

不同产地葛根药材的质量分析

裴莉昕, 陈随清*, 纪宝玉, 董诚明, 冯卫生
(河南中医学院 药学院, 河南 郑州 450008)

[摘要] 目的: 对不同产地葛根化学成分和醇溶性浸出物的含量进行测定, 为制定葛根药材质量标准提供参考依据。方法: 用高效液相法测定葛根中葛根素、大豆苷、大豆苷元的含量; 及紫外分光光度法测定总黄酮含量。结果: 不同产地葛根中葛根素、大豆苷、大豆苷元、总黄酮这 4 类成分和醇溶性浸出物的含量有较大差别。结论: 该研究结果可作为制订葛根质量标准的参考依据。

[关键词] 葛根; 化学成分; 总黄酮; 醇溶性浸出物

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)10-0024-03

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根。主产于河南、湖南、浙江、四川等地。有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻之功效^[1]。葛根的主要活性成分是葛根素、大豆苷、大豆苷元等多种异黄酮类物质。并含有多糖及多种微量元素^[2]。葛根为一个广布药材, 产地较多, 质量参差不齐, 为了更好地控制药材质量, 本实验采用药典及自行建立的方法对全国野葛药材主产区的葛根药材中葛根素、大豆苷、大豆苷元、总黄酮和醇溶性浸出物进行了含量测定, 可作为制订葛根药材质量控制标准的参考依据, 现报道如下。

1 仪器、试剂及样品

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪 (SPD-20A 型紫外检测器, CTO-10AS vp 型柱温箱, CBM-102 型工作站); 色谱柱 Phenomenex C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); HP-01 型无油真空泵; Agilent 8455 型紫外-可见分光光度计; 电子天平 (BS2242S, 北京赛多利斯仪器系统有限公司); 葛根素对照品 (110752-200511, 中国药品生物制品检定所); 大豆苷对照品 (07030613, 中国深圳同田生物技术有限公司); 大豆苷元对照品 (07030614, 中国深圳同田生物技术有限公司); 甲醇为色谱醇; 水为双蒸水; 乙醇为分析醇。

药材为 2007 年采自河南、湖南、浙江等 12 个产区的葛根药材, 经河南中医学院陈随清教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 葛根素的含量测定 按照《中国药典》方法测定^[1], 结果见图 1。

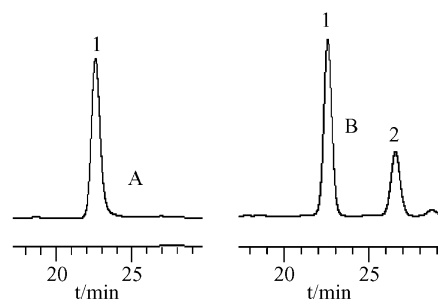


图 1 葛根素 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品; 1. 葛根素

2.2 大豆苷、大豆苷元的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇 (A) - 水 (B), 梯度洗脱: 0~18 min, 68% B; 18~20 min, 60% B; 20~22 min, 55% B; 22~45 min, 50% B; 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长: 248 nm, 进样量: 5 μL, 柱温: 30 °C。在上述色谱条件下, 大豆苷、大豆苷元与其他成分分离良好, 理论塔板数均不低于 4 000。见图 2。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取大豆苷、大豆苷元对照品适量, 加 70% 乙醇分别制成 0.1 mg · mL⁻¹, 0.05 mg · mL⁻¹ 溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取药材细粉 0.1

[收稿日期] 2008-12-22

[基金项目] 科技部“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAI06A10)

[通讯作者] * 陈随清, Tel: (0371) 65676686; E-mail: suiqingchen@sohu.com

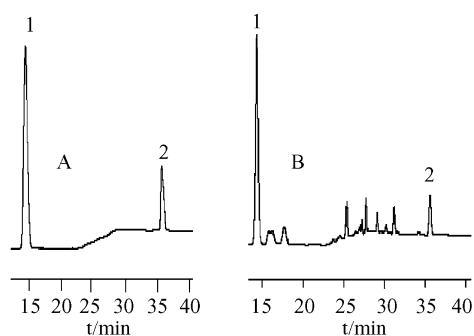


图 2 葛根 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品; 1. 大豆苷; 2. 元大豆苷

g(过 3 号筛), 置 50 mL 具塞平底烧瓶中, 精密加 70% 乙醇 10 mL, 密塞, 称定重量, 加热回流提取 1 h, 冷却。用乙醇补足至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密称取适量大豆苷、大豆苷元对照品, 分别制成 1 mL 含 0.1 mg 的对照品溶液和 1 mL 含 0.05 mg 的对照品储备溶液, 分别进样 1, 5, 8, 10, 12 μL 和 1, 4, 6, 8, 10 μL, 以进样量(μg)为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 大豆苷回归方程为: $Y = 3.58 \times 10^5 X - 1.16 \times 10^5$, $r = 0.9999$, 表明大豆苷在 0.1~1.2 μg 范围内线性关系良好。大豆苷元回归方程为: $Y = 1.04 \times 10^5 X - 3.58 \times 10^4$, $r = 0.9992$, 表明大豆苷元在 0.05~0.5 μg 范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取大豆苷对照品溶液、大豆苷元对照品溶液各 5 μL, 分别连续进样 6 次, RSD 分别为 1.2% 和 1.4%, 说明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样 5 μL, 大豆苷和大豆苷元 RSD 分别为 1.8% 和 1.2%, 表明供试液在 12 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一样品粉末 6 份, 各 0.1 g, 按 2.2.3 项下方法制备供试液, 测得大豆苷、大豆苷元的平均含量分别为 0.41% 和 0.37%, RSD 分别为 2.2% 和 1.2%, 结果表明该实验方法的重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的同一样品葛根粉末 6 份, 各约 0.05 g, 于每份样品中加入适量大豆苷和大豆苷元对照品, 按 2.2.3 项下方法制备供试液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 结果表明, 该方法的回收率良好。见表 1。

2.2.9 样品测定

2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精确称取葛根素标准品 10 mg 于 50 mL 量瓶中, 加 95% 乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。

2.3.2 供试品的制备 精密称取葛根粉末 0.2 g(过 60 目)于 50 mL 锥形瓶中, 加 95% 乙醇 30 mL 置热水浴加热 30 min 并时时振摇, 冷却后加乙醇补足减少的量, 摇匀, 澄清后吸取上清液 1 mL 于 25 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀。

2.3.3 最大吸收峰的确定 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液适量, 以 1 mL 95% 乙醇加水至 10 mL 量瓶中作为空白对照, 于 190~900 nm 扫描, 结果在 250 nm 处有最大吸收。

2.3.4 线性关系考察 精密称取葛根素对照品适量, 置于量瓶中, 用 95% 乙醇溶解至刻度, 摇匀, 分别制成 0.004, 0.008, 0.012, 0.016, 0.02 mg·mL⁻¹ 的对照品储备溶液, 在 250 nm 测定吸收值, 以葛根素浓度(mg·mL⁻¹)为横坐标(X), 吸收度为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 回归方程为: $Y = 61.142X - 0.0656$, $r = 0.9995$, 表明总黄酮在 4~20 μg·mL⁻¹ 的范围内, 浓度与吸收度呈良好的线性关系。

表 1 大豆苷、大豆苷元加样回收率试验结果

取样量 (g)	样品中含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		平均回收率(%)		RSD(%)	
	大豆苷	大豆苷元	大豆苷	大豆苷元	大豆苷	大豆苷元	大豆苷	大豆苷元	大豆苷	大豆苷元	大豆苷	大豆苷元
0.0504	0.207	0.186	0.2	0.19	0.414	0.378	101.7	100.5				
0.0509	0.209	0.188	0.22	0.19	0.418	0.384	97.4	101.5				
0.0502	0.206	0.186	0.2	0.19	0.398	0.379	98.0	100.8	99.2	99.1	1.8	2.2
0.0507	0.208	0.188	0.2	0.21	0.411	0.383	100.7	96.2				
0.0504	0.207	0.186	0.2	0.21	0.406	0.384	99.7	96.9				
0.0507	0.208	0.188	0.21	0.20	0.409	0.383	97.8	98.7				

2.3.5 精密度试验 精确称取总黄酮对照品溶液, 在 250 nm 测定吸光度, 连续测定 6 次, RSD 为 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试液, 在制备后 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 测定吸光度, RSD 为 1.2%, 表明供试液在 60 min 内基本稳定。

2.3.7 重复性试验 精密称取同一样品粉末 6 份, 各 0.2 g, 按 2.3.2 项下方法制备供试液, 在 250 nm 下测定吸光度, RSD 为 1.1%, 表明该实验方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取已知含量的同一样品粉末 6 份, 各约 0.1 g, 于每份样品中加入适量葛根素对照品, 按 2.3.2 项下方法制备供试液, 250 nm 下测定吸光度, 结果表明该实验方法的回收率良好。见表 2。

表 2 总黄酮加样回收率试验结果

取样量 (g)	样品中含量(mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率(%)	RSD (%)
0.100 6	10.694	10.60	20.506	96.3		
0.100 8	10.715	10.65	21.194	99.2		
0.100 3	10.662	10.70	21.447	100.4		
0.100 3	10.662	10.63	21.526	101.1	98.9	2.1
0.100 5	10.683	10.68	20.615	96.5		
0.100 2	10.651	10.71	21.319	99.8		

2.4 不同产地葛根成分样品测定 按照《中国药典》附录浸出物测定(冷浸法)的方法测定。结果见表 3。

表 3 不同产地葛根样品中成分的测定

产地	采集时间	葛根素含量(%)	大豆苷含量(%)	大豆苷元含量(%)	总黄酮含量(%)	醇溶性浸出物(%)
云南昭通	2007-03-10	9.27	1.29	0.32	13.91	19.19
普洱	2008-02-15	5.39	0.69	0.31	11.75	9.32
河南西峡	2007-03-15	10.15	1.66	0.39	14.83	19.89
辉县	2007-03-20	4.24	0.67	0.1	8.17	12.84
信阳	2007-03-23	2.61	0.29	0.18	6.23	8.19
龙峪湾	2007-03-26	6.61	0.53	0.32	10.43	10.46
湖南新化	2008-03-20	4.15	0.18	0.08	7.64	10.86
张家界	2007-03-15	6.15	0.67	0.43	10.85	12.07
陕西佛坪	2007-03-21	7.61	2.00	0.35	13.69	17.46
江西广丰	2008-03-08	2.73	0.42	0.06	5.34	6.91
浙江天台	2008-03-08	4.06	0.57	0.11	6.27	9.01
广东(粉葛)	2008-03-14	0.39	0.04	0.02	0.80	3.45

3 讨论

对大豆苷、大豆苷元标准品溶液及样品溶液进行紫外全波长扫描, 结果在 248 nm 处有最大吸收, 所以测定大豆苷、大豆苷元含量时选择测定波长为 248 nm。

根据文献资料记载葛根中黄酮类化合物易溶于乙醇^[3], 本试验比较了 30%, 50%, 70%, 90% 乙醇提取, 结果 70% 乙醇提取大豆苷、大豆苷元效果好于其它溶剂, 故本试验采用 70% 乙醇作为提取溶剂。含量测定方法学考察中对大豆苷、大豆苷元的流动相系统进行了研究, 当甲醇-水(25:75)、甲醇-水(32:68)、甲醇-水(45:55)时, 大豆苷元保留时间近 80 min, 分离也不好, 当甲醇-水(55:45)时, 大豆苷元峰与其它峰重合在一起。经过试验选用甲醇-水按 2.2.1 项下流动相比例进行梯度洗脱, 使大豆苷、大豆苷元达到基线完全分离, 分离效果好, 方法学考察结果稳定。

黄酮类化合物葛根素是葛根重要的特征性成分, 因此前人主要集中在从不同角度对葛根素进行研究, 本实验首次以葛根多种有效成分(葛根素、大豆苷、大豆苷元、总黄酮和醇溶性浸出物)为指标, 对收集于全国野葛药材主产区的葛根样品进行了质量分析, 结果表明, 不同产区葛根中葛根素、大豆苷、大豆苷元、总黄酮和醇溶性浸出物的含量均存在一定差异, 其中云南、河南、湖南、陕西产葛根的各种有效成分含量均较高。因此本实验结果为制定合适的葛根药材质量评价标准提供了参考依据, 丰富了葛根药材质量分析的参考数据。另外, 本实验结果还表明粉葛的有效成分含量明显低于其它产区野葛的有效成分含量, 与多数资料报道的结果一致, 同时也提示我们, 在生药学研究中, 重视药材产区及品种的研究, 对于保证和提高药材质量具有重要意义。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 233.

[2] 易红, 杨华. 葛根的品种产地和提取工艺研究进展概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006(11): 60.

[3] 冀春茹, 王浴铭, 刘延泽, 等. 中药化学实验技术与实验[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1986: 281.