

黑豆药材的HPLC指纹图谱建立及5种异黄酮类成分的含量测定^Δ

郭千祥^{1*},梁幼玲¹,史旭华¹,白俊其¹,黄娟¹,黄志海¹,丘小惠^{1,2#}(1.广东省中医院/广州中医药大学第二临床医学院,广州 510120;2.广东省中医症候临床研究重点实验室,广州 510006)

中图分类号 R282;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)04-0428-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.04.08

摘要 目的:建立黑豆药材的指纹图谱和5种异黄酮类成分的含量测定方法,为更好地控制该药材的质量提供参考。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)建立指纹图谱并检测5种异黄酮类成分的含量。色谱柱为Phenomenex C₁₈,流动相为乙腈-0.12%甲酸水溶液(梯度洗脱),流速为1 mL/min,检测波长为260 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。以大豆苷为参照,绘制12批黑豆药材样品的HPLC指纹图谱,采用《中药特征指纹图谱相似度评价系统》(2012A版)进行相似度评价,确定共有峰;分别采用SPSS 20.0软件和SIMCA 13.0软件进行聚类分析和主成分分析。结果:12批黑豆药材样品共有19个共有峰,相似度均大于0.94;指认了5个成分,分别为大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素。聚类分析结果显示,12批黑豆药材样品可聚为两类,即S1~S3聚为一类,S4~S12聚为一类。主成分分析结果显示,2个主成分因子的方差贡献率分别为53.261%、40.715%,累积方差贡献率为93.976%。上述5种成分的质量浓度线性范围分别为5.97~191.00 μg/mL($r=0.999\ 9$)、1.05~33.46 μg/mL($r=0.999\ 9$)、8.93~285.61 μg/mL($r=0.999\ 5$)、0.82~26.33 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.93~29.64 μg/mL($r=0.999\ 7$);定量限分别为0.881 1、0.611 6、0.078 6、0.243 3、0.511 6 μg/mL,检测限分别为0.264 3、0.244 7、0.021 4、0.124 8、0.106 7 μg/mL;精密度、稳定性、重复性、耐用性试验的RSD均小于5%;加样回收率为95.15%~96.56%(RSD=0.51%, $n=6$)、98.52%~103.45%(RSD=1.88%, $n=6$)、95.37%~97.91%(RSD=0.95%, $n=6$)、99.75%~102.00%(RSD=0.78%, $n=6$)、100.26%~103.65%(RSD=1.21%, $n=6$)。12批黑豆药材中上述5种成分的含量分别为0.178 3~0.265 9、0.021 7~0.096 2、0.288 5~0.597 2、0.014 1~0.058 8、0.012 9~0.082 9 mg/g。结论:所建指纹图谱和5种异黄酮类成分的含量测定方法均可用于黑豆药材的质量控制;不同产地黑豆药材中异黄酮类成分相似,但含量有所差异。

关键词 黑豆;异黄酮类;高效液相色谱法;指纹图谱;聚类分析;主成分分析;含量测定

- matory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils[J]. *Phytomedicine*, 2002, 9(8): 721-726.
- [17] PEANA AT, D' AQUILA PS, CHESSA ML, et al. (-)-linalool produces antinociception in two experimental models of pain[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 460(1): 37-41.
- [18] DE SOUSA DP, NÓBREGA FF, SANTOS CC, et al. Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence[J]. *Nat Prod Commun*, 2010, 5(12): 1847-1851.
- [19] CHENG BH, SHEEN LY, CHANG ST. Evaluation of anxiolytic potency of essential oil and S-(+)-linalool from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaves in mice[J]. *J Tradit Complement Med*, 2015, 5(1): 27-34.
- [20] 金晓玲,徐丽珊,施潇,等. 4种佛手挥发油化学成分的研究[J]. *中国药学杂志*, 2002, 37(10): 737-739.
- [21] 高幼衡,黄海波,徐鸿华. 广佛手挥发性成分的GC-MS分析[J]. *中草药*, 2002, 33(10): 21-22.
- [22] 王俊华,符红. 广佛手挥发油化学成分的GC-MS分析[J]. *中药材*, 1999, 22(10): 516-517.
- [23] 刘盼,雷素娟,唐鹏,等. 不同产地佛手GC指纹图谱及4种成分测定[J]. *中成药*, 2018, 40(11): 2491-2496.
- [24] 赵磊,籍保平,周峰,等. 12种金华佛手挥发油成分的比较研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(6): 179-184.
- [25] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 203.
- [26] 辛晓伟. 石韦药材挥发油成分分析及抑菌活性研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [27] LEGGIO A, LEOTTA V, BELSITO EL, et al. Aromatherapy: composition of the gaseous phase at equilibrium with liquid bergamot essential oil[J]. *Chem Cent J*, 2017. DOI: 10.1186/s13065-017-0340-y.
- [28] 陈菲,吴永江,马丽,等. GC-MS联用分析松针和佛手挥发油化学成分的差异[J]. *中国医药导报*, 2014, 11(6): 90-92.
- [29] 黄海波,贺红,潘超美,等. 3种不同产地佛手挥发油含量测定和GC-MS分析[J]. *医药世界*, 2002, 43(7): 57-59.
- [30] 杨君,邵海燕,储国海,等. 基于GC-MS和GC-O联用法分析佛手精油关键香气成分[J]. *食品科学*, 2015, 36(20): 194-197.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373967);广东省中医药局科研项目(No.20184013);广东省中医院中医药科学技术研究专项——中药精准煮散饮片标准化研究及应用启动项目

* 硕士研究生。研究方向:中药制剂及药效物质基础。E-mail: 1143665641@qq.com

通信作者:研究员,硕士生导师,硕士。研究方向:中药制剂及药效物质基础。电话:020-39318571。E-mail: qiuxiaohui@gzucm.edu.cn

(收稿日期:2019-08-08 修回日期:2020-01-03)

(编辑:陈宏)

Establishment of HPLC Fingerprint and Content Determination of 5 Kinds of Isoflavone Components in Sojae Semen Nigrum

GUO Qianxiang¹, LIANG Youling¹, SHI Xuhua¹, BAI Junqi¹, HUANG Juan¹, HUANG Zhihai¹, QIU Xiaohui^{1,2} (1. Guangdong Province Hospital of TCM & The Second College of Clinical Medicine, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research of TCM Syndrome, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint of Sojae Semen Nigrum and content determination method of 5 kinds of isoflavones, so as to provide reference for controlling its quality better. METHODS: HPLC method was adopted to establish the fingerprint and detect the contents of 5 kinds of isoflavones. The determination was performed on Phenomenex C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.12% formic acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was set at 260 nm; the column temperature was 30 °C and sample size was 10 μL. Using daidzin as reference, HPLC fingerprints of 12 batches of samples were determined. The similarity of 12 batches of samples was evaluated by TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012A) to confirm common peak. Cluster analysis and principal component analysis were performed by using SPSS 20.0 software and SIMCA 13.0 software. RESULTS: There were 19 common peaks in HPLC fingerprints of 12 batches of samples, the similarity of which was higher than 0.94. Totally 5 components were identified, such as daidzin, glycitin, genistin, daidzein, genistein. Cluster analysis showed that 12 batches of Sojae Semen Nigrum were clustered into 2 categories, i.e. S1-S3 clustered into one category, and S4-S12 clustered into the other category. By principal component analysis, the contribution rates of two principle components were 53.261% and 40.715%; accumulative contribution rate was 93.976%. The linear range of above 5 components were 5.97-191.00 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 1.05-33.46 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 8.93-285.61 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 0.82-26.33 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.93-29.64 μg/mL ($r=0.999\ 7$), respectively. The limits of quantitation were 0.881 1, 0.611 6, 0.078 6, 0.243 3, 0.511 6 μg/mL, respectively. The limits of detection were 0.264 3, 0.244 7, 0.021 4, 0.124 8, 0.106 7 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability, reproducibility and durability tests were all lower than 5%. Recoveries were 95.15% -96.56% (RSD=0.51%, $n=6$), 98.52% -103.45% (RSD=1.88%, $n=6$), 95.37% -97.91% (RSD=0.95%, $n=6$), 99.75% -102.00% (RSD=0.78%, $n=6$), 100.26% -103.65% (RSD=1.21%, $n=6$). Among 12 batches of Sojae Semen Nigrum, the contents of above 5 components were 0.178 3-0.265 9, 0.021 7-0.096 2, 0.288 5-0.597 2, 0.014 1-0.058 8, 0.012 9-0.082 9 mg/g. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint and content determination method of 5 kinds of isoflavones can be used for quality control of Sojae Semen Nigrum. The Isoflavone components are similar, but the contents are different among Sojae Semen Nigrum from different producing areas.

KEYWORDS Sojae Semen Nigrum; Isoflavones; HPLC; Fingerprint; Cluster analysis; Principal component analysis; Content determination

黑豆为豆科植物大豆 [*Glycine max*(L.) Merr.] 的干燥成熟种子^[1]。《本草纲目》中记载, 大豆有黑、白、黄、褐、青、斑数色, 黑者入药^[2]。中医认为, 五色入五脏, 黑色属水, 水走肾, 黑豆专入肾经, 故被认定为“补肾”之品^[3]。2015年版《中国药典》(一部) 收录黑豆, 载其有益精明目、养血祛风、利水、解毒等功效^[1]。现代药理研究表明, 黑豆具有抗氧化、调节激素水平、预防动脉硬化、延年益智、防癌抗癌等作用^[4]。该药的作用机制与其所含多种生物活性成分有关, 尤以异黄酮最为突出。该类成分除具有缓解更年期综合征、防治骨质疏松及心血管疾病等作用外, 还具有显著的防癌抗癌作用, 故备受学者关注^[5]。

化学成分是中药药效发挥作用的物质基础, 中药质量与其复杂的有效成分密切相关, 因此采用指纹图谱结合多指标成分的含量测定可更好地控制中药质量^[6]。黑

豆为2010年版《中国药典》(一部) 新收录的品种, 现行标准收载于2015年版《中国药典》(一部), 包括性状鉴别、显微鉴别和薄层色谱鉴别等^[1], 尚无含量测定项。虽然, 陆泉^[7]采用反相高效液相色谱法测定黑豆中大豆苷的含量; 刘洋等^[8]研究发现, 不同产地黑豆黄酮提取物的抗氧化还原能力不同, 其中产地影响较大, 因此认为不同产地黑豆的药效也存在一定差异。但这些研究的指标单一, 存在一定的局限性, 且关于黑豆的指纹图谱、不同产地质量差异的研究较少。本课题组通过前期化学成分和药理研究证实, 黑豆中含有大豆苷、黄豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素等5种异黄酮成分, 这5种成分也是其发挥药理作用的活性成分^[9]。为更加全面地评价黑豆质量, 本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立了12批黑豆药材样品的HPLC指纹图谱, 测定了上述5种异黄酮类成分的含量, 同时结合聚类分析和主成分分析

(PCA)进行综合质量评价,旨在为其质量标准的完善提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括G1322A型在线真空脱气机、G1311A型四元泵、G1329A型自动进样器、G1316A型柱温箱、G1315D型二极管阵列检测器、1200 Series色谱工作站B04.01版(美国Agilent公司);Milli-Q Advantage A10型纯水机(美国Millipore公司);BT-125D型十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];LK/CSJ-20型超声波清洗机(成都老肯科技股份有限公司)。

1.2 试剂

大豆苷元对照品(批号:JL22382,纯度:≥98%)、染料木素对照品(批号:MB2170,纯度:≥98%)均购自广州菲博生物科技有限公司;大豆苷对照品(批号:111738-201603,纯度:≥93.3%)、染料木苷对照品(批号:111709-201702,纯度:99.9%)均购自中国食品药品检定研究院;黄豆黄苷对照品(批号:J04044AS,纯度:≥98%)购自大连美仑生物技术有限公司;甲酸、乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

12批黑豆药材样品(编号:S1~S12)均由康美药业股份有限公司提供,经广州中医药大学第二临床医学院黄志海主任中药师鉴定为豆科植物大豆[*G. max*(L.) Merr.]的干燥成熟种子。黑豆药材样品信息来源见表1。

表1 黑豆药材样品信息

Tab 1 Information of Sojao Semen Nigrum

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	浙江省平湖市新仓镇	2018040701	S7	黑龙江省佳木斯市汤原县	2018040501
S2	浙江省兰溪市马涧镇	2018040702	S8	黑龙江省绥化市庆安县	2018040502
S3	浙江省绍兴市上虞区永和镇	2018040703	S9	黑龙江省黑河市北安市	2018040503
S4	安徽省滁州市乌衣镇	2018040601	S10	江苏省宿迁市宿豫区	2018040402
S5	安徽省宿州市丁湖镇	2018040602	S11	江苏省高邮市周山镇	2018040403
S6	安徽省安庆市怀宁县	2018040603	S12	江苏省泰兴市古溪镇	2018040404

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别取大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、染料木素、染料木苷对照品各4 mg,精密称定,置于10 mL棕色量瓶中,加70%甲醇制成质量浓度均为0.4 mg/mL的单一对照品溶液。取各单一对照品溶液适量,置于10 mL棕色量瓶中,加70%甲醇定容,摇匀,即得上述5种成分质量浓度均为4 μg/mL的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取黑豆药材样品粉末(过80目筛)2 g,精密称定,置于20 mL棕色量瓶中,加70%甲

醇20 mL,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)提取30 min,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱:Phenomenex C₁₈(250 mm×4.60 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.12%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1 mL/min;检测波长:260 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure

t, min	A, %	B, %
0	5	95
7	21	79
10	22	78
12	23	77
13	23	77
15	42	58
25	60	40

2.1.4 精密度试验 取“2.1.2”项下供试品溶液(编号:S8)适量,按“2.1.3”项下色谱条件连续进样测定6次,以大豆苷的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,19个共有峰相对保留时间的RSD均小于1%(n=6),相对峰面积的RSD均小于5%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液(编号:S8)适量,分别于室温避光放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,以大豆苷的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,19个共有峰相对保留时间的RSD均小于1%(n=7),相对峰面积的RSD均小于5%(n=7),表明供试品溶液于室温下放置12 h内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取黑豆药材样品(编号:S8)粉末2 g,共6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,以大豆苷的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,19个共有峰相对保留时间的RSD均小于1%(n=6),相对峰面积的RSD均小于5%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.1.7 HPLC指纹图谱的生成 取12批黑豆药材样品适量,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A版)进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图1、图2。

2.1.8 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A版),以黑豆药材样品的HPLC对照指纹图谱为对照,进行整体相似度评价。结果显示,12批黑豆药材样品的相似度均大于0.94,提示黑豆药材样品的化学成分一致性较好,详见表3。

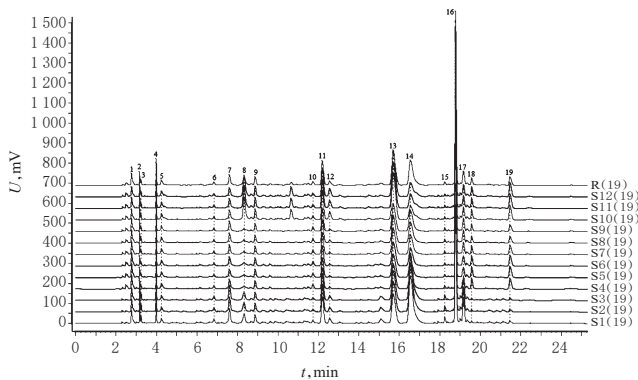


图1 12批黑豆药材样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superimposed fingerprints of 12 batches of Sojae Semen Nigrum

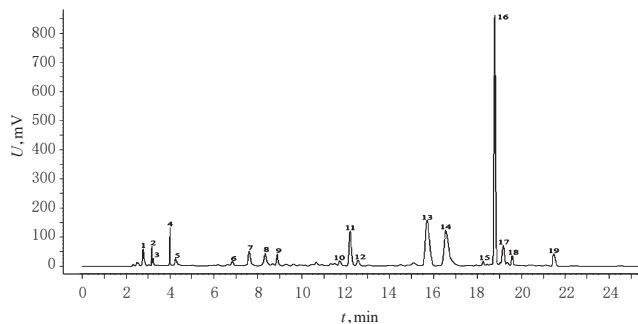


图2 黑豆药材样品的HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprint of Sojae Semen Nigrum

表3 相似度评价结果

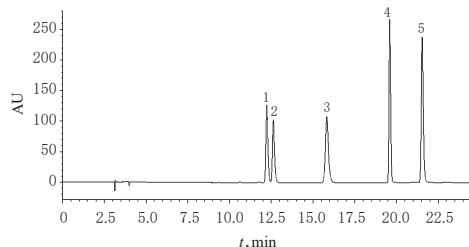
Tab 3 Results of similarity evaluation

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照
S1	1	0.999	0.999	0.963	0.960	0.961	0.966	0.968	0.968	0.952	0.956	0.953	0.996
S2	0.999	1	0.999	0.964	0.961	0.961	0.966	0.968	0.968	0.952	0.956	0.953	0.995
S3	0.999	0.999	1	0.965	0.962	0.963	0.968	0.970	0.970	0.955	0.959	0.955	0.996
S4	0.963	0.964	0.965	1	0.999	0.999	1	0.998	0.998	0.944	0.946	0.944	0.998
S5	0.960	0.961	0.962	0.999	1	0.999	0.999	0.996	0.997	0.944	0.946	0.944	0.998
S6	0.961	0.961	0.963	0.999	0.999	1	0.999	0.997	0.998	0.947	0.949	0.947	0.998
S7	0.966	0.966	0.968	0.999	0.999	0.999	1	0.999	0.999	0.945	0.947	0.945	0.946
S8	0.968	0.968	0.970	0.998	0.996	0.997	0.999	1	0.999	0.944	0.946	0.944	0.948
S9	0.968	0.968	0.970	0.998	0.997	0.998	0.999	0.999	1	0.943	0.945	0.943	0.946
S10	0.952	0.952	0.955	0.944	0.944	0.947	0.945	0.944	0.943	1	0.999	0.999	0.974
S11	0.956	0.956	0.959	0.946	0.946	0.949	0.947	0.946	0.945	0.999	1	0.999	0.974
S12	0.953	0.953	0.955	0.944	0.944	0.947	0.945	0.944	0.943	0.999	0.999	1	0.975

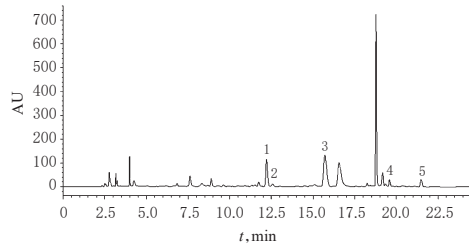
2.1.9 共有峰的指认 12批黑豆药材样品共有19个共有峰,通过与混合对照品溶液的HPLC图(见图3A)比对,指认11号峰为大豆苷。因该峰分离度良好、峰面积大且稳定,故以其保留时间和峰面积为参照,计算其他峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表4、表5。

2.2 聚类分析

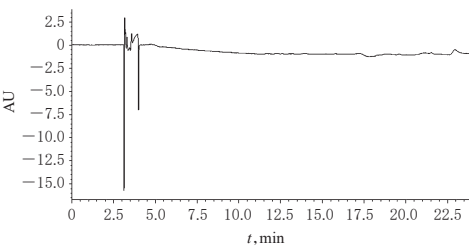
以各共有峰的峰面积为变量,得到19×12阶数据矩阵,采用SPSS 20.0软件以离差平方和法(即Ward法)对12批黑豆药材样品进行聚类分析,详见图4。由图4可知,12批黑豆药材样品可聚为两大类:S4~S12聚为一类,S1~S3聚为一类。



A.混合对照品溶液



B.供试品溶液



C.阴性对照溶液

注:1.大豆苷;2.黄豆黄苷;3.染料木苷;4.大豆苷元;5.染料木素

Note:1. daidzin; 2. glycitin; 3. genistin; 4. daidzein; 5. genistein

图3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

表4 12批黑豆药材样品HPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 4 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms for 12 batches of Sojae Semen Nigrum

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	RSD, %
1	0.228	0.228	0.228	0.227	0.227	0.227	0.227	0.227	0.227	0.227	0.228	0.227	0.11
2	0.260	0.260	0.260	0.259	0.260	0.259	0.259	0.259	0.260	0.260	0.260	0.260	0.12
3	0.267	0.267	0.267	0.265	0.266	0.265	0.265	0.266	0.266	0.266	0.266	0.266	0.26
4	0.327	0.328	0.327	0.327	0.327	0.327	0.326	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.12
5	0.349	0.349	0.349	0.348	0.349	0.348	0.348	0.348	0.349	0.348	0.349	0.349	0.10
6	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.561	0.560	0.560	0.562	0.561	0.561	0.561	0.08
7	0.624	0.624	0.623	0.624	0.624	0.624	0.623	0.624	0.624	0.624	0.624	0.624	0.07
8	0.683	0.684	0.682	0.685	0.685	0.684	0.682	0.683	0.683	0.682	0.682	0.683	0.16
9	0.729	0.729	0.728	0.729	0.728	0.728	0.727	0.728	0.729	0.728	0.728	0.728	0.09
10	0.963	0.963	0.963	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961	0.962	0.962	0.962	0.07
11(对照)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
12	1.029	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	0.02
13	1.287	1.288	1.286	1.287	1.287	1.287	1.288	1.287	1.288	1.288	1.287	1.287	0.05
14	1.358	1.358	1.357	1.355	1.356	1.356	1.358	1.357	1.332	1.359	1.358	1.357	0.53
15	1.497	1.497	1.496	1.495	1.496	1.495	1.495	1.495	1.496	1.497	1.497	1.496	0.06
16	1.541	1.540	1.540	1.539	1.539	1.538	1.537	1.538	1.539	1.540	1.540	1.540	0.06
17	1.573	1.573	1.573	1.572	1.572	1.571	1.570	1.571	1.572	1.573	1.573	1.572	0.07
18	1.605	1.606	1.605	1.605	1.605	1.604	1.603	1.604	1.604	1.605	1.605	1.605	0.05
19	1.760	1.761	1.761	1.761	1.761	1.761	1.758	1.759	1.760	1.760	1.761	1.760	0.06

表5 12批黑豆药材样品 HPLC 图谱共有峰的相对峰面积

Tab 5 Relative peak area of common peaks in HPLC chromatograms for 12 batches of Sojse Semen Nigrum

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	RSD,%
1	0.297	0.313	0.312	0.409	0.441	0.414	0.374	0.359	0.361	0.256	0.258	0.236	20.10
2	0.154	0.161	0.161	0.110	0.112	0.109	0.115	0.120	0.118	0.113	0.113	0.110	16.70
3	0.107	0.130	0.117	0.068	0.076	0.071	0.075	0.094	0.086	0.079	0.077	0.076	22.61
4	0.235	0.265	0.275	0.293	0.305	0.285	0.291	0.293	0.290	0.299	0.300	0.297	6.80
5	0.142	0.159	0.165	0.227	0.237	0.228	0.213	0.259	0.261	0.196	0.199	0.195	18.46
6	0.121	0.133	0.135	0.119	0.132	0.115	0.124	0.124	0.128	0.104	0.103	0.101	9.95
7	0.532	0.554	0.574	0.413	0.384	0.433	0.409	0.407	0.412	0.367	0.365	0.353	17.62
8	0.416	0.428	0.388	0.250	0.260	0.283	0.243	0.232	0.203	0.914	0.906	0.884	62.50
9	0.243	0.252	0.254	0.288	0.298	0.285	0.269	0.240	0.246	0.312	0.310	0.312	10.29
10	0.106	0.099	0.115	0.187	0.197	0.193	0.181	0.168	0.166	0.158	0.154	0.152	21.42
11(对照)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
12	0.194	0.184	0.195	0.091	0.093	0.095	0.106	0.122	0.107	0.324	0.321	0.328	52.93
13	1.913	1.936	1.938	2.024	2.050	2.015	2.070	2.009	2.054	2.800	2.788	2.727	16.06
14	3.643	3.667	3.604	1.749	1.739	1.719	1.752	1.741	1.754	1.138	1.148	1.133	47.57
15	0.145	0.136	0.134	0.115	0.112	0.109	0.110	0.108	0.103	0.075	0.073	0.072	22.63
16	5.905	6.013	5.850	3.566	3.634	3.491	3.616	3.456	3.552	2.616	2.648	2.541	32.83
17	0.781	0.775	0.748	0.484	0.491	0.470	0.471	0.457	0.465	0.372	0.376	0.360	29.94
18	0.062	0.067	0.066	0.407	0.452	0.417	0.328	0.242	0.250	0.262	0.261	0.257	52.96
19	0.085	0.088	0.085	0.517	0.603	0.536	0.419	0.277	0.295	0.515	0.516	0.501	52.95

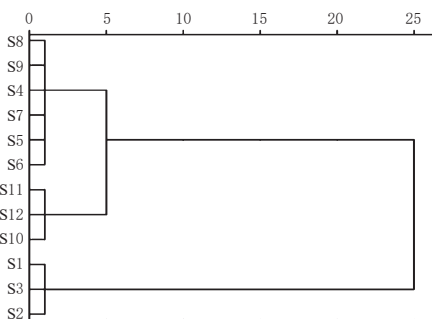


图4 12批黑豆药材样品的聚类分析树状图

Fig 4 Dendrogram of cluster analysis of 12 batches of Sojse Semen Nigrum from different producing areas

2.3 PCA分析

采用SIMCA 13.0软件进行PCA分析,结果见图5。由图5可知,S4~S12在PCA得分图的左侧,S1~S3在PCA得分图的右侧,该结果与聚类分析结果一致。

对12批黑豆药材样品的19个共有峰的峰面积进行标准化处理后,采用SPSS 20.0软件进行PCA分析,计算主成分因子的特征值、方差贡献率等,结果见表6。由表6可知,共得到2个主成分因子,方差贡献率分别为53.261%、40.715%,累积方差贡献率为93.976%,提示主成分因子1、2可作为黑豆药材的评价指标,适用于PCA分析。故以主成分因子1、2为指标对12批黑豆药材样品进行整体质量评价,结果见表7。由表7可知,S4~S12药材样品质量相近,与S1~S3药材样品质量存在较大差异。

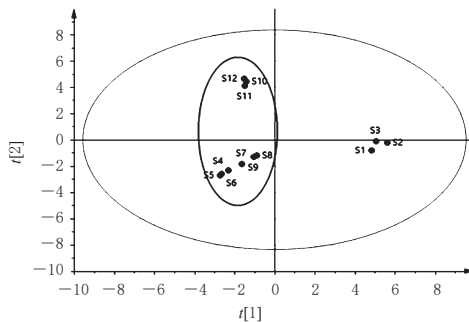


图5 黑豆药材样品的主成分分析图

Fig 5 PCA analysis charts of Sojse Semen Nigrum

表6 2个主成分因子的特征值和方差贡献率

Tab 6 Eigen value and variance contribution rate of 2 principle component factors

主成分因子	特征值	方差贡献率,%	累积方差贡献率,%
1	10.120	53.261	53.261
2	7.736	40.715	93.976

表7 主成分因子得分

Tab 7 Scores of principal component factors

编号	主成分因子1	主成分因子2	编号	主成分因子1	主成分因子2
S1	1.527	-0.285	S7	-0.507	-0.657
S2	1.767	-0.082	S8	-0.272	-0.434
S3	1.593	-0.038	S9	-0.319	-0.479
S4	-0.722	-0.841	S10	-0.435	1.599
S5	-0.851	-0.985	S11	-0.469	1.475
S6	-0.830	-0.937	S12	-0.480	1.665

2.4 含量测定

2.4.1 溶液的制备 混合对照品溶液的制备同“2.1.1”项;供试品溶液的制备同“2.1.2”项;以70%甲醇为阴性对照溶液。

2.4.2 色谱条件 同“2.1.3”项。

2.4.3 系统适用性试验 取“2.4.1”项下混合对照品溶液(70%甲醇稀释)、供试品溶液(编号:S8)、阴性对照溶液适量,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图3。由图3可知,供试品与混合对照品中各待测成分色谱峰的保留时间基本一致,且各成分在对应的位置无干扰,均在25 min内出峰完毕,分离度均大于1.5,理论板数以大豆苷峰计大于10 000,阴性对照无干扰。

2.4.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.1”项下大豆苷、黄豆苷、大豆苷元、染料木素单一对照品溶液955、167.30、131.65、148.20 μL ,置于2 mL棕色量瓶中;另取染料木苷单一对照品溶液1 428.05 μL ,置于2 mL棕色量瓶中;均分别加70%甲醇定容,摇匀,得大豆苷、黄豆苷、大豆苷元、染料木素质量浓度分别为191.00、33.46、26.33、29.64 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液以及染料木苷质量浓度为285.61 $\mu\text{g/mL}$ 的单一对照品溶液。另取上述4种混合对照品溶液及染料木苷单一对照品溶液,用70%

甲醇逐级稀释2、4、8、16、32倍,得系列线性关系工作溶液,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,结果见表8。

表8 回归方程、线性范围以及定量限、检测限

Tab 8 Regression equation, linear range and limits of quantification and detection

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$	定量限, $\mu\text{g/mL}$	检测限, $\mu\text{g/mL}$
大豆苷	$y=42.073x+0.7165$	0.9999	5.97~191.00	0.8811	0.2643
黄豆黄苷	$y=38.418x+0.092$	0.9999	1.05~33.46	0.6116	0.2447
染料木苷	$y=51.33x+45.864$	0.9995	8.93~285.61	0.0786	0.0214
大豆苷元	$y=57.479x-0.6831$	0.9999	0.82~26.33	0.2433	0.1248
染料木素	$y=69.605x+1.1423$	0.9997	0.93~29.64	0.5116	0.1067

2.4.5 定量限与检测限考察 精密量取“2.4.4”项下大豆苷、黄豆黄苷、大豆苷元、染料木素混合对照品溶液和染料木苷单一对照品溶液适量,用70%甲醇倍比稀释,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限,结果见表8。

2.4.6 精密度试验 精密量取“2.4.4”项下大豆苷、黄豆黄苷、大豆苷元、染料木素混合对照品溶液和染料木苷单一对照品溶液适量,按“2.4.2”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素峰面积的RSD分别为1.33%、1.31%、1.33%、1.36%、1.34% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4.7 稳定性试验 取“2.4.1”项下供试品溶液(编号:S8),分别于室温放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素峰面积的RSD分别为2.66%、2.47%、2.48%、2.90%、1.20% ($n=7$),表明供试品在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.4.8 重复性试验 取黑豆药材样品粉末(编号:S8)共6份,每份约1 g,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中5种成分的含量。结果,大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素的平均含量分别为0.2124、0.0406、0.3307、0.0401、0.0384 mg/g, RSD分别为0.67%、0.87%、0.78%、1.13%、1.82% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的黑豆药材样品粉末(编号:S8),共6份,每份约1 g,精密称定,加入适量“2.1.1”项下各单一对照品溶液,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表9。

2.4.10 耐用性试验 取黑豆药材样品粉末(编号:S8)

表9 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 9 Results of recovery tests ($n=6$)

待测成分	已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
大豆苷	0.1886	0.2124	0.3907	95.15	95.72	0.51
	0.1891	0.2124	0.3918	95.43		
	0.1895	0.2124	0.3927	95.67		
	0.1902	0.2124	0.3940	95.95		
	0.1893	0.2124	0.3922	95.53		
	0.1913	0.2124	0.3964	96.56		
黄豆黄苷	0.0402	0.0406	0.0813	101.23	101.03	1.88
	0.0407	0.0406	0.0822	102.22		
	0.0405	0.0406	0.0818	101.72		
	0.0394	0.0406	0.0796	99.01		
	0.0393	0.0406	0.0793	98.52		
	0.0411	0.0406	0.0831	103.45		
染料木苷	0.3154	0.3307	0.6308	95.37	96.87	0.95
	0.3231	0.3307	0.6462	97.70		
	0.3238	0.3307	0.6476	97.91		
	0.3205	0.3307	0.6411	96.95		
	0.3203	0.3307	0.6407	96.89		
	0.3187	0.3307	0.6375	96.40		
大豆苷元	0.0565	0.0401	0.0966	100.00	100.50	0.78
	0.0566	0.0401	0.0968	100.25		
	0.0569	0.0401	0.0972	100.50		
	0.0574	0.0401	0.0983	102.00		
	0.0564	0.0401	0.0964	99.75		
	0.0567	0.0401	0.0970	100.50		
染料木素	0.0398	0.0384	0.0796	103.65	101.26	1.21
	0.0389	0.0384	0.0778	101.30		
	0.0387	0.0384	0.0774	100.78		
	0.0383	0.0384	0.0769	100.52		
	0.0387	0.0384	0.0775	101.04		
	0.0384	0.0384	0.0769	100.26		

适量,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再参照“2.4.2”项下色谱条件[调整流动相(B)不同含酸量(0.7%、0.12%、0.17%)、不同流速(0.9、1.0、1.1 mL/min)、不同柱温(20、25、30 $^{\circ}\text{C}$)]进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中5个成分的含量,结果见表10。结果表明,该方法能够满足试验要求,耐用性良好。

表10 耐用性试验结果

Tab 10 Results of durability tests

色谱条件	大豆苷		黄豆黄苷		染料木苷		大豆苷元		染料木素		
	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	
流动相B含酸量, %	0.7	0.239	1.27	0.042	3.67	0.354	2.37	0.041	3.24	0.035	3.21
	1.2	0.233		0.040		0.342		0.044		0.037	
	1.7	0.236		0.043		0.358		0.042		0.037	
流速, mL/min	0.9	0.223	2.64	0.042	1.40	0.340	2.31	0.042	3.76	0.036	4.28
	1.0	0.233		0.041		0.342		0.041		0.034	
	1.1	0.234		0.041		0.355		0.039		0.037	
柱温, $^{\circ}\text{C}$	20	0.234	0.43	0.042	1.36	0.341	0.45	0.042	2.44	0.037	4.07
	25	0.232		0.043		0.339		0.041		0.035	
	30	0.233		0.042		0.342		0.040		0.034	

2.4.11 样品含量测定 取12批黑豆药材样品适量,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.2”项下色谱

条件进样测定,平行操作3次,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中5种成分的含量,结果见表11。

表11 样品含量测定结果($n=3$,mg/g)

Tab 11 Results of content determination of samples ($n=3$,mg/g)

编号	大豆苷	黄豆苷	染料木苷	大豆苷元	染料木素
S1	0.240 2	0.055 8	0.369 3	0.012 3	0.012 9
S2	0.247 9	0.057 4	0.388 8	0.014 8	0.016 5
S3	0.241 8	0.056 0	0.376 6	0.014 1	0.015 9
S4	0.192 9	0.022 1	0.308 7	0.058 1	0.059 7
S5	0.178 3	0.021 7	0.288 5	0.058 8	0.065 1
S6	0.186 3	0.023 8	0.295 7	0.056 5	0.059 9
S7	0.203 5	0.029 3	0.334 1	0.051 7	0.054 6
S8	0.214 4	0.041 6	0.342 6	0.039 5	0.035 8
S9	0.211 7	0.028 2	0.344 8	0.033 7	0.037 5
S10	0.264 3	0.094 4	0.597 2	0.050 9	0.082 5
S11	0.260 3	0.093 0	0.585 4	0.050 4	0.082 9
S12	0.265 9	0.096 2	0.584 2	0.050 2	0.081 0

3 讨论

在前期预试验中,笔者分别考察了30%、50%、70%、90%甲醇为提取溶剂时的提取效果,发现以70%甲醇提取时,各待测成分的色谱峰响应相对最高,故选择70%甲醇为提取溶剂。笔者又比较了不同检测波长(210、254、260、280、360 nm)下各色谱峰的分光效果,发现当检测波长为260 nm时,各色谱峰均有较强吸收,且分离度较好,故选择检测波长为260 nm。同时,笔者还考察了乙腈-0.10%冰乙酸水溶液、乙腈-0.12%甲酸水溶液不同流动相系统的分离效果,发现以乙腈-0.12%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时,各色谱峰分离度较好,故选择流动相为乙腈-0.12%甲酸水溶液进行梯度洗脱。

指纹图谱能体现中药成分的整体性,符合中药质量评价的特点^[10],但无法确定指纹图谱中各共有峰所代表的物质及其含量,因此在指纹图谱的基础上进行多成分定量分析,可在一定程度上弥补上述不足^[11]。相似度评价结果显示,12批黑豆药材样品的相似度均大于0.94,表明各批黑豆药材样品的化学成分一致性较好;共获得19个共有峰,相对保留时间的RSD为0~0.53%,相对峰面积的RSD为0~62.50%,表明不同产地黑豆药材样品间虽然具有相同的化学成分,但含量存在差异。聚类分析、PCA分析结果均显示,12批黑豆药材样品可聚为两类:S4~S12聚为一类,S1~S3聚为一类;S4~S12药材样品质量相近,与S1~S3存在较大差异。含量测定结果显示,同一省份产地黑豆药材样品中大豆苷、黄豆黄

苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素含量无显著差异,但不同省份产地黑豆药材样品间含量差异明显,这可能与其产地的地理位置、气候、土壤等因素可影响黑豆的次生代谢产物有关(因黑豆的次生代谢产物中也含有黄酮类成分)^[12]。

综上所述,本文所建指纹图谱和5种异黄酮类成分的含量测定方法均可用于黑豆药材的质量控制;不同产地黑豆药材中异黄酮类成分相似,但含量有所差异。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:344-345.
- [2] 周三,关崎春雄,岳旺,等.野生大豆、黑豆和大豆的异黄酮类成分比较[J].大豆科学,2008,27(2):315-319.
- [3] 周莎,宛金,王彦晖,等.基于“黑豆补肾”的科学内涵论中医之“道理”观[J].医学与哲学,2018,39(8):78-81.
- [4] 刘秀玉,王利丽,左瑞庭,等.药用黑豆的研究进展[J].亚太传统医药,2017,13(20):82-85.
- [5] 张素霞,李红丽.大豆异黄酮功能特性及其检测方法的研究进展[J].粮油加工,2009,2(19):64-67.
- [6] 黄涛,刘丽,张笑敏,等.夏天无HPLC指纹图谱及多指标含量测定研究[J].中草药,2019,50(10):2474-2479.
- [7] 陆泉.RP-HPLC法测定药材黑豆中大豆苷的含量[J].首都医药,2014,21(18):73-74.
- [8] 刘洋,郭晓雨,孙殿奎,等.不同产地黑豆黄酮提取物的抗氧化能力比较研究[J].人参研究,2012,24(1):21-23.
- [9] ZHANG J, GUO Q, WEI M, et al. Metabolite identification and pharmacokinetic profiling of isoflavones from black soybean in rats using ultrahigh-performance liquid chromatography with linear-ion-trap-orbitrap and triple-quadrupole tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(49):12941-12952.
- [10] 姜华,高原,杨景明,等.源于“整体观”思想的中药质量评价方法研究概述[J].中国中药杂志,2015,40(6):1027-1031.
- [11] 何兵,刘艳,李春红,等.多指标定量指纹图谱在中药金银花质量评价中的应用[J].中国药学杂志,2015,50(14):1237-1242.
- [12] 屠鹏飞.中药指纹图谱制定的方法学探讨[C]//国际色谱指纹图评价中药质量研讨会论文集.广州:国家中医药管理局,2001:111-114.

(收稿日期:2019-08-19 修回日期:2020-01-03)

(编辑:陈宏)