

表 2 不同增溶剂对大蒜油水溶液中大蒜素稳定性的影响

Table 2 Effects of various solubilizers on stability of allicin of garlic oil water solution

试验条件	增溶剂	大蒜素/%		
		0 d	5 d	10 d
40 ℃	HP-β-CD	100	93.9	90.2
	聚山梨酯-80	100	83.6	73.1
60 ℃	HP-β-CD	100	83.7	72.7
	聚山梨酯-80	100	73.9	57.8
光照	HP-β-CD	100	96.6	92.3
	聚山梨酯-80	100	90.1	81.9

结果表明,大蒜油聚山梨酯-80 水溶液中的大蒜素对热和光极不稳定,以 HP-β-CD 作为增溶剂虽具有较好的稳定作用,但仍无法满足制成注射剂的标准。

3 讨论

大蒜素为大蒜油的主要有效成分之一,且量较高,故本研究以大蒜素作为大蒜油的主要指标性成分。在本实验色谱条件下,大蒜素与大蒜油中的其他色谱峰及内标素的色谱峰分离完全,峰形良好,采用气相色谱法测定大蒜素,方法简便、快速、准确,可作大蒜油及其水溶液中大蒜素的定量测定方法。

大蒜油中的大蒜素在水中的溶解度很低,β-CD 对其的增溶作用较低,而 HP-β-CD 对大蒜素具有显著的增溶作用,并且随着 HP-β-CD 质量浓度的增加,大蒜素的溶解度呈线性增加,1% HP-β-CD 可使大蒜素在水中的溶解度增大 12.8 倍,50% HP-β-CD 则可增加 806 倍,用 HP-β-CD 作为增溶剂的大蒜油水溶液澄明度良好。

大蒜油中的大蒜素在水中极不稳定,在偏酸特别是在偏碱条件下,其分解速度显著加快,经测定其最适 pH 值约为 5。水溶性抗氧剂的加入不仅不会提高大蒜素的稳定性反而加速其分解,充氮虽有增加大蒜素稳定性的作用,但影响不显著。在 100 ℃ 灭菌条件下,大蒜油 HP-β-CD 包合物水溶液中大蒜素于 30 min、45 min,分别降低约 18%、22%。大蒜素对酸、碱、热、光均不稳定,与以聚山梨酯-80 为增溶剂的大蒜油水溶液相比,HP-β-CD 虽可显著提高大蒜素的稳定性,但仍无法满足制成注射剂的标准。故应考虑制成粉针剂且避光冷藏为宜。

References:

- [1] Luo D, Fang F. Research development of pharmacology action of garlic effective components [J]. *Her Med* (医药导报), 2004, 23 (1): 379-381.
- [2] Yan M, Guo T, Zhang M X, et al. The inhibitory and bactericidal action of diflucan, allitridi and garlic oil injection against system fungi [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 17 (3): 214-216.
- [3] Wu D K, Yin X W. Studies on the stability of allicin [J]. *Food Sci* (食品科学), 1997, 18 (5): 34-36.
- [4] Zou J, Zhang Q, Tang B, et al. Determination of the hemolytic degree of Tween 80 to human and rabbit erythrocytes by UV spectrometry [J]. *Med J Southwest Natl Def* (西南国防医药), 2004, 14 (3): 255-256.
- [5] Wang N, Zhou Y D, Yang H, et al. Effect of Tween-80 on cardiovascular system in rats [J]. *China Pharm* (中国药房), 2004, 15 (5): 273-275.
- [6] Li J M, Yang H P. Hydroxypropyl-β-cyclodextrin's application and research development [J]. *China New Med* (中国新医药), 2004, 3 (8): 63-65.

大豆总异黄酮 HPLC 指纹图谱研究

石 荣, 王少云*, 姜维林, 聂 磊, 侯 准

(山东大学药学院, 山东 济南 250012)

摘要:目的 建立不同品种大豆植物药材异黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱,为科学评价大豆品种内在质量提供参考。方法 采用 HPLC 法测定了 25 个不同品种大豆的异黄酮类提取物,并用聚类分析和相似度计算软件进行数据分析。色谱条件: C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (冰醋酸调 pH 为 3.2) 梯度洗脱, 体积流量为 0.6 mL/min, 检测波长为 261 nm, 柱温为室温。测定了 25 个不同品种大豆, 运用软件进行聚类分析及相似性分析。结果 该方法重现性好, 不同品种大豆提取的异黄酮类成分的色谱指纹图谱有一定的差异。结论 色谱指纹图谱分析方法能够全面反映出不同品种大豆异黄酮化学成分间的差异, 为大豆品种内在质量控制提供参考。

关键词: 大豆; 异黄酮; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)02-0202-04

收稿日期: 2005-04-11

作者简介: 石 荣 (1979—), 女, 山西省翼城人, 硕士, 2002 年毕业于山西医科大学药专业, 现工作于上海中医药大学科技实验中心, 主要从事中药质量控制的研究。

* 通讯作者 王少云 Tel: (0531) 8382010 E-mail: shaoyunw@sdu.edu.cn

Fingerprints of soybean total isoflavone by HPLC

SHI Rong, WANG Shao-yun, JIANG Wei-lin, NIE Lei, HOU Zhun

(College of Pharmacy, Shandong University, Ji'nan 250012, China)

Abstract: Objective To study the HPLC fingerprints of isoflavones from different medicinal plants of *G. max* and establish a sensitive and specific method for controlling the quality of the soybean isoflavone.

Methods The gradient elution mode was applied in chromatographic separation. A C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase: ice acetic acid water solution (pH value 3.2)-methanol, flow rate: 0.6 mL/min, detecting wavelength: 261 nm, and the column temperature: room temperature. All 25 samples collected from different species were determined. The clustering analysis and the software of similarity analysis were applied for datum analysis. **Results** This method had a good repeatability and reproducibility. The ratio of peaks' area from distinct samples were different. **Conclusion** The method can show the difference of chemical compositions among species completely and can be used as a quality control method for soybean.

Key words: *Glycine max* L. Merr. (soybean); isoflavone; fingerprints; HPLC

大豆异黄酮为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. (*Phaseolus max* L.) 的提取物。近年来国内外研究表明,大豆异黄酮有预防癌症、防止骨质疏松、防止心血管疾病、抗炎、抗菌、抗衰老、抗氧化以及防止酒精中毒等生理活性^[1]。大豆中异黄酮类化合物有 14 种^[2,3]。本实验采用 HPLC 法研究了不同品种大豆提取物中异黄酮类成分的指纹图谱,用指标成分染料木素作内参比,分析了 23 个色谱峰,对不同品种大豆进行了比较研究,为大豆品种的内在

质量控制提供了参考。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪,SPD-M10A 二极管阵列检测器,CLASS-VP 色谱工作站。PHS-3C 型精密 pH 计。甲醇为色谱纯,冰醋酸为分析纯,水为纯水。染料木素对照品(Sigma 公司,质量分数 > 98%),不同品种的大豆由山东省农业科学院大豆室提供,见表 1。

2 方法与结果

表 1 大豆相似度分析结果

Table 1 Samples and similarity of *G. max*

编号	样品品种	相似度	编号	样品品种	相似度	编号	样品品种	相似度
1	鲁豆 10 号	0.900	10	鲁 98-8	0.943	19	鲁 6 号	0.913
2	鲁豆 9 号	0.902	11	平顶黄	0.939	20	93127-4	0.930
3	齐毛豆	0.942	12	跃进 10 号	0.935	21	东解 10 号	0.923
4	齐黄 29 号	0.928	13	台 75	0.945	22	滨职豆 1 号	0.949
5	黄苦豆	0.930	14	汾 61	0.928	23	齐黄 1 号	0.938
6	秦豆 9 号	0.949	15	淮豆 6 号	0.940	24	冀豆 12 号	0.947
7	南展 1 号	0.925	16	台 292	0.936	25	中黄 24 号	0.927
8	齐黄 27 号	0.943	17	郑 9528-8	0.946			
9	齐黄 31 号	0.936	18	山宁 10 号	0.920			

2.1 色谱条件: C_{18} 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(冰醋酸调 pH 3.2), 梯度洗脱: 0~5 min 甲醇为 10%, 5~20 min 甲醇上升到 37%, 20~37 min 甲醇维持 37%, 37~45 min 甲醇上升到 54%, 45~75 min 甲醇上升到 80%, 75~80 min 甲醇维持 80%; 体积流量: 0.6 mL/min; 检测波长: 261 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。

2.2 参照物溶液的制备: 精密称取染料木素对照品适量, 用流动相溶解, 制成 10 μg/mL 的参照物溶液。

2.3 供试液的制备: 称取粉碎大豆(过 40 目筛)约 5.0 g, 用石油醚脱脂 2 次(料液比 1:2), 滤过, 弃去滤液, 将脱脂大豆粉置锥形瓶中, 用 70% 乙醇 15

mL, 超声提取 3 次, 每次 10 min, 滤过, 合并滤液, 用 95% 乙醇定容至 50 mL。精密量取提取液 3 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释定容, 过 0.45 μm 滤膜, 取续滤液 20 μL 进样。

2.4 测定方法: 取参照物和供试品溶液各 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。指纹图谱见图 1。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验: 取 4 号样品制备供试品溶液, 连续进样 5 次, 记录指纹图谱。结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积比值 RSD 为 0.8%~2.3%, 符合指纹图谱要求^[4]。

2.5.2 重现性试验: 取 4 号样品 5 份, 制备供试品

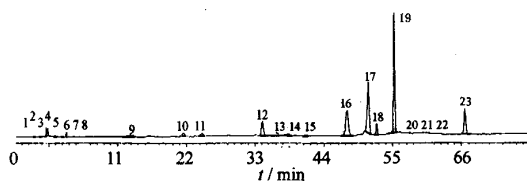


图 1 大豆样品(台 292)指纹图谱

Fig.1 Fingerprint of *G. max* (tai 292)

溶液,分别进样,记录色谱图。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积比值 RSD 为 1.1%~2.9%,符合指纹图谱要求^[4]。

2.5.3 稳定性实验:取供试品溶液(4 号样品),分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行检测,记录色谱图。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积比值 RSD 为 1.4%~2.8%,符合指纹图谱要求^[4]。

2.6 大豆异黄酮的指纹图谱:测定了 25 个不同品种大豆,可得到 23 个色谱峰。色谱图见图 2。其中,以大豆异黄酮主要活性成分之一染料木素(第 23 号峰, $t_R = 66.435$ min)作为内参比峰。

2.7 数据处理

2.7.1 系统聚类分析:系统聚类分析是一种无管

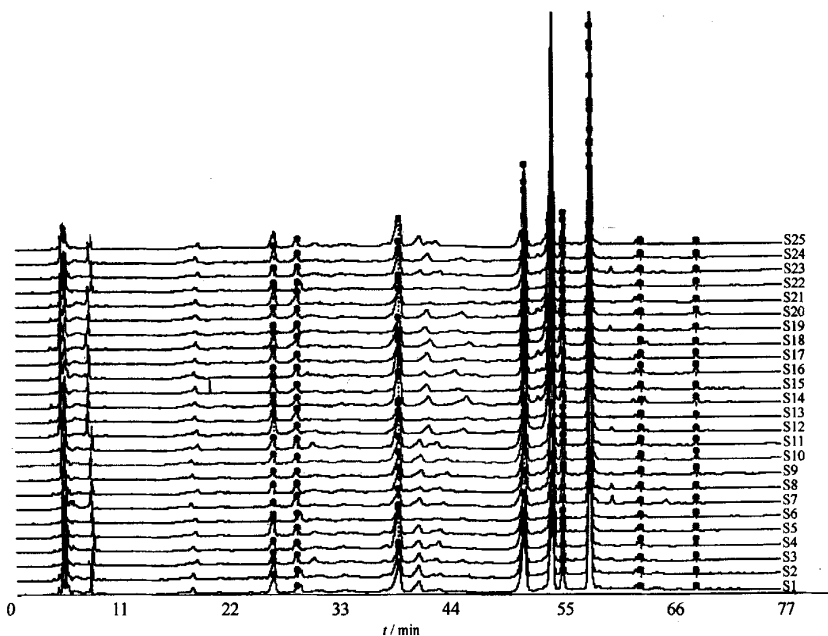


图 2 不同品种大豆异黄酮样品色谱指纹图谱

Fig.2 Fingerprint of soybean isoflavones from different species of *G. max*

理、无指导的模式识别法,可依据所测样品的数据,对样品进行分类。本实验以 25 个不同品种大豆提取物中异黄酮为对象,进行指纹图谱研究,获得包括染料木素在内的 23 个色谱峰,将各色谱峰相对于参照物染料木素的峰面积量化,得到 5×23 阶原始数据矩阵,运用 SPSS 11.0 软件对其进行系统聚类分析,采用类间平均链锁法 (between-groups linkage),利用相关系数 (pearson correlation) 测量技术,样品聚类结果见图 3。

聚类结果显示,1、2 号样品归为一类(Ⅲ类),4、7、14、18、19、21、25 号样品聚为一类(Ⅱ类),其他 16 种样品聚为一类(Ⅰ类)。表明:4、7、14、18、19、21、25 号样品化学成分间的差异相对较小,1、2 号样品较为相似,其他 16 种样品化学成分之间差异较小。

2.7.2 相似度分析:指纹图谱反映的是样品整体的

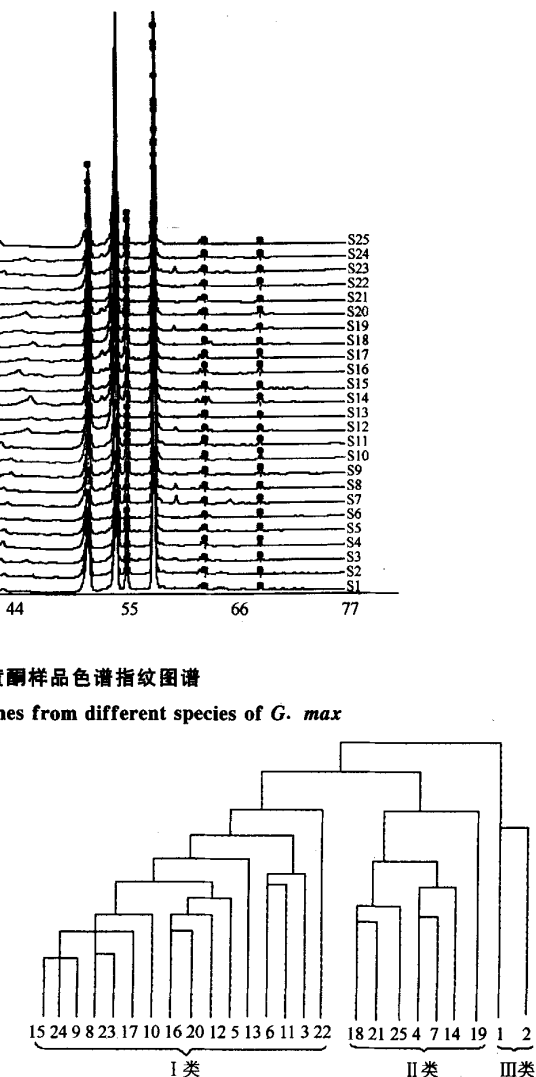


图 3 大豆样品聚类谱系图

Fig.3 Clustering analysis of soybean isoflavones

特征,相似度可以定量的描述指纹图谱。本实验根据聚类分析结果,以 I 类 16 种样品的色谱指纹图谱建立共有模式(共有模式图见图 2 中 S26),利用中国药典委员会推荐使用的“中药色谱指纹图谱相似度

评价软件”计算各样本与共有模式指纹图谱的相似度,结果见表 1。

表 1 显示, I 类样品与共有模式的相似度值大于 0.93, II 类的相似度值在 0.93~0.91, III 类样品的相似度值小于 0.91。聚类分析和相似度软件分析结论一致。

3 讨论

3.1 文献报道染料木素最大吸收波长位于 261 nm 处^[6],异黄酮类化合物的最大吸收在 245~270 nm^[6],本实验采用二极管阵列检测器(PAD)提取了 245~270 nm 的色谱图,结果表明,在 261 nm 处峰数目较多,多数峰响应较大。因此,选择 261 nm 作为检测波长。

3.2 在实验过程中比较了甲醇-水(H₃PO₄、HAC 调节不同 pH)、甲醇-乙腈-水(HAC 调节不同 pH)、甲醇-SDS-磷酸盐缓冲液(调节不同 pH)、乙腈-SDS-磷酸盐缓冲液(调节不同 pH)。结果表明,以甲醇-水(冰醋酸调 pH 3.2)梯度洗脱系统为最佳,各色谱峰分离度较好,保留时间适中。

3.3 色谱指纹图谱是通过比较各样本间色谱图的差异来反映样品化学成分间的差异,不同品种大豆中总异黄酮类成分的指纹图谱相似,各共有峰都存在,但峰面积及相对峰面积却有差异。因此可通过大

豆异黄酮 HPLC 指纹图谱反映不同品种大豆内在质量的差别。

3.4 检验中药样品的指纹图谱是否符合标准应有指纹图谱的标准参照系,人为选择一张指纹图谱作为参照系,会因选择标准的不确定性而变得难以进行。本实验采用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”建立了大豆异黄酮的共有模式,使各样品指纹图谱之间的整体相似性达到最大化。

References:

- [1] Mao J Q, Bi H M. Advanced studies of soybean isoflavones [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (1): 61-64.
- [2] Wang Y X. Study and application on soybean isoflavone [J]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agri For: Nat Sci* (西北农林科技大学学报:自然科学版), 2003, 31 (10): 113-116.
- [3] Xu D P, Xiao K, Gu W Y, et al. Isolation of a new isoflavone from soybean germ [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (12): 1065-1067.
- [4] *Technical Requirements of the Fingerprint in Injection of Chinese Materia Medica (Tentative Standard)* (中药注射剂色谱指纹图谱实验研究操作规程指南(试行)) [S]. 2001.
- [5] Huang W Z, Wei J, Wang Z T, et al. RP-HPLC determination of genistein and formononetin in various parts of *Maackia amurensis* [J]. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), 2004, 13 (2): 60-61.
- [6] Yao X S. *Chemistry of Natural Medicine* (天然药物化学) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.

微量热法对不同生长年份黄连品质的评价

代春美^{1,2}, 肖小河^{1*}, 王 迪², 孙玉琦¹, 金城¹, 樊冬丽³, 赵艳玲¹, 刘 义⁴, 赵祥军¹

(1. 解放军 302 医院, 北京 100039; 2. 锦州医学院, 辽宁 锦州 121001; 3. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100094; 4. 武汉大学化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要:目的 尝试构建基于生物热力学表达的中药品质评价方法体系。方法 以不同生长年份黄连为例, 利用微量热法, 测定黄连作用于大肠杆菌生长代谢过程中的热功率图, 建立生物热力学模型, 分析热力学参数、生物活性与化学成分之间的相关性。结果 在不同生长年份黄连的作用下, 大肠杆菌生长代谢的热功率图不尽一致, 呈现较明显的指纹特征; 与正常对照组比较, 不同生长年份黄连均能不同程度地使大肠杆菌生长速率常数减小, 传代时间延长, 最大产热功率降低, 说明不同生长年份黄连对大肠杆菌生长代谢均有不同程度的抑制作用, 其中以含总生物碱最高的四年生黄连的抑制作用最强。结论 不同生长年份黄连作用于大肠杆菌生长代谢过程的部分热力学参数与热生物活性和化学成分之间具有显著的相关性; 是具有实时、在线、微量、高效、高通量、普适性好等特点的生物热力学方法和指标, 既可以间接地反映黄连的生物活性, 也可作为评价中药品质的一种新方法。

关键词: 黄连; 微量热法; 中药品质评价

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)02-0205-05

收稿日期: 2005-04-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970911; 30371724)

作者简介: 代春美(1977—), 女, 硕士, 主要研究方向为药理学及生物热力学研究。E-mail: xiaod1176@sina.com

* 通讯作者 肖小河 Tel: (010) 66933322 E-mail: pharmacy302@sohu.com