

HPLC 测定粉葛饮片中 3 种黄酮类成分的含量

张开霞^{1,2}, 章军¹, 荆文光¹, 王跃生¹, 刘安^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医学院, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定粉葛饮片中葛根素、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷和大豆苷 3 种黄酮类成分含量的方法。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.02% 磷酸(25:75)为流动相, 检测波长 250 nm。结果: 精密度、稳定性和重复性合格, 3 个成分的线性范围分别为 0.123~0.737, 0.024 9~0.150, 0.021 7~0.130 μg, 3 个成分的平均回收率分别为 99.4%, 99.0%, 99.1%, 测定了 4 批粉葛饮片中 3 个成分的含量。结论: 该方法简便、快速、准确度高, 可为粉葛饮片的质量控制提供参考依据。

[关键词] 粉葛; 葛根素; 大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷; 大豆苷; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0078-03

Determination of Three Flavonoids in Radix Pueraria thomsonii by HPLC

ZHANG Kai-xia^{1,2}, ZHANG Jun¹, JING Wen-guang¹, WANG Yue-sheng¹, LIU An^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of puerarin, daidzein-8-C-apiosyl-(1→6) glucoside and daidzin in Radix Pueraria thomsonii. **Method:** The mobile phase was methanol-0.02% phosphoric acid (25:75) with a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), detection wavelength at 250 nm. **Result:** The accuracy, stability, and reproducibility of this method all met the requirements. The linearity range of puerarin, daidzein-8-C-apiosyl-(1→6) glucoside and daidzin is 0.123-0.737, 0.024 9-0.150 μg and 0.021 7-0.130 μg. The average recovery of three components is 99.4%, 99.0% and 99.1%. The method was applied to determine the content of four batches of Radix Pueraria thomsonii. **Conclusion:** The method is rapid, simple and accurate, which can be used in the quality control in Radix Pueraria thomsonii.

[Key words] Radix Pueraria thomsonii; puerarin; daidzein-8-c-apiosyl-(1→6) glucoside; daidzin; HPLC; quantitative determination

粉葛具有解肌退热,生津止渴,透疹,升阳止泻,通经活络和解酒毒的作用,用于治疗外感发热头痛,消渴,麻疹不透,泄泻,中风偏瘫等。2000 年版《中国药典》以前粉葛和豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. 共同作为葛根药材使用,在 2005 年

版《中国药典》^[1] 开始把二者分开记载。文献研究发现,粉葛的化学成分与野葛类似,以异黄酮类物质为主,但含量明显低于野葛^[2-3],在质量控制上主要为葛根素、大豆苷元和总黄酮的含量测定^[2-12],其他成分的含量研究未见报道。为此,本文将报道 HPLC 同时测定粉葛中葛根素、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷和大豆苷 3 种成分含量的方法,该方法简便、快速、准确,可为粉葛饮片的质量控制提供参考依据。

1 材料

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪,SPD-M20A 型紫外-可见光二极管阵列检测器,SIL-20A 型自动进样器,岛津 LC-Solution 工作站,Sartorius BP211D 型

[收稿日期] 20121121(610)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2010CB530600)

[第一作者] 张开霞,硕士研究生, Tel: 010-64014411-2938, E-mail: zhangkaixia-01@163.com

[通讯作者] * 刘安,副研究员,硕士生导师,从事中药化学研究, Tel: 010-64014411 - 2938, E-mail: la62@163.com

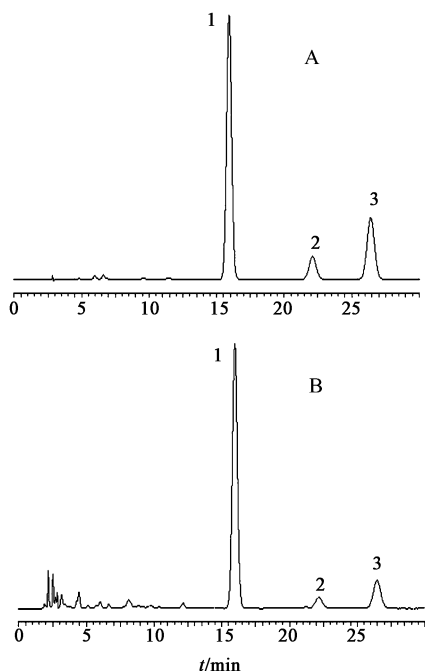
天平($d = 0.01 \text{ mg}$); KQ3200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 甲醇(色谱纯, Fisher公司), 双蒸水(娃哈哈), 其余试剂均为分析纯。

葛根素和大豆苷对照品购于中国食品药品检定研究院(批号分别为110752-200912, 111738-200501), 大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷对照品为本实验室自制, 经HPLC检测, 纯度 $>98\%$ 。

从不同饮片厂采购4批粉葛饮片, 经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定, 均为豆科植物甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 流动相 甲醇-0.02% 磷酸(25:75), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 对照品溶液进样量 $5 \mu\text{L}$, 供试品溶液进样量 $10 \mu\text{L}$, 检测波长 250 nm , 理论塔板数均不低于3000, 混合对照品溶液和供试品溶液的色谱图见图1, 各色谱峰分离效果良好。



1. 葛根素; 2. 大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷; 3. 大豆苷

图1 混合对照品(A)和粉葛饮片(B)HPLC

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取葛根素、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷和大豆苷对照品适量, 用甲醇配制成每 1 mL 分别含 52.04 , 20.32 , $8.672 \mu\text{g}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取粉葛饮片粉末 0.5 g , 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL , 称重, 超声处理 15 min , 冷却, 50% 甲醇补重, 过微孔滤膜($0.45 \mu\text{m}$), 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察 精密称取3个对照品适量, 用甲醇配制成一定质量浓度的混合对照品溶液, 其中葛根素浓度为 $61.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷浓度为 $12.44 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 大豆苷浓度为 $10.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别精密吸取混合对照品溶液 $2, 4, 6, 8, 10, 12 \mu\text{L}$, 按2.1项下色谱条件进行测定, 以峰面积积分值为纵坐标, 以进样量(μg)为横坐标, 进行线性分析得到回归方程。葛根素: $Y = 3827194X - 1667.1$ ($r^2 = 0.9999$), 线性范围 $0.123 \sim 0.737 \mu\text{g}$ 。大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷: $Y = 2312952X - 469.5$ ($r^2 = 0.9999$), 线性范围 $0.0249 \sim 0.150 \mu\text{g}$ 。大豆苷: $Y = 3782263X - 81.5$ ($r^2 = 0.9999$), 线性范围 $0.0217 \sim 0.130 \mu\text{g}$ 。

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液, 重复进样6次, 样品中葛根素、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷和大豆苷峰面积的RSD分别为 0.2% , 1.5% , 1.0% 。表明仪器性能良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按2.1项下色谱条件分别于 $0, 2, 4, 8, 12 \text{ h}$ 进行测定, 计算葛根素、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷和大豆苷峰面积的RSD分别为 0.2% , 1.1% , 1.0% 。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一供试品, 按2.3项下方法平行制备6份供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进行测定, 葛根素、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷和大豆苷的含量分别为 0.2547% , 0.0209% , 0.0431% , RSD分别为 1.1% , 2.7% , 1.0% 。表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 采用加样回收法, 精密称取已知含量的粉葛饮片粉末 0.25 g , 置锥形瓶中, 精密加入混合对照品适量, 按2.3项下方法制备供试品溶液。平行制样6份, 按2.1项下色谱条件测定, 计算平均回收率和RSD, 葛根素、大豆苷、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷的平均回收率分别为 99.4% , 99.1% , 99.0% , RSD分别为 1.7% , 2.0% , 1.9% 。表明该方法准确可靠。见表1~3。

2.9 含量测定 取粉葛饮片粉末按2.3项下方法制备成供试品溶液, 平行制备2份, 按2.1项下色谱条件测定3个成分含量, 结果见表4。

3 讨论

结果可见, 粉葛中葛根素、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷和大豆苷的含量均远低于野葛, 并且野葛中含量较高的3'-羟基葛根素和3'-甲氧基

表 1 葛根素加样回收率

No.	样品质量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.255 1	0.649 7	0.864	1.528	101.7		
2	0.257 1	0.654 8	0.864	1.507	98.6		
3	0.250 4	0.637 8	0.864	1.500	99.8		
4	0.258 7	0.658 9	0.864	1.496	96.9	99.4	1.7
5	0.256 2	0.652 5	0.864	1.520	100.4		
6	0.253 3	0.645 2	0.864	1.498	98.7		

表 2 大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷加样回收率

No.	样品质量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.255 1	0.053 32	0.098 4	0.152 9	101.2		
2	0.257 1	0.053 73	0.098 4	0.150 5	98.3		
3	0.250 4	0.052 33	0.098 4	0.146 4	95.6		
4	0.258 7	0.054 07	0.098 4	0.152 0	99.5	99.0	1.9
5	0.256 2	0.053 55	0.098 4	0.151 8	99.8		
6	0.253 3	0.052 94	0.098 4	0.150 9	99.6		

葛根素在粉葛中无法检测出^[13],说明两种饮片中有有效成分在种类和含量上存在很大差异。因此建议

表 4 4 批不同来源粉葛的含量测定 (n=2)

批次	厂家	产地	批号	葛根素 /%	大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷 /%	大豆苷 /%
1	北京仟草中药饮片有限公司	河南	110613002	0.244 9	0.020 29	0.042 49
2	北京华邈中药工程技术开发中心	广西	110101	0.249 0	0.003 46	0.032 84
3	北京圣惠堂中药饮片有限公司	湖南	11031604	0.234 0	0.003 06	0.030 11
4	北京丰泰金源药业有限公司	河南	11081501	0.262 3	0.003 88	0.049 34

[参考文献]

[1] 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: 272.

[2] 王新胜, 吴艳芳, 张延萍, 等. 伏牛山区野葛与粉葛中葛根素和大豆苷元含量比较[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(1): 5.

[3] 陈珺, 宋敏, 张珏, 等. 粉葛与野葛中异黄酮的 HPLC 指纹对照和比色测定[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(14): 1240.

[4] 舒抒. 重庆产粉葛的质量评价研究[D]. 成都: 成都中医药大学. 2007: 14.

[5] 王黎, 张小清, 苗延青. RP-HPLC 快速同时测定粉葛中葛根素和大豆苷元的含量[J]. 光谱实验室, 2011, 28(3): 1431.

[6] 王春怡, 杨方明, 李卫民, 等. 不同来源的粉葛中总黄酮和葛根素的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2008, 191(11): 2772.

[7] 邹翔, 曲中原. RP-HPLC 法测定湖南粉葛中葛根素的

表 3 大豆苷加样回收率

No.	样品质量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.255 1	0.109 95	0.208	0.320 8	101.4		
2	0.257 1	0.110 81	0.208	0.316 6	98.9		
3	0.250 4	0.107 92	0.208	0.315 6	99.8		
4	0.258 7	0.111 50	0.208	0.310 9	95.9	99.1	2.0
5	0.256 2	0.110 42	0.208	0.319 8	100.7		
6	0.253 3	0.109 17	0.208	0.313 0	98.0		

葛根成方制剂中应增加 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷和大豆苷作为检测指标, 这样不仅可以更加全面的控制含葛根制剂质量, 也可以防止用粉葛代替野葛投料。

粉葛中有效成分为异黄酮苷类, 在流动相中加入少量酸可改善峰形, 提高柱效和分离度。在粉葛饮片的制备方法中, 提取溶剂考察了甲醇、50% 甲醇、30% 甲醇, 当提取溶剂为 50% 甲醇时, 3 种黄酮类成分提取率高且色谱峰形良好。本方法简便、快速、准确, 可为粉葛饮片的质量控制提供参考依据。

含量[J]. 黑龙江医药, 2011, 24(4): 519.

[8] 杨立芳, 李小燕, 罗伟强, 等. 高效液相色谱法测定广西粉葛中葛根素的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 578.

[9] 黄樱华, 段园园, 黄月纯, 等. 粉葛提取物的制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 43.

[10] 刘宁, 盛蓉, 谈静. 高效液相色谱法测定四川粉葛中葛根素的含量[J]. 中国医药导报, 2009, 18(6): 50.

[11] 王永刚, 孙学刚, 魏凤环. 葛根及粉葛化学成分谱 HPLC 方法学研究[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(8): 1407.

[12] 李洪玉, 戴诗文, 寿旦, 等. 采用 HPLC 法测定不同栽培品种粉葛中葛根素的含量[J]. 中国实用医药, 2009, 4(4): 37.

[13] 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.

[责任编辑 顾雪竹]