

# HPLC 测定 3 种葛根素注射液中葛根素含量

李昌勤<sup>1</sup>, 李丹<sup>1</sup>, 王培卿<sup>1</sup>, 张丹<sup>1</sup>, 康文艺<sup>1</sup>, 程力<sup>2\*</sup>

(1. 河南大学 中药研究所, 河南 开封 475004; 2. 贵阳中医学院 第二附属医院, 贵阳 550003)

[摘要] 目的:应用高效液相色谱法同时测定葛根素注射液、葛根素葡萄糖注射液和葛根素氯化钠注射液中葛根素的含量。方法:采用 Merk, Purospher STAR RP-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-1% 冰乙酸水溶液(25:75), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 29 ℃, 检测波长 250 nm, 进样量 10 μL。结果:对照品葛根素在 0.192~1.152 μg 呈良好曲线关系, 线性回归方程  $Y = 468\ 374X + 3\ 105.25$  ( $r = 0.999\ 8$ ), 平均加样回收率为 99.81%, RSD 0.42%。结论:3 种注射液中的葛根素均可在选定的条件下得到较好的分离, 线性关系良好。该方法简单快速、合理可行, 可为葛根素注射液的质量控制提供科学依据。

[关键词] 高效液相色谱法; 葛根素注射液; 葛根素葡萄糖注射液; 葛根素氯化钠注射液; 葛根素

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)24-0060-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240060

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141106.1500.021.html>

[网络出版时间] 2014-11-06 15:00

## Determination for Content of Puerarin in Three Kinds of Puerarin Injections by HPLC Method

LI Chang-qin<sup>1</sup>, LI Dan<sup>1</sup>, WANG Pei-qing<sup>1</sup>, ZHANG Dan<sup>1</sup>, KANG Wen-yi<sup>1</sup>, CHENG Li<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. The Second Affiliated Hospital, Guiyang Traditional Medical College, Guiyang 550003, China)

[收稿日期] 20131218(005)

[基金项目] 河南省科技厅重点攻关项目(122102310272); 河南大学研究生教育综合改革项目(Y141108)

[第一作者] 李昌勤, 教授, 从事中药学研究, Tel:0371-23880680, E-mail:lcq@henu.edu.cn

[通讯作者] \*程力, 副教授, 硕士, 从事中西医结合妇产科研究, Tel:13984111000, E-mail:839074675@qq.com

**3.2 流动相的选择** 采用梯度洗脱, 以甲醇-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.3% 磷酸水溶液为流动相时, 色谱峰分离效果较差, 选择乙腈-0.3% 乙酸铵水溶液为流动相, 各组分分离好, 基线较稳定, 故经过优化, 选定其为本研究所用梯度洗脱系统。

**3.3 提取条件的选择** 考察了回流提取法和超声提取法, 结果超声提取 20 min 与回流提取 40 min 的提取效率没有明显的差异, 由于超声提取操作简单、易行, 因此选择超声波提取法作为本研究的提取方法; 试验过程中比较了超声提取 20, 30, 40 min, 结果提取 20, 30, 40 min 各被测成分的提取量没有明显差异, 因此选择提取时间 20 min。

### [参考文献]

- [1] 张秀荣, 崔佰吉, 郝乘仪, 等. 均匀设计优化延灯滴丸的制备工艺[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(2):112.
- [2] 李晓波, 汪瑞波, 沈勇, 等. HPLC 测定灯盏花不同部位绿原酸、灯盏乙素、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸含量[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14):2237.
- [3] 聂朝霞. 反相高效液相色谱法测定灯盏细辛中灯盏乙素含量[J]. 中国药业, 2013, 22(23):15.
- [4] 任琦, 谢媛媛, 祖双, 等. 灯盏细辛中多酚类成分定性、定量的分析[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7):1176.
- [5] 朱应刚, 李晓英, 孙洪胜. 不同比例配伍的延胡索-川楝子药对中延胡索乙素的含量测定[J]. 中国药房, 2013, 24(19):1793.

[责任编辑 顾雪竹]

**[Abstract]** **Objective:** An HPLC method was established to determine the content of puerarin in three types of injection. **Method:** Separation was achieved by a Merk, Purospher STAR RP-C<sub>18</sub> column used at 29 °C, and mobile phase was methanol and 1% acetic acid, water with the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength of 250 nm. **Result:** The puerarin was separated with good linearity in the sample size range of 0.192-1.152 μg. The average recovery was 99.81%, with RSD value of 0.42%. **Conclusion:** The puerarin in three types of puerarin injection could be well separated under the selected conditions, showing good linear relationship. The method was simple and quick, feasible and could provide scientific basis for the quality control of puerarin injection.

**[Key words]** HPLC; puerarin injection; puerarin and glucose injection; puerarin and sodium chloride injection; puerarin

葛根具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻、通经活络、解酒毒之功效;用于外感发热头痛、项背强痛、消渴、麻疹不透、泄泻、眩晕头痛、中风偏瘫、酒毒伤中等疾病<sup>[2]</sup>。葛根的药效成分主要是葛根素、葛根总黄酮、大豆苷元<sup>[3]</sup>、乙酰胆碱<sup>[4]</sup>、三萜及皂苷类、香豆素类及葛酚苷类化合物<sup>[5-6]</sup>等;现代药理研究证明,葛根素、大豆苷等异黄酮类物质具有降低血压、抗肿瘤、神经组织保护等作用<sup>[7]</sup>。葛根素具有抗心律失常<sup>[8-9]</sup>、增强心肌收缩力、降低血压、降低血糖<sup>[10-12]</sup>、降低心肌耗氧量、保护肝脏、抗血小板聚集<sup>[13-15]</sup>以及改善脂质代谢<sup>[16-17]</sup>等多种药理作用,葛根素是葛根的特有成分,在治疗心血管系统疾病上有着广泛的应用<sup>[5,18]</sup>。临床上葛根素常用于防治糖尿病<sup>[19]</sup>,治疗胃黏膜损伤、脑梗死<sup>[20-22]</sup>,治疗突发性耳聋<sup>[23-24]</sup>、骨质疏松<sup>[25-27]</sup>等多种疾病。

目前,市场上葛根素制剂有葛根素注射液、葛根素葡萄糖注射液和葛根素氯化钠注射液。查阅文献发现,近几年对葛根素注射液、葛根素葡萄糖注射液和葛根素氯化钠注射液中葛根素的含量测定研究比较少,且未见用高效液相色谱法同时测定这3种注射液中葛根素含量的研究。本文参考相关文献<sup>[28]</sup>,采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC法),以甲醇-1%冰醋酸水溶液(25:75)为流动相,采用C<sub>18</sub>色谱柱,能将葛根素较好的分离出来,可用于这3种注射液的含量测定及质量控制。

## 1 材料

Prominence LC-20AT型高效液相色谱系统(包括双波长紫外检测器,LC solution色谱工作站,日本岛津),UV-2000型紫外-可见分光光度计(上海尤尼科仪器有限公司),AL104型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

葛根素对照品(成都菲普德生物技术有限公司,批号130127,纯度≥98%),葛根素注射液(山东

方明药业集团股份有限公司,批号1301157,1210247;郑州卓峰制药有限公司,批号1302251E),葛根素葡萄糖注射液(扬子江药业集团有限公司,批号12090422),葛根素氯化钠注射液[上海华源药业(宁夏)沙赛制药有限公司,批号1208281],甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他均为分析纯。

## 2 方法与结果

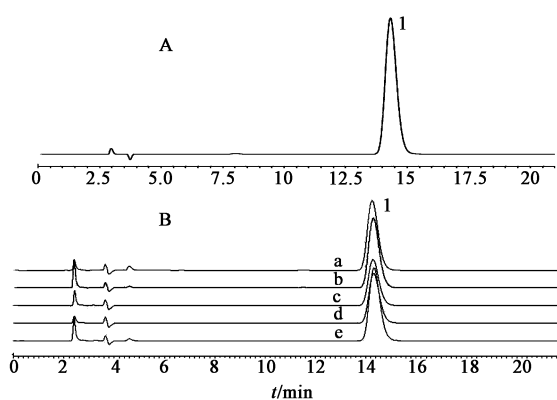
### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 对照品溶液** 精密称取一定量的葛根素对照品于10 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,得0.096 g·L<sup>-1</sup>的对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液** 精密量取3种不同批号的葛根素注射液0.3 mL于250 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度;精密量取葛根素葡萄糖注射液和葛根素氯化钠注射液0.2 mL于10 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,称重,超声30 min,静置放冷,再称重,用甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.2 色谱条件和系统适应性试验** Merk, Purospher STAR RP-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-1%冰醋酸水溶液(25:75),检测波长250 nm,柱温29 °C,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量10 μL。按上述色谱条件,精密吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μL,分别进样,记录色谱图(图1)。结果表明,在2.2项色谱条件下,样品中葛根素与其他组分分离良好、符合要求,对照品溶液和供试品溶液主峰的保留时间一致。理论塔板数按葛根素峰计不低于5 000。

**2.3 线性关系考察** 在2.2项的色谱条件下,分别精密吸取对照品溶液2,4,6,8,10,12 μL,注入液相色谱仪,记录各色谱峰峰面积。以对照品量(μg)为横坐标,色谱峰峰面积为纵坐标进行线性回归,绘



A. 对照品; B. 供试品; 1. 葛根素;

a. 葛根素注射液, 批号 1210247; b. 葛根素注射液, 批号 1301157;

c. 葛根素氯化钠注射液; d. 葛根素葡萄糖注射液;

e. 葛根素注射液, 批号 130225 1E

图 1 葛根素注射液 HPLC

制标准曲线。得线性回归方程  $Y = 468.374X + 3105.25 (r = 0.9998)$ , 进样量在  $1.92 \sim 12.52 \mu\text{g}$  与峰面积呈良好线性关系。

**2.4 精密度考察** 分别精密吸取 2.2.1 项下对照品溶液各  $10 \mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 测定峰面积, RSD 0.1%, 表明仪器的精密度良好。

**2.5 稳定性考察** 精密吸取同一批 (批号 1301157) 供试品  $10 \mu\text{L}$ , 在 2.2 项色谱条件下, 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样, 测定样品中葛根素的峰面积, RSD 1.6%。表明样品在 24 h 内基本稳定。

**2.6 重复性考察** 精密吸取同一批 (批号 1301157) 供试品 6 份适量, 按照 2.1.2 项方法制备供试品溶液, 在 2.2 项色谱条件下进样  $10 \mu\text{L}$ , 测定葛根素含量, RSD 1.2%, 结果表明此方法重复性良好。

**2.7 加样回收率考察** 精密吸取已知含量的同一批样品 (批号 1301157) 共 6 份, 每份 2 mL, 分别精密加入葛根素对照品 60 mg, 按 2.1.2 项制备供试品, 并依照 2.2 项下色谱条件测定, 进样量  $10 \mu\text{L}$ 。记录峰面积, 以外标法定量, 计算回收率。见表 1。

表 1 葛根素加样回收率试验

测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
286.62	99.61		
288.18	100.15		
285.81	99.33		
289.07	100.46	99.81	0.4
287.06	99.76		
286.45	99.55		

注: 样品中量均为 222.12 mg, 加入量均为 60 mg。

**2.8 样品含量测定** 分别精密吸取 5 个不同批次的样品适量, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 并按 2.2 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以外标法分别计算样品中葛根素的含量, 结果见表 2。

表 2 5 种样品注射液中葛根素的含量测定  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

样品	批号	葛根素
葛根素注射液	1301157	111.06
	1210247	110.39
	130225 1E	115.31
葛根素葡萄糖注射液	12090422	237.75
葛根素氯化钠注射液	1208281	218.43

### 3 讨论

试验结果显示, 相同规格 ( $2 \text{ mL} : 100 \text{ mg}$ )、不同厂家的葛根素注射液中葛根素的含量有一定的差别, 但差别不大。葛根素注射液、葛根素葡萄糖注射液和葛根素氯化钠注射液样品中葛根素的含量均符合其规格。

配制适当浓度的葛根素对照品溶液, 采用紫外-可见分光光度计在  $200 \sim 400 \text{ nm}$  波长进行扫描, 检测其最大波长为  $250 \text{ nm}$ , 并结合参考文献<sup>[13]</sup>, 确定选择  $250 \text{ nm}$  作为检测波长。

曾采用甲醇-水 ( $25 : 75$ ) 进行样品含量的测定, 但葛根素吸收峰的峰形不好, 后又采用文献<sup>[11]</sup>中的方法, 流动相为甲醇-1% 冰醋酸水溶液 ( $25 : 75$ ), 流速改变为  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温控制为  $29 \text{ }^\circ\text{C}$ , 葛根素的吸收峰形比较好, 分离效果好。结果表明, 所建立的方法简便、准确、灵敏、回收率高、重复性好, 可作为葛根素注射液、葛根素葡萄糖注射液和葛根素氯化钠注射液 3 种葛根素制剂的含量测定方法。

目前文献中用高效液相色谱方法测定葛根素注射液中葛根素含量的研究比较少, 且未见用 HPLC 方法同时测定葛根素注射液、葛根素葡萄糖注射液和葛根素氯化钠注射液 3 种注射液中葛根素含量的研究, 本文采用 HPLC 方法同时测定这 3 种注射液中葛根素的含量。葛根素注射液的种类较多, 可以用同一种方法对葛根素所有的注射液中葛根素的含量进行测定, 对以后测定葛根素注射液含量的研究提供方便; 本方法具有良好的准确性和重复性, 也有利于葛根素制剂的质量控制。

### [参考文献]

[1] 朱丽华, 贺浪冲. 葛根中有效部位及有效成分的高效液相色谱分析[J]. 西安交通大学学报: 医学版,

- 2005, 26(3):216.
- [ 2 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:313.
- [ 3 ] 柳航, 李占林, 郭婕. 葛根的化学成分[J]. 沈阳大学学报, 2009, 26(11):882.
- [ 4 ] 王苏静, 赵新杰. 葛根素的药理作用进展[J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(2):78.
- [ 5 ] 董英, 徐斌, 林琳, 等. 葛根的化学成分研究[J]. 食品与机械, 2005, 21(6):85.
- [ 6 ] 尤春雪, 张振秋, 李峰, 等. HPLC 波长切换技术对葛根中 8 种成分的测定及指纹图谱研究[J]. 中草药, 2013, 44(5):616.
- [ 7 ] 尹丽红, 李艳枫, 孟繁琳. 葛根的化学成分、药理作用和临床应用[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(3):371.
- [ 8 ] 张华, 周筠, 张力. 葛根素对大鼠心肌细胞 Ito、ICa-L、INa 离子通道的影响[J]. 心脏杂志, 2007, 19(5):524.
- [ 9 ] 郭晓纲, 陈君柱, 张雄, 等. 葛根素对大鼠心肌细胞 L 型钙离子通道的影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3):248.
- [ 10 ] 刘扬. 葛根素对实验性 2 型糖尿病小鼠血糖的影响[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(17):52.
- [ 11 ] 李荷英. 葛根素与甲钴胺联合治疗糖尿病周围神经病变疗效观察[J]. 实用中西医结合临床, 2011, 11(5):6.
- [ 12 ] 杜航. 葛根素干预血管内膜胰岛素抵抗的应用前景[J]. 海峡药学, 2011, 23(8):6.
- [ 13 ] 茅彩萍, 顾振纶. 葛根素对糖尿病大鼠主动脉糖基化终产物的形成及其受体表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(4):393.
- [ 14 ] Chen W C, Hayakaw S, Yamamoto T, et al. Mediation of beta-endorphin by the isoflavone puerarin to lower plasma glucose instreptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Planta Med*, 2004, 70(2):113.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] 金焕, 国燕霞, 刘涓, 等. 葛根黄酮对去卵巢大鼠肝脏脂代谢的影响[J]. 中国医药学报, 2003, 18(4):201.
- [ 17 ] Wang J F, Guo Y X, Niu J Z, et al. Effects of Radix Puerariae flavones on liver lipid metabolism in ovariectomized rats [ J ]. *World-Journal of Gastroenterology*, 2004, 10(13):1967.
- [ 18 ] 曹钟灵, 李建北, 张东明. 葛属植物中异黄酮类化合物的研究进展[J]. 中药材, 2005, 28(1):67.
- [ 19 ] 崔秀玲, 王远征, 刘晓健. 葛根素对糖尿病模型大鼠尿清蛋白排泄率的影响[J]. 医药导报, 2010, 29(2):163.
- [ 20 ] 何俊标. 葛根素注射液治疗急性脑梗塞的临床效果观察[J]. 当代医学:学术版, 2009, 15(3):93.
- [ 21 ] 晏英. 葛根素治疗视网膜中央静脉阻塞 36 例疗效观察[J]. 中国实用医刊, 2005, 32(5):62.
- [ 22 ] 黄彤, 金邦荃, 孙桂菊, 等. 葛根素对去卵巢大鼠机体骨代谢影响的观察[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(19):2560.
- [ 23 ] Liu J M, Ma L, He W P. Therapeutic effect of puerarin therapy on sudden deafness[J]. *Acad J First Med Coll PLA*, 2002, 22(11):1044.
- [ 24 ] Xuan B, Zhou Y H. Yang R L, et al. Improvement of ocular blood flow and retinal functions with puerarin analogs [ J ]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 1999, 15(3):207.
- [ 25 ] 黄延玲, 石凤英. 葛根素对去卵巢大鼠骨密度和骨代谢生化指标的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(12):2307.
- [ 26 ] 李斌斌, 于世凤. 葛根素调控骨代谢的体外实验研究[J]. 北京大学学报:医学版, 2003, 35(1):74.
- [ 27 ] 郭辉, 刘奕深. 葛根素对大鼠成骨细胞代谢调控机制的实验研究[J]. 现代中医药, 2008, 28(1):48.
- [ 28 ] 阮洪生. 高效液相色谱法测定葛根素注射液中葛根素的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(4):46.

[责任编辑 顾雪竹]