

葛根药材中化学成分 HPLC 指纹图谱研究

黄芳¹ 祝婧云² 梁新丽³

(1 张家港市中医医院, 苏州, 215600; 2 南昌大学第四附属医院, 南昌, 330004; 3 江西中医药大学, 南昌, 330004)

摘要 目的:探索研究建立葛根高效液相指纹图谱的方法与条件,以更好地控制葛根质量。方法:Agilent1260 高效液相色谱仪;kromasil 100-5C₁₈(4.6 mm×250 mm,E63848,25 cm)色谱柱;流动相:A-乙腈;B-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱,流速为1 mL/min,柱温为30℃,检测波长为250 nm,探索研究了葛根药材以及提取物指纹图谱。结果:运用梯度洗脱法得到的色谱图各色谱峰分离较好,达到指纹图谱要求,初步建立了葛根的指纹图谱。结论:HPLC 指纹图谱法使用方法不同,所得到的图谱结果也会有所不同,可根据最后所得到的理想指纹图谱来断定高效液相的最佳使用条件方法。

关键词 葛根药材;HPLC;质量

Study on HPLC Fingerprint Analysis on Chemical Composition of Radix Puerariae

Huang Fang¹, Zhu Jingyun², Liang Xinli³

(1 Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhangjiagang, Zhangjiagang 215600, China; 2 The fourth Affiliated Hospital of Nanchang university, Nanchang 330004, China; 3 Key Laboratory of Modern Preparation of TCM of Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

Abstract Objective: To study the method and condition for HPLC fingerprinting of Radix Puerariae, in order to better control the quality of herbal medicine. **Methods:** Agilent 1260 by high performance liquid chromatograph was applied and kromasil 100-5C₁₈ (4.6 mm×250 mm, E63848, 25 cm) chromatographic column was established. The mobile phase was A-acetonitrile and B-0.1% phosphoric acid aqueous solution with gradient elution and velocity was set as 1 mL/min with the column temperature for 30℃. The detection wavelength was 250 nm to explore and study Radix Puerariae extracts of medicinal herbs as well as fingerprints. **Results:** Separation in each chromatographic peak of obtained chromatogram by the above method was great, meeting the requirements to fingerprints. The fingerprint for Radix Puerariae was preliminary established. **Conclusion:** As different HPLC fingerprint methods are applied, the map results will vary. The optimal use and ideal conditions of high performance liquid chromatography method can be summarized based on the result of the best fingerprints.

Key Words Radix Puerariae; HPLC; Quality

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.12.069

葛根(Luerariae Lobatae Radix)为豆科植物野葛(*Pueraria lobata* Willd Ohwi)的干燥根,主产于湖南、河南、广东、浙江等地,秋冬季采挖,趁鲜切成厚片或小块,干燥^[1]。其被收载于《中华人民共和国药典》各版。葛根性凉,味甘、辛,解肌退热,生津止渴,透疹,升阳止泻,通经活络,解酒毒^[1]。各版的药典中规定葛根中的葛根素为该药材质量控制的重要成分,但是鉴于针对中药材或中成药的真正质量和疗效并不能因为某一个有效成分而得到完全保证,故而,目前使用指纹图谱技术已然成为能够被国际公认的控制中药和天然药物质量的最有效的手段^[2-7]。结合各版药典中葛根素为其控制的有效成分以及指纹图谱在中药和天然药物质量控制中的作用和地位来开展中药材葛根中化学成分的指纹图谱方法研

究。目前,文献报道的有关葛根药材指纹图谱的研究中,大多葛根素成分与其他成分很难分开^[8-9]。作者参考相关文献^[10-12],通过实验考察不同洗脱条件下的指纹图谱中各成分的分离情况,来建立中药材葛根高效液相指纹图谱,以作为评价和控制中药葛根原药材内在质量的标准。

1 材料与方法

1.1 实验仪器 色谱仪器为 Agilent 1260 高效液相色谱仪(自动进样器),DAD 检测器;SHB-III 循环式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 药物及试剂 葛根素对照品(中国药品生物制品检测所,批号为 101765-200408),乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。用于指纹图谱的 10 批药材葛根饮片购自精华制药亳州康普有限

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(编号:81303237)——白芷促进 P-gp 介导活性成分吸收的物质基础及机理研究

作者简介:黄芳(1977.11—),女,本科,主管中药师,研究方向:药剂学研究工作,E-mail:huangfang@126.com

通信作者:祝婧云(1986.11—),女,硕士,主管中药师,研究方向:药剂学研究工作,E-mail:paln7@163.com

公司(产地安徽霍山县葛根基地)。10 样品批号见表 1。

表 1 样品批号

| 编号 | 批号 |
|----|----------|
| A | 20141104 |
| B | 20141108 |
| C | 20141201 |
| D | 20141022 |
| E | 20141123 |
| F | 20141205 |
| G | 20141125 |
| H | 20141207 |
| I | 20141212 |
| J | 20141025 |

1.3 研究方法

1.3.1 梯度条件的优化 色谱柱为 kromasil 100-5C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 25 cm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水, 梯度洗脱; 考察乙腈起始浓度、终点浓度及梯度洗脱时间。流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 250 nm; 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL^[13]。梯度洗脱考察见表 2。色谱图见图 1 ~ 图 4。结果表明 0 ~ 40 min, 乙腈浓度由 10% ~ 30% 梯度洗脱, 葛根提取液各色谱峰均能够得到较好的分离, 即表 2 中方法 4。

1.3.2 对照品配制 精密称取葛根素对照品适量, 用甲醇稀释成每 1 mL 含 100 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

1.3.3 供试品溶液的制备 取各批葛根饮片 50 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加加 10 倍量双蒸水加热回流提取 3 h, 共提取 3 次, 合并 3 次提取液, 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

表 2 梯度洗脱条件考察

| 方法 | 时间 | 乙腈 (%) | 0.1% 磷酸水 (%) |
|------|----|--------|--------------|
| 方法 1 | 0 | 20 | 80 |
| | 50 | 55 | 45 |
| 方法 2 | 0 | 20 | 80 |
| | 60 | 60 | 40 |
| 方法 3 | 0 | 10 | 90 |
| | 60 | 60 | 40 |
| 方法 4 | 0 | 10 | 90 |
| | 40 | 30 | 70 |

1.3.4 指纹图谱的建立

1.3.4.1 测定方法 分别精密量取葛根素对照品溶液和各供试品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 按 0 ~ 40 min, 乙腈浓度由 10% ~ 30%, 0.1% 磷酸水由 90% ~ 70% 梯度洗脱, 记录 40 min 色谱图即得。对

照品色谱图见图 5, 供试品色谱图见图 4。以葛根素的色谱峰(s)的保留时间和峰面积为 1, 计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积比值。

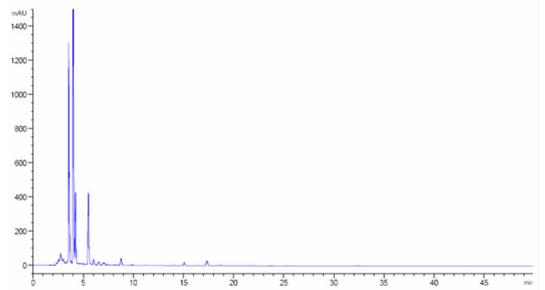


图 1 方法 1 葛根指纹图谱

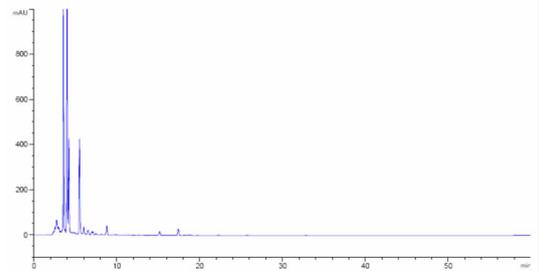


图 2 方法 2 葛根指纹图谱

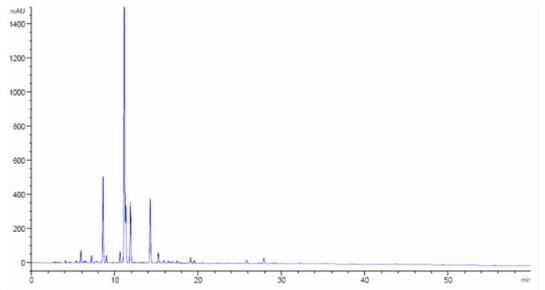


图 3 方法 3 葛根指纹图谱

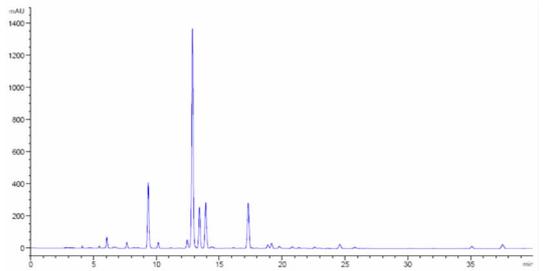


图 4 方法 4 葛根指纹图谱

1.3.4.2 精密度试验 以葛根药材 A (批号 20141104) 为供试品, 精密吸取供试品溶液, 连续进样 6 次, 测得共有峰 11 个, 各共有峰相对峰面积的 RSD 均 < 5%, 结果表明精密度良好。

1.3.4.3 重复性试验 取 A 号样品 6 份, 精密称定, 制备供试品溶液, 分别进样, 测得各共有峰相对峰面积的 RSD 均 < 5%, 结果表明其重复性较好。

1.3.4.4 稳定性试验 取 A 号葛根供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12 进样, 测得共有峰相对峰面积的 RSD 均 < 5%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

表3 10批样品共有指纹峰相对保留时间

| 编号 | 共有峰相对保留时间 | | | | | | | | | | |
|-----|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5(s) | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| A | 0.47 | 0.59 | 0.73 | 0.79 | 1 | 1.04 | 1.08 | 1.35 | 1.91 | 2.73 | 2.92 |
| B | 0.45 | 0.61 | 0.72 | 0.76 | 1 | 1.05 | 1.09 | 1.37 | 1.92 | 2.74 | 2.94 |
| C | 0.47 | 0.59 | 0.72 | 0.81 | 1 | 1.05 | 1.08 | 1.35 | 1.92 | 2.75 | 2.92 |
| D | 0.47 | 0.62 | 0.73 | 0.79 | 1 | 1.04 | 1.08 | 1.35 | 1.91 | 2.73 | 2.96 |
| E | 0.46 | 0.58 | 0.71 | 0.79 | 1 | 1.04 | 1.10 | 1.36 | 1.91 | 2.73 | 2.92 |
| F | 0.46 | 0.59 | 0.71 | 0.80 | 1 | 1.06 | 1.11 | 1.37 | 1.93 | 2.72 | 2.92 |
| G | 0.48 | 0.61 | 0.74 | 0.79 | 1 | 1.03 | 1.08 | 1.35 | 1.90 | 2.71 | 2.91 |
| H | 0.50 | 0.62 | 0.74 | 0.78 | 1 | 1.04 | 1.08 | 1.37 | 1.91 | 2.73 | 2.92 |
| I | 0.47 | 0.59 | 0.73 | 0.79 | 1 | 1.05 | 1.08 | 1.35 | 1.91 | 2.73 | 2.93 |
| J | 0.48 | 0.58 | 0.73 | 0.79 | 1 | 1.04 | 1.07 | 1.33 | 1.95 | 2.72 | 2.92 |
| 平均值 | 0.47 | 0.60 | 0.73 | 0.79 | 1 | 1.04 | 1.09 | 1.36 | 1.92 | 2.73 | 2.93 |
| RSD | 2.76 | 2.46 | 1.40 | 1.55 | 0 | 0.77 | 1.03 | 0.89 | 0.70 | 0.38 | 0.46 |

表4 10批样品共有指纹峰相对峰面积

| 编号 | 共有峰相对保留时间 | | | | | | | | | | |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5(s) | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| A | 0.039 | 0.023 | 0.278 | 0.025 | 1 | 0.178 | 0.213 | 0.242 | 0.026 | 0.017 | 0.029 |
| B | 0.035 | 0.025 | 0.282 | 0.026 | 1 | 0.175 | 0.209 | 0.237 | 0.022 | 0.014 | 0.028 |
| C | 0.042 | 0.024 | 0.271 | 0.022 | 1 | 0.173 | 0.218 | 0.235 | 0.027 | 0.015 | 0.027 |
| D | 0.040 | 0.024 | 0.268 | 0.029 | 1 | 0.174 | 0.208 | 0.252 | 0.021 | 0.013 | 0.028 |
| E | 0.037 | 0.021 | 0.265 | 0.028 | 1 | 0.184 | 0.210 | 0.236 | 0.020 | 0.014 | 0.025 |
| F | 0.039 | 0.026 | 0.276 | 0.026 | 1 | 0.166 | 0.211 | 0.237 | 0.029 | 0.014 | 0.029 |
| G | 0.035 | 0.027 | 0.272 | 0.023 | 1 | 0.173 | 0.218 | 0.243 | 0.027 | 0.017 | 0.027 |
| H | 0.040 | 0.024 | 0.275 | 0.022 | 1 | 0.178 | 0.228 | 0.237 | 0.025 | 0.017 | 0.026 |
| I | 0.036 | 0.027 | 0.268 | 0.027 | 1 | 0.165 | 0.211 | 0.245 | 0.024 | 0.014 | 0.028 |
| J | 0.037 | 0.022 | 0.274 | 0.027 | 1 | 0.178 | 0.217 | 0.243 | 0.025 | 0.016 | 0.028 |
| 平均值 | 0.038 | 0.024 | 0.273 | 0.026 | 1.000 | 0.174 | 0.214 | 0.241 | 0.025 | 0.015 | 0.028 |
| RSD | 5.88 | 7.82 | 1.79 | 9.15 | 0.00 | 3.11 | 2.69 | 2.09 | 11.09 | 9.57 | 4.38 |

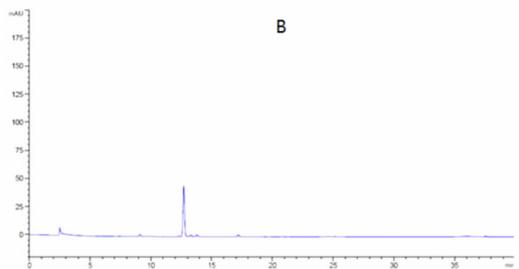
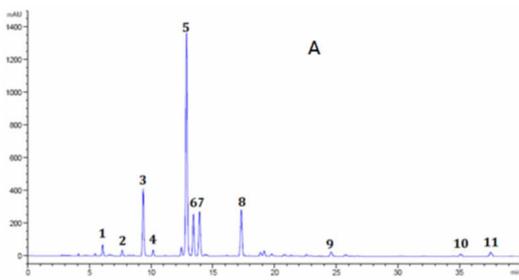


图5 A 葛根 HPLC 指纹图谱 B 葛根素对照品

表5 10批样品共有指纹峰峰面积

| 样品 | 共有峰总面积 | 总峰面积 | 共有峰总面积百分比(%) |
|-----|---------|---------|--------------|
| A | 24764.6 | 26342.5 | 94.01 |
| B | 25763.8 | 28706.2 | 89.75 |
| C | 30165.5 | 31706.4 | 95.14 |
| D | 24573.1 | 26080.6 | 94.22 |
| E | 18756.2 | 20798.6 | 90.18 |
| F | 20145.6 | 21603.9 | 93.25 |
| G | 23555.2 | 25018.8 | 94.15 |
| H | 27561.2 | 29317.3 | 94.01 |
| I | 22014.5 | 23889.9 | 92.15 |
| J | 28740.5 | 31283.9 | 91.87 |
| 平均值 | 24604.0 | 26474.8 | 92.87 |
| RSD | 14.08 | 13.54 | 1.86 |

2.2 共有指纹峰面积比 共有峰的峰面积、相对保留时间、相对峰面积:5号峰为葛根素,是葛根中的主要有效成分,其峰面积占总峰面积的48.3%,比较稳定,因此,可以以其作为参照峰。共有峰相对保留时间和峰面积见表3、表4、表5。由表3、表4可知10批样品间各共有峰相对保留时间 $RSD < 5\%$, 相对峰面积峰1、2、4、9、10 $RSD > 5\%$ 。表5结果表

2 指纹图谱分析与评价

2.1 共有指纹峰的标定 根据10批供试品溶液HPLC色谱提供的相关参数,比较各批样品的色谱图,其中共有峰11个(图5)。其中5号峰为葛根素的色谱峰。

明,共有峰总面积上总峰面积的平均百分数为 92.87%,RSD 为 1.86%,符合批纹图谱的有关规定。

3 讨论

本实验采用的是乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱法,能够使葛根中的大部分黄酮类化合物(即中药材葛根的主要有效成分)得到较好的分离^[14],因此得到了较完整的 HPLC 色谱图。本实验方法精密度和重现性都很好,因此可以用来研究葛根化学成分 HPLC 指纹图谱法出峰时间以及出峰质量,可以更好地鉴别野葛的各种品种的真伪和各种不同产地,不同类别葛根药材的内在质量的优劣。

从指纹图谱看,方法 1 和方法 2 出峰时间快,但色谱图中很多峰未能较好的分离。方法 3 出峰时间也较短,出峰质量较之方法 1 和方法 2 有了提高,但方法 3 中葛根素峰与其他峰未较好的分离。方法 4 出峰质量最好,很清晰,能够将各个峰很好地分离,对于葛根质量的控制有很大的保证。

本实验探讨研究应用不同的方法,来获得中药材的指纹图谱,探究了更加简便、更加可靠,可以用于大力推广的正确方法。为以后的实际运用提供切实可靠易行的参考方法。

参考文献

[1]康廷国. 中药鉴定学[M]. 9 版. 北京:中国中医药出版社,2014,4

(3):113,115.

[2]郭方遒. 基于化学计量学的指纹图谱技术及其用于复杂分析体系的表征和分析[D]. 长沙:中南大学,2004.

[3]李守信,展金祥,刘武占,等. 基于指纹图谱的金银花物质组纯化工工艺研究[J]. 中草药,2015,46(1):55-60.

[4]钟可,王文全,靳风云,等. 知母的 HPLC-ELSD 指纹图谱研究[J]. 中草药,2016,47(15):2747-2750.

[5]李强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药,2013,44(22):3095-3104.

[6]祝明,陈碧莲,石上海. 中药指纹图谱技术在中国药典 2015 年版一部中的应用[J]. 中国现代应用药学,2016,33(5):611-614.

[7]陈林伟,秦昆明,徐雪松,等. 中药指纹图谱数据库的研究现状及展望[J]. 中草药,2014,45(21):3041-3047.

[8]曹瑞敏. 中药指纹图谱及其在中药质量控制中的应用[J]. 中国药房,2004,15(10):635-636.

[9]张信青,蒋孟良,崔淑芬,等. 浅谈指纹图谱在中药饮片质量控制中应用的可行性[J]. 中医药导报,2005,11(3):55-58.

[10]方起程,林茂,孙庆民,等. 葛根黄酮的研究[J]. 中华医学杂志,1974(5):271.

[11]王春兰,陈建民. 梯度反相 HPLC 法测定葛根中 5 种异黄酮含量[J]. 药物分析杂志,1995,15(supple):292.

[12]苗明三. 现代实用中药质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:172.

[13]陈士林,陈四保,杨大坚,等. 葛根高效液相指纹图谱的研究[J]. 中草药,2003,34(7):661-663.

[14]尤春雪,张振秋,李峰,等. HPLC 波长切换技术对葛根中 8 种成分的测定及指纹图谱研究[J]. 中草药,2013,44(5):616-621.

(2016-05-19 收稿 责任编辑:张文婷)

世界中联中药鉴定专业委员会召开第三届学术年会

2016 年 12 月 16 日,由世界中医药学会联合会中药鉴定专业委员会主办的世界中联中药鉴定专业委员会第三届学术年会暨中药传承与创新博士论坛在湖南中医药大学举行。国家中医药管理局司长曹洪欣、世界中医药学会联合会副秘书长徐春波、上海中医药大学校长徐建光、世界中联中药鉴定专业委

员会会长王喜军出席开幕式并致辞。中国科学院院士陈凯先和中国工程院院士刘昌孝做了主题报告。来自香港中文大学,香港浸会大学,北京大学等 27 名国际知名专家和优秀青年学者,从经典的辨识经验到系统生物技术,为中药鉴定知识的应用、技术推广提供了很多新的研究成果。