

川产葛根药材的 HPLC 指纹图谱

陈玉¹, 郑萍²

(1. 四川大学华西医院, 四川 成都 610041; 2. 成都市食品药品检验所, 四川 成都 610044)

摘要: 目的 研究葛根药材水溶性部位的指纹图谱。方法 用 HPLC-DAD 法, 分别考察了不同因素对药材水溶性成分提取效果的影响; 优化流动相洗脱方式及色谱柱, 并进行方法学考察。结果 测定了 10 批药材, 相似度大于 0.9。结论 所建方法有助于制定葛根药材的标准指纹图谱, 为药材与注射液相关性研究奠定了基础。

关键词: 指纹图谱; 葛根; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006-0103(2008)02-0217-02

Fingerprint chromatograms of *Pueraria lobata* (Willd.) by HPLC

CHEN Yu¹, ZHENG Ping²

(1. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610044, China)

Abstract **OBJECTIVE** To establish the fingerprint chromatograms analysis and identification of water-soluble part of *Pueraria lobata* (Willd.). **METHODS** The method of HPLC-DAD was established for the fingerprint chromatograms analysis. The extraction method including extraction time, solvent and granularity of *Pueraria lobata* (Willd.) was investigated. **RESULTS** Calculation results indicated that the value of resemblance was more than 0.9. **CONCLUSION** The established method is useful for the quality control of *Pueraria lobata* (Willd.) and further development of Geger injection.

Key words Fingerprint chromatograms; Geger; HPLC

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2008)02-0217-02

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 具有解肌退热、生津、升阳止泻等功效。葛根含黄豆苷、黄豆苷元、葛根素等多种黄酮类成分及胡萝卜苷、尿囊素等非黄酮类成分, 主要为极性成分。葛根药材有野葛和粉葛两个品种, 前者的葛根素含量远高于后者, 我们仅研究野葛。文献均以 HPLC 法测定葛根中的葛根素^[1-4]。而我们考察了葛根水溶性成分的提取方案, 并用 HPLC 法建立了标准指纹图谱。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1100 高效液相色谱仪包括 Chemstation system 化学工作站 (美国安捷伦公司)。葛根药材 (四川彭州市) 经鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 采收期 2001 年 3~5 月, 除去泥沙, 干燥, 粉碎, 过三号筛; 葛根素对照品 (中国药品生物制品检定所); 甲醇为色谱纯; 醋酸为分析纯; 水为双重蒸馏水。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 保护柱为 HP HPLC sample clean-up and guard column (20 mm × 4.0 mm, 30 μm);

分析柱为 KR100-5 C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温 30°C; 检测波长 268 nm; 分析时间 60 min; 流速 1.0 mL min⁻¹; 进样量 10 μL, 满环进样; 流动相 A 为甲醇, B 为 1% 醋酸; 线性梯度洗脱程序为: 0~5 min 流动相为 B, 5~60 min 流动相为 A-B (6:4)。

1.2.2 溶液的制备及图谱 精密称取 0.1 g 样品粉末, 置锥形瓶中, 加入 50 mL 30% 乙醇, 称定重量, 加热回流 30 min, 放冷, 密塞, 再称定重量, 用 30% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液得样品溶液。精密称取 2.0 g 样品粉末, 置锥形瓶中, 加入 25 mL 蒸馏水, 称定重量, 加热回流 3 h, 放冷, 密塞, 再称定重量, 用蒸馏水补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液得参照物溶液。另取适量葛根素对照品, 精密称定, 用 10% 乙醇溶解并定容, 制成 0.028 mg mL⁻¹ 的葛根素对照品溶液。分别取 10 批次的药材粉末各 2.0 g 放入同一容器中, 充分搅拌、混匀, 取 2.0 g 混合药材粉末, 精密称定, 置磨口圆底烧瓶中, 分别精密加入 25 mL 蒸馏水, 称定重量, 加热回流 3 h, 放冷, 密塞, 再称定重量, 用蒸馏水补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得对照用提取物溶液。3 种溶液的指纹图谱见图 1。

作者简介: 陈玉, 女, 主管药师, 从事药物和临床药物分析工作。

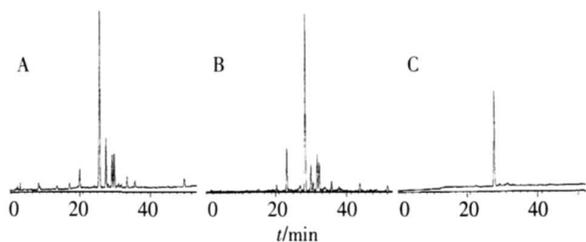


图 1 样品 (A)、参照物 (B)、对照品 (C) 溶液的指纹图谱

Fig 1 Fingerprint chromatograms of sample solution (A), gengen's form ononetin constituents solution (B) and puerarin solution (C)

1.2.3 计算方法 采用全谱峰面积作为相似度计算的测量参数。根据峰匹配的结果,以峰面积为参数,计算待测指纹图谱与标准指纹图谱的整体相似度。软件采用夹角余弦法计算相似度。样品指纹图谱(待测指纹图谱)与随行对照用提取物指纹图谱(标准指纹图谱)、经模拟相似度计算软件计算,相似度大于 0.9 符合要求。

1.2.4 稳定性试验 取同一样品溶液,分别在不同时间点进行检测,以特征指纹图谱相对峰面积和相对保留时间为指标,考察样品的稳定性。其共有峰的相对保留时间 $RSD = 5.38\%$,共有峰相对峰面积的 $RSD = 20.38\%$ 。

1.2.5 精密性试验 取同一样品溶液,连续进样 5 次,共有峰相对保留时间的 $RSD = 1.78\%$,共有峰相对峰面积的 $RSD = 11.48\%$ 。

1.2.6 重复性试验 取 5 份同一批号样品,分别处理测定,其共有峰相对保留时间的 $RSD = 2.38\%$,共有峰相对峰面积的 $RSD = 15.11\%$ 。

2 讨论

通过比较四川、安徽、河北、贵州所产葛根的指纹图谱,结果表明,各地产的葛根有共有峰,但其相对峰面积值有一定差异。为保证方法的准确性,特进行了单因素变量考察。实验药材固定产地为四川彭州市。

曾用 95% 乙醇、70% 乙醇、蒸馏水、甲醇加热回流 60 min 提取 HPLC 指纹图进行比较,蒸馏水提取的效果较好。取样品粉末(过三号筛)4 份,各 4.0 g 精密称定,置锥形瓶中,分别精密加入 20、30、40、60 ml 蒸馏水,称定重量,加热回流 3 h,放冷,密塞,

再称定重量,用蒸馏水补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液。测定 HPLC 指纹图谱的比较,以 20 ml 蒸馏水为溶剂提取的效果较好。

曾用超声提取 0.5、1 h 和加热回流提取 3、4、5 h 进行比较。结果表明,加热回流 3 h 的提取效果较好。

葛根的化学成分有黄酮类化合物、三萜类、香豆素类等。黄酮类化合物的含量达 12%,其主要有效成分为葛根素等异黄酮类化合物。葛根素色谱峰较高,且无干扰,故选葛根素为参照物,即以共有指纹峰中葛根素峰为 S 峰,以 S 峰面积作为 1,计算其他各共有指纹峰面积的比值。以葛根药材随行对照用提取物作为葛根药材指纹图谱的质量控制。

采用二极管阵列检测器优化选择测定波长,可对 HPLC 指纹图谱中各峰给出在线紫外图谱,并以选择出峰较多、各共有峰响应尽可能相当的原则,选定葛根药材的指纹图谱测定波长为 268 nm。

中药材中含有大量的未知成分,等度洗脱达不到较好分离,故采用线性梯度洗脱进行色谱分离,所得指纹图谱基线平稳、分离度好。曾比较了甲醇-水、甲醇-1.5% 甲酸溶液、甲醇-1.5% 醋酸溶液的分析流动相,结果甲醇-1.5% 醋酸溶液分离所得的指纹图谱基线平稳,分离度好。

将指纹图谱的记录时间定为 1 h。葛根药材共有 33 个指纹峰;借助“中药指纹图谱计算机辅助相似度评价软件”计算,10 批供试品指纹样品的指纹图谱相似度计算结果大于 0.9。

致谢:浙江大学计算机辅助中药分析实验室范晓辉老师在实验中提供帮助

参考文献:

- [1] 陈斌,刘训红,蔡宝昌. 葛根高效液相色谱指纹图谱的研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(5): 384-385
- [2] 朱丽华,贺浪冲. 葛根中有效部位及有效成分的高效液相色谱分析 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2005, 26(3): 216-219
- [3] 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
- [4] 马家骅,杨明,曹世栋,等. 葛根素的提取和含量测定 [J]. 华西药 学 杂 志, 2006, 21(2): 206-207

收稿日期: 2007-10