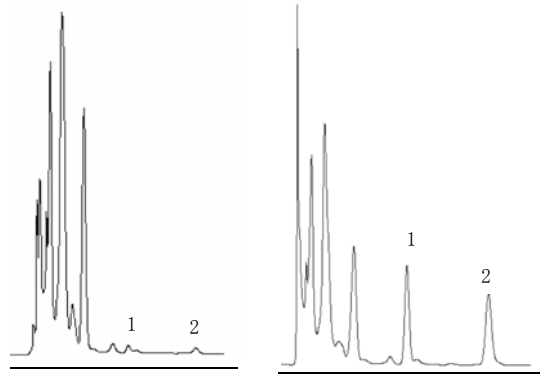
1. 大豆苷元; 2. 染料木素。  
图3 黄大豆水解前后苷元含量的变化  
Fig.3 Changes of aglycones contents in hydrolyzed soybean

表4 水解后样品的苷元含量  
Table 4 Aglycones contents of hydrolyzed sample

| 样品含量(μg/g) | 大豆苷元   | 染料木素   |
|------------|--------|--------|
| 淡豆豉        | 878.6  | 349.47 |
| 黄大豆        | 292.15 | 180.83 |
| 黑大豆        | 279.61 | 133.19 |

刻度试管中定容至相同体积,微孔滤膜过滤,HPLC 检测结果见表5。

以上精密度实验结果表明,本实验仪器及检测方法重现性和稳定性好,检测结果准确性高。



1. 大豆苷元; 2. 染料木素。  
图4 黑大豆水解前后苷元含量的变化  
Fig.4 Changes of aglycones contents in hydrolyzed black soybean

表5 精密度实验结果  
Table 5 Results of precision experiments

|      | 大豆苷元    | RSD(%) | 染料木素    | RSD(%) |
|------|---------|--------|---------|--------|
| 精密度1 | 2105094 |        | 1683421 |        |
| 精密度2 | 2122474 |        | 1714545 |        |
| 精密度3 | 2132163 | 1.45   | 1645376 | 1.6    |
| 精密度4 | 2185244 |        | 1696460 |        |
| 精密度5 | 2155177 |        | 1665201 |        |

### 2.6 加样回收实验

精密移取九份已知含量的淡豆豉样品溶液, 分别置于10ml 刻度试管中, 准确添加染料木素标准溶液适量, 配成高、中、低三组不同浓度, 定容混匀, 检测结果见表6。平均加样回收率分别为: 102.6%、99.6%、100.6%(n=3)。

## 3 讨论

3.1 本实验首先尝试采用硅胶板分离异黄酮, 使用多种展开剂系统, 均未得到理想的分离效果。用聚酰胺薄膜分离大豆异黄酮的效果明显优于硅胶板, 经筛选得到两种最优展开系统: 甲醇-醋酸-水(18:1:1)和丙酮-乙酸-水(4:2:4)。然而丙酮系统展开时间较长且毒性较大, 故选用甲醇-醋酸-水(18:1:1)为最佳展开系统, 用于异黄酮的定性分析。结果表明, 聚酰胺薄膜更适用于分离大豆异黄酮。曾有相关文献报道薄层层析法分离大豆异黄酮<sup>[7-8]</sup>, 但普遍存在展开剂系统毒性较大(如苯系统, 氯仿系统等)或选用硅胶板分离效果差、灵敏度低

大豆异黄酮苷元和葡萄糖配基。本实验采用 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解异黄酮, 操作条件温和, 且不会减少高效液相柱的使用寿命。估计由于 $\beta$ -葡萄糖苷酶添加量不足, 造成水解效率不高。

3.3 本研究结果表明, 异黄酮苷元在三种不同原料中的含量为: 淡豆豉>黄大豆>黑大豆, 证明了大豆发酵过程中生物转化所起的重要作用, 可能是发酵微生物产生了 $\beta$ -葡萄糖苷酶, 此酶使异黄酮糖苷转化为游离苷元, 从而使淡豆豉中苷元的含量远远高于黄、黑大豆。同时, 本实验结果表明, 黄大豆中大豆异黄酮含量略高于黑大豆。此结果与笔者的预想不一致, 推测可能与实验原料的选择有关。

本实验以表面光滑无皱缩的黑色表皮大豆为原料, 全国中药炮制规范及药典中记载淡豆豉的炮制原料为表面皱缩不平的黑大豆<sup>[10]</sup>, 故推测此种黑大豆异黄酮含量可能高于黄大豆和表面光滑的黑大豆, 此推测有待进一步研究和证明。从古至今多以黑大豆为原料炮制淡豆豉, 也可能并不是由于黑大豆与其它种皮大豆中异黄酮含量的差异, 而与黑大豆的特殊药用功效有关<sup>[11]</sup>, 详尽的化学成分和炮制原理有待于进一步研究。

表6 加样回收实验结果

Table 6 Results of recovery experiment

| 样 品  | 峰面积     | 加样回收率(%) | RSD (%) | 平均加样回收率(%) |
|------|---------|----------|---------|------------|
| 低剂量组 | 2245085 | 106      | 0.85    | 102.6      |
|      | 2207388 | 98.8     |         |            |
|      | 2229838 | 103      |         |            |
|      | 2441186 | 95.5     |         |            |
| 丰剂量组 | 2472392 | 99.1     | 1.50    | 99.6       |
|      | 2515007 | 104.5    |         |            |
|      | 2757540 | 101.2    |         |            |
| 高剂量组 | 2729578 | 98.6     | 0.71    | 100.6      |
|      | 2767078 | 102.1    |         |            |

等问题。

考虑到样品中大豆异黄酮为多种成分的混合物, 实验配制了混合标准溶液点样。结果表明, 本展开剂系统下混合标准样中三种标准物质分离良好, 但 $R_f$ 值均小于其单独点样时的 $R_f$ 值, 推测与混合物中各组分间相互作用有关。

3.2 大豆异黄酮糖苷属于氧苷类, 是酚羟基与糖缩合而成的 $\beta$ -D葡萄糖苷。通过水解反应使苷键裂解得到

### 参考文献:

- [1] 葛喜珍, 孔德娟, 刘昆, 等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠主动脉晚期糖化终末产物(AGEs)及脂质过氧化的影响[J]. 中药材, 2003, 26(1): 26-28.
- [2] LEE JEONG-SOOK. Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Life Sciences, 2006, 79: 1578-1584.
- [3] 徐萌萌, 王建芳, 徐春, 等. 微生物转化苷类中药的机理及应用[J]. 世界科学技术—中医现代化[J]. 2006, 8(2): 24-27.
- [4] 毛俊琴, 黄晓瑾, 周月芬, 等. 高效液相色谱法测定淡豆豉药材中异黄酮的含量[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(6): 587-590.
- [5] 宁海龙, 金双义, 王继安, 等. 大豆子粒中异黄酮含量的快速测定[J]. 大豆科学, 2004, 23(1): 45-49.
- [6] 孙艳梅, 张永忠, 王伊强, 等. 大豆 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮糖苷的研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(2): 86-89.
- [7] 刘燕华, 陈光芝, 褚新红. 薄层扫描法测定染料木素和大豆苷原的含量[J]. 齐鲁药事, 2006, 25(2): 98-99.
- [8] 苗慧, 戚天胜, 赵海. 大豆苷元和染料木素的提取、分离及定性、定量方法[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(3): 293-295.
- [9] 徐尔雅. 淡豆豉的原料应使用黑大豆[J]. 中药材, 1994, 17(4): 44-46.
- [10] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 2390.