

· 方药研究 ·

安徽“粉性葛”与“柴性葛”中6种
异黄酮类化合物含量比较刘毅^{1,2}, 尹旻臻², 徐涛², 段海燕², 程铭恩²

(1. 安庆医药高等专科学校, 安徽 安庆 246052; 2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 采用高效液相色谱法同时测定安徽省“粉性葛”与“柴性葛”中6种异黄酮化合物含量。方法 采用 Agilent Zorbax XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 流动相为甲醇(A)-0.2%醋酸水(B), 0.8 mL/min 梯度洗脱, 检测波长 250 nm, 柱温 30 ℃。结果 26批葛根样品中6种异黄酮化合物在48 min内完全分离且线性关系良好($r>0.999$), 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元的平均回收率分别为 98.6%、103.4%、98.5%、102.1%、105.9%、100.7% ($n=6$)。聚类分析和主成分分析结果表明, “粉性葛”与“柴性葛”分别聚为两类。结论 “粉性葛”与“柴性葛”中异黄酮类化合物的含量有差异, 其中, “粉性葛”中葛根素含量较“柴性葛”偏低。

[关键词]葛根; 粉性葛; 柴性葛; 异黄酮; 高效液相色谱法

[中图分类号]R927.2; R284 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.05.019

葛根, 始载于《神农本草经》, 来源于豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 具有解肌退热、透疹、生津止渴等功效^[1-2]。据文献报道, 葛根中含有丰富的异黄酮类化合物^[3-4], 具有很好的扩张冠状动脉, 降低心肌耗氧量等药理活性^[4-8]。安徽省是葛根的主产区之一^[9], 尤以大别山区和皖南山区产量大^[10]。有文献报道不同产地的葛根品质存在较大差异^[11-13], 其中安徽省不同产地的葛根中异黄酮化合物含量差异也较大。在产地调查过程中, 发现葛根存在两种类型。一种葛的根系庞大, 块根扭曲, 形状不规则, 纤维较多, 药农称之为“柴性葛”; 另一种葛的块根分枝少, 常呈纺锤形, 粉性较强, 药农称之为“粉性葛”^[14]。其中“粉性葛”并非是粉葛, 而是野葛中粉性较强的类型。药农认为“粉性根”质量较差, 而葛根的性状与其质量的相关性尚不清楚, 有必要对“粉性葛”与“柴性葛”进行质量评价。

本研究采用高效液相色谱法同时测定葛根中3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元的含量, 比较安徽省“粉性葛”与“柴性葛”中这6种成分的含量, 为安徽地区葛

根品质评价和资源利用提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(真空脱气装置、二元泵、ALS、TCC、DAD 和 Chemstation 工作站); Agilent 公司; Agilent Zorbax XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 美国 Agilent 公司; BP211D 电子天平; 德国 Startorius 公司; 恒温烘箱; 上海精宏实验设备有限公司; 杰瑞尔 HH-6 数显恒温水浴锅; 浙江金坛市杰瑞尔电器有限公司; Milli-Q 超纯水仪; 美国 Merck Millipore 公司。

1.2 试剂 3'-羟基葛根素(批号 CFN90236, 纯度≥98%)、葛根素(批号 CFN99169, 纯度≥98%)、3'-甲氧基葛根素(批号 CFN90780, 纯度≥98%)、大豆苷(批号 CFN99101, 纯度≥98%)、大豆苷元(批号 CFN98774, 纯度≥98%); 武汉天植生物技术有限公司; 葛根素芹菜糖苷(批号 G-021-161019, 纯度≥98%); 成都瑞芬斯生物科技有限公司; 甲醇(色谱纯); 美国 TEDIA 公司。

葛根药材于2016年12月采集, 共26批样品, 经安徽中医药大学彭华胜教授鉴定为豆科植物野葛 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] 的根。选取采挖葛根的粗大部位, 45 ℃烘干至恒质量, 粉碎, 过3号筛, 干燥保存。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Agilent Zorbax XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 柱温 30 ℃, 以甲醇(A)-0.2%醋酸水(B)为流动相, 梯度洗脱(0~25 min, 23% A; 25~35 min, 23% A→40% A; 35~

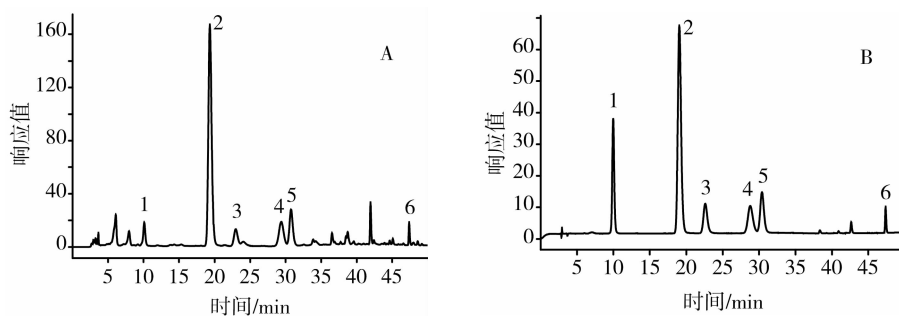
基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2017A296, KJ2019A1235); 安徽省高校优秀青年骨干人才国内访学研修项目(gxgnfx2018094); 安徽省高等学校省级质量工程项目(2018jxtd026)

作者简介:刘毅(1975-), 男, 硕士, 副教授

通信作者:程铭恩(1976-), 女, 硕士, 副教授, chengmingen@yeah.net

48 min, 40% A→65% A; 48~50 min, 65% A→23% A), 流速 0.8 mL/min; 检测波长 250 nm, 进样

量 10 μ L。对照品与样品色谱峰见图 1。



注: 1. 3'-羟基葛根素; 2. 葛根素; 3. 3'-甲氧基葛根素; 4. 葛根素芹菜糖苷; 5. 大豆苷; 6. 大豆苷元

图 1 样品(A)和对照品(B)的高效液相色谱图

2.2 对照品及供试品溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 以 50% 甲醇制备 3'-羟基葛根素 0.080 mg/mL、葛根素 0.16 mg/mL、3'-甲氧基葛根素 0.040 mg/mL、葛根素芹菜糖苷 0.040 mg/mL、大豆苷 0.040 mg/mL、大豆苷元 0.005 mg/mL 混合溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称取葛根样品粉末 0.1 g, 加 30% 乙醇 25 mL, 静置 30 min, 称量, 加热回流 30 min, 冷却至室温, 再次称质量, 用 30% 乙醇水溶液补足减失的量, 取上清液, 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 取“2.2.1”项下各混合对照品溶液, 以 50% 甲醇分别稀释成 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256 浓度混合对照品溶液, 按“2.1”项分别进样 30 μ L 注入液相色谱仪, 测定其峰面积。分别以 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元的浓度(mg/mL)为横坐标(ρ), 峰面积积分为纵坐标(A), 构建峰面积与含量的关系, 得线性回归方程见表 1。

表 1 各成分的线性范围、回归方程和相关系数

成分	回归方程	线性范围	r
3'-羟基葛根素	$A=108.012\rho-78.5770$	0.31~80.0	0.9997
葛根素	$A=148.230\rho+35.2480$	0.62~160.0	1.0000
3'-甲氧基葛根素	$A=79.719\rho+6.2413$	0.15~40.0	0.9999
葛根素芹菜糖苷	$A=95.739\rho+0.4151$	0.15~40.0	1.0000
大豆苷	$A=108.686\rho+4.9417$	0.15~40.0	1.0000
大豆苷元	$A=164.236\rho+1.9575$	0.039~4.0	1.0000

2.3.2 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液, 连续进样分析 6 次, 进样量 10 μ L, 记录色谱图。测得 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元峰面积的 RSD 分别为 1.40%、0.22%、1.84%、0.66%、0.53%、1.79%, 表

明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 按“2.2”项方法制备 6 份供试品溶液, 分别进样 10 μ L; 测得 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元的平均含量分别为 1.60、8.95、1.59、1.94、1.84、0.09 mg/g, 含量的 RSD 分别为 1.98%、1.55%、1.65%、1.54%、1.84%、2.05%, 表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性实验 按“2.2”项方法制备 1 份供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μ L, 测得 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元峰面积值 RSD 分别为 0.28%、0.43%、0.52%、0.14%、0.33%、1.23%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取已知含量的葛根样品粉末(3'-羟基葛根素 1.79%、葛根素 4.83%、3'-甲氧基葛根素 2.28%、葛根素芹菜糖苷 1.31%、大豆苷 1.32%、大豆苷元 0.02%) 0.1 g, 平行称取 6 份, 加入一定量的混合对照品溶液, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下方法测定, 分别计算各组加样回收率[回收率=(实际测得含量-样品中含量)/对照品加入量 \times 100%], 并计算平均值。3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元平均回收率分别为 98.6%、103.4%、98.5%、102.1%、105.9%、100.7%, 表明该实验方法具有良好的加样回收率。

2.4 样品含量测定 取不同性状的葛根样品粉末 0.1 g, 精密称定, 分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 测定混合对照品溶液和供试品溶液, 分别记录 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元的峰面积, 运用外标法计算其干燥品中含量。结果见表 2。

表 2 “粉性葛”与“柴性葛”中 6 种异黄酮含量测定结果

序号	样品编号	产地	3'-羟基 葛根素/%	葛根素/ %	3'-甲氧基 葛根素/%	葛根素芹菜 糖苷/%	大豆苷/ %	大豆苷元/ %
1	AHDZ-1	安徽东至	0.25	3.48		0.21	1.20	0.06
2	AHDZ-2	安徽东至	1.00	5.15	1.11	2.05	0.29	0.01
3	AHDZ-3	安徽东至	1.26	3.84	1.71	1.13	0.45	0.02
4	AHHS-1	安徽黄山	2.05	6.14	1.50	1.25	0.79	0.04
5	AHHS-2	安徽黄山	0.09	5.58	0.71	1.05	0.42	0.19
6	AHMG-1	安徽明光	1.29	8.11	1.47	2.87	0.89	0.02
7	AHMG-2	安徽明光	0.66	5.93	1.10	1.85	0.34	
8	AHMG-3	安徽明光	0.96	5.97	1.26	1.53	0.61	0.01
9	AHNG-1*	安徽宁国	0.25	2.04	0.49	0.62	0.36	0.03
10	AHNG-2*	安徽宁国	0.11	1.57	0.10	0.10	0.12	
11	AHNG-3*	安徽宁国	0.23	2.20	0.10	0.12	0.23	0.01
12	AHQM-1	安徽祁门	0.40	6.86	0.56	1.12	0.54	0.01
13	AHQM-2	安徽祁门	0.17	4.40	0.23	0.55	0.59	0.03
14	AHQY*	安徽青阳	0.10	1.49	0.10	0.11	0.12	
15	AHSS*	安徽宿松	0.07	0.52		0.03	0.09	0.02
16	AHST-1	安徽石台	0.73	3.01	0.83	0.40	0.15	0.02
17	AHST-2	安徽石台	0.24	3.16	0.30	0.54	0.32	0.03
18	AHTC	安徽桐城	0.79	5.27	1.16	1.22	0.56	0.03
19	AHTH-1*	安徽太湖	0.34	1.81	0.48	1.25	0.18	0.01
20	AHTH-2*	安徽太湖	0.25	0.99	0.41	0.99	0.10	0.01
21	AHTL*	安徽铜陵	0.49	0.94	0.24	0.15	0.21	0.01
22	AHWJ*	安徽望江	0.12	0.73		0.02	0.13	0.02
23	AHYX	安徽岳西	0.76	4.14	1.58	1.92	0.49	0.05
24	AHYXQ-1	安徽安庆宜秀区	0.82	4.36	1.09	0.85	0.82	0.02
25	AHYXQ-2	安徽安庆宜秀区	1.44	4.06	1.31	0.90	0.61	0.03
26	AHZY	安徽枞阳	0.32	3.15	0.44	1.42	0.28	0.01

注：“*”表示粉性葛根，空白单元格表示未测出含量

2.5 主成分分析 运用 IBM SPSS 19.0 统计分析软件,对不同性状葛根中 6 种异黄酮化合物做主成分分析。分析结果表明,主成分 1 特征值为 4.20,方差贡献率为 59.99%,主成分 2 特征值为 1.17,方差贡献率为 16.72%,主成分 1 与主成分 2 累计贡献率为 75.25%,表明主成分 1 和主成分 2 代表了 15 个产地的大部分信息。以两个主成分得分做散点图,见图 2。结果显示主成分分析能分别将 AHNG-2、AHQY、AHNG-3、ANTL、AHNG-1、AHTH-1、AHTH-2、AHSS、AHWJ 等聚为一类。

2.6 聚类分析 运用 IBM SPSS 22.0 统计分析软件,“粉性葛”与“柴性葛”样品中 6 种异黄酮化合物的含量运用欧式距离平方计算样品间相似系数,运用 Ward 法聚类分析,建立系统聚类树。由图 3 可知,当距离介于 12.50~25.00 时,可以将 26 个批次分为 2 类, AHNG-2、AHQY、AHNG-3、ANTL、AHNG-1、AHTH-1、AHTH-2、AHSS、AHWJ 为第一类, AHDZ-3、AHYXQ-2、AHYXQ-1、AHYX、

AHST-1、AHST-2、AHZY、AHDZ-1、AHQM-2、AHHS-2、AHQM-1、AHGM-2、AHGM-3、AHDZ-2、AHTC、AHJX、AHMG-1 为第二类。因此 2 类得以区分。从聚类分析结果可以看出其与主成分分析结果具有一致性。

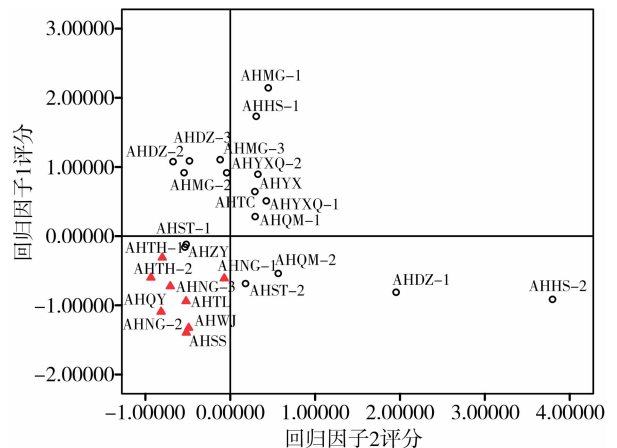


图 2 “粉性葛”与“柴性葛”中 6 种异黄酮含量主成分分析图

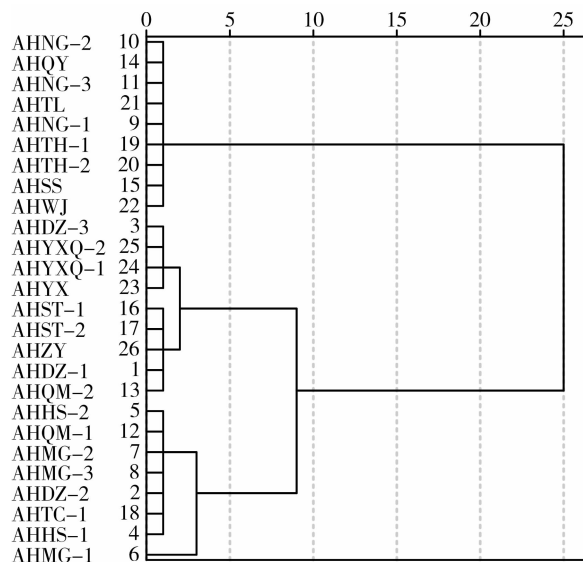


图3 聚类分析树状图

3 讨论

3.1 提取条件的优化 本研究对超声波提取法与加热回流提取法进行了比较,结果表明加热回流提取法所得的异黄酮类成分提取率较高,故选用加热回流提取法。本实验同时考察了不同提取溶剂、不同料液比、不同提取时间,发现以30%乙醇溶液为提取溶剂,采用250倍量,加热回流30 min,可充分将异黄酮类成分提取,说明该提取条件简便、合理、可行。

3.2 检测波长的选择 取3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元的对照品溶液,用紫外分光光度计测定,于190~400 nm波长范围内扫描,结果6种异黄酮成分在250 nm处有最大吸收。因此,将检测波长设定为250 nm。

3.3 流动相的选择 对甲醇-0.1%醋酸水、甲醇-0.2%醋酸水、甲醇-0.5%醋酸水的流动相系统进行考察,结果表明,甲醇-0.2%醋酸水能达到分离度的要求,分离时间合适,最后确定流动相为甲醇(A)-0.2%醋酸水(B),梯度洗脱(0~25 min,23% A;25~35 min,23% A→40% A;35~48 min,40% A→65% A;48~50 min,65% A~23% A)。

3.4 样品测定结果分析 实验结果表明,安徽省不同产地之间葛根中各成分含量差异较大。实验中所测定的15个产地的葛根样品存在两种性状类型:一种纤维性较强,当地药农称之为“柴性葛”;另一种粉性较强,当地称之为“粉性葛”。“柴性葛”与“粉性葛”均来自豆科植物野葛[Pueraria lobata (Willd.) Ohwi],仅在根的粉性强弱上有差异。“粉性葛”的粉性明显较“柴性葛”高,且多为短粗的纺锤形,性状

上易与“柴性葛”区分。

安徽省15个产地中,产于安徽宁国、青阳、太湖、铜陵、望江、宿松的葛根为“粉性葛”类型,异黄酮类成分含量较低,其葛根素含量低于《中华人民共和国药典》规定的2.40%。同为“柴性葛”的类型中,其不同产地“柴性葛”异黄酮含量亦有明显差异,如安徽明光地区的葛根中葛根素含量约8.11%,而安徽宿松地区的葛根中葛根素含量约0.52%,其差异可能受产地因素影响。基于含量测定结果,采用主成分分析和聚类分析对“粉性葛”与“柴性葛”进行分析,结果表明“粉性葛”与“柴性葛”可以在含量成分上进行区分。因此在临床用药时除了需要关注葛根的产地,同时需要关注葛根性状。

葛根为药食两用中药,由于葛根的需求量巨大,野生资源逐渐减少。考虑到“柴性葛”与“粉性葛”不仅粉性上有差异,其所含的异黄酮化合物含量也有明显差异。因此建议食用葛根时应选“粉性葛”,以合理利用其根中丰富的淀粉^[15],而药用的葛根应选用“柴性葛”,以充分利用其丰富的异黄酮化合物含量。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:333.
- [2] 中国植物志编写组. 中国植物志:41卷[M]. 北京:科学出版社,1995:224.
- [3] 李国辉,张庆文,王一涛. 葛根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(23):3156-3160.
- [4] 刘计权,刘亚明,裴香萍,等. 山西产葛根总黄酮及3种异黄酮含量的测定[J]. 中华中医药杂志,2012,27(2):309-312.
- [5] 周国海,于华忠,李国章,等. 葛根中总黄酮及葛根素的含量测定[J]. 湖南林业科技,2004,31(5):71-72.
- [6] 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):141-146.
- [7] JIN S E, YOU K S, MIN B S, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from Pueraria lobata roots [J]. Arch Pharmacol Res, 2012, 35(5):823-837.
- [8] JIANG R W, LAU K M, LAM H M, et al. A comparative study on aqueous root extracts of Pueraria thomsonii and Pueraria lobata by antioxidant assay and HPLC fingerprint analysis[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 96(2):133-138.
- [9] 《安徽植物志》协作组. 安徽植物志:第四卷:被子植物门[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1991:145-146.
- [10] 王慧清. 中药材产销[M]. 成都:四川科学技术出版社,

2007;251-254.

[11] 章军,薛翠娟,荆文光,等. HPLC测定葛根饮片中5个成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):108-111.

[12] 安伟建,夏光成,郭瑞. 不同产地葛根总黄酮含量的比较:简报[J]. 中国中药杂志,1999,24(6):339,380.

[13] 倪从蓉. 高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素、大豆苷元的含量[J]. 新中医,2015,47(2):215-217.

[14] 段海燕,程铭恩,彭华胜,等. 葛块根的异常结构解剖学研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(22):4364-4369.

[15] HUNG P V, MORITA N. Chemical compositions, fine structure and physicochemical properties of kudzu (*Pueraria lobata*) starches from different regions[J]. Food Chem,2007,105(2):749-755.

(收稿日期:2019-05-09;编辑:姚实林)

Comparison of the Content of Six Isoflavones in the Mealy-like Roots and the Wooden-like Roots of *Pueraria lobata* from Anhui Province, China

LIU Yi^{1,2}, YIN Min-zhen², XU Tao², DUAN Hai-yan², CHENG Ming-en²

(1. Anqing Medical and Pharmaceutical College, Anhui Anqing 246052, China; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] Objective To simultaneously determine the content of six isoflavones in the mealy-like roots and the wooden-like roots of *Pueraria lobata* from Anhui Province, China using high-performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** HPLC was performed on an Agilent Zorbax XDB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) with a mobile phase of methanol (A)-0.2% acetic acid (B) for gradient elution, at a flow rate of 0.8 mL/min, a detection wavelength of 250 nm, and a column temperature of 30 °C.

Results In the 26 batches of *Pueraria lobata* roots, the six isoflavones were completely separated within 48 minutes and had a good linear relationship ($r > 0.999$). The average recovery rates of 3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, puerarin celery glycoside, daidzin, and daidzein in *Pueraria lobata* roots were 98.6%, 103.4%, 98.5%, 102.1%, 105.9%, and 100.7%, respectively ($n=6$). The results of the cluster analysis and the principal component analysis showed that the mealy-like roots and the wooden-like roots were divided into two categories. **Conclusion** There is a great difference in the content of isoflavones between the mealy-like roots and the wooden-like roots of *Pueraria lobata*, and the mealy-like roots have a lower content of puerarin than the wooden-like roots.

[Key words] *Pueraria lobata*; Mealy-like root; Wooden-like root; Isoflavone; High-performance liquid chromatography