

云南产葛根 HPLC 指纹图谱研究

冷红琼¹⁾, 张 柳²⁾, 秦智彬¹⁾, 王礼燕¹⁾, 闵 颖¹⁾, 郭亚东¹⁾

(1) 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500; 2) 红河州卫生学校, 云南蒙自 661100)

[摘要] 目的 建立简单可行的葛根药材的 HPLC 指纹图谱分析方法. 方法 实验采用 watersC18 色谱柱 (4.6 mm × 25 mm, 5 μm), 以乙腈-0.4%冰醋酸水溶液为流动相进行二元梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 250 nm, 分析时间 65 min. 结果 建立 HPLC 指纹图谱共有模式, 云南葛根药材质量有较好的相似性. 结论 该方法简单、准确可靠、重复性良好, 可作为葛根药材的鉴别和质量控制的依据.

[关键词] 指纹图谱; 葛根; 高效液相色谱法

[中图分类号] R927 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 06 - 0039 - 04

Study on the HPLC Fingerprints of Radix puerariae in Yunnan Province

LENG Hong - qiong¹⁾, ZHANG Chen²⁾, QIN Zhi - bin¹⁾, WANG Li - yan¹⁾, MIN Ying¹⁾, GUO Ya - dong¹⁾

(1) School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Honghe Health School, Mengzi Yunnan 661100, China)

[Abstract] **Objective** To establish the simple and feasible analysis method of fingerprint for Radix puerariae by HPLC. **Methods** The fingerprint was investigated using waters C18 (4.6 mm 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile 0.4% glacial acetic acid and eluted in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 250 nm. **Result** The common mode of HPLC fingerprint was developed and quality of Radix puerariae in Yunnan province was similar. **Conclusion** The method is simple and accurate with good reproducibility, which can be used for indentify and quality control of Radix puerariae.

[Key words] Fingerprint; Radix puerariae; HPLC

葛根为豆科植物野葛 *Puerariae Lobata* (Wild.) Ohwi 或甘葛藤 *P.thomsonii* Benth. 的干燥根. 味甘、辛、凉, 归脾、胃经, 具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻之功效^[1]. 葛根具有多种药理作用^[2-4]. 但葛根药材外形相似, 易造成流通和利用过程中的混杂, 并且不同品种和不同产地葛根药材的有效成分含量差异显著, 从而影响用药安全和药材质量. 由于中药的药效是多种活性成分的协同综合作用, 而不是来自任何单一活性成分. 因此,

仅采用单一化学成分的定性定量已不能准确评价中药材质量. 中药指纹图谱作为一种有效的质量控制模式, 以其科学的理论依据获得国际上的一致认可^[5]. 迄今为止, 已有贵州、四川、广西等地葛根指纹图谱方面的文献报道, 但云南产葛根指纹图谱的研究未见文献报道. 为更有效地控制葛根的质量, 本实验采用高效液相色谱法对云南葛根药材的指纹图谱进行了研究, 为葛根药材的鉴别和质量控制建立有效的方法.

[基金项目] 昆明医科大学大学生创新基金资助项目 (CX201146)

[作者简介] 冷红琼 (1987~), 女, 重庆市人, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析研究工作.

[通讯作者] 郭亚东. E-mail: yadong_guo@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

9批葛根药材1~5批为新鲜葛根经干燥后用粉碎机研磨成粉,6~9批葛根药材购于云南中药材市场。其中2、4、8批为云南野生野葛,其余均为云南栽培野葛,均由昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室鉴定。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 Waters 2690型高效液相色谱仪,包括泵,自动进样器,柱温箱,waters 996 PDA检测器,色谱工作站和Millinum32软件,T6328B型万分之一电子天平(上海)。乙腈为色谱纯(TEDIA公司),试验用水为纯净水,其余试剂均为分析纯。葛根素(批号:09020922,上海同田生物技术股份有限公司),大豆苷(批号:552669,上海鼎瑞化工有限公司)。

1.2.2 色谱条件 色谱柱watersC18(4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙腈-0.4%冰醋酸水溶液为流动相,梯度洗脱(见表1),流速1.0 mL/min,柱温25℃,检测波长250 nm。

表1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution process

时间 (min)	乙腈 (%)	0.4%冰醋酸水溶液 (%)
0	10	90
10	10	90
30	15	85
35	25	75
45	30	70
55	70	30
65	90	10

1.2.3 供试品溶液的制备 分别精密称定葛根粉末约100 mg,置于25 mL量瓶中,加入50%乙醇5 mL,在常温下超声提取45 min,用50%乙醇定容,经0.45 μm微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

1.2.4 对照品溶液的制备 分别精密称取葛根素对照品1.5 mg和大豆苷对照品0.2 mg,置于10 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释成每1 mL含150 μg和20 μg的溶液,经0.45 μm微孔滤膜过滤,备用。

分别精密量取葛根素和大豆苷的对照品溶液各

1.0 mL混匀,即得葛根素和大豆苷的对照品混合溶液。

1.2.5 检测方法 取对照品溶液、葛根供试品溶液各10 μL进样分析,记录65 min的色谱图;采用Millinum32软件分析,获取谱图中各峰的保留时间和峰面积数值。

2 结果

2.1 检测方法的检验

2.1.1 精密度试验 取7#药材制备供试品溶液,在“1.2.2”项色谱条件下,分别连续进样5次,检测供试品溶液的指纹图谱。结果表明,各共有峰的保留时间RSD<1.49%,峰面积RSD<2.89%,符合指纹图谱的要求,表明仪器具有良好的精密度。

2.1.2 稳定性试验 取7#药材制备供试品溶液,分别在0、2、4、8、16、24 h检测指纹图。结果显示,各共有峰的保留时间RSD<3.61%,峰面积RSD<2.74%。因此,供试品溶液至少在24 h内稳定。

2.1.3 重现性试验 取7#药材5份,制备供试品溶液并进行检测。结果表明,各共有峰的保留时间RSD<2.90%,峰面积RSD<2.73%。表明该方法具有良好的重复性。

2.2 指纹图谱及技术参数

2.2.1 指纹图谱及共有指纹峰的标定 按照对照品和供试品溶液的制备和检测方法制备样品溶液,并对对照品(见图1)和9批次葛根药材供试品的HPLC图谱进行了检测。分析比对检测结果,总结出11个共有峰,建立葛根药材的HPLC指纹图谱共有模式图(见图2)。各峰分离效果良好,其中2号峰为葛根素,3号峰为大豆苷。以大豆苷对照品为参照,即S峰,以供试样品S峰的保留时间为1计算各共有峰相对保留时间见表2,以供试样品S峰面积为1计算各共有峰相对峰面积见表3。

2.2.2 相似度比较 为避免人工判峰的盲目性,保证共有峰确定的公正和客观。采用《中药指纹图谱相似度评价系统2004A版》软件,对9批葛根样品图谱进行相似度比较。以生成对照指纹图谱为模板,9批药材的HPLC指纹图谱叠加图见图3,9批样品与对照指纹图谱之间相似度为0.939~0.985(见表4)。

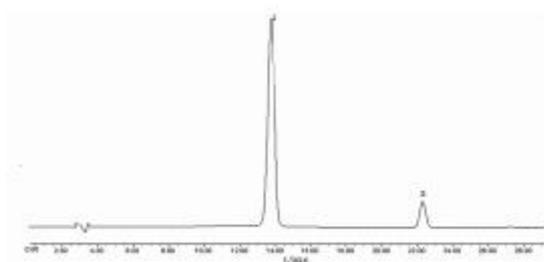


图1 对照品的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC of control

1:葛根素; 2:大豆苷.

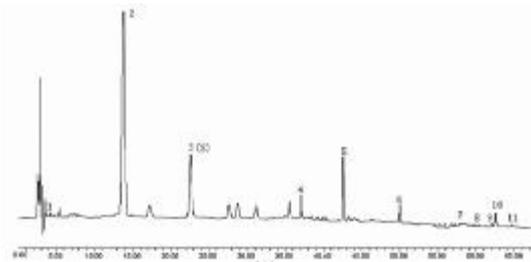


图2 11个共有峰的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC of 11 sharing peaks

表2 9批次葛根共有峰的相对保留时间

Tab. 2 The relative retention time of sharing peaks of 9 batches of Radix puerariae

峰号	样品									平均值	RSD (%)
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#		
1	0.190	0.187	0.191	0.187	0.190	0.190	0.188	0.204	0.190	0.191	2.620
2	0.607	0.607	0.606	0.600	0.596	0.594	0.610	0.593	0.592	0.601	1.16
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
4	1.678	1.649	1.672	1.698	1.696	1.711	1.642	1.715	1.683	1.683	1.49
5	1.932	1.898	1.924	1.956	1.952	1.971	1.888	1.975	1.937	1.937	1.55
6	2.265	2.226	2.261	2.302	2.294	2.314	2.215	2.316	2.275	2.274	1.58
7	2.618	2.573	2.622	2.664	2.656	2.680	2.565	2.677	2.639	2.633	1.60
8	2.716	2.668	2.719	2.763	2.755	2.779	2.660	2.776	2.736	2.730	1.61
9	2.805	2.756	2.808	2.855	2.846	2.870	2.747	2.867	2.826	2.820	1.60
10	2.828	2.778	2.831	2.877	2.868	2.893	2.770	2.890	2.849	2.843	1.58
11	2.924	2.872	2.928	2.975	2.966	2.992	2.864	2.988	2.946	2.939	1.60

表3 9批次葛根共有峰的相对峰面积

Tab. 3 The relative areas of sharing peaks of 9 batches of Radix puerariae

峰号	样品									平均值	RSD (%)
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#		
1	0.225	0.046	0.063	0.069	0.064	0.044	0.026	0.493	0.109	0.127	118.11
2	28.029	6.025	8.627	3.316	2.590	3.856	3.664	9.372	14.910	8.932	91.50
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
4	1.136	0.960	0.576	1.296	1.115	0.089	0.120	2.197	2.429	1.102	73.77
5	0.691	0.467	0.201	0.536	0.281	0.370	0.529	1.207	0.697	0.553	53.71
6	0.274	0.057	0.024	0.092	0.024	0.041	0.123	0.517	0.049	0.133	123.31
7	0.085	0.010	0.011	0.035	0.035	0.050	0.014	0.392	0.111	0.083	145.78
8	0.076	0.011	0.016	0.058	0.056	0.027	0.014	0.233	0.102	0.066	106.06
9	0.095	0.007	0.008	0.028	0.048	0.025	0.014	0.287	0.082	0.066	134.85
10	0.568	0.055	0.060	0.267	0.276	0.196	0.092	2.279	0.549	0.481	145.74
11	0.055	0.004	0.005	0.017	0.024	0.022	0.009	0.212	0.049	0.044	150.00

表 4 相似度计算结果

Fig. 4 The semblance values

编 号	相似度
S1	0.939
S2	0.963
S3	0.974
S4	0.965
S5	0.959
S6	0.981
S7	0.974
S8	0.951
S9	0.985
S	1.000

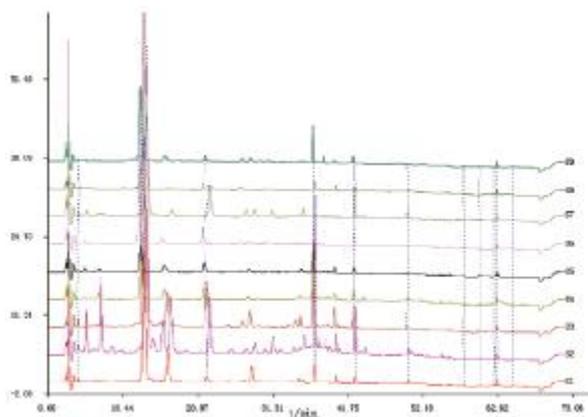


图 3 9 批次葛根样品的高效液相色谱叠加图

Fig. 3 The HPLC layout chart of 9 batches of Radix puerariae

3 讨论

本实验采用 PDA 检测器对检测波长进行了考察, 并比较了不同波长的指纹图谱, 结果在 250 nm 检测波长下, 指纹图谱中色谱峰较多, 基线平稳, 所以选择 250 nm 为检测波长。

试验过程中曾分别以多种流动相系统: (1) 甲醇-水; (2) 甲醇-0.4%冰醋酸水溶液; (3)

乙腈-水; (4) 乙腈-0.4%冰醋酸水溶液进行二元等度和梯度洗脱。其中以乙腈-0.4%冰醋酸水溶液进行二元梯度洗脱得到的 HPLC 图谱分离度较好, 峰形较好且保留时间合适。

选择供试品溶液制备方法时, 分别采用 30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇对葛根药材进行超声提取, 还比较了不同的料液比和超声时间对提取率的影响。结果以 50% 乙醇提取液, 料液比为 1:50, 超声时间为 45 min 的色谱峰数量最多、强度较大。

本实验结果表明, 指纹图谱研究、相似度分析、各共有峰特征、相对保留时间等可作为从整体上评价葛根药材的内在质量的重要参数。从相似度分析结果来看, 9 批葛根样品的指纹图谱相似度均 > 0.9, 说明云南产地葛根药材化学成分差别不大。但是, 各共有峰相对峰面积 RSD (%) 为 53.71% ~ 150.00%, 说明相对峰面积有较大的差异, 即化学成分的相对含量不同。提示云南产地的野生与栽培野葛之间内在质量存在差异性。9 批葛根药材化学成分的差异可能与葛根的生长年限有一定的关系, 但有待深入研究。本文所建立的葛根药材指纹图谱分析方法, 可有效地鉴别和评价葛根药材的真伪和质量优劣, 又可用于药材中葛根素和大豆苷的含量测定, 为云南葛根药材质量控制提供了一定的科学依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 233 - 234.
- [2] 马翔凌, 王莉. 葛根素氯化钠注射液治疗急性脑梗死的疗效观察[J]. 中国临床保健杂志, 2005, 8(4): 335 - 336.
- [3] 李桂兰. 葛根素对小儿心肌炎的作用及心功能影响[J]. 医学文选, 2005, 24(4): 487 - 489.
- [4] 李爱民. 葛根素注射液治疗高黏血症[J]. 中华现代临床医学杂志, 2005, 3(15): 1 586 - 1 589.
- [5] 刘文, 蒋世云. 中药指纹图谱研究与应用进展[J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1 820 - 1 822.

(2012 - 03 - 04 收稿)