

制首乌辅料黑豆的质量控制研究

宋艳刚^{1,2}, 白俊其¹, 闵江³, 蔡锡潮¹, 丘小惠^{1*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510120;

2. 丽珠集团利民制药厂, 广东 韶关 512028; 3. 广东康美药业股份有限公司, 广东 普宁 515300)

[摘要] 目的: 建立制首乌辅料黑豆原料及其在炮制品中的质量控制方法。方法: 通过比较黑豆、豆制何首乌和清蒸何首乌 HPLC 色谱图差异, 确定制何首乌辅料黑豆的质量控制指标, 在此基础上, 建立豆制何首乌中黑豆的检测方法和黑豆原料的质量控制方法。结果: 通过 HPLC 色谱图比较, 检测到豆制何首乌中的微量大豆苷元。建立了制何首乌中黑豆的 TLC 色谱检测方法。采用 HPLC, 建立了黑豆原料中大豆苷元含量测定方法, 测定了 12 批不同产地黑豆, 以广东产黑豆大豆苷元含量最高。结论: 本方法可作为制首乌辅料黑豆原料及其在炮制品中的质量控制方法。

[关键词] 制首乌; 辅料; 黑豆; 质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0058-05

Study on Adjuvant Black Beans of Radix Polygoni Multiflori Preparata Quality Control

SONG Yan-gang^{1,2}, BAI Jun-qi¹, MIN Jiang³, CAI Xi-chao¹, QIU Xiao-hui^{1*}

(1. The Second College of Clinic Medicine of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;

2. Liming Pharmaceutical Factory, Lizon Pharmaceutical Group Inc., Shaoguan 512028, China;

3. Guangdong Kangmei Pharmaceutical Co. Ltd., Puning 515300, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality control methods of adjuvant black beans and that in Radix Polygoni Multiflori preparata. **Method:** By comparing differences of HPLC chromatogram of black beans. Radix Polygoni Multiflori preparata without adjuvant and processing with black beans, to determine quality control index of adjuvant black beans. On this basis, to establish the detection method of black beans in Radix Polygoni Multiflori preparata and the quality control method of raw black beans. **Result:** Comparison by HPLC chromatogram, detected in trace daidzein in Radix Polygoni multiflori preparata with adjuvant, and then established the TLC Chromatography of black bean in Radix Polygoni Multiflori preparata. On the other hand, HPLC determination method of assaying daidzein in raw black beans has been established. Black beans from 12 different areas were determined, that from Guangdong province was the highest content of all. **Conclusion:** This method could be used as the quality control methods of adjuvant black beans and that in Radix Polygoni Multiflori Preparata.

[Key words] Radix Polygoni Multiflori Preparata; adjuvant; black beans; quality control

黑豆为豆科大豆属植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr 的干燥成熟种子, 产地遍及全国各地, 具有活血

[收稿日期] 2010-12-06

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划基金项目(2006BAI09B06-06); 广东省科学技术厅社会发展项目(2007B031407009)

[第一作者] 宋艳刚, 硕士研究生

[通讯作者] * 丘小惠, 研究员, 研究方向: 中药药效物质基础及成分分析, Tel: 020-39318571, E-mail: gxhgxh@medmail.com.cn

利水、祛风解毒、健脾益肾的作用,归入补肾药。何首乌是蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb 的块根,炮制品具有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨之功效。加黑豆作为辅料炮制是何首乌传统炮制方法,黑豆可增强其补肝肾功效,以往已有研究也证明了高压豆制何首乌比高压清蒸何首乌功效较好^[1]。2010年版《中国药典》(一部)正文制首乌项下记载了黑豆汁制法^[2],但尚未有豆制何首乌中黑豆的质量控制方法。本文通过对辅料黑豆质量进行研究,为豆制何首乌中的黑豆质控提供依据,从而完善黑豆制何首乌的质量标准。

1 仪器和试剂

Waters600 型液相色谱仪(600 泵,717 自动进样器,2998 紫外检测器,Empower 工作站),安捷伦 LC1100 液相色谱仪(G1311A 二元泵,自动进样器,DAD 检测器,VWD 检测器,安捷伦高效液相化学工作站),CAMAG 薄层色谱成像系统(Digistorez 数码相机,Wincats 软件)。

大豆苷元(批号 1502-200101)、大豆苷(批号 111738-200501)、二苯乙烯苷(批号 110844-200505)对照品购自中国药品生物制品检定所。乙腈、甲醇(色谱纯 Dikma 生产),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

黑豆汁、豆制何首乌及清蒸何首乌按照 2010 年版《中国药典》(一部)正文制首乌项下方法制备^[2]。何首乌(产地广东德庆,批号 20080817)、黑豆由广东康美饮片厂提供,经该厂质检部鉴定为合格品。黑豆汁制备原料为采集自广州的黑豆(批号 20070824)。12 批黑豆样品来源见表 1。

表 1 黑豆样品来源

No.	产地	No.	产地
1	河南郑州	7	茂芸
2	江苏徐州	8	福建仙游
3	山东淄博-1	9	山东淄博-2
4	山东平邑	10	安徽六安
5	辽宁宽甸	11	宁夏
6	上海	12	广州

2 豆制何首乌与清蒸何首乌色谱图比较

2.1 色谱条件 采用制何首乌指纹图谱色谱条件:Waters600 液相色谱仪(600 泵,717 自动进样器,2998 检测器,Empower 工作站),Phenomenes 110A C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm)流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱(1:99 ~ 99:1),检测波长 260 nm,流速 1 mL·min⁻¹。制何首乌色谱图见图 1。

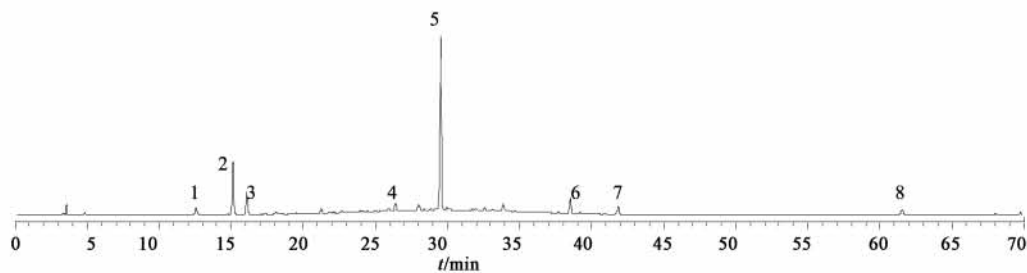


图 1 制何首乌色谱图

5. 二苯乙烯苷

2.2 对照品溶液制备 精密称取大豆苷、大豆苷元对照品,分别加甲醇配制成浓度为 0.1 g·L⁻¹ 标准液。精密称取二苯乙烯苷对照品,加甲醇配制成浓度为 0.96 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 分别称取清蒸何首乌、豆制何首乌(过 4 号筛)0.5 g,移入 10 mL 量瓶,加 80% 甲醇超声 40 min,冷却后用 80% 甲醇定容,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,取滤液为供试品溶液。按照 2010 年版《中国药典》(一部)正文制首乌项下方法制备黑豆汁^[2],取黑豆汁(相当于 0.5 g 黑豆原料)加甲醇

至 80% 并定容至 10 mL,摇匀,取上清液过 0.45 μm 滤膜,取滤液为供试品溶液。

2.4 色谱条件方法学考察

2.4.1 稳定性试验 取供试品溶液,分别在配制后的 0,2,4,8,10,12,24 h 进样,测得二苯乙烯苷峰面积的 RSD 1.03%,表明供试品溶液(二苯乙烯苷)在 24 h 内基本稳定。

2.4.2 精密度试验 取供试品溶液,连续进样 6 次,测得二苯乙烯苷峰面积的 RSD 0.65%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取 6 份同一样品各 0.5 g, 按照供试品溶液制备方法制备, 分别进样, 测得二苯乙烯苷峰面积的 RSD 1.37%, 表明方法重复性较好。

2.5 结果 取大豆苷、大豆苷元对照品溶液及 2.3 项下各供试品溶液, 采用 2.1 项下制何首乌指纹图谱色谱条件, 分别进样 10 μ L 测定。

结果表明, 豆制何首乌和清蒸何首乌色谱图无

明显差异, 应用 Empower 工作站提取光谱功能对色谱图进行全程光谱扫描, 在豆制何首乌色谱图中检测到与大豆苷元对照品保留时间基本相同、光谱图一致的微量成分, 将色谱图局部放大, 可观察到很小的大豆苷元色谱峰。而在清蒸何首乌色谱图中未检测到大豆苷元。采用相同方法, 在豆制何首乌中未检测到大豆苷及黑豆提取物色谱图中其他峰面积值较大的成分。各对照品和供试品图谱见图 2~6。

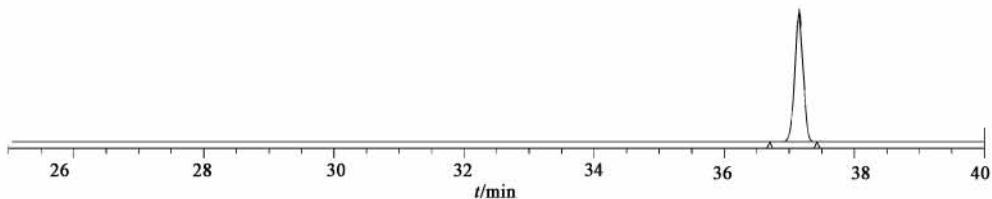


图 2 大豆苷元对照品色谱

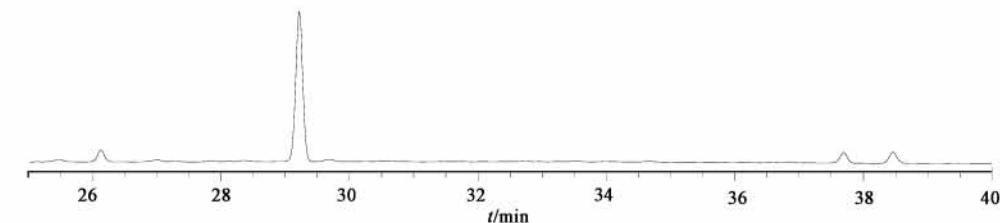


图 3 大豆苷对照品色谱

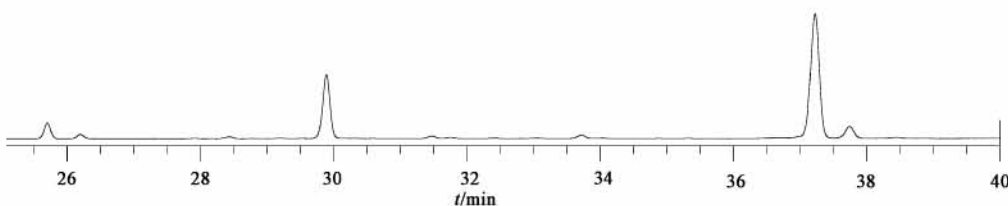


图 4 黑豆提取物色谱

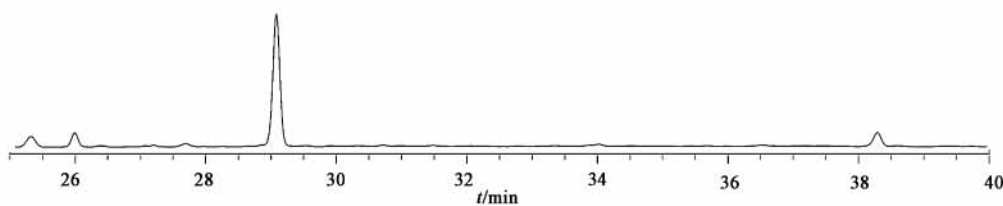


图 5 清蒸何首乌色谱

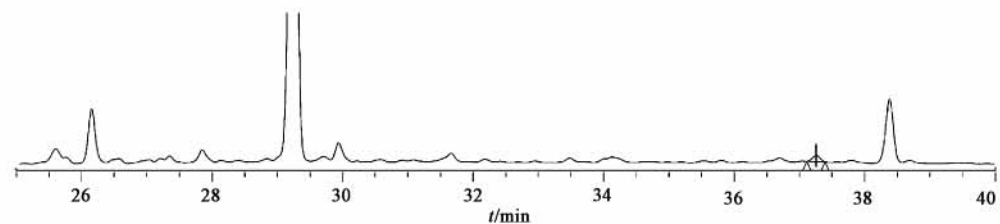


图 6 豆制何首乌色谱

3 制首乌中黑豆的薄层色谱检测方法

3.1 对照品溶液配制 精密称取大豆苷元对照品,加甲醇配制成 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 标准液。

3.2 供试品溶液制备 取黑豆粗粉 0.5 g ,生首乌、清蒸何首乌、豆制何首乌粗粉各 2 g ,分别置索氏提取器中,加石油醚($60 \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$) 100 mL ,加热回流 1 h ,弃去石油醚液,药渣挥干后,再加醋酸乙酯 100 mL ,加热回流 2 h ,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣用 2 mL 甲醇溶解,作为供试品溶液。

3.3 样品检测 分别吸取上述供试品溶液各 $5 \mu\text{L}$,点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙醇($10:0.7$)为展开剂,预饱和 10 min ,展开,取出,晾干,氨气熏后,置紫外灯(366 nm)下检视并照相。

黑豆、豆制何首乌供试品色谱在与大豆苷元对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,清蒸何首乌供试品色谱未显斑点。

4 黑豆原料大豆苷元含量测定

4.1 色谱条件 AgilentLC1100 液相色谱仪(G1311A 二元泵,自动进样器,DAD 检测器,VWD 检测器,安捷伦高效液相化学工作站),Dikma Kromasil 100A C_{18} 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),流动相甲醇-水($1:1$),洗脱时间 30 min ,流速 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 260 nm ,柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $10 \mu\text{L}$,大豆苷元对照品及黑豆供试品溶液色谱图见图 7,8。

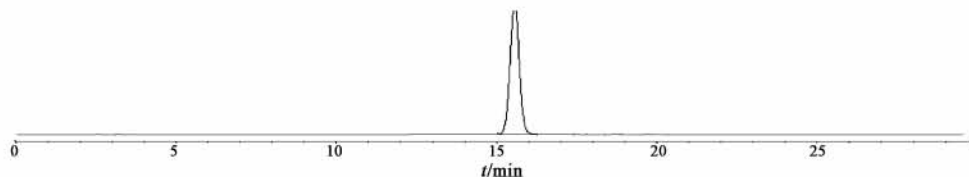


图7 大豆苷元对照品

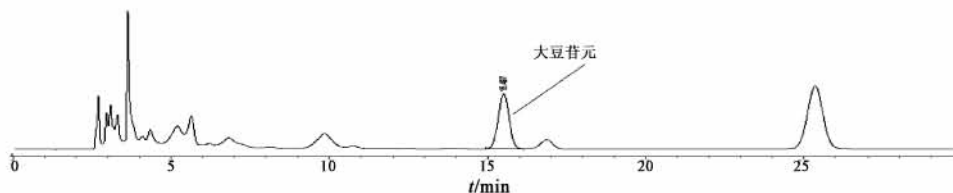


图8 黑豆供试品溶液

4.2 对照品溶液制备 精密称取大豆苷元对照品适量,加入 70% 乙醇制成 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。

4.3 供试品溶液制备 取黑豆粉末(过 4 号筛),精密称定 0.5 g ,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 50 mL ,称定质量,超声处理(功率 300 W ,频率 100 kHz) 30 min ,取出放冷,称定质量,用 70% 乙醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液。

4.4 方法学考察

4.4.1 线性关系考察 精密称取大豆苷元对照品适量,用 70% 乙醇配制成 $0.1094 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 大豆苷元溶液。精密量取该对照品溶液 $0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 \text{ mL}$ 于 10 mL 量瓶中,加 70% 乙醇稀释至刻度。分别吸取 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,以峰面积积分值为纵坐标,样品浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程 $Y = 5.18 + 61.20X$ ($R^2 = 0.9997$),表明大

豆苷元在 $1.09 \sim 87.52 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性良好。

4.4.2 精密度试验 取同一供试品溶液连续进样 6 次,测得面积百分比 $\geq 10\%$ 共有峰相对峰面积的 RSD 0.28% 。

4.4.3 稳定性试验 取供试品溶液于配制后 $0, 1, 2, 4, 6, 12, 21 \text{ h}$ 测定,测得面积百分比 $\geq 10\%$ 共有峰相对峰面积 RSD 0.18% 。

4.4.4 重复性试验 精密称定同一批次供试品 6 份,照 4.3 项下方法制备供试品溶液并测定,面积百分比 $\geq 10\%$ 的共有峰相对峰面积的 RSD 1.96% 。

4.4.5 回收率试验 取已知含量黑豆粉末约 0.5 g ,精密称定,另精密量取 $1 \text{ mL } 300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的大豆苷元标准品乙醇溶液,置于同一 100 mL 具塞锥形瓶中,挥干溶剂,按 4.3 项下方法制备供试品溶液。平行操作 6 份,分别按 4.1 项下方法测定。计算得大

大豆苷元回收率为 99.93% ,RSD 1.69%。见表 3。

表 3 大豆苷元加样回收率试验

No.	样品量 /g	样品中 含量 /μg	加入量 /μg	实测值 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.499 9	299.86	300	605.69	101.94	99.93	1.69
2	0.515 3	308.09	300	601.69	97.87		
3	0.509 6	306.02	300	600.66	98.21		
4	0.498 4	298.36	300	602.36	101.33		
5	0.514 4	307.96	300	610.30	100.78		
6	0.501 5	301.29	300	599.65	99.45		

4.5 样品测定 12 批黑豆样品按 4.3 项下方法制备供试品溶液。依照 4.1 项下色谱条件分析各样品,测定大豆苷元的含量。结果见表 4。

表 4 12 批样品中大豆苷元的含量测定(n=3)

No.	大豆苷元	No.	大豆苷元
1	0.001 7	7	0.002 1
2	0.005 0	8	0.014 9
3	0.005 6	9	0.005 2
4	0.004 8	10	0.007 6
5	0.009 7	11	0.001 6
6	0.012 6	12	0.057 3

5 讨论

黑豆主要有效成分为异黄酮类,大豆苷元为黑豆主要异黄酮成分之一。本实验分别考察甲醇、50% 甲醇、95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇、50% 乙醇 6 种提取溶媒对黑豆大豆苷元的提取率。结果表明,70% 乙醇提取率最高,故确定大豆苷元含量测定供试品制备以 70% 乙醇为提取溶媒。另外,对 12 批黑豆大豆苷元的含量测定结果表明,不同来源黑豆样品大豆苷元含量差异较大,因此,饮片炮制品中辅料的质量亦应从原料开始控制。

2010 年版《中国药典》制首乌质量标准尚未建立辅料黑豆的检测方法,收录的黑豆汁拌蒸制首乌制备方法,何首乌与黑豆配比为 4:1,由于在豆制何首乌中黑豆化学成分含量远低于何首乌中的化学成分含量,且黑豆所含的大豆苷元等异黄酮成分与制首乌有效成分二苯乙烯苷等在乙醇、甲醇、醋酸乙酯等溶剂中溶解性均较为接近,因此在豆制何首乌供试品制备中,大豆苷元等异黄酮类化学成分较难获得有效的分离富集,以适宜于色谱柱载样量的豆制

何首乌供试品浓度和进样量进行检测,黑豆化学成分较难达到足够的检测量。因此本实验分别建立了黑豆原料的 HPLC 含量测定方法和豆制何首乌中黑豆的 TLC 检测方法,所建立的方法简便、快捷,可有效控制黑豆原料及其在豆制何首乌中的质量。

本实验在豆制何首乌 HPLC 色谱图中仅检测到微量大豆苷元(daidzein),可能是由于炮制过程的流失导致原本含量比例较低的黑豆成分含量进一步降低,极难检测;或经过长时间高温蒸制,原有成分发生变化所致。现代药理研究已证明,大豆苷元具有明显抗心律失常、耐缺氧、抗氧化、提高免疫功能作用^[3-6],并且对骨质疏松有明显效果^[7],而中医理论认为肾藏精,精生骨髓,骨髓充实,骨骼则强壮。肾的精气盛衰,影响骨骼的生长、营养、功能等。因此,大豆苷元的药理作用与制何首乌补肾功效相一致。而曾靖等^[6]研究表明大豆苷元可促进幼龄小鼠的生长发育,增加脾脏、胸腺质量及提高其指数,且呈剂量依赖性,初步证明大豆苷元含量愈高,其药效愈明显。因此,大豆苷元可作为制首乌辅料黑豆的有效成分指标。我们前期研究表明豆制何首乌比清蒸何首乌药效较好^[1],但除异黄酮类成分外,黑豆还含有多糖、蛋白质、氨基酸、微量元素等成分,因此,豆制何首乌中增强何首乌补肝肾、益精髓功效的黑豆物质基础有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 丘小惠,宋艳刚,孙景波,等.不同炮制工艺制何首乌对大鼠血虚模型的作用研究[J].中药材,2008,31(1):16.
- [2] 中国药典.一部[S].2005:122,123.
- [3] 叶和扬,邱峰,曾靖,等.大豆苷元抗心律失常作用的研究[J].中国中药杂志,2003,23(9):853.
- [4] 曾靖,黄志华,邱峰,等.大豆苷元耐缺氧的实验研究[J].中国现代应用药学,2004,21(6):454.
- [5] 曾靖,邱峰,叶和扬,等.大豆苷元局部麻醉作用的研究[J].赣南医学院学报,2004,24(6):637.
- [6] 曾靖,邱峰,叶和扬,等.大豆苷元对免疫器官的影响[J].赣南医学院学报,2004,24(2):117.
- [7] Umgar Y, Osundahunsi O F, Shimoni E. Thermal stability of genistein and daidzin and its effect on their antioxidant activity[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(15):4394.

[责任编辑 蔡仲德]