

References

- [1] *Ch P* (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol I .
- [2] Zhou R H. *Drug Plant Chemotaxonomy* (药用植物化学分类学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1988.
- [3] Huang M S, Zhou Z C. Determination of naringin contents in pummelo (*Citrus grandis* or *C. grandis* var *to mentosa*) peel [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1984, 15(5): 11.
- [4] Hu M H. About *Exocarpium Citri grandis* [J]. *J Tradit Med* (中医杂志), 1959, 6: 60.

葛根高效液相指纹图谱的研究

陈士林^{1,2}, 陈四保^{1,2}, 杨大坚¹, 陈新滋¹, 徐宏喜^{3*}

(1. 香港理工大学, 香港 红磡; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 3. 香港赛马会中药研究院, 香港 九龙)

摘要: 目的 采取高效液相色谱法建立野葛的指纹图谱, 为野葛药材质量控制提供依据。方法 Agilent 高效液相色谱仪, Zorbax XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇和水梯度洗脱, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 250 nm。结果 精密度和重复性试验中各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 符合有关规定。结论 此方法可作为控制野葛内在质量的标准。

关键词: 野葛; HPLC; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)07-0661-03

HPLC fingerprint analyses of *Radix Puerariae*CHEN Shi-lin^{1,2}, CHEN Si-bao^{1,2}, YANG Da-jian¹, Albert S. C. Chan¹, XU Hong-xi³

(1. The Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom, Hong Kong, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, CAMS & PUMC, Beijing 100094, China; 3. Hong Kong Jockey Club Institute of Chinese Medicine Limited, Kowloon, Hong Kong, China)

Key words *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; HPLC; fingerprint; quality control

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *P. thomsonii* Benth. 的干燥根。味甘、辛、凉, 归脾胃二经, 具有解肌退热、生津透疹、升阳止泻之功效^[1]。其主要有效成分为异黄酮类。由于受产地、气候和生态环境等的影响, 不同葛根药材所含的有效成分差异较大^[2,3]。针对中药材或中成药的某个有效成分或指标进行定性、定量分析并不能有效控制中药材或中成药的质量, 目前, 指纹图谱已成为国际公认的控制中药和天然药物质量的最有效的手段, 其根据色谱指纹图谱的模糊属性, 着眼于宏观的规律性的特征分析。本实验通过考察安徽霍山产的野葛, 建立野葛高效液相指纹图谱, 作为评价和控制野葛原药材内在质量的标准。

1 仪器与试剂

Agilent 高效液相色谱仪, DAD 二级管阵列检测器, HP1100 色谱工作站。甲醇为 Fisher 色谱纯,

其他试剂为分析纯。水为超净水。用于指纹图谱的 10 批野葛药材采自安徽霍山县葛根基地, 其他供试样品分别为南京、西安、沈阳、广州 (粉葛) 等地药材市场所售商品药材。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Zorbax XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱: 0~10 min 甲醇由 25% 升为 30%, 20~50 min 甲醇由 30% 升为 80%, 50~60 min 甲醇由 80% 升为 100%; 流速为 0.5 mL/min; 检测波长为 250 nm; 进样量为 20 μL。

2.2 参照物溶液的制备: 采用葛根素 (外标) 为参照物, 精密称定适量, 制成 20 μg/mL 的参照物溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称定葛根粉末 (50 目) 100 mg, 置圆底烧瓶中, 精密加入 100 mL 30% 乙醇溶液, 称定重量, 加热回流 30 min, 用 30% 乙醇

* 收稿日期: 2003-01-22

作者简介: 陈士林 (1961-) 男, 博士, 湖北人, 现任香港理工大学客座教授, 中国医学科学院药用植物研究所常务副所长, 香港理工大学中药研究所常务副所长, 以中药资源与开发为研究方向。

Tel: 00852-27665606 (010) 62899701 E-mail: scsichen@sohu.com

补足减失的质量,摇匀,滤过,再用 0.45 μ m 滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.4 测定方法: 取各供试品溶液 20 μ L,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,计算,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 对照试验: 取参照物溶液 20 μ L,注入 HPLC,记录色谱(图 1)

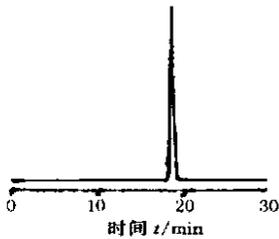


图 1 葛根素 HPLC图谱
Fig. 1 HPLC chromatogram of puerarin

2.5.2 精密度试验: 取供试品溶液(1号样品)连续进样 6次,测得共有峰 17个,各共有峰相对峰面积的 $RSD < 5\%$,表明精密度良好。

2.5.3 重复性试验: 取 1号样品 6份,精密称定,按 2.3项下方法制备供试品溶液,分别进样,测得各共有峰相对峰面积的 $RSD < 5\%$,表明其重复性试验较好。

2.5.4 稳定性试验: 取供试品溶液(1号样品),分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h进样,测得各共有峰相对峰面积的 $RSD < 5\%$,表明样品溶液在 24 h内稳定。

2.6 指纹图谱及各项技术参数

2.6.1 共有峰的指定: 根据 10批供试品溶液 HPLC谱提供的相关参数,比较各批样品的色谱图,其中共有峰 15个(图 2)。

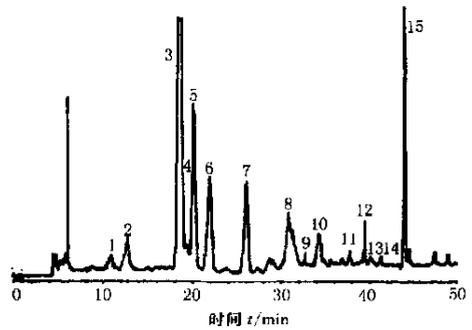


图 2 野葛(安徽霍山 1号样品)HPLC指纹图谱
Fig. 2 HPLC fingerprint chromatogram of *P. lobata* (No. 1 from Huoshan, Anhui Province)

2.6.2 共有峰的相对保留时间、峰面积、相对峰面积: 3号峰为葛根素,是葛根中的主要成分,其峰面积占总峰面积的 55%,比较稳定,因此,以其作为参照峰。共有峰相对保留时间和峰面积见表 1, 2 由表 2 可以看出 10批样品间各共有峰相对峰面积 $RSD < 5\%$ 。共有峰总面积占总峰面积的平均百分比为 94.6%, RSD 为 2.59%,符合指纹图谱的有关规定(表 3)。

表 1 10批样品共有峰相对保留时间

Table 1 Relative retention times of common peaks for ten batches of samples

样品	共有峰相对保留时间														
	1	2	3(S)	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.58	0.68	1	1.04	1.09	1.18	1.40	1.66	1.76	1.84	2.03	2.13	2.16	2.22	2.37
2	0.57	0.67	1	1.05	1.09	1.18	1.37	1.60	1.69	1.79	1.97	2.07	2.09	2.16	2.30
3	0.63	0.74	1	1.09	1.19	1.17	1.55	1.74	1.84	1.94	2.14	2.27	2.30	2.38	2.53
4	0.63	0.68	1	1.09	1.19	1.17	1.55	1.70	1.84	1.94	2.13	2.26	2.29	2.37	2.52
5	0.63	0.74	1	1.09	1.18	1.17	1.54	1.70	1.84	1.94	2.16	2.26	2.29	2.37	2.52
6	0.58	0.68	1	1.09	1.15	1.18	1.40	1.70	1.84	1.90	2.12	2.22	2.25	2.32	2.48
7	0.57	0.68	1	1.04	1.08	1.19	1.41	1.65	1.74	1.83	2.01	2.11	2.13	2.20	2.35
8	0.57	0.67	1	1.04	1.08	1.19	1.42	1.63	1.72	1.81	1.98	2.07	2.10	2.16	2.31
9	0.58	0.68	1	1.04	1.08	1.19	1.42	1.65	1.75	1.83	2.02	2.11	2.14	2.20	2.35
10	0.57	0.68	1	1.04	1.08	1.18	1.41	1.65	1.74	1.83	2.02	2.11	2.14	2.21	2.35
平均值	0.59	0.69	1	1.06	1.12	1.18	1.45	1.67	1.78	1.87	2.06	2.16	2.19	2.259	2.407

2.7 不同产地野葛药材的比较: 取不同产地的野葛药材按供试样品溶液制法,制备供试溶液,测定得不同产地药材的 HPLC图谱,见图 3 从测定结果看,三地产的野葛药材指纹图谱比较相似,各共有峰都存在,但色谱峰之间的相对峰面积并不相同,由此可以看出它们之间的内在质量是有差别的。所以,指纹图谱正是通过这种内在的差异,达到控制不同批次、产地的药材。

3 讨论

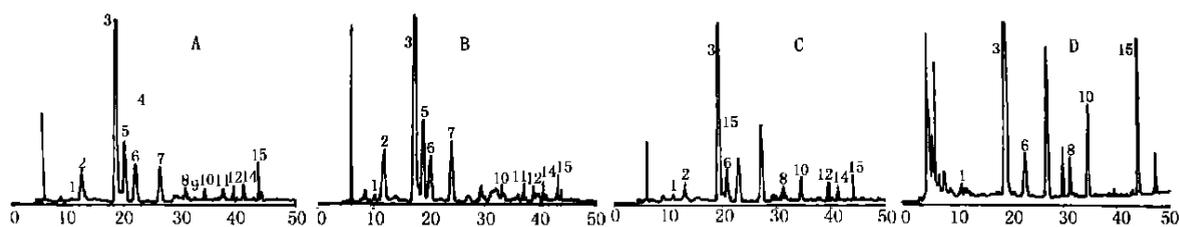
3.1 本实验采用甲醇-水梯度洗脱法,使葛根中大部分黄酮类化合物得到了较好的分离,得到较完整的 HPLC色谱图。本法精密度和重现性好,可以用来评价和控制野葛内在质量。

3.2 本实验所用材料来自安徽霍山葛根基地,从指纹图谱看,10批样品具有较好的相似性,平均共有峰总面积在 94% 以上。因此,利用指纹图谱可以较好地控制葛根样品的内在质量。另一方面说明,建立

表 2 10批样品共有峰相对峰面积

Table 2 Relative areas of common peaks for ten batches of samples

样品	共有峰相对保留时间														
	1	2	3(S)	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0	0.04	1	0.03	0.15	0.15	0.11	0.11	0.01	0.02	0.01	0.02	0	0	0.1
2	0.01	0.07	1	0.05	0.07	0.21	0.12	0.13	0	0	0.01	0.01	0	0.01	0.02
3	0.01	0.05	1	0.03	0.16	0.16	0.12	0.1	0	0.03	0	0.02	0.01	0	0.05
4	0.01	0.05	1	0.04	0.16	0.16	0.11	0.16	0	0.03	0	0.02	0.01	0	0.05
5	0.01	0.05	1	0.04	0.2	0.2	0.12	0.05	0.01	0	0	0.01	0.01	0	0.04
6	0	0.03	1	0.12	0.13	0.13	0.13	0.07	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0	0.05
7	0.01	0.05	1	0.04	0.05	0.21	0.14	0.08	0.01	0.04	0.01	0	0.01	0	0.03
8	0.01	0.05	1	0.03	0.11	0.08	0.18	0.02	0.01	0.04	0.02	0.01	0.01	0.01	0.03
9	0.01	0.03	1	0.03	0.11	0.11	0.13	0.01	0.01	0.04	0.01	0.01	0.01	0	0.08
10	0.01	0.05	1	0.07	0.09	0.3	0.08	0.05	0.01	0.03	0.02	0	0	0	0.03
平均值	0.01	0.05	1	0.048	0.12	0.173	0.12	0.08	0.007	0.025	0.009	0.01	0.005	0.005	0.047
RSD %	0.42	2.47	0.00	2.69	4.60	3.64	2.05	4.52	0.31	1.31	0.57	0.51	0.09	0.17	2.41



A-南京 B-陕西 C-沈阳 D-广州(粉葛)
A-Nanjing B-Shaanxi C-Shenyang D-Guangzhou (P. thomsonti)

图 3 不同产地葛根指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint chromatogram of Radix Puerariae from different sources

表 3 10批样品共有峰峰面积

Table 3 Areas of common peaks for ten batches of samples

样品	共有峰 总面积	总峰面积	共有峰总面 积百分比 %
1	8 030.5	8 524.6	94.20
2	10 591.0	11 093.0	95.48
3	6 672.3	6 964.8	95.80
4	7 259.6	7 420.6	97.83
5	6 424.1	6 639.2	96.76
6	7 343.5	7 546.5	97.31
7	7 846.4	8 341.9	94.06
8	10 189.0	11 003.0	92.60
9	6 259.5	6 825.3	91.71
10	8 578.8	9 475.2	90.54

野生药材种植生产基地,能很好地使药材质量稳定。

3.3 野葛与粉葛的指纹图谱差异较大,说明种间的成分差别较大,所以,生产过程中一定要使用同品种的原料;不同产地野葛的指纹图谱相似,各共有峰都存在,只是各峰面积及相对面积有差异。

References

[1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol I.
 [2] Gu Z P, Lian W Y, Chen B Z, et al. An investigation on the plant resource of Chinese medicine "Gegen" (genus Pueraria DC) [J]. Chin Med Mater (中药材), 1993, 16(8): 13.
 [3] Gu Z P, Chen B Z, Feng R Z, et al. The source utilization and evaluation of medical KuDZu and roots from the genus plants Pueraria DC. in China [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1996, 31(5): 387.

招 聘 启 事

本公司欲招聘 1~2名在天然植物有效成分提取、分离纯化技术专业上有扎实的理论基础和丰富的生产实践经验的专业人才,一经录用年底薪拾万元整,食宿、差旅由我公司承担,具体事宜面谈

联系人: 刘先生 冯小姐

联系电话: Tel (0510) 6992298 Fax (0510) 6992618 手机: 13815149199

江阴康正生物制品有限公司