

## HPLC 同时测定不同产地葛根中 6 种主要异黄酮类成分的含量

王治平<sup>1\*</sup>, 李卫民<sup>2</sup>, 高英<sup>2</sup>, 刘杰<sup>2</sup>

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 建立同时测定葛根药材中 6 种主要异黄酮类成分含量的 HPLC 方法。方法: 采用 RP-HPLC 法, Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱; 流动相: 甲醇-0.1% 枸橼酸溶液, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 250 nm。结果: 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、染料木苷、芒柄花苷、大豆苷元的线性范围分别为 76.2 ~ 1 016, 65.8 ~ 1 316, 85.6 ~ 1 712, 49.98 ~ 499.8, 21.94 ~ 219.4, 48.5 ~ 485 ng, 相关系数 ( $R^2$ ) 均大于 0.999 6, 6 种成分的平均加样回收率分别为 99.73% (RSD 0.6%), 100.48% (RSD 1.11%), 100.37% (RSD 0.79%), 100.28% (RSD 1.07%), 99.96% (RSD 1.22%), 97.36% (RSD 1.59%)。结论: 方法简便快速, 重复性良好, 结果准确可靠, 可用于葛根药材中 6 种主要异黄酮类成分的含量测定。

**[关键词]** 高效液相色谱; 葛根异黄酮; 3'-羟基葛根素; 葛根素; 大豆苷; 染料木苷; 大豆苷元; 芒柄花苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0125-04

**[doi]** 10.11653/syfyj2013080125

## Simultaneous Determination of Six Isoflavonoids in Radix Puerariae Lobatae from Different Habitats by HPLC

WANG Zhi-ping<sup>1\*</sup>, LI Wei-min<sup>2</sup>, GAO Ying<sup>2</sup>, LIU Jie<sup>2</sup>

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** A reversed-phase high performance liquid chromatographic method (RP-HPLC) was developed for the simultaneous analysis of six isoflavonoids of Gegen, the roots of Puerariae lobatae. **Method:** HPLC determination was performed on a Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and detected at 250 nm. The mobile phase was consisted of methanol and 0.1% citric acid solution with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and column temperature was kept at 30 °C. **Result:** The method was proved to be linear in the ranges of 76.2-1 016, 65.8-1 316, 85.6-1 712, 49.98-499.8, 21.94-219.4, 48.5-485 ng for the six isoflavonoid, 3'-hydroxypuerarin, puerarin, daidzin, genistin, ononin, daidzein, respectively. The average

**[收稿日期]** 20121020(005)

**[通讯作者]** \* 王治平, 博士, 从事中药药效物质、新剂型及质量控制研究, Tel:13570314011, E-mail:wzping\_jshb@126.com

- [7] 刘丽, 曲静, 康廷国. 中风回春丸中五种动物药刚毛的显微鉴别研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (12): 2964.
- [8] 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.
- [9] 张丽增, 代云桃, 秦雪梅, 等. 僵蚕薄层鉴别方法的改进 [J]. 中国药品标准, 2006, 7(4): 61.
- [10] 李晓华. 僵蚕质量标准规范化研究 [D]. 成都: 成都中医药大学硕士研究生论文, 2006.
- [11] 李新园, 唐琼, 熊学敏. 复方加味牵正合剂中自附子僵蚕的薄层色谱鉴别 [J]. 江西医学院学报, 2001, 41 (61): 129.
- [12] 雷田香, 彭延古, 郝晓云, 等. 僵蚕抗凝作用的进展 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(3): 76.
- [13] 杨琼, 廖森泰, 邢东旭, 等. 白僵蚕的化学成分和鉴别技术研究进展 [J]. 蚕业科学, 2009, 35(3): 696.

[责任编辑 顾雪竹]

recoveries were 99.73% (RSD 0.6%), 100.48% (RSD 1.11%), 100.37% (RSD 0.79%), 100.28% (RSD 1.07%), 99.96% (RSD 1.22%), 97.36% (RSD 1.59%), respectively. **Conclusion:** Results obtained showed that the method is convenient, accurate and reliable, can be applied to the simultaneous determination of the six isoflavonoids in Radix Puerariae lobatae.

**[Key words]** HPLC; isoflavonoids of puerariae lobatae; 3'-hydroxy puerarin; puerarin; genistin; ononin; daidzein

葛根来源于豆科植物野葛干燥根。习称野葛。具有解肌退热,生津,透疹,升阳止泻之功。用于外感发热头痛、项背强痛,消渴等<sup>[1]</sup>。异黄酮类是其有效成分,具有降低血管阻力,改善心脑血管血液循环,减慢心率,降低心肌耗氧量等药理活性<sup>[2-6]</sup>。近年有关葛根异黄酮类成分含量测定的报道,有葛根素<sup>[7]</sup>,葛根素及大豆苷元<sup>[8]</sup>、葛根素、大豆苷和大豆苷元<sup>[9-10]</sup>,葛根素、大豆苷、染料木苷和大豆苷元<sup>[11]</sup>,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)葡萄糖苷和大豆苷元<sup>[12]</sup>。国外有用 LC-MS 法测定葛根 12 种成分(其中异黄酮类 10 种)的报道<sup>[13]</sup>。目前未见上述成分和 3'-羟基葛根素及芒柄花苷(芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷)6 种成分同时测定的报道。当前,液-质联用仪在国内普及程度有限,因此建立简便快捷的测定多种异黄酮类成分的含量具有理论和实际意义。本文建立葛根中 6 种主要异黄酮成分含量的 HPLC-UV 测定方法,采用该方法测定和比较了 3 批不同产地的葛根药材饮片中的含量,为控制葛根药材及制剂的质量提供方法和依据。

### 1 材料

SHIMADZU LC-10AT vp plus 高效液相色谱仪, SHIMADZU SPD-10A vp plus 紫外检测器, SHIMADZU CBM-10A vp plus 化学工作站, UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu, UVmini 1240), Sartorius 电子分析天平(德国, d = 0.01 mg), WXC-4 旋光仪(上海浦东物理光学仪器厂)。甲醇为色谱纯,水为制备纯水,其他试剂为分析纯,葛根素对照品购自中国食品药品检定研究院(含量测定用,批号 110752-200511),染料木苷、芒柄花素-7-O-葡萄糖苷及大豆苷元对照品购自上海同田生物(批号分别为 09062911, 09090721, 09020513, 纯度分别 ≥ 98%, 95%, 99%), 3'-羟基葛根素及大豆苷对照品<sup>[14-16]</sup>由本实验室自制(熔点、比旋度、UV、MS 及 NMR 与文献一致,纯度均 > 95%)。葛根药材购自广州中医药大学大药房有限公司,由本院高英教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi

的干燥根。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试溶液制备

**2.1.1 对照品溶液** 精密称取各对照品适量,分别用甲醇制成每 1 mL 中含 3'-羟基葛根素 0.304 8 mg、葛根素 0.658 mg、大豆苷 0.816 mg、染料木苷 0.357 mg、芒柄花苷 0.212 mg、大豆苷元 0.197 mg 的溶液,即得。临用时稀释或制成混合对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液** 取葛根药材(过三号筛,产地广东),粉碎,过三号筛,取约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 30% 乙醇 50 mL,称定质量,加热回流 30 min,放冷,再称定质量,用 30% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得<sup>[1]</sup>。

**2.2 检测波长的确定** 取上述对照品溶液,适当稀释,以甲醇为空白,分别于 200 ~ 400 nm 扫描,6 种异黄酮类成分的最大吸收波长分别为 249.7, 250.1, 250.7, 249.1, 246.8, 252.1 nm,为兼顾各成分的测定,确定检测波长为 250 nm。

**2.3 色谱条件** Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,加预柱 (Security Guard, C<sub>18</sub>, 4.0 mm × 3.0 mm, Phenomenex); 以甲醇为流动相 A, 以 0.1% 枸橼酸溶液为流动相 B, 按表 2 进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 10 μL,检测波长 250 nm。

表 2 流动相梯度洗脱程序

| t/min   | A/%     | B/%     |
|---------|---------|---------|
| 0 ~ 15  | 25      | 75      |
| 15 ~ 30 | 25 ~ 45 | 75 ~ 55 |
| 30 ~ 45 | 45      | 55      |
| 45 ~ 50 | 45 ~ 25 | 55 ~ 75 |
| 50 ~ 60 | 25      | 75      |

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 检测限及定量限** 将各对照品色谱峰测出的信号与空白样品测出的信号进行比较,分别以信噪比为 3:1 及 10:1 时注入仪器的量确定检测限和定量限,结果见表 3。

**2.4.2 线性关系考察** 分别精密吸取上述对照溶

液适量,进样分析,分析结果以峰面积( $Y$ )对对照品的进样质量( $X$ , ng)进行回归,得回归方程、相关系数( $R^2$ )及线性范围,结果见表3。

**2.4.3 精密度试验** 精密吸取各对照品溶液,注入液相色谱仪分析,重复6次,所得峰面积的标准偏差(RSD)分别为0.94%,1.13%,0.77%,1.81%,

0.93%,1.31%。表明仪器精密度良好。

**2.4.4 重复性试验** 精密称取同批次葛根药材粉末0.1g,6份,按2.1.2项下供试品溶液制备方法制备。进样分析,所得各成分含量的RSD分别为0.97%,1.15%,0.87%,1.89%,0.91%,1.25%。表明本法重复性良好。

表3 6种异黄酮类成分线性关系考察

| 成分         | 回归方程                          | $R^2$   | 线性范围/ng       | 检测限/ng | 定量限/ng |
|------------|-------------------------------|---------|---------------|--------|--------|
| 1 3'-羟基葛根素 | $Y = 3\ 269.8X + 9273.8$      | 1       | 76.2 ~ 1 016  | 19.24  | 63.5   |
| 2 葛根素      | $Y = 4\ 846.4X - 1\ 490\ 266$ | 0.999 9 | 65.8 ~ 1 316  | 19.74  | 65.8   |
| 3 大豆苷      | $Y = 3\ 374X - 60\ 751$       | 0.999 6 | 85.6 ~ 1 712  | 21.4   | 68.48  |
| 4 染料木苷     | $Y = 2\ 966.4X - 14\ 174$     | 0.999 8 | 49.98 ~ 499.8 | 14.28  | 49.98  |
| 5 芒柄花苷     | $Y = 6\ 478.9X - 27\ 492$     | 0.999 9 | 21.94 ~ 219.4 | 6.58   | 19.64  |
| 6 大豆苷元     | $Y = 4\ 327.2X - 252.42$      | 0.999 9 | 48.5 ~ 485    | 14.55  | 48.5   |

表4 样品中6种异黄酮类成分的回收率测定

| 成分       | 样品含量/mg | 加入量/mg  | 检出量/mg  | 回收率/%  | $\bar{x}$ | RSD/% |
|----------|---------|---------|---------|--------|-----------|-------|
| 3'-羟基葛根素 | 0.295 3 | 0.304 8 | 0.601 3 | 100.39 | 99.73     | 0.60  |
|          | 0.307 7 | 0.304 8 | 0.609 3 | 98.95  |           |       |
|          | 0.300 7 | 0.304 8 | 0.603 8 | 99.44  |           |       |
|          | 0.305 8 | 0.304 8 | 0.610 3 | 99.90  |           |       |
|          | 0.307 1 | 0.304 8 | 0.613 1 | 100.39 |           |       |
|          | 0.299 1 | 0.304 8 | 0.601 7 | 99.28  |           |       |
| 葛根素      | 1.575 5 | 1.645   | 3.210 9 | 99.42  | 100.48    | 1.11  |
|          | 1.641 6 | 1.645   | 3.303 1 | 101.00 |           |       |
|          | 1.604 4 | 1.645   | 3.238 2 | 99.32  |           |       |
|          | 1.631 5 | 1.645   | 3.304 9 | 101.73 |           |       |
|          | 1.638 2 | 1.645   | 3.310 6 | 101.67 |           |       |
|          | 1.595 8 | 1.645   | 3.236 7 | 99.75  |           |       |
| 大豆苷      | 0.388 6 | 0.408   | 0.799 2 | 100.64 | 100.37    | 0.79  |
|          | 0.404 9 | 0.408   | 0.813 1 | 100.05 |           |       |
|          | 0.395 8 | 0.408   | 0.810 3 | 101.59 |           |       |
|          | 0.402 4 | 0.408   | 0.811 9 | 100.37 |           |       |
|          | 0.404 1 | 0.408   | 0.808 6 | 99.14  |           |       |
|          | 0.393 6 | 0.408   | 0.803 3 | 100.42 |           |       |
| 染料木苷     | 0.068 7 | 0.071 4 | 0.141 3 | 101.68 | 100.28    | 1.07  |
|          | 0.071 6 | 0.071 4 | 0.143 9 | 101.26 |           |       |
|          | 0.070 0 | 0.071 4 | 0.140 6 | 98.88  |           |       |
|          | 0.071 1 | 0.071 4 | 0.142 3 | 99.72  |           |       |
|          | 0.071 4 | 0.071 4 | 0.143 2 | 100.56 |           |       |
|          | 0.069 6 | 0.071 4 | 0.140 7 | 99.58  |           |       |

续表4

| 成分   | 样品含量/mg | 加入量/mg  | 检出量/mg  | 回收率/%  | $\bar{x}$ | RSD/% |
|------|---------|---------|---------|--------|-----------|-------|
| 芒柄花苷 | 0.023 1 | 0.021 2 | 0.044 1 | 99.06  | 99.96     | 1.22  |
|      | 0.024 0 | 0.021 2 | 0.045 5 | 101.42 |           |       |
|      | 0.023 5 | 0.021 2 | 0.044 7 | 100.00 |           |       |
|      | 0.023 9 | 0.021 2 | 0.045 4 | 101.42 |           |       |
|      | 0.024 0 | 0.021 2 | 0.045 1 | 99.53  |           |       |
|      | 0.023 4 | 0.021 2 | 0.044 2 | 98.11  |           |       |
| 大豆苷元 | 0.148 2 | 0.155 2 | 0.301 3 | 98.65  | 97.36     | 1.59  |
|      | 0.154 4 | 0.155 2 | 0.304 1 | 96.46  |           |       |
|      | 0.150 9 | 0.155 2 | 0.304 6 | 99.03  |           |       |
|      | 0.153 4 | 0.155 2 | 0.300 6 | 94.85  |           |       |
|      | 0.154 1 | 0.155 2 | 0.305 1 | 97.29  |           |       |
|      | 0.150 1 | 0.155 2 | 0.301 9 | 97.81  |           |       |

**2.4.5 稳定性试验** 于0,1,2,4,8 h,分别精密吸取供试品溶液,注入液相色谱仪分析,所得峰面积的RSD分别为1.34%,1.27%,1.03%,1.99%,1.39%,1.83%。表明在8 h内稳定。

**2.4.6 加样回收率试验** 取已知含量的葛根药材粉末(过3号筛)50 mg,6份,精密称定,分别精密加入相当量的对照品溶液,挥干溶剂,同2.1.2方法处理,测定,计算加样回收率,结果见表4。

结果表明,葛根药材含量测定方法回收率符合要求。

**2.5 样品含量测定** 精密吸取上述供品溶液各10  $\mu$ L,注入高效液相色谱仪分析,测定结果见表5。

表 5 不同产地葛根样品中异黄酮类成分含量测定 (n=3) %

| 来源/省 | 3'-羟基<br>葛根素 | 葛根素   | 大豆苷   | 染料<br>木素 | 芒柄<br>花苷 | 大豆<br>苷元 |
|------|--------------|-------|-------|----------|----------|----------|
| 四川   | 1.095        | 2.375 | 0.981 | 0.132    | 0.113    | 0.291    |
| 湖南   | 1.803        | 3.893 | 1.281 | 0.243    | 0.114    | 0.408    |
| 广东   | 0.576        | 3.073 | 0.758 | 0.134    | 0.117    | 0.289    |

### 3 结论与讨论

不同产地葛根药材中 6 种异黄酮类成分含量比较,3'-羟基葛根素:湖南 > 四川 > 广东;葛根素:湖南 > 广东 > 四川;大豆苷:湖南 > 四川 > 广东;染料木苷:湖南 > 广东 ≈ 四川;芒柄花苷:湖南 > 四川 > 广东;大豆苷元:湖南 > 广东 > 四川。含量较高的异黄酮类成分有葛根素、3'-羟基葛根素、大豆苷;不同产地含量相差较大的有 3'-羟基葛根素、大豆苷元及芒柄花苷。

现行药典规定,以甲醇-水(25:75)等度洗脱测定葛根素的含量,试验发现葛根素等吸收峰拖尾,芒柄花苷、大豆苷元无法在 60 mn 之内完成分析。经比较甲醇-水、乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-1% 冰醋酸溶液等梯度洗脱条件,选择了优化的甲醇-0.1% 枸橼酸溶液梯度洗脱条件。

预试验时,比较超声、回流和索氏提取对葛根中 6 种异黄酮成分含量测定的影响。结果表明,回流和索氏提取者无明显差异,两法略优于超声提取,故采用回流法。

考察 30%、50% 及 70% 3 种不同浓度的乙醇提取对葛根中 6 种异黄酮成分含量测定的影响。结果表明,50% 及 70% 乙醇提取的供试品溶液 LC 分析时 3'-羟基葛根素及葛根素为前伸畸形峰,而 30% 乙醇处理的供试品溶液分析时吸收峰正常,故采用 30% 乙醇为提取溶剂。

### [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.

[2] 易红,杨华. 葛根的品种产地和提取工艺研究进展概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(11):60.

[3] 王艳艳,王团结,丁琳琳. 响应面分析法优化葛根中异黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18

(2):45.

[4] 巩红岩,秦元旭,王更富,等. 葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):165.

[5] 睦荣燕,王万辉,连磊凡,等. 染料木素对 Iso 致心肌肥厚大鼠的抗氧化及抑制炎症反应作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):175.

[6] 胡志苹,黄志华,吴亮亮,等. 染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):164.

[7] 王言才,段金廛,华永庆,等. 不同品种葛根中葛根素及总黄酮的含量测定[J]. 时珍国医国药,2008,19(1):132.

[8] 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.

[9] 金文姗,谈钰元,陈有根,等. 高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素、大豆苷及大豆苷元的含量[J]. 中国中药杂志,2003,28(1):49.

[10] 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.

[11] 宋丽君,谭晓梅,罗佳波. RP-HPLC 同时测定葛根异黄酮提取部位中葛根素、大豆苷、染料木苷和大豆苷元的含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(6):968.

[12] 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.

[13] Lin C C, Wu C I, Sheu S J. Determination of 12 pueraria components by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2005, 28:1785.

[14] Kinjo J E, Furusawa J I, Baba J, et al. Studies on the constituents of pueraria lobata. III isoflavonoids and related compounds in the roots and the voluble stems [J]. Chem Pharm Bull,1987,35(12):4846.

[15] 张晓塔,王明奎,彭树捧,等. 葛根的化学成分研究(英文)[J]. 中草药,2002,33(1):11.

[16] 张璐,陈民辉,蔡美明,等. HPLC 和 LC-MS<sup>n</sup> 分析葛根素及其注射剂中的有关物质[J]. 中国生化药物杂志,2008,29(6):361.

[责任编辑 顾雪竹]