

萌芽黑青稞喷干粉的主要成分测定及 HPLC 指纹图谱的建立

毕继全, 王希通, 陈林伟, 葛善春, 陈瑞, 陈志鹏*

(南京中医药大学药学院 南京 210023)

摘要 目的:测定萌芽黑青稞喷干粉中主要成分的含量,并建立指纹图谱,为萌芽黑青稞喷干粉质量标准的制定提供依据。方法:采用高效液相色谱法测定萌芽黑青稞喷干粉中 γ -氨基丁酸、阿魏酸、花青素的含量;采用紫外分光光度法测定 β -葡聚糖的含量;采用指纹图谱相似度软件和 SPSS 软件进行数据分析,建立萌芽黑青稞喷干粉的指纹图谱共有模式,对 10 批样品进行质量评价。结果:不同批次萌芽黑青稞喷干粉中 β -葡聚糖含量为 68.35~73.82 mg/g, γ -氨基丁酸含量 6.56~7.31 mg/g,阿魏酸含量 0.15~0.23 mg/g,花青素含量 0.86~1.53 mg/g。在萌芽黑青稞喷干粉 HPLC 指纹图谱中共标定 18 个共有峰,指出 3 种活性物质包括绿原酸、对香豆素和阿魏酸,建立了萌芽黑青稞喷干粉的指纹图谱共有模式,相似度值评价在 0.902 以上。聚类分析将 10 批萌芽黑青稞分为 2 个大类,主成分分析选出 3 个主因子,并对 10 批样品综合评分,两种分析结果均显示 S10 质量较优。结论:建立的主要成分含量测定方法具有良好的重复性和稳定性,分析所得对照指纹图谱可为萌芽黑青稞喷干粉及其产品质量评价提供参考依据。

关键词 萌芽黑青稞; γ -氨基丁酸; β -葡聚糖; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

文章编号 1009-7848(2022)09-0293-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.09.031

青稞 (*Hordeum vulgare* Linn. var. nudum Hook. f.) 又称裸大麦,是禾本科大麦属作物,是我国西藏、青海地区具有民族特色的重要粮食作物^[1]。青稞又分白青稞、黑青稞、紫青稞、墨绿青稞等品种^[2],其中黑青稞中 Zn、K、Mg、Fe 和 P 5 种矿物元素、总氨基酸、B 族维生素及花青素的含量均较高,符合现代人对黑色健康食品的要求,是一类珍贵的种植资源,具有潜在的开发利用价值^[3-7]。研究表明,青稞功效成分主要包括 β -葡聚糖、 γ -氨基丁酸、酚酸类成分、黄酮类成分、花青素等^[8-10]。青稞等谷物萌芽可改善其营养和能效,原因在于谷物萌芽后蛋白酶等水解酶活性被激活,使纤维素酶、 β -葡聚糖酶等活性提高,促进了青稞等谷物中功效成分含量的增加^[11]。

萌芽黑青稞中人体所需基本营养物质水分、蛋白质、脂肪、纤维及微量元素等含量均高于普通青稞,所含各种氨基酸种类更多且品质更优^[12-13]。目前对萌芽青稞开发的产品主要包括三大类:第 1 类为粮食用产品,如青稞面食、青稞米等;第 2 类为饮品和保健品,如青稞酒、青稞茶、青稞奶及青稞提取的 β -葡聚糖等^[14];第 3 类为化妆品,如青

稞面膜、青稞爽肤水等。就目前产品开发而言,萌芽黑青稞在生产过程中存在运输成本高、单位质量中功效物质含量低等问题,阻碍了其产品多元化的发展。为解决此问题,本课题组将萌芽黑青稞的活性物质进一步富集,制备成喷干粉,为其产品开发提供更优质的原料。

本文以青海地区萌芽黑青稞为研究对象,采用恒温水浴法得萌芽黑青稞提取液,经除杂、喷雾干燥制萌芽黑青稞喷干粉。为全面反映萌芽黑青稞喷干粉的质量,评价不同场地、批次间的差异性,采用多指标、多方法、多角度进行综合评价,采用紫外分光光度法测定 β -葡聚糖含量,同时建立稳定高效的 HPLC 方法测定萌芽黑青稞粉中 γ -氨基丁酸、阿魏酸和花青素的含量。近年来,指纹图谱技术应用广泛,是评价天然产物质量的真实性、优良性和稳定性的一种有效手段。本文拟建立 10 批不同萌芽黑青稞喷干粉的指纹图谱,通过聚类分析和主成分分析评价其质量。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

萌芽黑青稞,青海汉和生物科技股份有限公司提供,来源见表 1; β -葡聚糖(纯度 $\geq 80.21\%$),批号 C10939034,麦克林; γ -氨基丁酸($\geq 98\%$),

收稿日期: 2021-09-14

作者简介: 毕继全(1996—),男,硕士生

通信作者: 陈志鹏 E-mail: czpepu2000@hotmail.com

批号 C10490853, 麦克林; 阿魏酸($\geq 99.4\%$), 批号 110773-201915, 中国食品药品检定研究院; 矢车菊素-3 葡萄糖苷($\geq 98\%$), 批号 CFN99740, Chem Faces; 绿原酸($\geq 98\%$), 南京世洲生物科技有限公司; 对香豆素($>98\%$), 南京森贝伽生物科技有限公司; 刚果红, 罗恩试剂; 乙腈(色谱纯), TEDIA; 三氟乙酸($\geq 99.5\%$)(色谱纯), 麦克林; 其它试剂

均为国产分析纯; 喷雾干燥剂, 瑞士 BUCHI 公司。

Agilent1100 高效液相色谱仪(四元泵), 美国 Agilent 公司; Shimadzu LC-20AT, 日本岛津公司; UV-1780 紫外分光光度计, 日本岛津公司; Sartorius BSA2202S, 德国赛多利斯; AUW120D 分析天平, 日本岛津公司。

表 1 10 批萌芽黑青稞样品来源信息

Table 1 Source information of 10 batches of budding black highland barley samples

编号	批号	来源	采集时间
S1	H20200801	青海汉和生物公司原料 1	2020.08
S2	H20200901	青海汉和生物公司原料 2	2020.09
S3	K20200801	青海昆盛农业公司原料 1	2020.08
S4	K20200901	青海昆盛农业公司原料 2	2020.09
S5	Y20190901	青海省海晏县原料 1	2019.08
S6	Y20200801	青海省海晏县原料 2	2020.08
S7	Y20200901	青海省海晏县原料 3	2020.09
S8	T20190801	青海省共和县塘格木镇原料 1	2019.08
S9	T20200801	青海省共和县塘格木镇原料 2	2020.08
S10	T20200901	青海省共和县塘格木镇原料 3	2020.09

1.2 试验方法

1.2.1 萌芽黑青稞喷干粉的制备 称取 1.0 kg 萌芽黑青稞籽粒, 加 10 L 水, 95 °C 提取 3 次, 每次 2 h, 用 6~8 层纱布粗滤, 再用布氏漏斗抽滤, 合并滤液, 真空-0.08 MPa 条件下 60 °C 浓缩至 0.50~0.55 g/mL (按黑青稞质量/浓缩液体积计), 将浓缩液于 -20 °C 冷冻过夜, 70 °C 解冻后以 400~600 目滤布过滤, 滤液经喷雾干燥机干燥成粉末, 即得黑青稞喷干粉。

1.2.2 β -葡聚糖含量测定

1.2.2.1 对照品溶液的制备 取 β -葡聚糖(5.21×10^5 g/mol) 对照品 10.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 相当于 β -葡聚糖 0.1 mg)。

1.2.2.2 标准曲线的绘制 精密量取标准溶液 5.0 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 作为母液。精密量取母液 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置 10 mL 具塞试管中, 加水至 1.0 mL, 加入 5.0 mL 刚果红溶液, 混匀, 在 25 °C 条件下放置 60 min, 采用分光光度法, 在 545 nm 处测定吸光度值^[5]。以吸光度为纵坐标(Y), 浓度为横坐标(X),

绘制标准曲线。

1.2.2.3 样品中 β -葡聚糖含量的测定 取本品粉末 20 mg, 加水定容 25 mL, 超声 10 min, 置 70 °C 水浴中 60 min, 离心, 取上清液 1 mL 至 10 mL 具塞试管中, 按 1.2.2.2 节方法测定, 计算 β -葡聚糖的含量。

1.2.3 γ -氨基丁酸含量测定

1.2.3.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 以乙腈-0.02 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相 ($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{乙酸铵}}=15:85$), 检测波长 320 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL/min。

1.2.3.2 邻苯二甲醛(OPA)衍生液的制备 0.3 g OPA 用 15 mL 甲醇溶解后, 加入 0.4 mol/L 硼酸缓冲液(pH 10.2) 60 mL 和巯基乙醇 0.9 mL, 放置 2 d。

1.2.3.3 对照品溶液的制备 取 γ -氨基丁酸对照品 10.0 mg, 置 200 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 得母液(每 1 mL 相当于 γ -氨基丁酸 50 μ g), 精密吸取母液 5.0 mL 置 10 mL 容量瓶中。

1.2.3.4 标准曲线的绘制 精密量取标准溶液 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 分别置于具塞试管

中,加60%乙醇至1.0 mL,加入OPA衍生液4 mL,涡旋振荡5 s,各静置2 min后过0.45 μm 滤膜,取20 μL 进样^[16]。对照品溶液进高效液相色谱仪测定,根据外标法,以峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),绘制标准曲线。

1.2.3.5 样品中 γ -氨基丁酸含量的测定 取萌芽黑青稞喷干粉粉末约20 mg,加适量60%乙醇溶解,超声20 min,用60%乙醇定容5 mL量瓶,4 000 r/min离心20 min。精密吸取上清液1.0 mL,加入OPA衍生液4 mL,涡旋振荡5 s,静置2 min后,过0.45 μm 滤膜,取20 μL 进样,按照1.2.3.1节色谱条件分析,计算 γ -氨基丁酸的含量。

1.2.4 阿魏酸含量的测定

1.2.4.1 色谱条件 Aglient ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);以甲醇-0.1%三氟乙酸水溶液为流动相梯度洗脱,洗脱条件见表2;检测波长323 nm;柱温25 $^{\circ}\text{C}$;流速0.8 mL/min^[17]。

1.2.4.2 对照品溶液的制备 取阿魏酸对照品5.0 mg,置50 mL量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得母液(每1 mL相当于阿魏酸0.1 mg),临用前精密吸取1.0 mL母液加50%甲醇稀释至50 mL,即得标准溶液(每1 mL相当于阿魏酸2.0 μg)。

1.2.4.3 标准曲线的绘制 精密量取标准溶液0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL分别置量瓶中,加50%甲醇至10 mL,用0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得系列标准曲线溶液。对照品溶液进高效液相色谱仪测定。根据外标法,以峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),绘制标准曲线。

1.2.4.4 阿魏酸含量的测定 取本品萌芽黑青稞喷干粉粉末约50 mg,加适量50%甲醇溶解,超声5 min,用50%甲醇定容5 mL量瓶,室温10 000 r/min离心10 min,上清液用0.45 μm 滤膜滤过。取样品溶液10 μL 进样,按照1.2.4.1节色谱条件分析,计算阿魏酸的含量。

1.2.5 花青素含量的测定

1.2.5.1 色谱条件 Aglient ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);以乙腈-0.3%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱,洗脱条件见表2;检测波长510 nm;柱温40 $^{\circ}\text{C}$;流速1.0 mL/min^[18]。

表2 阿魏酸含量测定的洗脱条件

Table 2 Elution conditions for determination of ferulic acid

时间/min	甲醇/%	0.1%三氟乙酸-水/%
0	10	90
8	35	65
25	50	50
35	10	90
40	10	90

表3 花青素含量测定的洗脱条件

Table 3 Elution conditions for determination of anthocyanin content

时间/min	乙腈/%	0.3%磷酸-水/%
0	5	95
20	15	85
30	25	75
40	50	50
48	5	95
60	5	95

1.2.5.2 对照品溶液的制备 取矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对照品5.0 mg,置50 mL量瓶中,用70%乙醇稀释至刻度,摇匀,得母液(每1 mL相当于矢车菊素-3-O-葡萄糖苷0.1 mg)。精密吸取母液1.0 mL置10 mL量瓶中,得到10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液。

1.2.5.3 标准曲线的绘制 精密量取标准溶液1.0,2.0,3.0,5.0,10.0 mL分别置量瓶中,加70%乙醇至10 mL,用0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得系列标准曲线溶液。精密量取上述系列标准曲线溶液各20 μL ,对照品溶液进高效液相色谱仪测定,根据外标法,以峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),绘制标准曲线。

1.2.5.4 花青素含量的测定 取本品萌芽黑青稞喷干粉粉末10 mg,加适量70%乙醇溶解(含1%盐酸),超声60 min,70%乙醇(含1%盐酸)定容至棕色2 mL量瓶,室温,避光浸提过夜,4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 r/min离心10 min,上清液用0.45 μm 滤膜滤过,取样品溶液10 μL 进样,按照1.2.5.1节色谱条件分析,计算花青素的含量。

1.2.6 萌芽黑青稞喷干粉主要成分含量数据分析 将10批样品的主要成分含量测定数据导入

SPSS 26.0 软件,使用单因素方差分析法对各主要成分含量结果进行显著性差异分析,以 $P < 0.05$ 为标准进行分组,以不同字母表示差异显著。

1.2.7 指纹图谱的建立

1.2.7.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液为流动相梯度洗脱,洗脱条件见表 3; 检测波长 280 nm; 柱温 30 ℃; 流速 1.0 mL/min。

1.2.7.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取阿魏酸、绿原酸、对香豆素对照品 3.96, 4.05, 5.08 mg, 用甲醇定容于 50 mL 量瓶中, 制成一定浓度的混合对照品溶液, 摇匀即得。

1.2.7.3 样品指纹图谱建立 取 10 批样品粉末 20 mg, 分别加水定容 25 mL, 超声 10 min 后, 室温 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.45 μm 滤膜滤过, 取样品溶液 10 μL 进样, 按照 1.2.5.1 节色谱条件分析, 得到 10 批样品的 HPLC 图谱。

1.2.7.4 数据分析 将 10 批萌芽黑青稞样品的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”, 选取中位数计算方法, 通过多点校正, 自动匹配生成对照图谱, 建立 10 批样品的指纹图谱, 计算各批样品的相似度。选取峰形正, 分离度较好的共有峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。应用 SPSS 26.0 软件, 对共有峰的数据进行聚类分析和主成分分析。

2 结果与分析

2.1 方法学验证

2.1.1 β-葡聚糖含量测定方法学验证

2.1.1.1 标准曲线 按 1.2.2.2 节方法绘制标准曲线, 得到回归方程 $Y = 0.0371X + 0.0077$, $R^2 = 0.9994$, 表明在 4.12~16.48 μg/mL 质量浓度范围, 样品浓度与其吸光度间呈良好的线性关系。

2.1.1.2 方法学验证 取 1 号萌芽黑青稞样品, 按 1.2.3.3 节方法制备溶液, 连续测定 6 次, 结果显示, β-葡聚糖含量的 RSD 为 1.72%, 说明仪器精密度高。取 1 号萌芽黑青稞样品 6 份, 按 1.2.1.3 节方法制备溶液, 测定吸光度值, 结果显示, β-葡聚糖含量测定 RSD 为 1.11%, 说明该方法重复性好。取 1 号萌芽黑青稞样品溶液, 分别在制备 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h 后测定其吸光度值, 结果表明,

表 4 萌芽黑青稞喷干粉指纹图谱洗脱条件

Table 4 Elution conditions of fingerprint of budding black highland barley

时间/min	乙腈/%	0.1%三氟乙酸-水/%
0	0	100
20	0	100
35	20	80
45	35	65
60	70	30
75	30	70
80	10	90
90	0	100

β-葡聚糖含量测定的 RSD 为 1.86%, 说明用本方法制备的样品在 8 h 内稳定性好。

2.1.2 γ-氨基丁酸含量测定方法学验证

2.1.2.1 标准曲线 按 1.2.3.4 节方法进行标准曲线绘制, 得回归方程为 $Y = 37\ 619X + 2\ 094.9$, $R^2 = 0.9996$, 结果表明, 本品在 0.1976~9.8784 μg/mL 质量浓度范围内, 浓度与峰面积间呈良好的线性关系。

2.1.2.2 方法学验证 取 1 号萌芽黑青稞样品, 按 1.2.3.5 节方法制备溶液, 1.2.3.1 节色谱方法测定, 连续测定 6 次。结果显示: γ-氨基丁酸含量的 RSD 为 1.12%。取 1 号萌芽黑青稞样品 6 份, 按 1.2.3.5 节方法制备溶液, 1.2.3.1 节色谱方法测定, 结果显示, γ-氨基丁酸含量测定 RSD 为 1.06%, 说明方法的重复性好。取 1 号萌芽黑青稞样品溶液, 分别在制备 0, 30, 60, 90 min 后测定, 结果表明, RSD 为 2.35%, 说明该方法制备的样品 90 min 内稳定性较好。

2.1.3 阿魏酸含量测定方法学验证

2.1.3.1 标准曲线 按 1.2.4.3 节方法绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 67\ 233X - 5\ 042.6$, $R^2 = 0.9998$, 结果在 1.08~10.78 μg/mL 质量浓度范围, 浓度与峰面积间呈良好的线性关系。

2.1.3.2 方法学验证 取 1 号萌芽黑青稞样品, 按 1.2.4.4 节方法制备溶液, 1.2.4.1 节色谱方法测定, 连续测定 6 次, 结果显示, 阿魏酸含量的 RSD 为 0.30%, 说明该方法重复性好。取制备好的 1 号萌芽黑青稞样品溶液, 分别在制备 0, 2, 4, 8 h 后测定其含量, 各时间点样品阿魏酸含量的 RSD 为

1.98%,说明制备的样品 8 h 内稳定性较好。

2.1.4 花青素含量测定方法学验证

2.1.4.1 标准曲线 按 1.2.5.3 节方法绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 5\ 021.5X - 2\ 523.4$, $R^2=0.9997$ 。在 1.20~100.40 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围,浓度与峰面积间呈良好的线性关系。

2.1.4.2 方法学验证 取 1 号萌芽黑青稞喷干粉样品 6 份,按 1.2.5.4 节方法制备溶液,1.2.5.1 节色谱方法测定,结果显示,花青素含量测定 RSD 为 0.83%,说明该方法重复性好。取 1 号萌芽黑青稞喷干粉样品溶液,分别在制备 0,30,60,90 min 后测定其含量,各时间点样品花青素含量的 RSD 为 1.68%,说明制备的样品 90 min 内稳定性较好。

2.2 不同批次的萌芽黑青稞粉主要成分含量

不同批次萌芽黑青稞喷干粉的主要成分含量存在差异。10 批萌芽黑青稞粉样品中, β -葡聚糖含量 68.36~73.82 mg/g, γ -氨基丁酸含量 6.56~7.31 mg/g,阿魏酸含量 0.15~0.23 mg/g,花青素含量 0.87~1.90 mg/g。 β -葡聚糖含量最高的是 3 号,为 73.82 mg/g,明显高于其它产地的样品 ($P < 0.05$); γ -氨基丁酸含量最高的是 6 号,为 7.31 mg/g,明显高于其它批次的样品 ($P < 0.05$);阿魏酸含量最高的是 2 号,为 0.23 mg/g;花青素含量最高的是 8 号,为 1.90 mg/g,明显高于其它批次的样品 ($P < 0.05$)。

表 5 萌芽黑青稞喷干粉主要成分含量(mg/g)

Table 5 Content of main components in spray dried powder of budding black highland barley (mg/g)

编号	β -葡聚糖	γ -氨基丁酸	阿魏酸	花青素
S1	69.81 \pm 0.01 ^e	7.01 \pm 0.02 ^e	0.21 \pm 0.01 ^a	1.23 \pm 0.02 ^c
S2	70.02 \pm 0.02 ^e	6.56 \pm 0.01 ^e	0.23 \pm 0.01 ^a	1.01 \pm 0.01 ^e
S3	73.82 \pm 0.02 ^a	6.83 \pm 0.03 ^d	0.18 \pm 0.01 ^b	1.13 \pm 0.02 ^d
S4	71.39 \pm 0.02 ^e	6.91 \pm 0.01 ^d	0.22 \pm 0.02 ^a	1.22 \pm 0.03 ^e
S5	68.36 \pm 0.02 ^e	6.88 \pm 0.01 ^d	0.20 \pm 0.03 ^b	0.98 \pm 0.01 ^f
S6	70.56 \pm 0.02 ^d	7.31 \pm 0.01 ^a	0.16 \pm 0.02 ^c	0.87 \pm 0.02 ^e
S7	72.08 \pm 0.02 ^b	7.06 \pm 0.01 ^c	0.17 \pm 0.01 ^c	1.03 \pm 0.01 ^e
S8	69.68 \pm 0.03 ^e	7.23 \pm 0.03 ^b	0.20 \pm 0.01 ^a	1.53 \pm 0.03 ^b
S9	68.68 \pm 0.05 ^f	6.98 \pm 0.01 ^c	0.15 \pm 0.02 ^c	1.90 \pm 0.01 ^a
S10	70.63 \pm 0.02 ^d	6.82 \pm 0.08 ^d	0.19 \pm 0.01 ^b	0.86 \pm 0.02 ^e

注:表中数值以平均值 \pm 标准偏差表示($n=3$),同列肩标的不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 HPLC 指纹图谱分析

2.3.1 指纹图谱 将 1.2.6.3 节 10 批样品的液相图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”分析,以 S1 色谱图为参照图谱,采用中位数法生成对照图谱,时间窗为 0.3 min,经多点校正,全峰匹配,得到 10 批样品的指纹图谱及生成对照图谱 R^[9],见图 1 和图 2。

2.3.2 相似度评价 以萌芽黑青稞喷干粉的 HPLC 对照指纹图谱为对照,对 10 批样品进行整体相似度评价。结果显示,10 批萌芽黑青稞样品的相似度均在 0.902 以上,见表 6。不同批萌芽黑青稞样品的化学成分一致性较好。

2.3.3 共有峰的指认及分析 通过软件分析生成的共有模式图,确定萌芽黑青稞粉 HPLC 指纹图谱中共有 18 个共有色谱峰。与对照品比对,确定

11 号峰为绿原酸,13 号峰为对香豆素,14 号峰为阿魏酸,见图 2。因 5 号峰保留时间适中,峰形较佳,分离度较好,故以其为参照峰,计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD < 2.0%,相对峰面积的 RSD 为 5.39%~26.17%,说明各成分含量存在较大差异。

2.3.4 指纹图谱方法学验证 取 1 号萌芽黑青稞粉样品,按照 1.2.6.3 节方法连续进样 6 次,18 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%,相对峰面积均小于 2.0%。取 1 号萌芽黑青稞粉样品,照 1.2.6.3 节方法制备 6 份溶液样品,分别进样,18 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%,相对峰面积均小于 3.0%,说明方法重复性好。取 1 号萌芽黑青稞粉样品,照 1.2.6.3 节方法将制备 0,2,4,8,12,24 h 后的同一份样品溶液进样,18 个

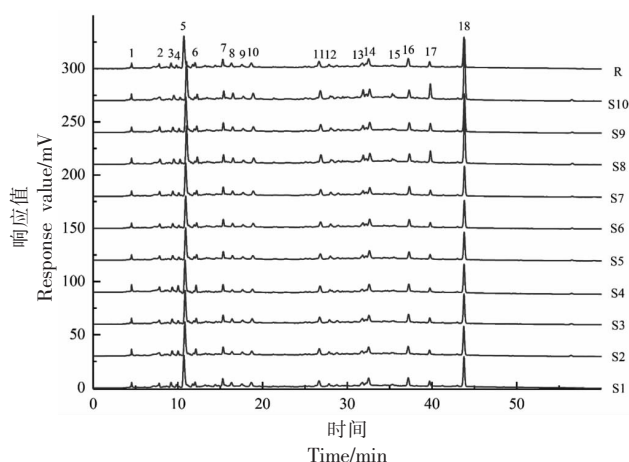


图1 萌芽黑青稞喷干粉的HPLC指纹图谱(S1~S10)及对照图谱(R)

Fig.1 HPLC fingerprint of budding black highland barley(S1~S10) and control fingerprint (R)

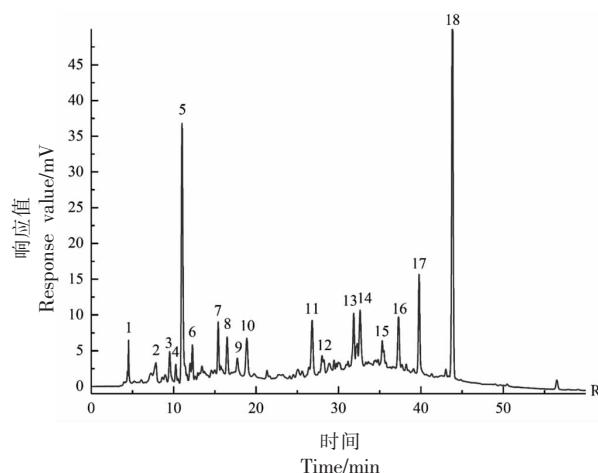


图2 萌芽黑青稞喷干粉的HPLC图谱的共有模式图
Fig.2 The common pattern of HPLC fingerprint of budding black highland barley

表6 10批萌芽黑青稞及对照指纹图谱的相似度评价

Table 6 Similarity evaluation of 10 batches of budding black highland barley and reference fingerprints

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000	0.943	0.936	0.955	0.964	0.956	0.968	0.951	0.92	0.906	0.970
S2	0.943	1.000	0.989	0.954	0.958	0.954	0.948	0.926	0.958	0.936	0.979
S3	0.936	0.989	1.000	0.940	0.952	0.953	0.945	0.924	0.961	0.943	0.978
S4	0.955	0.954	0.940	1.000	0.957	0.952	0.960	0.935	0.930	0.902	0.969
S5	0.964	0.958	0.952	0.957	1.000	0.993	0.986	0.948	0.951	0.916	0.983
S6	0.956	0.954	0.953	0.952	0.993	1.000	0.984	0.942	0.956	0.918	0.981
S7	0.968	0.948	0.945	0.96	0.986	0.984	1.000	0.960	0.948	0.920	0.983
S8	0.951	0.926	0.924	0.935	0.948	0.942	0.960	1.000	0.935	0.948	0.971
S9	0.920	0.958	0.961	0.930	0.951	0.956	0.948	0.935	1.000	0.978	0.980
S10	0.906	0.936	0.943	0.902	0.916	0.918	0.920	0.948	0.978	1.000	0.966
对照	0.970	0.979	0.978	0.969	0.983	0.981	0.983	0.971	0.980	0.966	1.000

共有峰的相对保留时间的RSD均小于1.0%,相对峰面积均小于3.0%,说明样品溶液制备24h内保持稳定。

2.3.5 聚类分析 将10批萌芽黑青稞粉样品指纹图谱中18个共有峰的峰面积导入SPSS 26.0软件,采用组间联结法,以平方Euclidean距离为测量度,进行聚类分析^[20],结果见图4。当欧式平方距离标尺在2时,4批样品可聚为一类;当欧式平方距离标尺在5时,7批样品可聚为一类;当欧式平方距离标尺在15时,8批样品可聚为一类;当欧式平方距离标尺在25时,9批样品可聚为一

类,说明S1-S9相似度比较高,观察分析S10色谱图中13、14和15号共有峰面积明显较大,根据共有峰的指认,猜测这3种活性物质与萌芽黑青稞抗逆性相关,因此萌芽黑青稞因抗逆性活性物质含量不同被分为两类,提示青海省共和县塘格木镇原料3样品的抗逆性可能更强,需进一步确证青海省共和县塘格木镇原料3的生长环境和研究生长环境对萌芽黑青稞质量的影响。

2.3.6 主成分分析 将10批萌芽黑青稞样品指纹图谱中18个共有峰的峰面积数据导入SPSS 26.0软件,进行主成分分析,以特征值>1为标准,

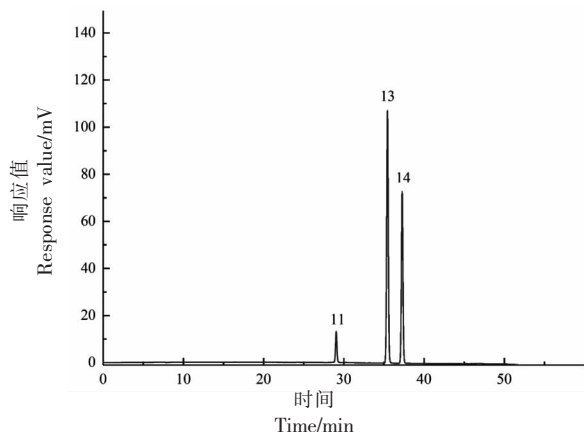


图 3 混合对照品图谱

Fig.3 Chromatogram of mixed reference substance

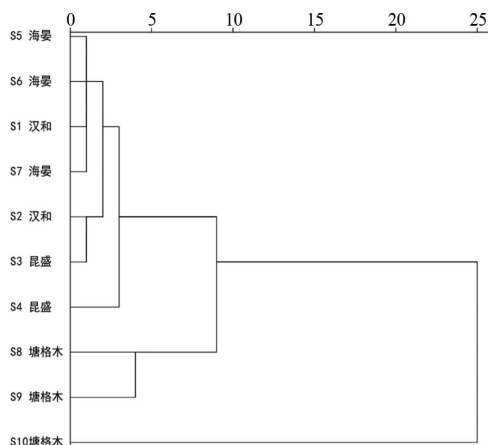


图 4 10 批萌芽黑青稞样品的聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis of 10 batches of budding black highland barley samples

得到 3 个主成分，累计方差贡献率为 90.961%，见表 7。得分系数矩阵见表 8，以绝对值大小作为评价依据，其中共有峰 12,14,17 号对主成分 1 有较大的贡献；共有峰 1,3,5 号对主成分 2 有较大的贡献；共有峰 16,18 号对主成分 3 有较大的贡献。利用 Origin 2017 作图软件绘制主成分分析得分图，见表 9 和图 5。该结果与聚类分析结果相似。

表 7 萌芽黑青稞主成分特征值及方差贡献率

Table 7 Principal component eigenvalues and variance contribution rate of budding black highland barley

成分	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	9.44	52.443	52.443
2	5.464	30.357	82.799
3	1.469	8.162	90.961

表 8 萌芽黑青稞样品主成分得分系数矩阵

Table 8 Score coefficient matrix of principal components of sprouting black highland barley

峰号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	峰号	主成分 1	主成分 2	主成分 3
1	0.03	0.172	-0.038	10	0.086	-0.083	-0.199
2	0.053	0.105	-0.136	11	0.09	-0.077	-0.052
3	0.027	0.174	-0.002	12	0.105	0.002	0.02
4	0.044	0.155	0.079	13	0.085	-0.057	0.32
5	0.015	0.178	0.085	14	0.098	-0.059	0.041
6	0.089	-0.005	-0.321	15	0.093	-0.033	0.26
7	0.041	0.16	0.004	16	0.081	-0.025	0.374
8	0.086	-0.061	0.083	17	0.099	-0.009	-0.161
9	0.084	0.073	0.087	18	0.083	-0.017	-0.388

表 9 10 批萌芽黑青稞样品的主成分综合得分

Table 9 Comprehensive score of principal components of 10 batches of budding highland barley samples

样品	Y ₁	Y ₂	Y ₃	综合得分	排序
S1	-0.58	-0.36	-0.42	-0.49	7
S2	0.43	0.39	0.80	0.45	4
S3	-0.20	-1.05	1.13	-0.36	6
S4	-0.14	2.55	0.70	0.84	2
S5	-0.76	-0.35	0.14	-0.54	8

(续表 9)

样品	Y_1	Y_2	Y_3	综合得分	排序
S6	-0.69	-0.57	0.27	-0.57	9
S7	-1.12	-0.42	0.02	-0.78	10
S8	-0.30	0.44	-2.44	-0.25	5
S9	1.25	-0.12	0.34	0.71	3
S10	2.11	-0.52	-0.53	1.00	1

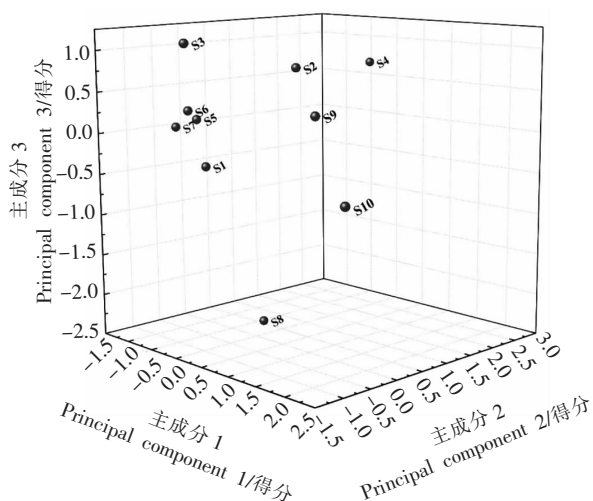


图5 10批萌芽黑青稞样品主成分分析得分图

Fig.5 Score chart of principal component analysis of 10 batches of budding black highland barley samples

3 讨论与结论

β -葡聚糖是由葡萄糖单位组成的多聚糖,能够活化巨噬细胞与嗜中性白血球等,提高白细胞素、细胞分裂素和特殊抗体含量,全面刺激机体免疫系统^[12]。植物来源的 β -葡聚糖具有更好的肠道益生作用。 β -葡聚糖是青稞籽粒胚乳细胞壁的主要成分,占细胞壁干重的75%左右,是迄今为止所有谷类作物中含量最高的^[24]。研究发现,青稞中含有丰富的酚酸类物质,其中阿魏酸含量最高,具有抗血小板聚集,抑制血小板5-羟色胺释放,抑制血小板血栓素A₂(TXA₂)的生成,增强前列腺素活性,镇痛,缓解血管痉挛等药理作用,同时在人体中可起到健美和保护皮肤的作用^[27]。 γ -氨基丁酸广泛存在于植物组织中^[30],是发挥镇静神经、抗焦虑,改善脑血流通,增加氧供给,促进脑代谢等功能的重要物质基础^[31],而萌芽黑青稞中具有含量极高的 γ -氨基丁酸。花青素是自然界一类广泛

存在于植物中的水溶性天然色素,属于生物类黄酮物质,主要的生理活性功能是清除自由基和抗氧化,花青素在食品中可作为营养强化剂,还能作为食品防腐剂代替苯甲酸等合成防腐剂^[35]。

通过建立高效液相色谱法测定萌芽黑青稞喷干粉中 γ -氨基丁酸、阿魏酸、花青素的含量,通过紫外分光光度法测定 β -葡聚糖的含量,经验证,以上方法稳定,可控,重复性好。10批不同来源的萌芽黑青稞样品中 γ -氨基丁酸、阿魏酸、花青素、 β -葡聚糖的含量存在显著差异($P < 0.05$),通过多指标评价和指纹图谱相结合的方式可全面评价萌芽黑青稞的质量,建立不同来源的萌芽黑青稞喷干粉的HPLC指纹图谱,结果表明10批样品的进样精密性、重现性、稳定性均良好,指纹图谱的特征性和专属性较强,18个共有峰分离度良好。样品的指纹图谱平均相似度在0.935~0.956之间,可较好地反映样品的特异性和整体性信息。确定18个色谱峰为共有峰后,指出3种活性物质。聚类分析将10批样品分为了两大类,说明10批样品化学成分相似度高。主成分分析将18个成分缩减为3个主成分,累计贡献率超过90%。通过综合计算得到S10青海省共和县塘格木镇原料3质量最佳,且聚类分析结果显示S10抗逆性最佳,与其质量最佳结果相符,可能与其土壤环境、采集时间等因素有关。综上,采用高效液相色谱法建立的萌芽黑青稞喷干粉指纹图谱,结合指标成分测定、聚类分析和主成分分析,可为萌芽黑青稞喷干粉及其相关产品的质量标准的建立提供试验依据,也为萌芽黑青稞产品开发及资源利用提供参考。

参 考 文 献

- [1] HUI Z, NING Z, XIONG Z, et al. Structural characterization and rheological properties of β -D-glucan from hull-less barley (*Hordeum vulgare* L.

- var. nudum Hook. f.) [J]. *Phytochemistry*, 2018, 155:155-163.
- [2] 吕远平, 熊荣君, 贾利蓉, 等. 青稞特性及在食品中的应用[J]. *食品科学*, 2005(7): 266-270.
LÜ Y P, XIONG M J, JIA L R, et al. Characteristics of highland barley and its application in food [J]. *Food Science*, 2005(7): 266-270.
- [3] 袁福敏. 高原无公害青稞高产栽培技术[J]. *农民致富之友*, 2016(14):183.
YUAN F M. High yield cultivation techniques of highland barley[J]. *Nong Min Zhi Fu Zhi You*, 2016 (14): 183.
- [4] MANGELSEN E, KILIAN J, HARTER K, et al. Transcriptome analysis of high-temperature stress in developing barley caryopses: early stress responses and effects on storage compound biosynthesis [J]. *Molecular Plant*, 2011, 4(1): 97-115.
- [5] 梁寒峭, 李金霞, 陈建国, 等. 黑青稞营养成分的检测与分析[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(1): 180-182, 188.
LIANG H Q, LI J X, CHEN J G, et al. Detection and analysis of nutritional components in black highland barley[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(1): 180-182, 188.
- [6] 陈建国, 梁寒峭, 李金霞, 等. 囊谦黑青稞的功效成分检测与分析[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(8): 199-202.
CHEN J G, LIANG H Q, LI J X, et al. Detection and analysis of functional components in Nangqian black highland barley[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(8): 199-202.
- [7] 张一鸣, 吴跃中, 杨士花, 等. 云南黑青稞多酚的提取及纯化工艺研究[J]. *食品科技*, 2018, 43(5): 206-213.
ZHANG Y M, WU Y Z, YANG S H, et al. Extraction and purification of polyphenols from Yunnan black highland barley[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(5): 206-213.
- [8] 符琼, 周文化, 黄卫文, 等. 发芽糙米生物活性物质及生理功能研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(14): 325-333.
FU Q, ZHOU W H, HUANG W W, et al. Research progress on bioactive substances and physiological functions of germinated brown rice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(14): 325-333.
- [9] LIN S, GUO H, GONG J, et al. Phenolic profiles, β -glucan contents, and antioxidant capacities of colored Qingke (Tibetan hulless barley) cultivars[J]. *Journal of Cereal Science*, 2018, 81: 69-75.
- [10] 王波, 张文会. 3种青稞发芽过程中营养物质的变化[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(6): 26-30, 35.
WANG B, ZHANG W H. Changes of nutrients in three kinds of highland barley during germination[J]. *Food Research And Development*, 2019, 40(6): 26-30, 35.
- [11] CHO D H, LIM S T. Germinated brown rice and its bio-functional compounds[J]. *Food Chem*, 2016, 196: 259-271.
- [12] 林津, 洛桑仁青, 周陶鸿, 等. 西藏山南隆子县黑青稞与白青稞的营养成分及生理活性物质的比较分析[J]. *食品科技*, 2016, 41(10): 88-92.
LIN J, LUO S R Q, ZHOU T H, et al. Comparative analysis of nutritional components and physiological active substances between black and white highland barley in Longzi County, Shannan, Tibet [J]. *Food Science and Technology*, 2016, 41(10): 88-92.
- [13] 臧慧, 陈和, 陈健, 等. 黑大麦的营养价值及其开发利用前景[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(3): 13-14.
ZANG H, CHEN H, CHEN J, et al. Nutritional value of black barley and its development and Utilization Prospect [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 40(3): 13-14.
- [14] 包雪梅, 谢惠春. 青稞主要成分及其应用的研究进展[J]. *粮食流通技术*, 2019(2): 43-47.
BAO X M, XIE H C. Research progress on main components and application of highland barley [J]. *Grain Distribution Technology*, 2019(2): 43-47.
- [15] 林伟静, 吴广枫, 王强, 等. 燕麦及其制品 β -葡聚糖含量测定方法比较[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(6): 417-420.
LIN W J, WU G F, WANG Q, et al. Oats and their products β -Comparison of determination methods of dextran[J]. *Science And Technology of Food Industry*, 2011, 32(6): 417-420.
- [16] 杨晶晶, 曲媛, 崔秀明. γ -氨基丁酸的制备方法与含量测定研究进展[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 351-356.
YANG J J, QU Y, CUI X M. Research progress on preparation methods and content determination of

- γ -aminobutyric acid[J]. Science And Technology of Food Industry, 2014, 35(3): 351-356.
- [17] 张国强, 李运, 鲁艳梅, 等. 雪松松针 HPLC 特征图谱及 6 个成分的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(3): 525-532.
- ZHANG G Q, LI Y, LU Y M, et al. HPLC characteristic chromatogram and content determination of six components of Cedrus deodara needles[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2021, 41(3): 525-532.
- [18] 陈海龙, 陈静, 翟丹云, 等. HPLC 测定不同溶剂提取蓝莓花青素中 C3G 含量[J]. 食品工业, 2019, 40(8): 285-288.
- CHEN H L, CHEN J, ZHAI D Y, et al. Determination of C3G in blueberry anthocyanins extracted by different solvents by HPLC[J]. The Food Industry, 2019, 40(8): 285-288.
- [19] 曹进, 饶毅, 沈群, 等. 中药指纹图谱及其建立原则[J]. 中药新药与临床药理, 2001(3): 200-203.
- CAO J, RAO Y, SHEN Q, et al. Fingerprint of traditional Chinese medicine and its establishment principle[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2001(3): 200-203.
- [20] 曹雨晴, 楚尧娟, 刘克锋, 等. 我国中药指纹图谱研究的可视化分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(9): 3073-3081.
- CAO Y Q, CHU Y J, LIU K F, et al. Visual analysis of fingerprint of traditional Chinese medicine in China [J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2020, 22(9): 3073-3081.
- [21] DAOU C, ZHANG H. Oat beta-glucan: Its role in health promotion and prevention of diseases[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2012, 11(4): 355-365.
- [22] 陈琼. 酵母 β -葡聚糖加锌复合配方对免疫抑制幼龄小鼠的免疫调节作用[J]. 食品工业科技, 2021(8): 313-319.
- CHEN Q. Yeast β -glucan Immunomodulatory effect of dextran and zinc compound formula on immunosuppressive young mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021(8): 313-319.
- [23] 张维, 任锦丽, 杨娇, 等. 燕麦 β -葡聚糖对糖尿病大鼠肾功能及其肠道菌群的影响[J]. 中国食物与营养, 2020, 26(3): 52-56.
- ZHANG W, REN J L, YANG J, et al. Oats β -glucan effects of dextran on renal function and intestinal flora in diabetic rats[J]. Food and Nutrition in China, 2020, 26(3): 52-56.
- [24] LIN S, GUO H, GONG J, et al. Phenolic profiles, β -glucan contents, and antioxidant capacities of colored Qingke (Tibetan hulless barley) cultivars[J]. Journal of Cereal Science, 2018, 81: 69-75.
- [25] 阚建全, 洪晴悦. 青稞生物活性成分及其生理功能研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(6): 11-20.
- KAN J Q, HONG Q Y. Research progress on bioactive components and physiological functions of highland barley [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(6): 11-20.
- [26] 王梦倩, 孙颖, 邵丹青, 等. 青稞的营养价值和功效作用研究现状[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(23): 206-211.
- WANG M Q, SUN Y, SHAO D Q, et al. Research status of nutritional value and efficacy of highland barley[J]. Food Research and Development, 2020, 41(23): 206-211.
- [27] 张欣, 高增平. 阿魏酸的研究进展[J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 138-147.
- ZHANG X, GAO Z P. Research progress of ferulic acid[J]. Modern Chinese Medicine, 2020, 22(1): 138-147.
- [28] NAOWABOOT J, PIYABHAN P, MUNKONG N, et al. Ferulic acid improves lipid and glucose homeostasis in high - fat diet - induced obese mice[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2016, 43(2): 242-250.
- [29] 晏娜, 徐宇琦, 汤湛, 等. 阿魏酸体内外微透析回收率及其乳剂的经皮皮肤药动学研究[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(2): 115-121.
- YAN N, XU Y Q, TANG Z, et al. *In vitro* and *in vivo* microdialysis recovery of ferulic acid and transdermal pharmacokinetics of ferulic acid emulsion[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2021, 56(2): 115-121.
- [30] MANEERAT M, RUJIRA D. Determination of γ -aminobutyric acid (GABA) in rambutan fruit cv. rongrian by HPLC-ELSD and separation of GABA from rambutan fruit using dowex 50W-X8 column[J]. Journal of Chromatographic Science, 2015, 54(3): 445-452.
- [31] MIHALIK B, PÁLVÖLGYI A, BOGÁR F, et al.

- Loop-F of the α -subunit determines the pharmacologic profile of novel competitive inhibitors of GABAA receptors[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 798: 129.
- [32] 江波. GABA (γ -氨基丁酸)——一种新型的功能食品因子[J]. *中国食品学报*, 2008, 8(2): 1-4.
- JIANG B. GABA (γ -aminobutyric acid) - a new functional food factor[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2008, 8(2): 1-4.
- [33] HONG K B, PARK Y, SUH H J. Sleep-promoting effects of a GABA/5-HTP mixture: Behavioral changes and neuromodulation in an invertebrate model[J]. *Life Sciences*, 2016, 150: 42-49.
- [34] DIANA M, QUÍLEZ J, RAFECAS M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: A review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 10: 407-420.
- [35] 焦龙, 李玉伟. 蓝莓果实中花青素提取方法的研究进展[J]. *北京农业*, 2011, 3: 10-11.
- JIAO L, LI Y W. Progress of blueberry anthocyanin extraction methods[J]. *Beijing Agriculture*, 2011, 3: 10-11.
- [36] 马越, 张超, 王丹, 等. 花青素饮料缓解人体视疲劳作用研究[J]. *食品科技*, 2015, 40(2): 104-107.
- MA Y, ZHANG C, WANG D, et al. Clinical results of anthocyanin soft drink on asthenopia relief [J]. *Food Science and Technology*, 2015, 40(2): 104-107.
- [37] 卓毓光, 刘儒华, 古福生, 等. 花青素稳定性影响因素与应用研究进展[J]. *广东化工*, 2018, 45(24): 70-72.
- ZHUO Y G, LIU R H, GU F S, et al. The factors influencing anthocyanins stability and progress on application research[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2018, 45(24): 70-72.

Determination of Main Components in Sprouting Black Highland Barley and Establishment of Its HPLC Fingerprint

Bi Jiquan, Wang Xitong, Chen Linwei, Ge Shanchun, Chen Rui, Chen Zhipeng*
(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023)

Abstract Objective: to determine the content of main components in germinating black highland barley from different areas and establish the corresponding fingerprint, so as to provide the basis for the formulation of quality standard of germinating black highland barley. Methods: the contents of GABA, ferulic acid and anthocyanin in germinating black highland barley powder were determined by HPLC; the contents of β -glucan were determined by UV spectrophotometry; the fingerprint similarity software and SPSS software were used for data analysis to establish the fingerprint common mode of germinating black highland barley, and the quality of 10 batches of samples was evaluated. Results: the contents of β -glucan, γ -aminobutyric acid, ferulic acid and anthocyanin in different batches of germinated highland barley powder were $(68.35 \pm 0.03) - (73.82 \pm 0.02)$ mg/g, $(6.56 \pm 0.05) - (7.31 \pm 0.03)$ mg/g, $(0.15 \pm 0.03) - (0.23 \pm 0.01)$ mg/g and $(0.86 \pm 0.05) - (1.53 \pm 0.03)$ mg/g, respectively. A total of 18 common peaks were demarcated in the HPLC fingerprint of budding black highland barley, and three active substances were identified. The fingerprint common mode of budding black highland barley was established, and the similarity value was above 0.902. The cluster analysis results divided 10 batches of budding black highland barley into two major categories, three main factors were selected by principal component analysis, and 10 batches of samples were comprehensively scored. Conclusion: the HPLC and UV methods established in this paper have good repeatability and stability, and the fingerprint can provide reference for the quality evaluation of different sprouting highland barley.

Keywords sprouting black highland barley; γ -aminobutyric acid(GABA); β -glucan; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis