

HPLC 测定葛根饮片中 5 个成分的含量

章军¹,薛翠娟²,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 测定葛根饮片中 3'-羟基葛根素、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 5 个成分含量的方法。方法:采用 Zorbax 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:方法学考察合格,并测定了 12 批葛根饮片中 5 个成分的含量。结论:该方法简便、快速、准确度高,可作为葛根饮片的质量标准。

〔关键词〕 葛根; 3'-羟基葛根素; 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; 大豆苷

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)07-0108-04

Determination of 5 Active Components in
Radix *Pueraria lobata* by HPLC

ZHANG Jun¹, XUE Cui-juan², JING Wen-guang¹, WANG Yue-sheng¹, LIU An^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of chinese Medical Science, Beijing 100700, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To establish a HPLC method for determination of 3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, daidzein-8-c-apiosyl- (1→6) glucoside and daidzin in radix *Pueraria lobata*. **Method:** A Zorbax C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used; the mobile phase was methanol-0.02% phosphoric acid (25:75). The detection wavelength was at 250 nm; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at 40 ℃. **Result:** The accuracy, precision, sensitivity, specificity and linearity of this method met the requirements. The method was applied to 12 batches of radix *Pueraria lobata*. **Conclusion:** The method is rapid, simple and accurate, which can be used in the quality control in radix *Pueraria lobata*.

〔Key words〕 radix *Pueraria lobata*; 3'-hydroxy puerarin; puerarin; 3'-methoxy puerarin; daidzein-8-c-apiosyl- (1→6) glucoside; daidzin

中药葛根具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻的作用,用于治疗外感发热头痛、项背强痛、口渴、麻疹不透、泄泻等^[1]。其化学成分以异黄酮类物质为主,其饮片的质量控制主要为葛根素、大豆苷和总黄酮的含量测定^[2-5],其他成分的含量测定较少^[6]。而实际上葛根饮片中 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素和大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷的含量较高,均不低于大豆苷的含量,更是远高于染料木苷、染料木素和大豆素。因此,研究 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素和大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷含量测定方法,有助于更加全面的评价葛根饮片的质量。本文将报道一种同时测定葛根素、3'-羟基葛根素等 5 种成分的 HPLC 方法,该方法有望应用于葛根饮片的质量控制中。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪,SPD-M20A 型紫外-可见光二极管阵列检测器,SIL-20A 型自动

〔收稿日期〕 2011-09-15

〔基金项目〕 中药质量控制技术国家工程实验室课题(2010DZHT001)

〔第一作者〕 章军,实习研究员,从事分析化学研究,Tel:010-64014411-2848, E-mail: junzhang654321 @ yahoo.com.cn

〔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

进样器,岛津 LC-Solution 工作站,甲醇(色谱纯, fisher),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),3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素和大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷对照品为自制,经 HPLC 检测,纯度均>98%。

12 批葛根饮片信息见表 1,经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定,均为豆科植物野葛 *Pueraria lobata*(Wild.) Ohwi 的干燥根。

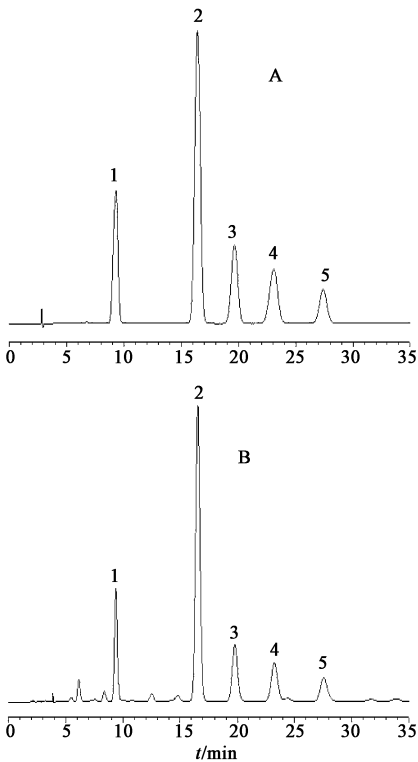
表 1 12 批葛根饮片信息

No.	厂家	产地	批号
1	北京双桥燕京中药饮片厂	河南	090924003
2	北京双桥燕京中药饮片厂	河南	912014
3	北京仟草中药饮片有限公司	河南	090924003
4	安国市神农中药饮片有限公司	湖南	090501
5	北京燕北饮片厂	安徽	090816
6	北京华邈中药工程技术开发中心	安徽	090901
7	北京中医药大学东方医院	河南	090924003
8	同仁堂药店购买	-	-
9	北京双桥燕京中药饮片厂	河南	0909077
10	北京双桥燕京中药饮片厂	河南	090901
11	北京双桥燕京中药饮片厂	河南	1007081
12	北京仟草中药饮片有限公司	河南	110721006

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Zorbax C₁₈ (4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.02% 磷酸(25:75),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,进样量 5 μL,检测波长 250 nm,理论塔板数均不低于 3 000,此条件下对照品和供试品色谱图见图 1,5 个成分分离良好。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷和大豆苷对照品适量,用甲



1. 3'-羟基葛根素;2. 葛根素;3. 3'-甲氧基葛根素;
4. 大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1 6)葡萄糖苷;5. 大豆苷

图 1 混合对照品(A)和葛根饮片(B)HPLC

醇配制每 1 mL 分别含 25.68,51.2,20.0,20.32, 8.672 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取葛根粉末 0.1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入 30% 甲醇 50 mL,称重,超声处理 15 min,冷却,30% 甲醇补重,过微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察 精密称取 5 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,分别精密吸取混合对照品溶液 2,4,6,8,10,12 μL,按 2.1 项下色谱条件注入液相色谱仪,以峰面积积分为纵坐标,以进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,见表 2。

表 2 5 个成分线性关系考察

成分	质量浓度/mg·L ⁻¹	标准曲线	线性范围/μg	r ²
3'-羟基葛根素	51.36	Y = 3 195 751X + 10 011.7	0.102 7 ~ 0.616 3	1.000 0
葛根素	122.8	Y = 3 819 716X + 555.1	0.245 6 ~ 1.474	0.999 9
3'-甲氧基葛根素	52.72	Y = 2 635 024 X + 2 124	0.105 4 ~ 0.632 6	0.999 9
大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1(6)葡萄糖苷	24.88	Y = 2 315 755 X - 1 870	0.049 76 ~ 0.298 6	0.999 9
大豆苷	43.36	Y = 3 755 705X - 1 903.7	0.086 72 ~ 0.520 3	0.999 9

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液,重复进样 6 次,计算 5 个成分峰面积的 RSD,见表 3。

2.6 稳定性试验 按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别于 0,2,4,8,12 h,精密吸取 5 μL,按 2.1 项

表 3 5 个成分的精密度、稳定性和重复性试验				%
成分	精密度	稳定性	重复性含量	重复性 RSD
3'-羟基葛根素	1.6	1.8	1.105	2.2
葛根素	0.1	0.1	3.240	0.4
3'-甲氧基葛根素	0.2	0.2	0.998	0.4
大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷	1.9	2.8	1.047	2.9
大豆苷	0.9	0.9	0.453	1.4

表 4 3'-羟基葛根素加样回收率							
No.	样品重/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.051 02	0.563 8	0.646	1.213	100.5	100.2	1.6
2	0.051 77	0.572 1	0.646	1.212	99.1		
3	0.050 03	0.552 8	0.646	1.212	102.0		
4	0.049 92	0.551 6	0.646	1.211	102.1		
5	0.052 01	0.574 7	0.646	1.210	98.3		
6	0.051 47	0.568 7	0.646	1.210	99.3		

表 5 葛根素加样回收率							
No.	样品重/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.051 02	1.653	1.46	3.104	99.4	99.6	2.0
2	0.051 77	1.677	1.46	3.103	97.7		
3	0.050 03	1.621	1.46	3.102	101.4		
4	0.049 92	1.617	1.46	3.111	102.3		
5	0.052 01	1.685	1.46	3.106	97.3		
6	0.051 47	1.668	1.46	3.117	99.2		

表 6 3'-甲氧基葛根素加样回收率							
No.	样品重/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.051 02	0.509 2	0.52	1.053	104.6	102.0	2.3
2	0.051 77	0.516 7	0.52	1.039	100.4		
3	0.050 03	0.499 3	0.52	1.038	103.6		
4	0.049 92	0.498 2	0.52	1.038	103.8		
5	0.052 01	0.519 1	0.52	1.031	98.4		
6	0.051 47	0.513 7	0.52	1.041	101.4		

表 7 大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷加样回收率							
No.	样品重/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.051 02	0.534 2	0.532	1.067	100.2	102.2	1.7
2	0.051 77	0.542 0	0.532	1.082	101.5		
3	0.050 03	0.523 8	0.532	1.079	104.4		
4	0.049 92	0.522 7	0.532	1.078	104.4		
5	0.052 01	0.544 5	0.532	1.083	101.2		
6	0.051 47	0.538 9	0.532	1.080	101.7		

下测定,计算 5 个成分峰面积的 RSD,结果见表 3。

2.7 重复性试验 按 2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定 5 个成分含量,并计算 RSD,见表 3。

2.8 回收率试验 采用加样回收法(按 1:1 加入),精密量取已知含量的葛根饮片 0.05 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 6 份,分别精密吸取上述供试品溶液各 5 μL,按 2.1 项下色谱条件测定,计算 5 个成分的平均回收率和 RSD,见表 4~8。

表 8 大豆苷加样回收率

No.	样品重/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.051 02	0.231 1	0.244	0.481	102.4	99.7	2.3
2	0.051 77	0.234 5	0.244	0.468	95.7		
3	0.050 03	0.226 6	0.244	0.471	100.2		
4	0.049 92	0.226 1	0.244	0.472	100.8		
5	0.052 01	0.235 6	0.244	0.479	99.8		
6	0.051 47	0.233 2	0.244	0.475	99.1		

2.9 含量测定 取表 1 中的 12 批葛根饮片,按 2.3 项下方法制备成供试品溶液,平行 2 份,按 2.1 项下色谱条件测定 5 个成分含量,结果见表 9。

表 9 12 批葛根饮片中 5 个成分的含量(n=2) %

No.	3'-羟基 葛根素	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	大豆苷
1	1.032	3.26	0.951	0.956	0.458
2	0.999	3.08	0.797	0.765	0.533
3	0.845	2.97	0.804	0.810	0.461
4	0.558	3.37	0.955	0.963	0.372
5	0.800	2.81	0.866	0.816	0.553
6	0.823	2.90	0.831	0.788	0.444
7	0.790	2.73	0.721	0.719	0.475
8	0.907	2.94	0.774	0.751	0.659
9	1.054	3.39	0.975	0.897	0.445
10	0.842	3.05	0.721	0.762	0.524
11	0.887	3.59	0.933	0.951	0.559
12	1.581	4.62	1.409	1.235	0.739

3 讨论

从本文的研究结果可以看出,所测的 12 批饮片中 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素和大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷的含量均高于大豆苷,与文献[6]的研究结果相比,前 3 种成分的含量更是远高于染料木苷、大豆素和染料木素。3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷元-8-C-芹菜糖-(1→6)葡萄糖苷和大豆苷的总含量与葛根素含量相仿。

因而采用本研究方法,能够更全面的控制葛根饮片的质量。

葛根中有效成分为异黄酮苷类,在流动相中加入少量酸可使色谱峰明显变窄,提高柱效和分离度。

葛根饮片的制备方法考察了甲醇、50% 甲醇、30% 甲醇、95% 乙醇、50% 乙醇和 30% 乙醇 6 种提取溶剂,最终选择 30% 甲醇,此时 5 个成分提取率高且色谱峰形良好。

考察了提取方法和提取时间,发现以回流方法提取时,大豆苷含量随提取时间的延长而显著增加,而其余 4 个成分含量没有变化,提示高温提取时,存在未知成分转化为大豆苷的可能,因此不宜采用回流方法提取。最后选择超声提取 15 min 的提取方法。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010;312.
[2] 李树国.高效液相色谱法测定葛根配方颗粒中葛根素的含量[J].吉林中医药,2011,31(3):264.
[3] 吴可,谢朝晖,王芳.炮制对葛根中总黄酮及葛根素含量的影响[J].药品鉴定,2011,8(1):64.
[4] 裴莉昕,陈随清,纪宝玉,等.不同产地葛根药材的质量分析.[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(10):24.
[5] 葛尔宁.RP-HPLC 法测定葛根汤中葛根素的含量及变化[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(4):12.
[6] 赖红梅,邢君宇.HPLC 法同时测定葛根食品中葛根素,大豆苷,染料木苷,大豆素,染料木素的含量[J].中国卫生检验杂志,2010,20(8):1899.

[责任编辑 蔡仲德]