

HPLC 法测定不同产地黑豆皮中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量

刘占云^{1,2}, 刘晓秋², 白淑芳¹, 刘岱琳^{1,*}

(1. 中国人民武装警察部队医学院生药教研室, 天津市职业与危害生物标志物重点实验室, 天津 300162;

2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的: 建立黑豆皮中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量测定方法, 测定 5 个不同产地黑豆皮中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量。方法: 采用 HPLC 法测定黑豆皮中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量, 色谱柱采用 Phenomenex Luna Su C₁₈ 柱 (250mm × 4.60mm, 5 μm); 流动相 A 相为 0.5% 磷酸溶液, B 相为水-乙腈(50:50), 进行梯度洗脱; 流速 0.8mL/min; 检测波长 520nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。结果: 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准曲线回归方程为: $Y = 2 \times 10^7 X - 33120$ ($r = 0.9998$), 在 0.1041 ~ 1.041 μg 范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 92.4%、92.5% 和 95.5%, 不同产地黑豆皮中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷含量范围为 5.263 ~ 12.829mg/g。结论: 所用方法简便、准确, 可用于不同产地黑豆皮的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法(HPLC); 黑豆皮; 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷; 含量测定

HPLC Determination of Cyanidin-3-O-Glucoside in Black Soybean Hulls Grown in Different Regions of China

LIU Zhan-yun^{1,2}, LIU Xiao-qiu², BAI Shu-fang¹, LIU Dai-lin^{1,*}

(1. Tianjin Key Laboratory for Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Department of Pharmacognosy,

Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective: To determine cyanidin-3-O-glucoside (C3G) content in black soybean hulls grown in different regions of China by HPLC. Methods: The chromatographic separation was performed on Phenomenex Luna Su C₁₈ (250 mm × 4.60 mm, 5 μm) column by gradient elution using 0.5% phosphoric acid solution as mobile phase A and water: acetonitrile (50:50, V/V) as mobile phase B at a flow rate of 0.8 mL/min. The column temperature was set at 30 °C and the detection wavelength at 520 nm. Results: The developed regression equation of cyanidin-3-O-glucoside standard is: $Y = 2 \times 10^7 X - 33120$ ($r = 0.9998$). A good linearity was shown in the range of 0.1041 - 1.041 μg. The average recoveries at three spike levels were 92.4%, 92.5% and 95.5%, respectively. The contents of cyanidin-3-O-glucoside in samples from Northeast China and Shandong, Hubei and Anhui provinces were in the range of 5.263 - 12.829 mg/g. Conclusions: The method is simple and reliable, and may be used for the quality control of black soybean hull from different geographic origins.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); black soybean hulls; cyanidin-3-O-glucoside; content determination

中图分类号: TS207.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0256-04

黑豆是我国种植的一种传统农作物, 其具有悠久的食用和药用历史, 自古以来民间就有用黑大豆补血、活血和乌发养颜的记载^[1-2]。黑豆皮, 又称乌衣, 为豆科植物黑大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)的干燥成熟种皮^[3], 富含大量花青素, 主要以飞燕草素、矢车菊素为主^[4], 具有抗氧化活性^[5-7]、抑制诱变^[8-9]、抗炎^[10]、预防癌症^[11]、

延缓衰老^[12]等多种保健功效, 一直是天然食用添加剂和保健食品的原料。目前仅韩国学者 Lee 等^[13]报道了黑豆皮中分离得到的 5 种花青素: 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、牵牛花色素-3-O-葡萄糖苷、锦葵花色苷-3-O-葡萄糖苷和矢车菊素。有文献^[14-15]报道矢车菊素-3-O-葡萄糖苷是黑豆皮重要的活性成分, 能

收稿日期: 2010-12-27

基金项目: 天津市科技支撑项目(09ZCKFNC01000)

作者简介: 刘占云(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物活性成分。E-mail: liuzhanyun1984921@163.com

*通信作者: 刘岱琳(1973—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物活性成分。E-mail: dailinlch@163.com

够减少 3T3-L1 脂肪细胞胞内的活性氧物质的产生,从而剂量依赖地改善 H₂O₂ 或者 TNF- α 诱导的胰岛素耐受性;同时能够减少视黄醇结合蛋白在 2 型糖尿病大鼠的表达,改善高血糖症和提高胰岛素敏感度,从而改善糖尿病症状。

目前黑豆皮的质量控制研究主要是检测花青素这类成分的含量^[16],并没有针对黑豆皮中单一功效成分进行含量测定的研究报道。因此本实验以矢车菊素 3-O-葡萄糖苷(cyanidin 3-O-glucoside, C3G)为指标,建立了高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测方法,并且测定 5 个不同产地的黑豆皮中矢车菊素 3-O-葡萄糖苷的含量,为黑豆皮的合理开发应用和质量评价提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

5 种黑豆皮样品分别为黄仁黑豆皮(产自湖北)、小青仁黑豆皮(产自东北)、KL0901 青圆黑豆皮(产自山东滨州市)、KL0902 青扁黑豆皮(产自安徽)、有机黄仁黑豆皮(产自东北)。所有实验用黑豆皮原料由天津市尖峰天然产物研究开发有限公司提供。

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对照品 挪威 Polyphenols 公司;甲醇、乙腈为色谱纯;水为双蒸水;其他试剂均为分析纯。

高效液相色谱仪(泵型号 LC-20AT、检测器 SPD-M20A) 日本 Shimadzu 公司;MT5 电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司;TP-500B 超声波清洗器 天鹏电子新技术(北京)有限公司;DHG-9000A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海益恒实验仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的配制

精密称取 C3G 对照品 2.6025mg,置于 25mL 棕色容量瓶中,用色谱甲醇定容,摇匀,即得 0.1041mg/mL 的对照品溶液,于冰箱中冷藏保存。

1.2.2 样品处理

称取不同产地黑豆皮样品各 1.0g,用 1% 盐酸-甲醇溶液 10mL 浸提 24h,过滤,得滤液。准确吸取 1.0mL 滤液,置于 25mL 棕色容量瓶中,用色谱甲醇定容,摇匀,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液,于冰箱中冷藏保存。

1.2.3 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna Su C₁₈ 柱(250mm \times 4.60mm, 5 μ m);流动相:A 相为 0.5% 磷酸溶液,B 相为水-乙腈(50:50, V/V)。进行梯度洗脱:0min(18% B)、23min(50% B)、28min(18% B)、33min(18% B)、40min(stop);流速:0.8mL/min;检测波长:520nm;柱温:30 $^{\circ}$ C。对照品以及样品的色谱图见图 1。

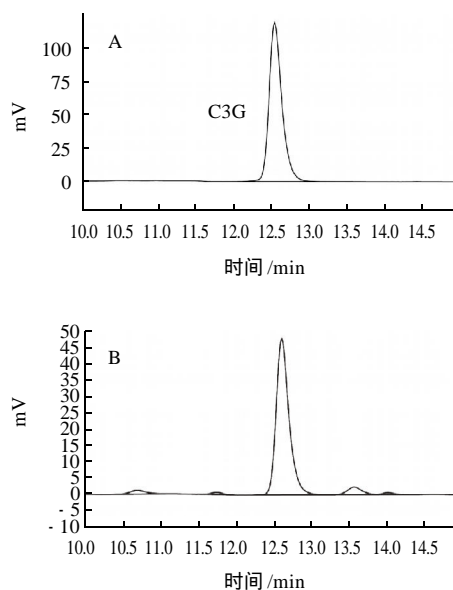


图 1 C3G 对照品(A)及样品(B)的 HPLC 色谱图
Fig.1 HPLC chromatograms of C3G standard and sample

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

取 C3G 对照品溶液适量,进行紫外扫描,结果 C3G 在 280nm 和 520nm 处都有最大吸收(图 2),可见光区域 520nm 处为其特征吸收,所以本实验在 520nm 波长处检测 C3G 的含量。

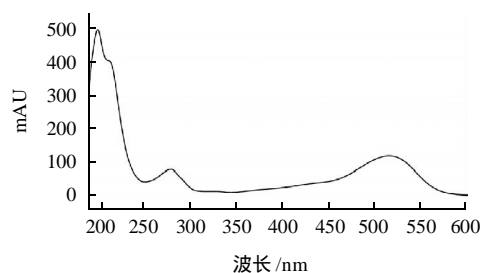


图 2 C3G 的紫外图谱
Fig.2 UV absorption spectrum of C3G

2.2 线性关系考察

分别取上述对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0mL,置于 5mL 棕色容量瓶中,进行 HPLC 测定。以峰面积 Y 对 C3G 的质量浓度 X/(mg/mL)进行线性回归。结果显示 C3G 在 0.1041 ~ 1.041 μ g 范围内与峰面积相关性较好,回归方程为: $Y = 2 \times 10^7 X - 33120$, $R^2 = 0.9996$ 。C3G 的标准曲线如图 3 所示。

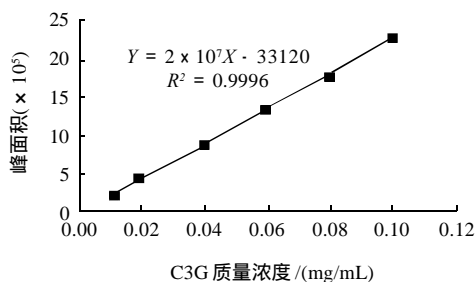


图3 C3G标准曲线

Fig.3 Calibration curve of C3G

2.3 精密度实验

取质量浓度为0.06246mg/mL的对照品溶液,连续进样5次,测得平均峰面积为1440488.2, RSD = 0.49%,表明仪器精密度良好。

2.4 稳定性实验

取KL0902青扁样品分别于0、2、4、8、12h各进样一次,测得平均峰面积为560149.8, RSD = 1.41%,表明在12h之内供试品溶液稳定性良好。

2.5 重复性实验

精密称取KL0902青扁样品5份,每份1.0g,按1.2.2节样品处理方法制备,依方法进行测定,计算出该样品C3G的平均含量为7.281mg/g, RSD = 1.45%,表明该方法重现性良好。

2.6 加标回收实验

取已知C3G含量的KL0902青扁样品,分别加入相当于样品中C3G含量的80%、100%、120%的对照品溶液进行测定,结果显示(表1)各成分回收率实验均良好。

表1 C3G加标回收率(n = 3)

Table 1 Average spike recoveries for C3G at different concentrations in a known sample (n = 3)

成分	底物质量浓度/(mg/mL)	C3G加入量/(mg/mL)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
C3G	0.03072	0.024576	92.2	92.4	2.0
			94.4		
			90.6		
		0.03072	91.2	92.5	1.7
			94.2		
			92.0		
		0.036864	95.6	95.5	1.5
			94.0		
			94.0		
			96.8		

2.7 样品含量测定

各样品按1.2.2节样品处理方法制备,测定各供试品溶液的峰面积,计算C3G的含量,结果见表2。

表2 不同产地黑豆皮C3G含量的测定(n = 3)

Table 2 Average contents of C3G black soybean hull from different geographic origins (n = 3)

产地	C3G含量/(mg/g)	RSD/%
青仁(产于东北)	9.147	1.98
KL0902青扁(产于安徽)	7.517	1.85
黄仁(产于湖北)	7.778	1.67
KL0901青圆(产于山东)	5.263	1.35
有机黄仁黑豆皮(产于东北)	12.829	1.73

本实验曾采用三氟乙酸-水(0.5%)和三氟乙酸-乙腈(0.5%)作为流动相,按35min的时间程序进行二元梯度洗脱,结果C3G的分离效果不好;也曾用1%磷酸溶液和乙腈-水(80:20)作为流动相,按时间程序进行二元梯度洗脱,C3G分离效果优于前述的溶剂系统,但未实现基线分离。在此基础上,优化乙腈和水之间的比例,采用0.5%磷酸溶液和乙腈-水(50:50)作为流动相,按40min的时间程序进行二元梯度洗脱,结果C3G的峰形良好且达到基线分离。

矢车菊素3-O-葡萄糖苷是一个含有钾盐离子的分子结构,在盐酸溶液中具有很好的溶解性和稳定性。因此,为了有效地提高黑豆皮原料中矢车菊素3-O-葡萄糖苷的提取率,保证原料提取液测定的稳定性,样品提取溶剂采用1%盐酸-甲醇溶液。

3 结论

目前市场销售的黑豆皮产品的优劣好坏通常以花青素为指标,采用紫外分光光度法进行测定,花青素是一类成分,并不能真正反应黑豆皮特有成分的含量,且黑豆皮中单一成分的含量测定未见文献报道。因此本实验建立了HPLC法测定黑豆皮中C3G的含量,采用的是标准曲线含量测定法,该方法简便、快速、灵敏,可用于黑豆皮的质量控制。

实验中选择全国具有地域代表性的5个产地黑豆皮药材,测得C3G的含量范围在5.263~12.829mg/g之间。由此可知,C3G在不同产地黑豆皮中含量差异较大,在选取黑豆皮原料时更应注意评价单体成分的含量,不能仅凭花青素含量或者色价比确定优劣好坏。因此本实验的研究结果为黑豆皮的临床应用或保健食品开发提供参考。

参考文献:

- [1] 黄昉,李沛生,徐志宏,等.黑豆种皮色素的测定和提取[J].食品工业科技,2004,25(4):112-114.
- [2] 马同锁,陈连文,袁红楼.黑豆色素的提取及理化性质的研究[J].山西食品工业,2004(2):19-21.
- [3] 刘岱琳,董晋泉,王娟,等.YWD-01大孔吸附树脂分离纯化黑豆红色素的研究[J].食品科学,2007,28(3):85-88.

- [4] 刘岱琳, 陆艳玲, 刘丹, 等. 黑豆皮中花青素的研究进展[J]. 中草药, 2007(增刊 1): 687-689.
- [5] ASTADI I R, ASTUTI M, SANTOSO U, et al. *In vitro* antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL)[J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 659-663.
- [6] 董季平, 吴珍龄. 黑豆皮醇提物清除自由基效果的研究[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(5): 445-449.
- [7] 黄昉, 徐志宏, 李沛生, 等. 黑大豆皮的抗氧化性及其活性物质的提取研究[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(4): 86-90.
- [8] WANG Y J, SHEEN L Y, CHOU C H, et al. Storage effects on the content of anthocyanin, mutagenicity and antimutagenicity of black soybean koji[J]. LWT - Food Science and Technology, 2010, 43(4): 702-707.
- [9] HUANG Y H, HUANG Huiyu, CHOU C H, et al. Mutagenic and antimutagenic effects of methanol extracts of unfermented and fermented black soybeans[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 118(1): 62-68.
- [10] IRINA T N, YOUNG M K, CHUNG J, et al. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(11): 2806-2812.
- [11] 李秋凤, 王金亭. 天然黑豆红色素的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(10): 102-104.
- [12] 刘岱琳, 谢文利, 朱珊, 等. 黑豆皮花青素在制备防治糖尿病及血管并发症药物或食物的应用: 中国, 200810053954.3[P]. 2008-10-28.
- [13] LEE J H, KANG N S, SHIN S O, et al. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis [J]. Food Chemistry, 2009, 112(2): 226-231.
- [14] GUO Honghui, LING Wenhua, WANG Qing. Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L₁ adipocytes against H₂O₂- or TNF- α -induced insulin resistance by inhibiting c-Jun NH₂-terminal kinase activation[J]. Biochemical Pharmacology, 2008, 75(6): 1393-1401.
- [15] RIE S, NATSUMI N, HIROMI H. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice[J]. Biochemical Pharmacology, 2007, 74(11): 1619-1627.
- [16] 高雪琴, 王若兰, 杨建平. 黑豆皮红色素的微波提取工艺及特性研究[J]. 河南工业大学学报, 2006, 27(1): 98-101.