

一测多评法测定葛根药材中5种异黄酮类成分

吴文杰^{1,2}, 邓阳¹, 谭桂林¹, 罗娟¹, 陈秧¹, 黄莺^{1*}, 张峰^{2*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 中国检验检疫科学研究院食品安全研究所, 北京 100176

摘要: 目的 建立葛根药材中5种异黄酮类成分大豆苷元、大豆苷、葛根素、葛根素芹菜糖苷、葛根素-6"-O-木糖苷的一测多评法, 验证该方法在葛根质量分析中应用的准确性及可行性。方法 以葛根素为内标, 分别建立葛根素与葛根素芹菜糖苷、葛根素-6"-O-木糖苷、大豆苷、大豆苷元的相对校正因子, 计算葛根中葛根素芹菜糖苷、葛根素-6"-O-木糖苷、大豆苷、大豆苷元的量, 实现一测多评。同时采用外标法测定葛根药材中5种异黄酮类成分的量, 并比较计算值与实测值的差异, 以验证一测多评法在测定中的科学性及可行性。结果 各相对校正因子重复性良好, 一测多评法测定结果与外标法测定结果无显著差异。结论 以葛根素为内标同时测定葛根素芹菜糖苷、葛根素-6"-O-木糖苷、大豆苷、大豆苷元的一测多评法可用于葛根药材的定量分析。

关键词: 一测多评法; 葛根; 葛根素; 大豆苷元; 大豆苷; 葛根素芹菜糖苷; 葛根素-6"-O-木糖苷; 相对校正因子; 质量控制
中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)04-0777-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.04.026

Determination of five isoflavonoids in *Pueraria Radix* by QAMS

WU Wen-jie^{1,2}, DENG Yang¹, TAN Gui-lin¹, LUO Juan¹, CHEN Yang¹, HUANG Ying¹, ZHANG Feng²

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China

Abstract: Objective To establish a method for simultaneously determination of five isoflavones (daidzein, daidzin, puerarin, mirificin, and 6"-O-xylosidepuerarin) in *Pueraria Radix* by single marker (QAMS), which is feasible and accurate. **Methods** Puerarin was taken as internal standard substance to establish the relative correction factor (RCF) for quantitative analysis of multi-components with QAMS. Thus, the contents of mirificin, 6"-O-xylosidepuerarin, daidzin, and daidzein were calculated. The contents in 10 batches of samples were determined by external standard method and QAMS. The scientificity and feasibility of the methods were evaluated by comparison of the quantitative results between external standard method and QAMS. **Results** The reproducibility of RCF was perfect. The results calculated with QAMS were consistent with the results by the external standard method. **Conclusion** QAMS is accurate and feasible to evaluate the quality of *Pueraria Radix*.

Key words: QAMS; *Pueraria Radix*; puerarin; daidzein; daidzin; mirificin; 6"-O-xylosidepuerarin; relative correction factor; quality control

葛根和粉葛分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 和甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth. 的干燥根, 在中医用药史上二者均作为葛根 *Pueraria Radix* 药材使用, 具有解肌退热、透发麻疹、生津止渴、升阳止泻的作用^[1]。葛根和粉葛作为常用中药收载于《中国药典》2015年版一部^[2], 定量

指标仅葛根素一项, 不能完全反映葛根药材的整体质量。现代研究显示, 葛根素、大豆苷、大豆苷元是葛根药材中的主要活性成分^[3]; 另外葛根素芹菜糖苷、葛根素-6"-O-木糖苷在葛根中的量很高, 甚至高于大豆苷和大豆苷元^[4-5]。因此, 葛根素芹菜糖苷、葛根素-6"-O-木糖苷、大豆苷元、大豆苷应同

收稿日期: 2016-10-19

基金项目: 湖南省科技厅科学研究项目(2015JC3072); 湖南省教育厅科学研究项目(14C0860); 进出口药食同源产品质量检测技术研究(YS2017YFZG020006)

作者简介: 吴文杰(1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药分析及食品分析。E-mail: 15207497825@163.com

*通信作者 黄莺(1965—), 女, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药抗凝有效成分分离纯化及物化和无机体系计算化学的研究。

E-mail: 1125218638@qq.com

张峰(1974—), 男, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为食品安全。E-mail: fengzhang@126.com

时作为检测指标。虽然有文献报道^[3]采用 HPLC 结合外标法同时测定葛根药材中多种异黄酮类成分的量,但由于缺乏其中的对照品及分析成本高等原因,外标法限制了葛根药材的多组分分析和质量控制的实际应用。

一测多评法(quantitative analysis of multi-compounds by single-marker)是利用中药有效成分之间内在的函数和比例关系,通过测定一个成分(对照品易于得到或供应)而实现多个成分(对照品难以得到或供应)的同步测定,是适合中药特点的多指标质量评价新模式,已广泛地用于中药的质量控制^[6-9]。相比外标法,一测多评法只需测定一个有代表性的成分(易得、廉价、有效),简化了数据处理,降低了成本。虽然有研究尝试^[10]采用一测多评法同时测定粉葛中葛根素、大豆苷、大豆苷元等成分的量,但并未同时测定在葛根中量很高且价格相对较贵的葛根素芹菜糖苷、葛根素-6"-O-木糖苷的量,也并未探讨进样体积、体积流量、柱温等对耐用性及系统适用性的影响。

本实验采用 HPLC 结合外标法同时测定了葛根药材中大豆苷元、大豆苷、葛根素、葛根素芹菜糖苷、葛根素-6"-O-木糖苷的量,并采用一测多评法,根据以上 5 种异黄酮类成分内在的函数和比例关系,以葛根素为内标成分,得出大豆苷元、大豆苷、葛根素芹菜糖苷、葛根素-6"-O-木糖苷与葛根素之间的相对校正因子^[11],计算出这 4 种异黄酮类成分的量,为葛根药材多指标定量测定提供全新的分析模式。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC-30AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司);AB104-N 万分之一天平(梅特勒-托利多);AUW2200 十万分之一天平(SHIMADZU 岛津);KQ3200 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);Mili-Q 超纯水仪(美国 Milipore 公司)。

1.2 试药

葛根素对照品(批号 3681-99-0,质量分数>98%)、葛根素芹菜糖苷对照品(批号 103654-50-8,质量分数>98%)、葛根素-6"-O-木糖苷对照品(批号 114240-18-5,质量分数>98%)、大豆苷对照品(批号 552-66-9,质量分数>98%)、大豆苷元对照品(批号 486-66-8,质量分数>98%)均购自上海源叶生物科技有限公司。10 批葛根药材均由昆明生

物公司采集,经昆明植物标本馆刘恩德博士鉴定为豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤(粉葛) *Pueraria thomsonii* Benth. 的干燥根。甲醇(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司);Milipore 超纯水;99%甲酸(分析纯,北京百威灵科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 Waters 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-0.5%甲酸溶液(B),梯度洗脱 0~20 min, 20%~30% A; 20~25 min, 30%~40% A; 25~35 min, 40%~70% A; 体积流量 1.0 mL/min, 进样体积 5 μL, 检测波长 254 nm, 柱温为 25 ℃。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取大豆苷元、大豆苷、葛根素、葛根素芹菜糖苷和葛根素-6"-O-木糖苷对照品适量,加甲醇溶解和稀释,配制成含葛根素 20 μg/mL、葛根素-6"-O-木糖苷 4 μg/mL、葛根素芹菜糖苷 4 μg/mL、大豆苷 4 μg/mL、大豆苷元 1 μg/mL 的混合对照品溶液,摇匀,置棕色瓶内,并于 4 ℃冰箱中避光保存,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备^[12] 取药材粉末(过 40 目筛)0.1 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶,精密加入 30%甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 20 min,放冷,30%甲醇补足减失质量,摇匀,经 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 系统适应性及专属性试验 精密量取混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶液各 5 μL,在上述色谱条件下进样分析。结果显示,供试品溶液色谱中呈现与对照品保留时间相同的色谱峰;葛根素、葛根素-6"-O-木糖苷、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元与其相邻色谱峰的分离度均大于 1.5,理论塔板数均大于 3 000,阴性对照在相应位置处未见色谱峰,方法专属性良好。混合对照品、样品 HPLC 图见图 1。

2.1.5 标准曲线的绘制 分别精密吸取系列质量浓度的混合对照品溶液 5 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。以峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X)绘制标准曲线,并进行线性回归。实验结果表明,各成分在各自浓度范围内呈良好的线性关系。结果见表 1。

2.1.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 5 μL,连续进样 6 次,计算葛根素、葛根素-6"-O-木

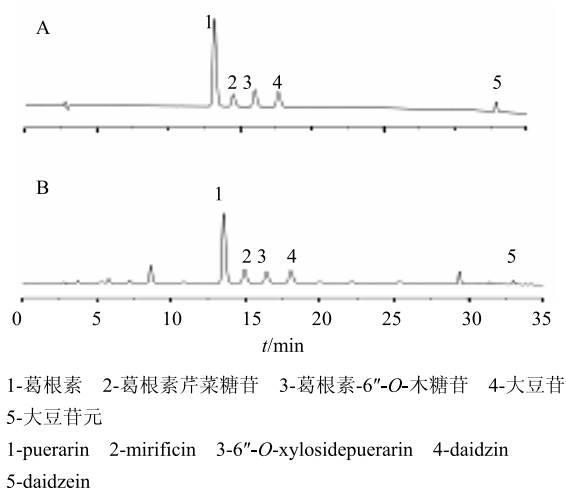


图 1 混合对照品 (A) 和葛根样品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and *Pueraria Radix* sample (B)

表 1 5 种异黄酮类成分的线性关系考察结果
Table 1 Results of linear equations of five isoflavones

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ng
葛根素	$Y=1\,929.4X+7.750\,3$	0.999 3	25~500
葛根素-6''-O-木糖苷	$Y=1\,396.3X+0.784\,0$	0.999 9	5~100
葛根素-6''-O-木糖苷	$Y=1\,653.5X+2.870\,6$	0.999 8	5~100
大豆苷	$Y=1\,940.9X+2.245\,8$	0.999 5	5~100
大豆苷元	$Y=2\,356.8X+1.151\,2$	0.999 8	1.25~25

糖苷、葛根素-6''-O-木糖苷、葛根素-6''-O-木糖苷、大豆苷和大豆苷元的峰面积的 RSD 分别为 1.3%、1.0%、1.5%、1.1%、0.4%。表明仪器精密性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别于制备后 0、4、8、12、24、36、48、72 h 后进样 5 μ L，测定葛根素、葛根素-6''-O-木糖苷、葛根素-6''-O-木糖苷、大豆苷和大豆苷元的峰面积积分值 RSD 分别为 0.8%、1.8%、1.5%、1.7%、2.6%。表明供试品溶液在 72 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 取同一批药材粉末 0.1 g，共 6 份，精密称定，按“2.1.3”项方法制备样品，测定葛根素、葛根素-6''-O-木糖苷、葛根素-6''-O-木糖苷、大豆苷和大豆苷元的平均质量分数分别为 37.679 9、11.285 7、6.505 10、8.243 8、0.895 8 mg/g，RSD 值分别为 0.9%、1.2%、1.1%、1.0%、2.2%。表明本实验重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取已测定的样品 0.1 g，精密称定，平行 6 份，分别加入一定量的对照品，按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，进

行回收率测定。结果表明，葛根素、葛根素-6''-O-木糖苷、葛根素-6''-O-木糖苷、大豆苷和大豆苷元的平均回收率分别为 97.78%、95.84%、96.68%、98.12%、102.23%，RSD 值分别为 3.1%、3.3%、2.5%、2.4%、4.2%。表明该方法的准确度良好。

2.2 相对校正因子计算^[10]

取混合对照品溶液，进样 1、2、5、8、10 μ L 测定，以葛根素为内标，分别计算葛根素对葛根素-6''-O-木糖苷、葛根素-6''-O-木糖苷、大豆苷和大豆苷元的相对校正因子，相对校正因子的平均值分别为 1.41、0.97、1.03、0.77，RSD 值均小于 5%。

2.3 相对校正因子的耐用性及系统适用性评价

2.3.1 不同色谱柱和仪器对相对校正因子的影响 分别采用 Agilent (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、SUPELCOSIL (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、COSMOSIL (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 和 Waters (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 4 种不同品牌的色谱柱以及岛津、Agilent 和 Waters 3 种高效液相色谱系统进行测定时，考察仪器色谱行为的变化。实验结果表明，各条件下所测量的 RSD<3.0%，分离效果理想。结果见表 2。

2.3.2 不同体积流量对相对校正因子的影响 实验在同一实验室进行，采用岛津 LC 20-A 高效液相色谱系统和 Waters (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱。分别考察了体积流量为 1.10、1.05、1.00、0.95、0.90、0.85、0.80 mL/min 时葛根素对其他成分的相对校正因子，结果各成分相对校正因子在不同体积流量下重现性良好 (RSD<3%)，结果见表 3。

2.3.3 不同柱温对相对校正因子的影响 实验在同一实验室进行，采用岛津 LC 20-A 高效液相色谱系统和 Waters (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱。分别考察了柱温为 20、25、30、35、40、45、50 $^{\circ}$ C 时葛根素对其他成分的相对校正因子，结果各成分相对校正因子在不同柱温下重现性良好，RSD 值分别为 0.53%、0.41%、0.51%、0.70%。结果见表 4。

2.4 待测色谱峰的定位

实验分别考察了相对保留时间差和相对保留时间比在不同仪器和色谱柱条件下的稳定性。实验发现不同规格的色谱柱比较时，相对保留时间比和相对保留时间差都明显改变，RSD 值较大，因此实验只在不同仪器上比较了同一规格的色谱柱。结果表明相对保留时间比值法 RSD 值分别为 3.57、0.90、0.82、4.20，保留时间差法 RSD 值分别为 1.26、1.05、0.56、1.00，说明二者都适宜进行色谱峰定位。

表 2 不同色谱柱和仪器对相对校正因子的影响 ($n = 3$)Table 2 RCF determined by different columns and instruments ($n = 3$)

仪器	色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)	葛根素对其他成分的相对校正因子			
		葛根素-6"-O-木糖苷	葛根素芹菜糖苷	大豆苷	大豆苷元
岛津	Agilent	1.40	0.97	1.00	0.75
	SUPELCOSIL	1.42	0.98	1.02	0.74
	COSMOSIL	1.41	0.96	1.00	0.74
	Waters	1.42	0.96	1.02	0.78
Agilent	Agilent	1.38	0.96	0.99	0.72
	SUPELCOSIL	1.40	0.96	1.00	0.74
	COSMOSIL	1.40	0.95	1.00	0.74
	Waters	1.40	0.96	1.01	0.76
Waters	Agilent	1.51	1.05	1.08	0.75
	SUPELCOSIL	1.44	0.97	0.98	0.77
	COSMOSIL	1.44	0.98	0.99	0.77
	Waters	1.41	1.00	1.06	0.80
RSD/%		2.36	2.78	2.92	2.91

表 3 不同体积流量对相对校正因子的影响 ($n = 3$)Table 3 RCF determined by different flow rates ($n = 3$)

体积流量/(mL·min ⁻¹)	葛根素对其他成分的相对校正因子			
	葛根素-6"-O-木糖苷	葛根素芹菜糖苷	大豆苷	大豆苷元
1.10	1.40	0.96	1.02	0.77
1.05	1.41	0.96	1.01	0.75
1.00	1.42	0.96	1.02	0.78
0.95	1.39	0.96	1.01	0.75
0.90	1.41	0.97	1.02	0.75
0.85	1.40	0.96	1.01	0.73
0.80	1.41	0.96	1.02	0.73
RSD/%	0.69	0.46	0.48	2.55

表 4 不同柱温对相对校正因子的影响 ($n = 3$)Table 4 RCF determined by different temperatures ($n = 3$)

柱温/°C	葛根素对其他成分的相对校正因子			
	葛根素-6"-O-木糖苷	葛根素芹菜糖苷	大豆苷	大豆苷元
20	1.40	0.96	0.98	0.77
25	1.39	0.96	1.00	0.76
30	1.40	0.97	0.99	0.76
35	1.40	0.96	1.00	0.77
40	1.40	0.97	0.99	0.76
45	1.41	0.97	0.99	0.77
50	1.39	0.97	1.00	0.77
RSD/%	0.53	0.41	0.51	0.70

2.5 样品测定

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 5 μ L, 注入高效液相色谱仪, 依法测定 10 批样品, 采用外标法和一测多评法计算葛根中葛根素、葛根素-6"-O-木糖苷、葛根素芹菜糖苷、大豆苷和大豆苷元的量, 测定结果见表 5。常规的外标法实测值与一测多评法计算的质量分数值相对误差均不大于 3%, 说明 2 种方法测得结果没有显著性差异, 一测多评法在葛根药材的多组分分析和质量评价中的应用是可行的。

3 讨论

因葛根素价廉易得、性质稳定, 故本实验选择葛根素为内参物质进行一测多评分析。与传统的热回流提取法相比, 超声提取省时、易于操作、提取效果好^[12]。由于超声功率、温度不同, 在前人研究基础上^[12], 考察了不同提取时间 (15、20、25 min) 时的提取效果, 发现选择超声提取 20 min 时提取效果最好, 故选择超声提取 20 min。对葛根素、葛根素-6"-O-木糖苷、葛根素芹菜糖苷、大豆苷和大豆苷元进行全波长扫描, 发现其紫外吸收峰相似, 均在 254 nm 左右有最大吸收, 故选择 254 nm 为检测波长。

在葛根素与葛根素-6"-O-木糖苷、葛根素芹菜糖苷、大豆苷和大豆苷元的相对校正因子的评价中, 实验考察了进样体积、色谱柱、液相色谱仪、体积流量、柱温的影响。结果表明, 在本实验条件下相

表 5 样品测定结果
Table 5 Results of sample determination

批次	品种	葛根素	葛根素-6"-O-木糖苷/%			葛根素芹菜糖苷/%			大豆苷/%			大豆苷元/%		
			外标法	一测多评法	RSD	外标法	一测多评法	RSD	外标法	一测多评法	RSD	外标法	一测多评法	RSD
1	野葛	23.210 9	1.263 4	1.253 5	0.8	1.335 6	1.321 9	1.0	0.773 9	0.754 4	2.5	0.108 1	0.105 9	2.0
2	野葛	10.381 0	0.000 0	0.000 0	—	1.525 1	1.519 4	0.4	0.979 0	0.971 5	0.8	0.106 2	0.105 6	0.6
3	野葛	38.826 4	6.393 3	6.497 4	1.6	3.001 2	2.983 7	0.6	8.342 6	8.564 9	2.7	0.274 0	0.271 8	0.8
4	野葛	4.021 2	2.757 9	2.741 4	0.6	0.000 0	0.000 0	—	0.910 9	0.914 3	0.4	0.298 9	0.303 6	1.6
5	野葛	9.974 7	1.994 3	2.013 4	1.0	2.004 3	2.002 2	0.1	2.011 2	2.045 0	1.7	0.504 8	0.509 2	0.9
6	野葛	37.679 9	11.285 7	11.501 4	1.9	6.505 1	6.484 8	0.3	8.243 8	8.463 7	2.7	0.895 8	0.901 6	0.6
7	粉葛	1.554 8	0.000 0	0.000 0	—	0.000 0	0.000 0	—	0.530 9	0.534 4	0.7	0.201 1	0.205 6	2.2
8	粉葛	11.405 7	0.505 9	0.499 7	1.2	1.584 6	1.578 0	0.4	0.820 7	0.806 2	1.8	0.117 1	0.113 6	3.0
9	粉葛	3.118 9	0.000 0	0.000 0	—	0.354 2	0.349 2	1.4	0.000 0	0.000 0	—	0.094 2	0.092 3	2.0
10	粉葛	7.660 9	0.000 0	0.000 0	—	0.647 9	0.639 1	1.4	0.379 3	0.369 4	2.6	0.000 0	0.000 0	—

对校正因子具有较好的重现性。实验发现对色谱峰峰位进行确定时, 相对保留时间差法比相对保留时间比法重现性更好, 其 RSD 值均小于 3%。为了验证一测多评法可行性, 本实验选取了 10 批不同来源的样品进行比较, 结果表明一测多评法与外标法在葛根药材 5 种异黄酮类成分的测定中无显著差异。

本实验所建立的一测多评测定葛根药材中异黄酮类成分的量的方法具有较高的重现性、稳定性和可信度, 有利于葛根药材的质量控制, 也证明了一测多评法测定同类化合物成分是可行的。

参考文献

- [1] 李天星, 李新民. 中药葛根的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(8): 151-153.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] Song W, Li Y J, Qiao X, *et al.* Chemistry of the Chinese herbal medicine *Puerariae Radix* (Ge-Gen): A review [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(6): 347-360.
- [4] Du G, Zhao H Y, Zhang Q W, *et al.* A rapid method for simultaneous determination of 14 phenolic compounds in *Radix puerariae* using microwave-assisted extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatography A*, 2010, 1217(5): 705-714.
- [5] Du G, Zhao H Y, Song Y L, *et al.* Rapid simultaneous determination of isoflavones in *Radix puerariae* using high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with novel shell-type column [J]. *J Separ Sci*, 2011, 34(19): 2576-2585.
- [6] 蓝天凤, 王 晓, 王岱杰, 等. 一测多评法测定丹参中 4 种丹参酮类成分 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2420-2423.
- [7] 蔡雪萍, 李振华, 华俊磊, 等. 一测多评法测定枇杷叶有效部位中 6 种三萜酸成分的量 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 3057-3062.
- [8] 陈建维, 刘 圆, 刘晟楠, 等. 一测多评法测定枳实中 4 种黄酮类成分 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1374-1377.
- [9] 王 欣, 覃 瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展 [J]. 中成药, 2016, 38(2): 395-402.
- [10] 戴 玲, 叶惠煊, 邹亲朋, 等. 湘葛一号根 HPLC 指纹图谱及 5 种异黄酮含量的同时测定 [J]. 西北药学杂志, 2016, 31(3): 239-244.
- [11] 罗祖良, 仇 峰, 韦日伟, 等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.
- [12] 章 军, 薛翠娟, 荆文光, 等. HPLC 测定葛根饮片 5 个成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 108-111.