

基于多指标成分含量与抗氧化活性的葛根类药材质量评价研究

黄再强^{1,2}, 王甜甜¹, 马逾英¹, 张燕飞¹, 胡明勋¹, 吴兵^{1*}

1 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2 文山学院三七学院, 云南 文山 663000

摘要: **目的** 通过测定葛根类药材中 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素 6 种成分含量, 结合抗氧化活性评价, 综合评价葛根类药材质量。**方法** 采用 UPLC-DAD 法测定样品的主要成分含量, Agilent Zorbax SB-C₁₈ (5 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 以乙腈-0.1% 乙酸水溶液作为流动相洗脱, 柱温 30 °C, 体积流量 0.4 mL/min; 采用紫外分光光度法, 以 DPPH 清除活性进行抗氧化活性评价; 以样品中 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素 6 种成分含量, 结合其半数抑制浓度 (IC₅₀), 进行 7 个指标的综合加权评分, 并进行聚类分析。**结果** 粉葛以 8、9、50、51 号样品综合加权评分较高, 质量较好, 产自四川简阳、江油地区; 19、20、29~31 号人工种植峨眉葛样品质量较差; 葛根以 33~37、65~69 号样品综合加权评分较高, 质量较好, 产自平武、北川、青川地区。**结论** UPLC 波长切换技术多成分同时测定方法操作简单、简便快捷、重复性好, 专属性强; 综合加权评价法能够较全面地分析药材质量, 为葛根类药材质量综合评价提供参考依据。**关键词:** 葛根; 粉葛; UPLC-DAD; 3'-羟基葛根素; 葛根素; 大豆苷; 大豆苷元; 染料木苷; 染料木素; 抗氧化活性; 质量评价

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)07-1667-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.027

Quality evaluation study of *Pueraria Radix* and *Pueraria thomsonii* by component contents and anti-oxidant activity

HUANG Zai-qiang^{1,2}, WANG Tian-tian¹, MA Yu-ying¹, ZHANG Yan-fei¹, HU Ming-xun¹, WU Bing¹

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. College of Sanqi, Wenshan College, Wenshan 663000, China

Abstract: Objective To determine the components of 3'-hydroxy puerarin, puerarin, daidzin, daidzein, genistein glycosides, and genistein from *Pueraria Radix* and to study the quality of medicinal materials combining with anti-oxidant activity. **Methods** The contents of six main components from *Pueraria Radix* samples were determined by using UPLC-DAD method, which performed on Agilent Zorbax SB-C₁₈ (5 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), acetonitrile and 0.1% acetic acid aqueous solution as mobile phase, column temperature 30 °C, and the flow rate of 0.4 mL/min. The anti-oxidant activity evaluation of DPPH was accomplished by using UV spectrophotometry. Comprehensive weighted evaluation was based on seven indicators, combined six kinds of ingredients with the IC₅₀ of medicine, and made cluster analysis. **Results** Studies had shown that the quality of No. 8, 9, 50, and 51 samples of *Pueraria thomsonii* was better than others, which collected from Jianyang and Jiangyou. And the quality of No. 19, 20, 29, 30, and 31 samples of cultivated-planting *Pueraria omeiensis* was poor. The quality of No. 33~37, 65~69 samples of *Pueraria Radix* was better than other places in Sichuan Province, which collected from Pingwu, Beichuan, and Qingchuan. **Conclusion** The UPLC wavelength switching technology multicomponent simultaneous determination method is simple and convenient, which has good reproducibility, strong specificity. Comprehensive weighted evaluation method can analyze the quality of medicinal materials better, which provides references for comprehensive evaluation on the main varieties of *Pueraria*.

Key words: *Pueraria Radix*; *Pueraria thomsonii* Benth; UPLC-DAD; 3'-hydroxy puerarin; puerarin; daidzin; daidzein; genistein glycosides; genistein; anti-oxidant activity; quality evaluation

《中国药典》2015 年版收载葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 粉葛为

其同属植物甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth. 的干燥根^[1]。据文献报道^[2], 野葛同属其他植物在部分

收稿日期: 2017-08-12

基金项目: 四川省科技计划项目 (2014SZ0131)

作者简介: 黄再强, 在读硕士, 从事中药品种、质量与资源开发研究。Tel: 18380186079 E-mail: 1164375439@qq.com

*通信作者 吴兵, 实验师, 从事中药品种、质量及资源开发研究。Tel: 13882089133 E-mail: 466945108@qq.com

区域也作中药葛根或粉葛使用。川产葛根类药材资源丰富,除上述药典收载品种外,尚有以野生或栽培的峨眉葛 *Pueraria omeiensis* Wang et Tang 做粉葛使用,并有商品药材。在质量控制方面,《中国药典》2015 年版规定了测定葛根、粉葛药材的葛根素含量,但据文献报道^[3-8],葛根、粉葛中除葛根素为有效成分外,其他成分如 3'-羟基葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素均有较好药理活性。有研究认为^[9-10],人类疾病多数与氧自由基有关,其中有常见的癌症、心脑血管疾病、糖尿病、动脉粥样硬化、脑卒中、白内障、风湿性关节炎等,而与自由基相关的药理活性是抗氧化,中药多数都具有抗氧化作用,中药抗氧化作用体现了中药多方面的功效,能比较好地反映中药的质量问题,可用于评价药材质量。

本实验采用 UPLC-DAD 法,通过测定各样品中 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素 6 个有效成分的含量,结合抗氧化活性评价,并进行综合加权评分,以评价四川不同来源、不同产地葛根类药材的质量,为探索其质量评价方法及进一步深入研究提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

对照品葛根素(质量分数 $\geq 99.71\%$,批号 MUST-16011207)、大豆苷(质量分数 $\geq 98.72\%$,批号 MUST-16011207)、大豆苷元(质量分数 $>99.99\%$,批号 MUST-16011207)均购自成都曼思特生物科技有限公司,3'-羟基葛根素(质量分数 $>98.50\%$,批号 PS0182-0020)、染料木苷(质量分数 $>98.5\%$,批号 PS0369-0025)购自成都普思生物科技有限公司,染料木素(质量分数 $\geq 98.00\%$,批号 C15H1005)购自北京中科仪友化工技术研究院;DPPH(分析纯,美国 Sigma 公司);维生素 C (VC)(分析纯,北京化工厂);实验用乙醇、乙腈、乙酸等试剂均为分析纯;实验收集药材 71 批,均经成都中医药大学药学院卢先明、马逾英教授鉴定(表 1)。其中自采对口药材 44 批,均于 2015 年 10~12 月采自四川各产地,商品药材 27 批,均于 2016 年 3 月购于成都荷花池药材市场。1~18、45~48、50、51、53~61 号为豆科植物甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth; 19~31、49、52 号为豆科植物峨眉葛 *Pueraria omeiensis* Wang et Tang; 32~44、62~71 号为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi。

表 1 药材样品信息

Table 1 Information of medicinal material sample

编号	样品名称	样品来源	编号	样品名称	样品来源	编号	样品名称	样品来源
1	甘葛藤	自采/苍溪歧坪/野生	26	峨眉葛	自采/雷波雷池/野生	49	峨眉葛	成都荷花池药材市场/峨眉/熏硫
2	甘葛藤	自采/旺苍龙凤/野生	25	峨眉葛	自采/峨眉市峨眉山/野生	50	甘葛藤	成都荷花池药材市场/简阳/熏硫
3	甘葛藤	自采/大竹双溪/种植	27	峨眉葛	自采/金阳大兴/野生	51	甘葛藤	成都荷花池药材市场/江油/熏硫
4	甘葛藤	自采/渠县大石/野生	28	峨眉葛	自采/横峰青板/种植	52	峨眉葛	成都荷花池药材市场/绵阳
5	甘葛藤	自采/峨眉双福/种植	29	峨眉葛	自采/横峰葛源/种植	53	甘葛藤	成都荷花池药材市场/彭州
6	甘葛藤	自采/仁寿青冈/种植	30	峨眉葛	自采/绵阳新桥/种植	54	甘葛藤	成都荷花池药材市场/青川/熏硫
7	甘葛藤	自采/广安永兴/引种	31	峨眉葛	自采/绵阳新桥/种植	55	甘葛藤	成都荷花池药材市场/四川/熏硫
8	甘葛藤	自采/简阳草池/野生	32	野葛	自采/平武白马/野生	56	甘葛藤	成都荷花池药材市场/中江/熏硫
9	甘葛藤	自采/江油永胜/野生	33	野葛	自采/青川清溪/野生	57	甘葛藤	成都荷花池药材市场/资阳/熏硫
10	甘葛藤	自采/绵阳玉河/野生	34	野葛	自采/平武古城/野生	58	甘葛藤	成都荷花池药材市场/资阳
11	甘葛藤	自采/彭州红颜/野生	35	野葛	自采/平武阔达/野生	59	甘葛藤	成都荷花池药材市场/广西/熏硫
12	甘葛藤	自采/青川清溪/野生	36	野葛	自采/北川高川/野生	60	甘葛藤	成都荷花池药材市场/广西/熏硫
13	甘葛藤	自采/射洪复兴/野生	37	野葛	自采/北川桂渡/野生	61	甘葛藤	成都荷花池药材市场/重庆
14	甘葛藤	自采/新津文井/引种	38	野葛	自采/雷波雷池/野生	62	野葛	成都荷花池药材市场/广元
15	甘葛藤	自采/中江永安/野生	39	野葛	自采/金阳大兴/野生	63	野葛	成都荷花池药材市场/广元
16	甘葛藤	自采/资阳保和/野生	40	野葛	自采/苍溪歧坪/野生	64	野葛	成都荷花池药材市场/青白江
17	甘葛藤	自采/阆中五马/种植	41	野葛	自采/旺苍龙凤/野生	65	野葛	成都荷花池药材市场/平武
18	甘葛藤	自采/温江基地/种植	42	野葛	自采/青白江姚渡/野生	66	野葛	成都荷花池药材市场/平武
19	峨眉葛	自采/阆中五马/种植	43	野葛	自采/米易南坝/野生	67	野葛	成都荷花池药材市场/北川
20	峨眉葛	自采/温江基地/种植	44	野葛	自采/会东新山/野生	68	野葛	成都荷花池药材市场/北川
21	峨眉葛	自采/苍溪歧坪/野生	45	甘葛藤	成都荷花池药材市场/广元	69	野葛	成都荷花池药材市场/平武
22	峨眉葛	自采/旺苍龙凤/野生	46	甘葛藤	成都荷花池药材市场/达州	70	野葛	成都荷花池药材市场/攀枝花
23	峨眉葛	自采/苍溪元坝/野生	47	甘葛藤	成都荷花池药材市场/达州/熏硫	71	野葛	成都荷花池药材市场/攀枝花
24	峨眉葛	自采/旺苍盐河/野生	48	甘葛藤	成都荷花池药材市场/峨眉/熏硫			

1.2 仪器

Agilent Technologies 1290 Infinity 液相色谱系统(美国 Agilent 公司), A580 型双光束紫外可见分光光度计[翱艺仪器(上海)有限公司], SQP 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], SB-3200DTD 型超声仪(宁波新艺超声设备有限公司), HWS-26 型电恒温水浴锅(上海-恒科技有限公司), SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

2 方法与结果

2.1 6 个成分的 UPLC-DAD 测定方法

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素对照品适量, 精密称定, 用 50%乙醇配制成质量浓度为 0.140 1、0.105 1、0.156 0、0.150 1、0.136 0、0.160 1 mg/mL, 低温避光保存得到对照品储备液。

精密移取对照储备液适量, 加 50%乙醇制成含 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素的质量浓度分别为 11.200、42.010、12.300、7.800、2.720、1.980 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取葛根(野葛)供试品 0.5 g 和粉葛(甘葛藤、峨眉葛)供试品 1 g, 分别加 100 倍 50%和 70%乙醇, 50 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 30 min, 冷却, 用溶剂补足质量, 滤过, 即得。

2.1.3 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (5 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm), 乙腈-0.1%乙酸水溶液作为流动相洗脱, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 0.4 mL/min, 葛根药材进样 0.5 μL , 粉葛药材进样 2.0 μL , 按表 2 梯度洗脱。检测波长: 2~4.5 min, 250 nm (3'-羟基葛根素); 4.5~6 min, 256 nm (葛根素); 6~9 min, 250 nm (大豆苷); 9~12 min, 260 nm (染料木苷); 12~14 min, 248 nm (大豆苷元); 14~18 min, 260 nm (染料木素)。

2.1.4 线性关系 分别精密移取“2.1.1”项下的混合对照品溶液适量, 用 50%乙醇稀释成不同质量浓

度的溶液, 每个质量浓度按“2.1.3”项下条件平行进样 3 次。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 3。

表 3 6 个对照品线性回归结果

Table 3 Substance linear regression results of six reference

对照品	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
3'-羟基葛根素	$Y=50\,417X+17\,730$	0.999 9	0.448 1~ 63.62
葛根素	$Y=48\,287X+83\,274$	0.999 9	2.954 0~118.10
大豆苷	$Y=50\,096X+23\,149$	0.999 8	0.492 3~ 68.35
大豆苷元	$Y=55\,932X+29\,990$	0.999 9	0.312 7~ 64.14
染料木苷	$Y=64\,484X+36\,934$	0.999 9	0.272 2~106.40
染料木素	$Y=64\,109X+91\,472$	0.999 7	0.198 4~ 65.65

2.1.5 方法学考察^[11-13] 实验对仪器进样精密度、重现性、稳定性及加样回收率进行了考察, RSD ($n=5$) 值均小于 3.0%, 供试品溶液中上述 6 个成分在 24 h 内稳定性良好, 平均加样回收率为 98.5%, 表明仪器精密度良好, 该方法重复性、加样回收率良好, 方法可行。

2.1.6 样品测定 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”色谱条件进行测定, 计算各样品中 6 个成分的含量, 结果见表 4。

《中国药典》2015 年版规定粉葛中葛根素 $\geq$ 0.3%, 葛根中葛根素 $\geq$ 2.4%, 葛根、粉葛样品质量分数在 0.853 1~6.135 0 mg/g, 1、2、4、8、9、10、13 号样品含量符合药典规定, 分别产自苍溪、旺苍、渠县、江油、简阳、绵阳、射洪, 葛根素质量分数均高于 0.3%, 其余粉葛样品含量不符合规定; 峨眉葛样品质量分数在 1.045~9.012 mg/g, 野生峨眉葛样品质量分数高于 0.3%, 人工种植峨眉葛 19、20、29、30、31 号样品中葛根素含量与种植粉葛相近, 但含量低于 0.3%, 不符合药典要求; 葛根样品含量在 20.56~47.31 mg/g, 除 38、39 号样品含量低于 2.4%外, 其余葛根样品含量均符合《中国药典》2015 年版要求, 以 32~37 样品葛根素量较高, 分别产自平武、青川、北川地区。

商品药材中葛根素量存在不符合《中国药典》2015 年版规定的情况, 46、48、49、53、54、59、60 号粉葛商品样品葛根素量低于 0.3%, 其余样品均符合规定; 葛根商品样品中除 70 号样品量低于 2.4%, 其余样品均符合规定。商品药材各成分含量存在差异, 与其相对应产地对口药材相近。

表 2 洗脱梯度

Table 2 Gradient chromatography

t/min	乙腈/%	0.1%乙酸水溶液/%
0	4	96
2	10	90
8	10	90
16	25	75
18	42	58

表 4 样品中 6 个成分测定结果 ($n = 3$)
Table 4 Assay results of six components in sample ($n = 3$)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
	3'-羟基葛根素	葛根素	大豆苷	染料木苷	大豆苷元	染料木素	
1	0.736 50	3.062 00	0.576 60	0.321 50	1.138 00	0.114 70	1.293 00
2	0.731 50	3.125 00	0.564 20	0.302 60	1.125 00	0.116 50	1.341 00
3	0.063 12	0.858 30	0.241 60	0.131 50	0.732 80	0.058 07	1.360 00
4	0.239 20	4.126 00	0.854 80	0.543 70	0.369 00	0.139 70	1.303 00
5	0.041 27	0.885 50	0.302 10	0.027 51	0.017 31	0.219 20	2.463 00
6	0.024 13	0.853 10	0.298 80	0.016 42	0.016 48	0.226 90	2.261 00
7	0.014 61	1.741 00	0.339 80	0.205 90	0.962 60	0.095 54	1.630 00
8	0.540 60	6.135 00	1.247 00	0.675 60	0.701 80	0.150 10	1.153 00
9	0.685 20	5.485 00	1.465 00	0.610 70	0.750 70	0.237 40	1.369 00
10	0.423 30	3.105 00	1.379 00	0.279 20	0.546 90	0.232 50	1.567 00
11	0.024 13	1.071 00	0.426 90	0.016 25	0.165 30	0.111 30	2.019 00
12	0.018 42	1.370 00	0.017 50	1.447 00	0.282 20	0.062 96	2.225 00
13	0.496 10	3.571 00	0.623 70	0.484 10	0.976 30	0.155 80	1.540 00
14	0.138 30	2.216 00	0.283 80	0.203 80	1.121 00	0.115 80	2.030 00
15	0.015 47	1.281 00	0.226 10	0.168 20	0.127 00	0.282 40	1.860 00
16	0.805 50	1.522 00	0.521 40	0.198 40	0.446 80	0.128 50	1.281 00
17	0.158 40	1.608 00	0.294 80	0.218 80	0.215 70	0.138 20	1.737 00
18	0.180 50	2.659 00	0.465 50	0.281 00	0.120 10	0.138 40	1.667 00
19	0.136 80	2.268 00	0.329 90	0.363 80	0.807 90	0.109 90	2.173 00
20	0.146 10	2.413 00	0.412 00	0.341 70	0.812 70	0.214 30	1.705 00
21	0.021 49	1.067 00	0.282 90	0.137 20	0.662 10	0.106 50	1.165 00
22	0.024 18	1.045 00	0.253 10	0.146 10	0.556 10	0.142 10	1.265 00
23	1.445 00	9.201 00	2.677 00	0.790 10	3.857 00	0.301 60	1.265 00
24	1.253 00	9.012 00	2.243 00	0.713 10	3.804 00	0.291 80	1.235 00
25	1.012 00	6.412 00	2.046 00	0.453 70	2.847 00	0.274 90	1.070 00
26	1.102 00	7.241 00	2.191 00	0.457 20	2.762 00	0.245 00	1.106 00
27	1.117 00	7.542 00	2.173 00	0.431 60	2.815 00	0.257 30	1.216 00
28	0.346 10	3.213 00	0.512 00	0.541 70	0.712 70	0.314 30	1.707 00
29	0.354 70	3.156 00	0.567 10	0.512 80	0.674 20	0.289 20	1.757 00
30	0.294 60	3.014 00	0.415 60	0.348 10	0.467 90	0.297 60	1.807 00
31	0.221 90	3.102 00	0.456 70	0.389 70	0.486 40	0.312 90	1.867 00
32	22.270 00	35.590 00	11.830 00	2.765 00	6.785 00	1.039 00	0.711 00
33	18.700 00	47.310 00	18.040 00	3.213 00	3.477 00	1.748 00	0.581 00
34	15.920 00	45.430 00	19.950 00	2.795 00	4.504 00	1.481 00	0.732 00
35	7.049 00	32.340 00	6.750 00	2.536 00	5.246 00	0.824 00	0.787 00
36	17.420 00	44.510 00	19.050 00	5.341 00	4.255 00	1.458 00	0.553 10
37	17.560 00	44.580 00	19.320 00	5.245 00	4.174 00	1.441 00	0.364 10
38	8.913 00	21.797 00	2.018 00	2.677 00	5.008 00	0.795 00	1.092 00
39	8.879 00	20.560 00	2.231 00	2.687 00	5.102 00	0.841 00	1.112 00

续表 4

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
	3'-羟基葛根素	葛根素	大豆苷	染料木苷	大豆苷元	染料木素	
40	12.680 00	38.940 00	11.340 00	15.650 00	6.552 00	0.773 40	0.892 00
41	12.640 00	37.820 00	11.210 00	15.120 00	6.312 00	0.755 60	0.822 00
42	11.890 00	37.940 00	11.340 00	2.567 00	6.276 00	0.518 80	0.841 00
43	8.290 00	24.290 00	5.508 00	2.064 00	5.202 00	0.519 90	0.991 00
44	8.974 00	25.610 00	5.671 00	2.314 00	5.621 00	0.512 30	0.951 00
45	0.760 70	3.184 00	0.610 10	0.334 60	1.175 00	0.121 30	1.243 00
46	0.013 25	0.944 40	0.258 70	0.136 70	0.738 30	0.062 81	1.351 00
47	0.255 60	4.638 00	0.896 40	0.587 10	0.385 60	0.147 90	1.313 00
48	0.021 46	0.896 40	0.301 70	0.017 21	0.015 18	0.224 00	2.363 00
49	0.016 49	0.846 90	0.324 10	0.015 24	0.017 46	0.245 80	2.231 00
50	0.531 40	6.249 00	1.232 00	0.666 80	0.692 50	0.145 50	1.143 00
51	0.713 80	5.813 00	1.485 00	0.613 70	0.575 00	0.240 90	1.469 00
52	0.428 40	3.236 00	1.395 00	0.283 40	0.553 80	0.233 20	1.517 00
53	0.016 24	0.934 50	0.348 80	0.019 97	0.143 70	0.114 90	2.119 00
54	0.021 43	1.356 00	0.018 74	0.144 90	0.282 20	0.064 88	2.325 00
55	0.438 90	5.210 00	0.826 30	0.963 90	1.137 00	0.190 30	1.607 00
56	0.125 40	3.057 00	0.296 10	0.433 70	0.416 50	0.103 60	1.734 00
57	0.761 40	5.089 00	0.477 10	0.183 70	0.443 00	0.167 90	1.492 00
58	0.757 80	5.449 00	0.570 30	0.269 90	0.446 90	0.165 40	1.281 00
59	0.017 71	1.439 00	0.301 90	0.180 90	0.848 20	0.088 83	1.423 00
60	0.011 42	1.555 00	0.268 00	0.177 40	0.854 10	0.087 09	1.545 00
61	0.464 70	3.591 00	1.476 00	0.327 90	0.636 60	0.250 80	1.417 00
62	13.470 00	34.430 00	13.570 00	2.235 00	3.382 00	1.765 00	0.685 10
63	13.410 00	36.590 00	13.270 00	2.523 00	3.451 00	1.573 00	0.679 00
64	11.760 00	37.850 00	11.230 00	2.513 00	6.261 00	0.499 30	0.841 10
65	18.700 00	47.310 00	17.710 00	3.052 00	4.391 00	1.371 00	0.312 00
66	22.070 00	35.360 00	11.820 00	2.693 00	4.557 00	0.798 00	0.414 10
67	16.450 00	44.550 00	19.350 00	5.322 00	4.255 00	1.499 00	0.354 00
68	17.230 00	47.550 00	19.250 00	5.346 00	6.962 00	1.458 00	0.304 00
69	15.870 00	45.360 00	19.860 00	2.608 00	5.052 00	1.571 00	0.767 00
70	7.354 00	23.440 00	5.278 00	2.064 00	5.165 00	0.514 70	0.991 00
71	7.843 00	25.460 00	5.541 00	2.156 00	5.315 00	0.524 50	1.109 00

2.1.7 成分相关性分析 应用 DPS 数据处理系统软件分析 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素之间的相关性, 结果见表 5。各成分之间在含量上存在相互影响, 3'-羟基葛根素与染料木苷呈负相关, 与其他成分均存正相关性, 与葛根素正相关最显著; 葛根素与各成分之间均呈正相关, 与大豆苷元正相关性最显著, 其次大豆苷; 大豆苷与染料木苷和大豆苷元呈负相关, 与其他成分均呈正相

关, 与葛根素正相关性最显著; 染料木苷与葛根素呈正相关, 与其他成分均呈负相关; 大豆苷元与大豆苷、染料木苷、染料木素呈负相关, 与 3'-羟基葛根素、葛根素呈正相关, 与葛根素正相关最显著; 染料木素与大豆苷元、染料木苷呈负相关, 与其他成分呈正相关, 与葛根素相关最显著。3'-羟基葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素与葛根素都具有较高的相关性, 可见葛根素在药材中的含量对其他成分的含量

表 5 相关性分析结果
Table 5 Correlation analysis results

成分	3'-羟基葛根素	葛根素	大豆苷	染料木苷	大豆苷元	染料木素
3'-羟基葛根素	—	0.369 9	0.067 4	-0.169 2	0.097 0	0.102 5
葛根素	0.362 0	—	0.783 2	0.348 6	0.810 4	0.421 1
大豆苷	0.069 8	0.783 2	—	-0.121 4	-0.595 3	0.090 4
染料木苷	-0.163 5	0.379 3	-0.117 3	—	-0.022 5	-0.232 1
大豆苷元	0.103 4	0.809 7	-0.647 2	-0.021 7	—	-0.361 9
染料木素	0.109 3	0.388 1	0.090 3	-0.236 9	-0.369 4	—

影响显著。染料木苷和大豆苷元与其他成分之间存在显著的负相关,可见染料木苷和大豆苷元在药材中的含量对其他成分的含量影响也较显著。

2.2 抗氧化活性评价

不同产地的不同品种葛根类药材中所含 6 个成分含量存在差异,中药成分复杂,功效较多,往往是多种成分综合作用的结果,仅以葛根素单一成分含量不能客观地反映药材质量情况。所以本实验将抗氧化活性评价引入质检,以 6 个成分含量与其抗氧化活性相结合,并采用综合加权评分法、聚类分析法综合评价分析样品质量。

本实验以 DPPH 的清除率研究样品的抗氧化活性, DPPH 自由基清除能力用 IC_{50} 值表示, IC_{50} 值定义为 DPPH 清除率为 50% 时所需药物浓度,根据不同浓度药物的清除率做回归曲线得出 IC_{50} 值, IC_{50} 值越小,抗氧化活性越强。

2.2.1 供试品溶液制备 精密称取葛根(32 号)、粉葛(1 号)样品 1 g,加蒸馏水、10%、30%、50%、70%乙醇 100 mL, 50 °C 超声 30 min,冷却,用相应溶剂补足质量,滤过即得。

2.2.2 DPPH 溶液的制备 精密称取 DPPH 适量,置于 100 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并定容至 100 mL,得 0.201 g/L DPPH 甲醇溶液低温避光保存。

2.2.3 VC 溶液的制备 称取 10 mg 的 VC 对照品,精密称定,用蒸馏水溶解并定容至 10 mL 棕色量瓶中,即得质量浓度为 1.0 g/L 的 VC 溶液,现用现配。

2.2.4 DPPH 线性关系的考察 精密量取“2.2.2”项下现配的 DPPH 溶液适量,于波长 516 nm 处测定吸光度(A)值,以 A 值为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,进行线性回归分析,得回归方程 $A=32.837 C+0.056 58$, $R^2=0.999 8$,表明 DPPH 在 4.020~80.40 mg/L 线性良好。

2.2.5 DPPH 自由基清除能力 将“2.1.1”项下 6

个对照品和“2.2.1”项下供试品稀释成不同浓度,以 VC 为对照。取不同质量浓度的待测液 1 mL,加入质量浓度为 16.08 mg/L 的 DPPH 溶液 3 mL,立即摇匀,25 °C 避光反应 30 min 后,于波长 516 nm 处测定 A 值。计算 DPPH 清除率(I)。

$$I=1-(A_i-A_j)/A_0$$

A_0 为未加试样 DPPH 甲醇溶液的 A 值; A_i 为样品与 DPPH 反应后的 A 值; A_j 为样品的 A 值

表 6 中结果表明,各提取物的 IC_{50} 值,葛根以 50%乙醇提取物的抗氧化活性最强,粉葛以 70%乙醇提取物抗氧化活性最强。各成分的抗氧化活性强弱顺序为 3'-羟基葛根素>VC>染料木苷>大豆苷>染料木素>大豆苷>葛根素。

表 6 不同样品提取液溶液 IC_{50} ($n=3$)

Table 6 Sample IC_{50} for different extracts ($n=3$)

葛根	$IC_{50}(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	粉葛	$IC_{50}(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
水提取溶液	0.482 0	水提取溶液	3.673 0
10%乙醇提取溶液	1.233 0	10%乙醇提取溶液	8.390 0
30%乙醇提取溶液	0.830 0	30%乙醇提取溶液	12.364 0
50%乙醇提取溶液	0.315 0	50%乙醇提取溶液	5.214 0
70%乙醇提取溶液	0.418 0	70%乙醇提取溶液	3.093 0

2.2.6 葛根、粉葛抗氧化活性评价 取“2.2.1”项下葛根 50%乙醇提取物和粉葛 70%乙醇提取物作供试品,将提取溶液稀释成 7 个不同质量浓度的溶液,按“2.2.5”项下方法,用 8.04 mg/L 的 DPPH 溶液,进行抗氧化活性评价。按“2.2.5”项下方法计算各浓度样品的 DPPH 清除率,回归分析并计算各样品 IC_{50} 值时相对药材质量量化的质量浓度(表 4)。

2.3 6 个成分含量与 IC_{50} 值之间的相关性分析

应用 DPS 处理分析软件对 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素含量与 IC_{50} 之间的相关性进行分析,结果显示 6 个成分含量与 IC_{50} 的相关性分别为-0.804 1、-0.830 1、-0.787 2、

-0.520 3、-0.779 4、-0.735 5，表明 6 个成分含量与 IC₅₀ 呈现出显著的负相关，葛根素含量与 IC₅₀ 的相关性最显著，其次为 3'-羟基葛根素。

2.4 综合加权评分

分析统计中国知网数据库、万方数据库、Springer 外文数据库中 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素 6 个成分药理活性相关的文献数据^[3-31]，并在文献研究的基础上，结合抗氧化活性评价结果，对 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素含量和 IC₅₀ 值 7 个指标赋予主观权重系数 (α)，分别 0.150、0.300、0.100、0.100、0.120、0.100、0.130 进行综合评分。将原始数据进行标准化处理，通过 SPSS 22 软件计算各指标的客观权重系数 (β)，分别为 0.156、0.250、0.135、0.105、0.142、0.103、0.109。为了既兼顾对主观赋权法和客观赋权法的偏好，又充分利用主观赋权法和客观赋权法各自带来的信息，达到主客观的统一，并取偏好系数 $\mu=0.5$ ，通过公式计算综合权重 (w)^[32]：

$$w = \mu \times \alpha_1 + (1 - \mu) \beta_1, \mu \times \alpha_2 + (1 - \mu) \beta_2, \dots, \mu \times \alpha_n + (1 - \mu) \beta_n$$

得到各项指标的 w 分别为 0.153、0.275、0.118、0.103、0.131、0.102、0.120。

综合加权评分结果见表 7，评分结果采用 SPSS 质量控制分析 (图 1)。将粉葛评分分为 3 个等级，I 等 (评分 ≥ 13)，II 等 ($9 \leq \text{评分} < 13$)，III 等 (评分 < 9)。粉葛对口药材 8、9 为 I 等，分别产自简阳、江油；1、2、4、10、13 为 II 等，分别产自苍溪、旺苍、渠县、绵阳、射洪；其余粉葛对口药材，评分均低于 9，为 III 等；人工种植峨眉葛对口药材样品评分低于 9，等级为 III 等，野生峨眉葛为 20.21~24.36，等级为 I 等；粉葛商品药材 50、51 为 I 等；45、47、52、55、58、61 为 II 等，46、48、49、53、54、56、59、60 为 III 等。

将葛根评分分为 3 个等级，I 等 (评分 ≥ 80)，II 等 ($80 > \text{评分} \geq 60$)，III 等 (评分 < 60)。葛根对口药材 33、34、35、36、37 评分为 I 等，分别产自平武白马、青川清溪、平武阔达、平武古城、北川高川、北川桂溪；40、41、42 评分为 II 等，分别产自苍溪歧坪、旺苍龙凤、青白江姚渡；38、39、43、44 评分为 3 等，分别产自凉山雷波、凉山金阳、米易南坝、会东新山。葛根商品药材 65、

表 7 综合加权评分结果

Table 7 Results of comprehensive weighted score

样品编号	评分	样品编号	评分
1	11.71	37	90.17
2	11.42	38	46.25
3	7.91	39	45.98
4	11.23	40	66.20
5	1.20	41	65.17
6	2.32	42	65.25
7	7.75	43	47.46
8	14.63	44	50.25
9	13.76	45	12.23
10	9.97	46	8.03
11	3.46	47	11.68
12	4.94	48	1.76
13	11.15	49	2.61
14	6.26	50	14.68
15	5.59	51	13.13
16	9.42	52	10.37
17	6.01	53	2.76
18	7.08	54	1.87
19	5.20	55	12.86
20	8.55	56	7.45
21	9.28	57	10.49
22	8.72	58	12.09
23	24.36	59	8.40
24	23.72	60	7.76
25	20.42	61	11.55
26	20.52	62	67.81
27	20.21	63	68.43
28	10.00	64	64.79
29	9.45	65	84.65
30	8.29	66	72.06
31	8.19	67	89.11
32	76.47	68	94.14
33	84.18	69	81.87
34	80.99	70	46.08
35	86.03	71	47.62
36	92.25		

67、68、69 为 I 等，62、63、64、66 为 II 等，70、71 为 III 等。

2.5 聚类分析

应用 SPSS 22 软件，以 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素含量和 IC₅₀ 值 7 个指标，采用组间平均连接，以平方 Euclidean 为各样品相似度计算公式，进行系统聚类分析，结果见图 2。聚类分析将所有样品均分为 3 类，质量顺序为 I>II>III，与综合加权评分结果相似。

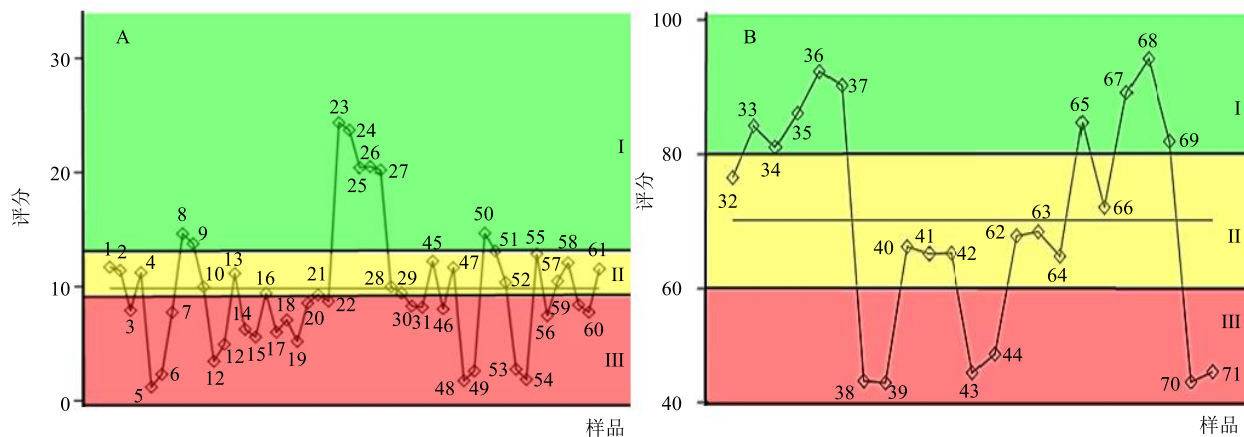


图 1 粉葛 (A) 和葛根 (B) 质量控制分析结果

Fig. 1 Results of quality control analysis about *P. thomsonii* (A) and *P. lobate* (B)

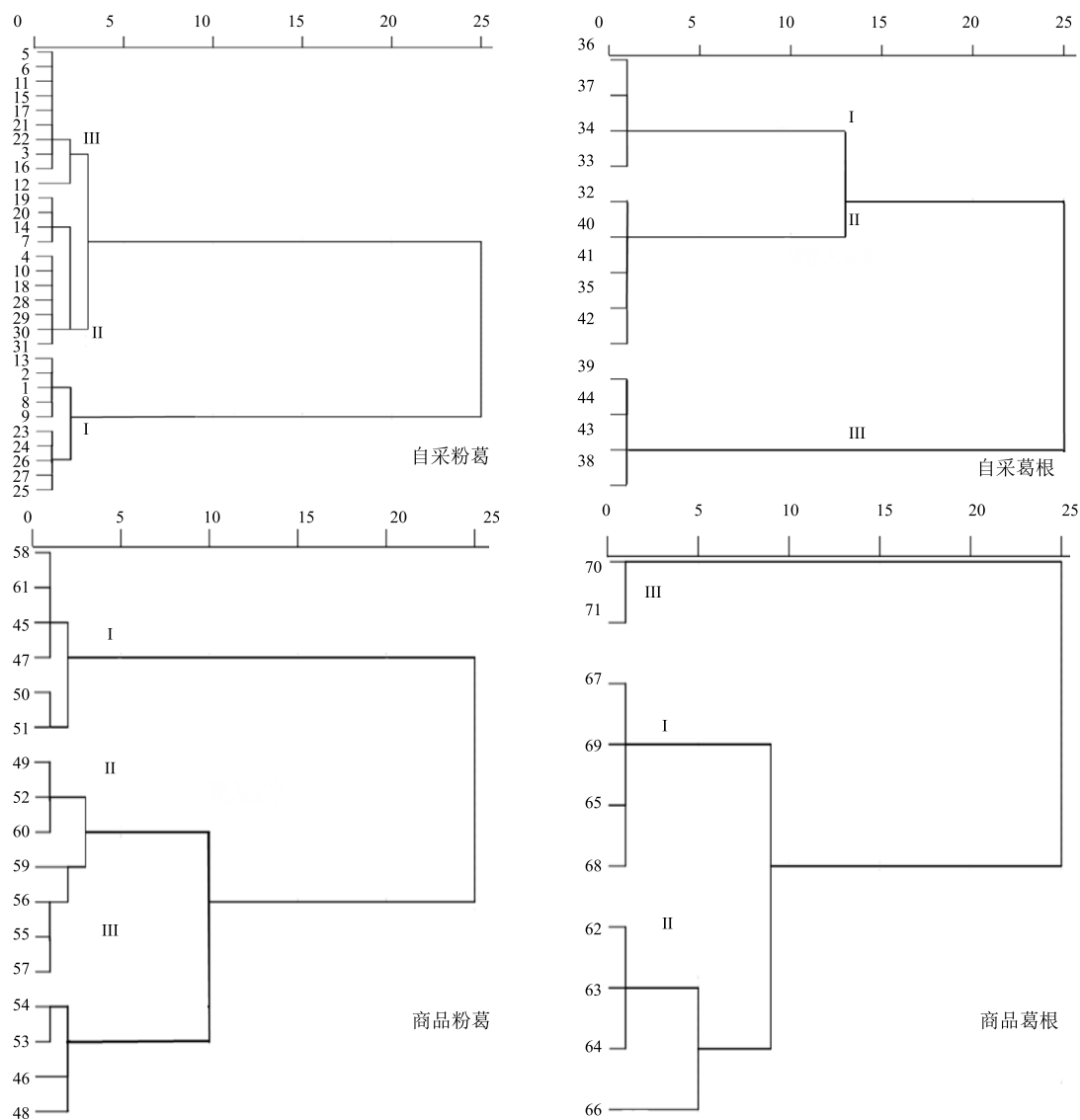


图 2 聚类结果

Fig. 2 Clustering results

3 讨论

通过比较分析各对照品的系统等吸收图,确定了各成分的最大吸收波长,以 UPLC 波长切换测定的峰面积明显增加,表明采用 UPLC 波长切换测定 6 个成分含量更合理。根据葛根、粉葛中成分含量的不同,为了提高测定的准确性,选择了葛根进样量为 0.5 μL ,粉葛进样量为 2.0 μL 。

实验通过测定葛根类药材中 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素 6 种成分含量,结合抗氧化活性评价,综合评价其药材质量。本实验中应用了不同成分的相关性分析、成分与抗氧化活性的相关性分析、综合加权以及聚类分析等分析评价方法,为中药质量评价提供了有益的思路和方法,能够较全面分析药材质量,为葛根类药材质量综合评价提供了参考,具有较好的实际应用价值。葛根、粉葛药材的质量受多方面因素影响,除与产地相关外,还可能与生态条件、生长年限以及取样测定的药材部位等多种因素相关,并且样品的覆盖度、取样代表性也非常重要。下一步研究应该综合考虑药材质量影响因素,注重样品的代表性,增加取样的覆盖度,以多因素结合多指标对药材质量评价进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 楼之岑. 常用中药材品种整理和质量研究 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2003.
- [3] 王小康, 刘清霞, 叶开和, 等. 3'-羟基葛根素对脂肪细胞 3T3-L1 胰岛素抵抗的影响及其机制研究 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2352-2357.
- [4] 楚纪明, 马树运, 李海峰, 等. 葛根有效成分及其药理作用研究进展 [J]. 食品与药品, 2015, 17(2): 142-146.
- [5] 王群林, 李 伟. 葛根素在治疗糖尿病肾病分子作用机制的研究进展 [J]. 中医临床研究, 2016, 8(4): 40-43.
- [6] 徐兆景. 葛根素药理作用机制探讨及临床应用 [J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(8): 256-257.
- [7] 黄志华, 李良东, 韩立民. 染料木素的脑保护作用及机制研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(1): 141-145.
- [8] 翁春艳, 杨 艳, 李晓波. 染料木素抗动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2016, 14(7): 33-34.
- [9] 殷晓煌. 活性氧自由基与老年疾病代谢的关系 [J]. 药物生物技术, 2013, 20(2): 183-185.
- [10] 张翠利, 付丽娜, 杨小云, 等. 活性氧自由基与细胞衰老关系的研究进展 [J]. 广州化工, 2015, 43(19): 4-7.

- [11] 吴文杰, 邓 阳, 谭桂林, 等. 一测多评法测定葛根药材中 5 种异黄酮类成分 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 777-781.
- [12] 王钰乐, 刘 文, 杨道斌, 等. 葛根 UPLC-MS/MS 指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(7): 1541-1544.
- [13] 王紫燕, 李春沁, 穆敏婕, 等. HPLC 波长切换法同时测定补肾活血方中丹参素、葛根素、大豆苷和丹酚酸 B 的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1020-1026.
- [14] 马锦锦, 林娟娜, 魏崧丞, 等. 葛根异黄酮类化合物对 Or-葡萄糖苷酶的抑制作用及构效分析 [J]. 中成药, 2015, 37(4): 858-861.
- [15] 杨 丽, 常笑语, 石 搏. 葛根素对糖尿病大鼠视网膜中 IGF-1 和 TNF- α 表达的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(5): 697-699.
- [16] 刘清霞. 大豆苷改善 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗及其作用机制 [D]. 广州: 暨南大学, 2014.
- [17] 丁同斌, 法宪恩, 简立国, 等. 大豆苷元对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化抑制作用及其机制 [J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(1): 76-78.
- [18] 孙 强. 大豆苷元对大鼠糖皮质激素性骨质疏松的预防作用研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2013.
- [19] 关红亚, 张海风, 宋 石, 等. 大豆苷元激活过氧化物酶体增殖子激活受体 γ 通路抑制人骨肉瘤 MG63 细胞的侵袭和迁移 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(7): 1563-1565.
- [20] Xu X H, Wang J B, Zhang H, *et al.* Puerarin reduces apoptosis in rat hippocampal neurons cultured in high glucose medium by modulating the p38 mitogen activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways [J]. *J Trad Chin Med*, 2015, 36(1): 78-84.
- [21] Chen J C, Chen P Y, Qi H X, *et al.* Puerarin affects bone biomarkers in the serum of rats with intrauterine growth restriction [J]. *J Trad Chin Med*, 2016, 36(2): 211-216.
- [22] 秦灵灵, 桂海水, 徐敬海, 等. 染料木苷对 3T3-L1 脂肪细胞分化以及 AMPK 磷酸化的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(5): 453-456.
- [23] 雷红伟, 陆付耳, 董 慧, 等. 染料木苷对 FFAs 诱导的 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响 [J]. 中西医结合研究, 2010, 2(4): 178-181.
- [24] 贾佩佩, 张晓旭, 张智勇, 等. 染料木苷在大鼠肝微粒体中的代谢及酶促反应动力学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(9): 797-801.
- [25] 宋胜梅, 汤文芳, 郭晓莉, 等. 荧光光谱法研究染料木苷与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 分析科学学报, 2011, 27(4): 459-462.
- [26] Huang H H, Liao D, Liang L P, *et al.* Genistein inhibits

- rotavirus replication and upregulates AQP4 expression in rotavirus-infected Caco-2 cells [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(6): 1421-1433.
- [27] Chatsri D, Sutthasinee P. Activation of chloride secretion by isoflavone genistein in endometrial epithelial cells [J]. *Cellular Physiol Biochem*, 2013, 32(5): 1473-1486.
- [28] Aleksandra G, Zdzisaw K, Wiesaw S, *et al.* Synthetic genistein glycosides inhibiting EGFR phosphorylation enhance the effect of radiation in HCT 116 colon cancer cells [J]. *MolecuLes*, 2014, 19(11): 18558-18573.
- [29] 刘丹凤. 染料木素对高脂饮食诱导的肥胖 ICR 小鼠脂质代谢的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
- [30] Luo X Y, Zhong B L, Hong X, *et al.* Puerarin exerts a delayed inhibitory effect on the proliferation of cardiomyocytes derived from murine ES cells via slowing progression through G₂/M phase [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(4): 1333-1342.
- [31] Hang X Z, Liu Y J, Han Q L. Puerarin attenuates cardiac hypertrophy partly through increasing Mir-15b/195 expression and suppressing non-canonical transforming growth factor beta (Tgfb) signal pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 1516-1523.
- [32] 陶菊春, 吴建民. 综合加权评分法的综合权重确定新探 [J]. *系统工程理论与实践*, 2001(8): 44-48.