

HPLC 法测定葛花中鸢尾苷和鸢尾苷元的含量

赵楠, 刘丹, 王艳萍, 王金凤, 魏颖 (解放军第208医院, 吉林长春 130062)

[摘要] 目的 建立测定葛花中鸢尾苷和鸢尾苷元含量的高效液相色谱方法。方法 采用美国 Agilent-C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-乙腈-水(2: 1: 2)为流动相, 流速为 1.0 ml/min; 检测波长为 264 nm, 柱温为室温。结果 鸢尾苷在 2.0 ~ 120.0 μg/ml 呈线性关系, $r=0.9998$; 平均加样回收率为 99.7%, RSD 为 1.9%; 鸢尾苷元在 0.8 ~ 80.0 μg/ml 呈线性关系, $r=0.9986$; 平均加样回收率为 99.4%, RSD 为 1.7%。结论 该方法简便易行, 结果准确、可靠, 重复性好, 可用于葛花中鸢尾苷和鸢尾苷元的含量测定。

[关键词] 葛花; 鸢尾苷; 鸢尾苷元; 高效液相色谱法

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)03-0226-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.03.020

Determination of tectoridin and tectorigenin in *Flos Puerariae lobata* by HPLC

ZHAO Nan, LIU Dan, WANG Yan-ping, WANG Jin-feng, WEI Ying (The No. 208 Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

[Abstract] **Objective** To establish an HPLC method for the determination of Tectoridin and Tectorigenin in *Flos Puerariae lobata*. **Method** The separation was performed on Agilent -C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), using a mobile phase with methanol-acetonitrile-water (2: 1: 2). Flow rate was 1.0 ml/min, the detection wavelength was set at 264 nm. Column temperature was ambient temperature. **Result** The linear range of tectoridin was 2.0 ~ 120.0 μg/ml, $r=0.9998$. The average recovery was 99.7%, RSD was 1.9%; The linear range of tectorigenin was 0.8 ~ 80.0 μg/ml, $r=0.9986$. The average recovery was 99.4%, RSD was 1.7%. **Conclusion** The method was simple, accurate, reliable with a good repeatability, which could be used to determinate of tectoridin and tectorigenin in *Flos Puerariae lobata*.

[Key words] *Flos puerariae lobata*; tectoridin; tectorigenin; HPLC

葛花是豆科植物葛根 *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi 的干燥花蕾,《神农本草经》记载葛花主要用于解酒醒脾,治伤酒发热烦渴、不思饮食、呕呃吐酸、吐血和肠风下血等,是具有代表性的解酒药物^[1]。解酒保肝作用的成分是葛花中的异黄酮。本研究采用 HPLC 法可同时测定葛花中鸢尾苷和鸢尾苷元这两种异黄酮的含量,以控制葛花药材的质量,国内报道并不多见。

1 仪器与试剂

LC-10AVT 高效液相色谱仪(岛津); SPD-10AV 检测器(岛津); HP-8452A 型紫外分光光度计(美国惠普); CP225D 电子天平(德国赛多利斯); 葛花(河南广安堂贸易有限公司 20100225), 鸢尾苷和鸢尾苷元对照品(实验室自制 20050817, 20051208, 纯度 >99%); 水为重蒸溜水; 甲醇为色谱纯; 其它试剂均为分析纯。

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20090919)。

[作者简介] 赵楠(1980-), 女, 硕士, 主管药师。Tel: (0431) 86988187, E-mail: naner_jy@163.com.

2 方法与结果

2.1 色谱条件 美国 Agilent C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 甲醇-乙腈-水(2: 1: 2)为流动相, 流速为 1.0 ml/min; 检测波长 264 nm, 柱温为室温。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 鸢尾苷对照品: 精密称取干燥至恒重的鸢尾苷对照品 5.00 mg 置 25 ml 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 超声处理 10 min。用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得含鸢尾苷 200.00 μg/ml 的对照品溶液。

鸢尾苷元对照品: 精密称取干燥至恒重的鸢尾苷元对照品适量置 25 ml 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 超声处理 10 min。用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得含鸢尾苷元 80.00 μg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 葛花药材 500 g 制成粗粉, 用索氏提取器提取。加 85% 的乙醇回流提取 20 h, 减压回收乙醇, 水浴干燥获得乙醇粗提物。将粗提物用去离子水悬浮, 湿法上样于 50 倍量(W :

V)的大孔树脂 AB-8 柱,分别用 20%、50% 乙醇依次洗脱。收集 50% 乙醇洗脱液,减压浓缩回收溶剂,得到葛花混合物。精密称取葛花提取物 10.60 mg 于 10 ml 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,精密量取 2 ml 置 10 ml 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,超声处理 20 min,取出,放冷至室温,滤过,取续滤液,得到供试品溶液。

2.3 线性关系的考察

2.3.1 鸢尾苷 精密量取上述鸢尾苷对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 ml 置 10 ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得 7 种不同浓度的鸢尾苷对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,分别进样 25 μ l,测定峰面积。以对照品浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $Y = 44\ 122X + 5\ 039.1$,相关系数 $r = 0.999\ 8$,鸢

尾苷在 2.0 ~ 120.0 μ g/ml 范围之内线性关系良好。

2.3.2 鸢尾苷元 精密量取上述鸢尾苷元对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 ml 置 10 ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得 7 种不同浓度的鸢尾苷元对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,分别进样 25 μ l,测定峰面积。以对照品浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $Y = 61\ 221.3X - 35\ 086.8$,相关系数 $r = 0.998\ 6$,鸢尾苷元在 0.8 ~ 80.0 μ g/ml 范围之间线性关系良好。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 分别精密吸取鸢尾苷、苷元对照品溶液和供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别进样 25 μ l,结果表明,供试品色谱中,在与对照品图谱相应的位置上,有相同保留时间的色谱峰。见图 1。

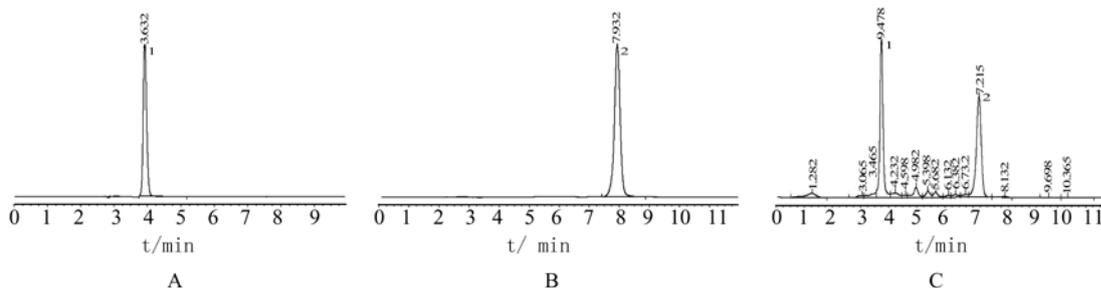


图 1 HPLC 色谱图

A-鸢尾苷对照品; B-鸢尾苷元对照品; C-供试品; 1-鸢尾苷; 2-鸢尾苷元

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一鸢尾苷对照品浓度为 20.0 μ g/ml 的溶液,重复进样 5 次,每次 25 μ l,测得鸢尾苷峰面积积分值的 RSD 为 2.9%。精密吸取同一鸢尾苷元对照品浓度为 8.0 μ g/ml 的溶液,重复进样 5 次,每次 25 μ l,测得鸢尾苷元峰面积积分值的 RSD 为 1.4%,表示精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批次的葛花提取物适量制成供试品溶液,重复进样 5 次,每次 25 μ l,测得结果苷和苷元的 RSD 分别为 1.8% 和 1.6%,表明重复性良好。

2.4.4 加样回收率试验 精密称取已知含量的供试品 10 mg 共 6 份,分别精密加入鸢尾苷和苷元对照品溶液适量,按上述色谱条件测定其含量,计算回收率,结果平均回收率分别为 99.7% 和 99.4%,RSD 为分别为 1.9% 和 1.7%,具体结果见表 1。

2.5 样品含量测定 葛花药材取 5 份各 500 g,按照 2.2.2 方法提取制备,得葛花提取物 5 批(得率为 0.1%),按供试品溶液制备方法制备,按 2.1 色谱条件依法测定,结果葛花中鸢尾苷和苷元总含量平均为 5 g。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

成分	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
鸢尾苷	4.52	4.20	8.79	100.8	99.7	1.9
	4.65	4.20	8.77	99.1		
	4.62	4.20	8.86	100.5		
	4.20	4.20	8.35	99.4		
	4.10	4.20	8.20	98.8		
	4.35	4.20	8.49	99.3		
鸢尾苷元	1.09	1.00	2.10	100.5	99.4	1.7
	1.00	1.00	1.95	97.5		
	0.95	1.00	1.95	100		
	0.90	1.00	1.87	98.4		
	1.10	1.00	2.09	99.5		
	1.05	1.00	2.06	100.5		

3 讨论

3.1 测定波长的选择 精密称取一定量的鸢尾苷和鸢尾苷元对照品,用流动相溶解配制成含鸢尾苷和苷元为 0.08 mg/ml 的溶液,于 200 ~ 400 nm 波长范围内扫描,均在 264 nm 处有最大吸收,故选择

264 nm 为鸢尾苷和昔元的测定波长。

3.2 本研究建立了同时测定葛花药材中两种异黄酮(鸢尾苷和昔元)含量的 HPLC 方法,可用于葛花药材中此类成分的定量分析。曾对甲醇-水、甲醇-0.2% 磷酸溶液、乙腈-水等流动相进行考察,结果分离度都不理想,试用甲醇-乙腈-水为流动相时,分离度大于 1.5,拖尾因子在 0.95 ~ 1.05,故确定甲醇-乙腈-水为含量测定的流动相。

3.3 用 HPLC 法测定葛花中黄酮类成分的报道并不多,大多数以紫外分光光度测定,且测定指标的选择也不尽相同。张淑萍等^[3]采用 HPLC 法测定野葛花中葛花苷、次葛花苷及尼泊尔鸢尾异黄酮含量,张国峰等^[4]则以 HPLC 法同时测定了野葛花中葛花苷、尼泊尔鸢尾异黄酮、鸢尾黄素-7-O-木糖葡萄糖苷、鹰嘴豆芽素 A 的含量,刘立辉等^[5]采用 HPLC 同时测定野葛花中鸢尾黄素-7-O-木糖葡萄糖苷、鸢尾苷、鸢尾昔元的含量。有报道表明^[6],存放 5 年以内的葛花中几乎检测不到葛花苷,而主要的异黄酮成分为鸢尾苷,且葛花产地不同,葛花苷的含量也有明显差别,所以选择鸢尾苷作为测定葛花含量的主要指标成分。本研究结果表明,葛花乙醇提取物中主要的异黄酮成分为鸢尾苷和昔元等,与其他一些

相关报道一致^[7]。本文所采用的方法简便,可行,准确度高,可同时测定两种主要成分的含量,因此可用作葛花药材质量控制的方法。

【参考文献】

[1] 田代华. 实用中药辞典. 下卷[M]. 北京. 人民卫生出版社, 2002;1338,1897.
 [2] 尹俊亭, 仲英, 孙敬勇, 等. 葛花化学成分的研究[J]. 中草药, 2006, 37(3):350.
 [3] 张淑萍, 贺云, 刘柏涛, 等. RP-HPLC 测定野葛花中 3 种异黄酮[J]. 分析实验室, 2006, 25(2):74.
 [4] 张国峰, 吴瑕, 白雪, 等. HPLC 法同时测定野葛花中 4 种异黄酮成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(1):40.
 [5] 刘立辉, 李卫民, 高英. HPLC 同时测定野葛花中鸢尾黄素-7-O-木糖葡萄糖苷、鸢尾苷、鸢尾昔元的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17):2308.
 [6] Kim CS, Shin SM, Ha HK, et al. Study of substance change in flowers of *Pueraria thunbergiana* B enth. during storage[J]. Arch Pharm Res, 2003, 26(3):210.
 [7] Niho Y, Nakajima Y, Yamazaki T, et al. Simultaneous analysis of isoflavones and saponins in *Pueraria* flowers using hplc coupled to an evaporative light scattering detector and isolation of a new isoflavone diglucoside[J]. J Nat Med, 2010, 64(3):313.

[收稿日期] 2012-01-10

[修回日期] 2012-04-06

(上接第 164 页)

[20] Law MR, Wald NJ, Morris JK, et al. Value of low dose combination treatment with blood pressure lowering drugs: analysis of 354 randomised trials[J]. BMJ, 2003, 326:1427.
 [21] Lonn E, Yusuf S. Polypill: the evidence and the promise[J]. CURR OPIN LIPIDOL. 2009, 20(6):453.
 [22] Frishman WH, Ztmkerman AL. Amlodi pjne/atovrastatin: tile first cross risk factor polypill for tile prevention and treatment of caldiovascular disease[J]. Expert Prey Cardiovasc Ther, 2004, 2675:681.
 [23] Zwolska Z, Niemirowska H, Augustynowicz E, et al. Bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide from fixed-dose combination capsules[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2(10):824.
 [24] Kulkanya C, Nottasorn P, Tim RC, et al. Pharmacokinetics of nevirapine in HIV-infected children receiving an adult fixed-dose combination of stavudine, lamivudine and nevirapine[J]. AIDS, 2005, 19:1495.
 [25] Freedberg KA, Losina E, Weinstein MC, et al. The cost effectiveness of combination antiretroviral therapy for HIV disease[J]. N Engl J Med, 2001, 334:824.
 [26] Bakshi R, Hermeling I, Gathmann I, et al. An integrated assessment of the clinical safety of artemether-lumefantrine: a new oral fixed-dose combination antimalarial drug[J]. T Roy Soc Trop Med H, 2000, 94:419.
 [27] Valentin F. Prime time for a polypill after myocardial infraction [J]. Nat Clin Pract Card, 2009, 6:83.

[28] <http://www.emea.europa.eu/htms/human/epar/a.htm>.
 [29] Lonn E, Yusuf S. Polypill: the evidence and the promise[J]. Curr Opin Lipidol 2009, 20(6):453.
 [30] Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, et al. AHA guidelines for primary prevention of cardiovascular disease and stroke: 2002 update. Consensus panel guide to comprehensive risk reduction for adult patients without coronary or other atherosclerotic vascular diseases[J]. Circulation, 2002, 106:388.
 [31] Jha P, Peto R, Zatonsky W, et al. Social inequalities in male mortality and in male mortality from smoking: indirect estimation natio from nal death rates in England and Wales, Poland, and North america[J]. Lancet, 2006, 368:367.
 [32] NCEP Expert Panel. Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) [J]. JAMA, 2001, 285:2486.
 [33] Williams PT. Physical fitness and activity as separate heart disease risk factors: a meta-analysis[J]. Med Sci Sports Exerc, 2001, 33:754.
 [34] Blair SN, Kampert JB, Kohl HW III, et al. Influences of cardio-respiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women [J]. JAMA, 1996, 276:205.

[收稿日期] 2011-04-26

[修回日期] 2011-12-18