• 研究论文 •

HPLC-DAD 结合交替三线性分解二阶校正方法进行中药葛根中 主要有效成分同时测定

苏志义 吴海龙* 刘亚娟 许 慧
张 娟 聂重重 俞汝勤

(湖南大学化学化工学院 化学生物传感与计量学国家重点实验室 长沙 410082)

摘要 应用高效液相色谱-二极管阵列联用仪(HPLC-DAD)结合基于交替三线性分解(ATLD)算法的二阶校正方法快速测定了中药葛根样中主要活性成分葛根素、大豆苷和大豆苷元的含量, 实现了同时定量分析. 色谱条件: 甲醇-水(体积比为 53:47), 检测波长范围为 190~380 nm, 柱温为 30 °C, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 20.0 μ L. 预测的实际样中三种目标分析组分葛根素、大豆苷、大豆苷元的含量分别为 (0.465 ± 0.023) , (0.553 ± 0.015) 和 (0.098 ± 0.005) mg/g, 它们的加标回收率分别为 $(101.1 \pm 3.2)\%$, $(100.4 \pm 6.4)\%$ 和 $(100.1 \pm 4.9)\%$.

关键词 二阶校正; 交替三线性分解; HPLC-DAD; 葛根; 葛根素; 大豆苷; 大豆苷元

Simultaneous Determination of Main Effective Constituents in Traditional Chinese Medicine Kudzuvine Root Using HPLC-DAD Coupled with Second-order Calibration Based on Alternating Trilinear Decomposition

Su, Zhiyi Wu, Hailong* Liu, Yajuan Xu, Hui
Zhang, Juan Nie, Chongchong Yu, Ruqin

(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract A method for simultaneously quantifying the main effective constituents such as puerarin, daidzin and daidzein in traditional Chinese medicine kudzuvine root was developed in this paper, by using high performance liquid chromatography coupled with diode array detection (HPLC-DAD) and second-order calibration method based on alternating trilinear decomposition (ATLD) algorithm. Profiting from the application of second-order calibration method, it needs very simple chromatographic conditions. The mobile phase consisted of methanol (53%, ϕ) and water (47%, ϕ), which was pumped at a flow rate of 1.0 mL/min with 20.0 μ L injection volume. The column temperature was set at 30 °C. The range of scanning wavelengths were 190~380 nm. The predicted contents of puerarin, daidzin and daidzein in kudzuvine root samples were (0.465 ± 0.023) , (0.553 ± 0.015) and (0.098 ± 0.005) mg/g, respectively and their spiked recoveries were $(101.3 \pm 3.2)\%$, $(100.4 \pm 6.4)\%$ and $(100.1 \pm 4.9)\%$, respectively.

Keywords second-order calibration; ATLD; HPLC-DAD; kudzuvine root; puerarin; daidzin; daidzein

* E-mail: hlwu@hnu.edu.cn

Received June 30, 2011; revised October 10, 2011; accepted October 25, 2011.

Project was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20775025, 21175041).

国家自然科学基金(Nos. 20775025, 21175041)资助项目.

中药葛根是一种古老而传统的常用中药, 具有发表解肌、升阳透疹、解热生津等功效^[1]. 已作为一种药食两用的材料, 广泛用于中成药及功能食品的开发. 因品种、产地、采摘期等的不同, 葛根中活性成分的含量差异较大, 导致开发用途的不同. 各地作为药用的葛根主要是野葛(也称作柴葛)和粉葛(也称作甘葛藤). 2005 年版《中华人民共和国药典》中, 将入药葛根分为葛根(豆科植物野葛的干燥根)和粉葛(葛根藤的干燥根). 葛根中的主要活性成分包括葛根素(puerarin)、大豆苷(daidzin)和大豆苷元(daidzein), 其中葛根素为本属的特征成分. 它们的结构式如图式 1 所示.

图式 1 葛根素(R=c, R¹=a)、大豆苷(R=b, R¹=d)和大豆苷元(R=c, R¹=d)的结构式

Scheme 1 Structural formula of puerarin (R=c, R¹=a), daidzin (R=b, R¹=d) and daidzein (R=c, R¹=d)

目前文献报道中的分类或鉴别方法多是基于对这些主要活性成分的定量分析, 如裴莉昕^[2]、金文姗^[3]等参照《中国药典》相关条件运用 HPLC 法完成了葛根中多种有效成分的测定, 并以此结果作为不同产地葛根分类标准. 王言才^[4]、迟霏菲^[5]等利用 HPLC 法主要测定了葛根中的葛根素含量以区分不同品种或产地的葛根. 按常规色谱方法, 虽能得到比较满意的结果, 但存在以下两点不足: (1)由于三种目标物质皆属异黄酮类衍生物, 结构相似, 因而要在常规色谱分析中达到基线分离需要足够长的洗脱时间; (2)预处理比较复杂. 由于中药是一个复杂的分析体系, 其中包含有许多未知的干扰, 常规思路是预处理时通过物理或化学的手段尽量去除这些未知的干扰, 以求响应信号的简单化.

结合了二阶校正方法的色谱联用技术, 恰好能克服以上不足, 大大简化测量步骤. 此法的优势在于: (1)预处理简单; (2)允许有部分谱峰重叠的存在. 这些都得益于二阶校正方法所特有的“二阶优势”^[6], 即使有未知干扰物和背景共存, 仍能实现复杂体系中目标分析组分的有效分离定量. 它是以一种“数学分离”的方式来部分代替或强化“物理和化学分离”. 因而, 其定量条件不再强制要求达到基线分离, 也就降低了对色谱分离条件的要求, 使洗脱时间缩短成为可能, 因而能够实现对

复杂体系的快速定量分析.

本工作应用 HPLC-DAD 结合基于 ATLD 算法的二阶校正方法尝试实现中药葛根样中三种主要活性成分的快速测定. 结果显示, 其预处理简单, 单次样本测试所耗时间较短, 可作为快速鉴定葛根种类的可选择方法.

1 方法与原理

1.1 二阶校正方法的三线性模型

一般用于多样本 HPLC-DAD 数据的二阶校正三线性模型可用下式表示:

$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad i=1, 2, \dots, I; j=1, 2, \dots, J; k=1, 2, \dots, K \quad (1)$$

Eq. 1 中 N 为体系总组分数, I 是洗脱时间数据点数, J 为紫外吸收波长点数, K 为样本总数, 含标样和预测样数. x_{ijk} 是三维响应数阵 $\mathbf{x}(I \times J \times K)$ 中的元素, e_{ijk} 是三维残差阵 $\mathbf{E}(I \times J \times K)$ 中的元素. a_{in} 是相对色谱矩阵 $\mathbf{A}(I \times N)$ 中的元素; b_{jn} 是相对光谱矩阵 $\mathbf{B}(J \times N)$ 中的元素; c_{kn} 是相对浓度矩阵 $\mathbf{C}(K \times N)$ 中的元素. 三维响应数阵 $\mathbf{x}$ 是由 HPLC-DAD 得到的 K 个样本的二维矩阵数阵 $(I \times J)$ 按照样品维方向有序堆叠而得到, 其大小为 $I \times J \times K$.

1.2 ATLD 算法

有关 ATLD 算法的内容详见参考文献[7], 其主要思路是利用基于切尾奇异值分解的 Moore-Penrose 广义逆计算和交替迭代来进行三线性数据分解, 使损失函数即残差阵元素的平方和达到极小值. 具体是通过交替分解三维数阵 $\mathbf{x}$ 得到三个相对轮廓矩阵 $\mathbf{A}$, $\mathbf{B}$ 和 $\mathbf{C}$, 再对这三个矩阵作后处理, 就可对照标样含量实现对未知样的定量预测. 该算法具有收敛快速、性能稳定、对组分数不敏感等特点. 中药葛根体系十分复杂从而较难进行准确的组分数估计, 选用 ATLD 算法能够建立起一种快速、稳健的分析方法. 算法的实现及对数据的处理是在 MATLAB 环境中进行的, 操作系统为 Windows XP.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

所用仪器包括: LC-20AT 液相色谱仪(日本, 岛津公司)、SPD-M20A 二极管阵列检测器(DAD)和 Hypersil-ODS (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱. SB3200HE 超声仪, Aquapro 超纯水仪.

所用试剂中, 水为超纯水, 甲醇为色谱纯级别. 葛

根素、大豆苷和大豆苷元标准品购于中国药品生物制品检定所, 中药葛根购于长沙某药店。

2.2 样品的配制

标准品储备液的配制: 在分析天平上分别精确称取葛根素、大豆苷及大豆苷元标准品 9.1、8.9 和 8.2 mg 于三个 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀后备用。

标准品工作液的配制: 依次取葛根素储备液 3.0 mL、大豆苷储备液 2.0 mL、大豆苷元储备液 1.0 mL 于三个 10 mL 容量瓶中, 分别用甲醇稀释定容, 摇匀后备用。

取葛根药材适量, 剪碎, 碾成粉末, 过筛, 备用。

校正样的配制: 分别量取三个标准品工作液配制不同浓度配比的 10 个校正样于 10 个 10 mL 容量瓶中, 依次标记为 1~10。

实际样的配制: 称取不同质量的葛根粉末 7 份于 7 个 10 mL 容量瓶中(分别标记为 1*~7*), 用甲醇溶解, 进行超声处理 1 h, 定容, 摇匀。静置, 取上层清液过 0.45 μm 滤膜, 滤液备用。

加标实际样的配制: 称取不同质量的葛根粉末 7 份于 7 个 10 mL 容量瓶中, 再依次量取一定体积的标准品工作液分别加入这 7 个容量瓶中(分别标记为 1#~7#), 用甲醇溶解, 进行超声处理 1 h, 定容, 摇匀。静置, 取上层清液过 0.45 μm 滤膜, 滤液备用。

2.3 色谱条件

流动相: 甲醇-水(体积比为 53:47), 流速为 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 20.0 μL , 检测波长 190~380 nm, 间隔 2 nm。

3 结果与讨论

单味中药的种属判断需建立在已知待测品为该中药的基础之上, 任何单一的活性成分或指标成分都难有效地评价中药的真伪优劣, 尤其是所检测的指标成分是多种中药的共性成分时, 就更难准确界定种属。若引入多种主要成分的含量的同时测定指标作为参考, 则在一定程度上可以降低待测品不属于目标种属的风险。

在本实验中所采用的简单色谱条件下, 由于目标分析组分间结构相似, 不可避免会出现色谱峰的重叠, 如果用常规色谱定性方法来判断, 可能由于谱峰重叠及未知干扰的影响使得各物质保留时间结果与标准品的有偏差, 将其作为定性依据存在困难。所以本工作采用了由二阶校正方法的三线性分解步骤所得到的纯光谱数据及纯色谱数据分别绘图再与标准品在相同条件下测得的光谱和色谱图形进行对比, 并以相应谱图的重合程

度作为定性依据, 从光谱和色谱两个方面做出更直观更能让人信服的定性结果。接着根据标样含量进行定量分析, 得到预测样含量, 并以加标回收率及算法品质因子来验证和评价本实验所采用的方法。

文献[2~5]中报道过的葛根中三种主要活性成分: 葛根素、大豆苷和大豆苷元的最大紫外吸收波长都在 250 nm 附近, 故选择 250 nm 作为检测时的观测波长。在 250 nm 下, 实际样、加标实际样及校正样的色谱对照图如图 1。

图 1 实际样、加标实际样及校正样的色谱对照图
Figure 1 Contrast figure of chromatographic profiles of spiked sample, actual sample, and calibration sample

此图也反映出了色谱维进行分段解析的必要性。目标分析组分中先出色谱峰的为葛根素和大豆苷, 从图中可见此二者有部分重叠, 需合并作一段进行同时解析; 后出峰的为大豆苷元, 也作为独立一段进行解析, 而且所有目标分析组分可在 7 min 以内出峰完全。

3.1 定性分析

由于三种物质在色谱维上隶属于两个峰群, 为减少显见的已知干扰, 截去部分比较明显的干扰信息区域, 我们按色谱维将数据分为两段, 光谱维上截掉 220 nm 以下干扰较多的远紫外区的信号, 然后分别对这两段数据单独进行解析。

关于解析时组分数选取的说明: 参考核一致诊断^[8]的结果, 前段数据包含两个目标分析组分, 它们各贡献给模型一个因子, 其余信号包括背景、噪声干扰等因相对比例变化不大只为三维数据阵拟合提供了一个因子, 即选取的解析组分数为 3, 得到的结果稳定且令人满意。后段数据包含一个目标分析组分, 其余信号包括背景和噪声干扰等提供一个因子, 即选取的解析组分数为 2, 得到的结果也是令人满意的。

由 ATLD 算法在相应组分数条件下, 解析由 HPLC-DAD 得到的矩阵数据所构成的三维数阵, 解析

出的图谱与由校正样解析出的标准品图谱的对照图如图 2 和图 3.

图 2 解析出的光谱和真实光谱对照图

Figure 2 The contrast figures of resolved spectroscopic profiles and the actual spectroscopic profiles

(a) puerarin and daidzin; (b) daidzein

从图 2 及图 3 可以看出, 算法解析出的色谱、光谱图的轮廓与对照品的色谱、光谱图分别重合较好, 说明从色谱、光谱两个角度上都证明了实际样中葛根素、大豆苷及大豆苷元的存在, 同时也证实被分析的物质确为中药葛根的可能性极大, 作为种属判别依据的结果是可靠的.

3.2 定量分析

所配校正样的浓度范围依次为葛根素 2.73~27.30 $\mu\text{g/mL}$, 大豆苷 1.78~17.80 $\mu\text{g/mL}$, 大豆苷元 0.82~8.20 $\mu\text{g/mL}$. 由 ATLD 算法分解所得到的相对浓度矩阵对照标样含量进行后续回归处理就能够实现定量预测.

本方法得出的葛根实际样中三种有效成分的预测含量如表 1.

对算法的评价用到的是其品质因子, 算法品质因子的计算和纯分析物信号(NAS^[9])密切相关, NAS 被定义为仅与目标分析组分相关的部分信号. 由此涉及的品质

图 3 解析出的色谱和真实色谱对照图

Figure 3 The contrast figures of resolved chromatographic profiles and the actual chromatographic profiles

(a) puerarin and daidzin; (b) daidzein

因子包括: 灵敏度(SEN^[10])、选择性(SEL^[11])、检测限(LOD^[12])及与预测精密度相关的预测均方差(RMSEP^[13])等. 计算的各品质因子见表 2.

3.3 加标回收率试验

加标回收率的计算结果如表 3. 由表中数据可知, 葛根素、大豆苷、大豆苷元的加标回收率范围分别为: $(101.1 \pm 3.2)\%$, $(100.4 \pm 6.4)\%$ 和 $(100.1 \pm 4.9)\%$. 通过查表可得到 t -检验的 t 值, $t_{0.10}^6 = 1.940$. 由 t -检验公式 $t = (\bar{x} - \mu_0) / (s / \sqrt{n})$ 计算得到的三个 t 值分别为 0.897, 0.184, 0.046, 它们均小于 $t_{0.10}^6$. 以上结果表明二阶校正方法得到的结果是可靠的.

4 结论

不同品种的葛根其化学成分的含量差异较大, 对于药用葛根品种的鉴定显得尤为重要. 本工作应用 HPLC-DAD 结合基于 ATLD 算法的二阶校正方法, 能够实现快速、可靠地对中药葛根样中葛根素、大豆苷、大豆苷元的同时定量分析, 其结果令人满意. 该分析策

表1 ATLD 算法分辨获得的实际样中主要活性成分的含量

Table 1 Resolved contents of the main effective constituents in actual samples using ATLD

Sample	Actual value of Kudzu vine root/mg	Content/(mg·g ⁻¹)		
		Puerarin	Daidzin	Daidzein
1*	200.1	0.436	0.563	0.102
2*	200.2	0.489	0.550	0.101
3*	200.0	0.482	0.554	0.093
4*	250.2	0.477	0.574	0.092
5*	250.0	0.482	0.556	0.105
6*	300.2	0.433	0.552	0.096
7*	300.0	0.459	0.525	0.100
Average value		0.465±0.023	0.553±0.015	0.098±0.005

表2 品质因子

Table 2 Figures of merit

Figures of Merit	Puerarin	Daidzin	Daidzein
SEN/(mL·ng ⁻¹)	10.50	5.22	30.70
SEL	0.097	0.104	0.193
LOD/(μg·mL ⁻¹)	1.910	0.449	0.612
RMSEP/(μg·mL ⁻¹)	0.373	0.362	0.100

表3 加标回收率实验的结果

Table 3 The results of spiked recovery experiments

Sample	Actual value of Kudzu vine root/mg	Recovery/%		
		Puerarin	Daidzin	Daidzein
1#	100.1	99.7	107.7	105.6
2#	100.2	106.6	104.8	108.2
3#	100.3	104.4	97.0	95.2
4#	150.0	98.0	101.2	97.0
5#	150.1	100.8	106.5	98.2
6#	200.3	98.0	90.8	97.1
7#	200.0	100.2	95.1	99.3
Average recovery		101.1±3.2	100.4±6.4	100.1±4.9
t (t-test)		0.897	0.184	0.046

略可以作为一种葛根种类快速判别的参考方法。与传统的色谱方法相比,二阶校正的优势在于分析时即使出现了诸如谱峰重叠、存在未知干扰等情况亦同样能够完成对目标分析组分的有效定量,这在一定程度上加强了色谱分析能力。得益于这种优势,该方法可降低对实际体系分析时的预处理要求,色谱条件相对简单(包括流动相组成简单,可等梯度洗脱及可使用非专用色谱柱等),消耗溶剂量相对较少,解析的结果比较稳定。简言之,该方法不仅能给出稳定可靠的预测结果,而且使用的条件易于实现,方法经济,便于推广。

References

- Xu, Y.-E.; Li, Q.-H.; Yang, F.-F. *Jilin J. Tradit. Chin. Med.* **2010**, *30*, 993 (in Chinese).
(徐轶尔, 李秋红, 杨菲菲, 吉林中医药, **2010**, *30*, 993.)
- Pei, L.-X.; Chen, S.-Q.; Ji, B.-Y. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Formulae* **2009**, *15*, 24 (in Chinese).
(裴莉昕, 陈随清, 纪宝玉, 中国实验方剂学杂志, **2009**, *15*, 24.)
- Jin, W.-S.; Tan, Y.-Y.; Chen, Y.-G. *Chin. J. Chin. Mater. Med.* **2003**, *28*, 49 (in Chinese).
(金文珊, 谈钰元, 陈有根, 中国中药杂志, **2003**, *28*, 49.)
- Wang, Y.-C.; Duan, J.-A.; Hua, Y.-Q.; Su, S.-L. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.* **2008**, *19*, 132 (in Chinese).
(王言才, 段金廪, 华永庆, 宿树兰, 时珍国医国药, **2008**, *19*, 132.)
- Chi, J.-F.; Zhang, G.-G. *Central South Pharmacy* **2006**, *4*, 307 (in Chinese).
(迟霁菲, 张国刚, 中南药学, **2006**, *4*, 307.)

1 Xu, Y.-E.; Li, Q.-H.; Yang, F.-F. *Jilin J. Tradit. Chin. Med.*

-
6	Kowalski, B. R.; Seasholtz, M. B. <i>J. Chemom.</i> 1991 , 5, 129.	11	Olivieri, A. C. <i>Anal. Chem.</i> 2005 , 77, 4936.
7	Wu, H.-L.; Shibukawa, M.; Oguma, K. <i>J. Chemom.</i> 1998 , 12, 1.	12	Boqué, R.; Ferré, J.; Faber, N. M. <i>Anal. Chim. Acta</i> 2002 , 451, 313.
8	Bro, R.; Kiers, H. A. L. <i>J. Chemom.</i> 2003 , 17, 274.	13	Lorber, A.; Faber, K.; Kowalski, B. R. <i>Anal. Chem.</i> 1997 , 69, 1620.
9	Lorber, A. <i>Anal. Chem.</i> 1986 , 58, 1167.		
10	Olivieri, A. C.; Faber, N. M. <i>J. Chemom.</i> 2005 , 19, 583.		

(A1106303 Zhao, C.)