

# RP-HPLC 法同时测定野葛的根、茎和叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元的含量

吴向阳<sup>1</sup>, 仰玲玲<sup>2</sup>, 仰榴青<sup>3,\*</sup>, 邹艳敏<sup>3</sup>, 陆继明<sup>4</sup>

(1. 江苏大学化学化工学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 4. 镇江缘源葛业开发有限公司, 江苏 镇江 212003)

**摘 要:** 目的: 建立 RP-HPLC 法同时测定野葛的根、茎及叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元的方法。方法: 样品前处理采用 70% 乙醇超声提取, HPLC 直接测定, 并与药典方法进行对比。结果: 对照品葛根素、大豆苷和大豆苷元分别在 11.87~73.91, 1.00~6.48 和 0.28~1.53  $\mu\text{g/ml}$  范围内呈良好线性关系, 相关系数  $r$  分别为 0.9998, 0.9997 和 0.9994, 最低检出限分别为 0.43、0.24、0.18  $\mu\text{g/ml}$ 。平均回收率分别为 99.78%、102.61% 和 105.57%, RSD 分别为 1.6%、2.8% 和 3.4% ( $n = 5$ )。精密度、稳定性和重现性良好。超声提取法测得的葛根中葛根素、大豆苷和大豆苷元含量分别为 3.98%、0.36% 和 0.039%, 高于药典提取法的提取率, 更适于同时提取葛根素、大豆苷和大豆苷元。葛茎中葛根素、大豆苷和大豆苷元含量分别为 0.004%、0.0032% 和 0.0007%, 葛叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元含量分别为 0.0016%、0.005% 和 0.0012%。结论: 该方法准确、快速, 操作简单, 分离效果好, 可用于野葛的根、茎和叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元含量的同时测定; 江苏茅山地区野葛茎和叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元含量大大低于葛根中的含量。

**关键词:** 野葛; 葛根素; 大豆苷; 大豆苷元; 高效液相色谱法

## Simultaneous RP-HPLC Determination of Puerarin, Daidzin and Daidzein in Roots, Stems and Leaves of *Pueraria lobata* (Wild) Ohwi

WU Xiang-yang<sup>1</sup>, YANG Ling-ling<sup>2</sup>, YANG Liu-qing<sup>3,\*</sup>, ZOU Yan-min<sup>3</sup>, LU Ji-ming<sup>4</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. College of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 4. Zhenjiang Yuanyuan Geyu Development Co. Ltd., Zhenjiang 212003, China)

**Abstract:** A RP-HPLC method was established for the simultaneous determination of puerarin, daidzin and daidzein in roots, stems and leaves of *Pueraria lobata* (Wild) Ohwi. The procedure was based on extraction of test portions with 70% ethanol solution in an ultrasonic field for 20 min at 50 °C followed by direct HPLC analysis of the extracts. The chromatographic conditions were as follows: using a Hypersil ODS-2 column (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) and a mobile phase composed of methanol and  $\text{H}_2\text{O}$ , gradient elution [0–4 min 25:75 (methanol/water volume ratio), 4–7 min 25:75  $\rightarrow$  32:78, 7–9 min 32:68, 9–11 min 32:68  $\rightarrow$  50:50, 11–24 min 50:50, 24–30 min 50:50  $\rightarrow$  25:75], column temperature 35 °C, detection wavelength 250 nm, and flow rate of the mobile phase 0.8 ml/min. A good linear relationship between peak area and concentration was found to puerarin, daidzin and daidzein in the ranges of 11.87–73.91 ( $r = 0.9998$ ), 1.00–6.48 ( $r = 0.9997$ ) and 0.28–1.53  $\mu\text{g/ml}$  ( $r = 0.9994$ ), respectively. The LODs were 0.43, 0.24 and 0.18  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Mean recoveries were 99.78%, 102.61% and 105.57% with the RSDs of 1.6%, 2.8% and 3.4% ( $n = 5$ ), respectively. The precision, stability and reproducibility of the method all were good. The contents of puerarin, daidzin, and daidzein in roots of *Pueraria lobata* (wild) Ohwi determined by this method were 3.98%, 0.36% and 0.039% respectively, higher than 3.28%, 0.26% and 0.028% of those analyzed according to the method stipulated in the *Chinese Pharmacopoeia* 2005 respectively, suggesting high efficiency of ultrasonic-assisted extraction of the three analytes. The contents of puerarin, daidzin, and daidzein in stems of *Pueraria lobata* (wild) Ohwi were 0.004%, 0.0032% and 0.0007% respectively, while

收稿日期: 2008-10-09

作者简介: 吴向阳(1965—), 男, 教授, 博士, 主要从事天然产物活性成分及应用研究。E-mail: wuxy@ujs.edu.cn

\* 通讯作者: 仰榴青(1965—), 女, 教授, 博士, 主要从事天然产物活性成分及应用研究。E-mail: yangliuqing@ujs.edu.cn

those in leaves were 0.0016%, 0.005% and 0.0012%, respectively. This method is accurate, fast and simple and therefore can be used for the simultaneous determination of puerarin, daidzin, and daidzein in roots, stems and leaves of *Pueraria lobata* (wild) Ohwi. Our results demonstrate that the contents of puerarin, daidzin, and daidzein in stems and leaves of *Pueraria lobata* (wild) Ohwi grown in Maoshan area of Jiangsu province are obviously lower than those in the roots.

**Key words:** *Pueraria lobata* (wild) Ohwi; puerarin; daidzin; daidzein; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0248-05

葛根为豆科植物野葛(*Pueraria lobata* (wild) Ohwi)的干燥根<sup>[1]</sup>, 是一种传统的中药材, 其主要有效成分为葛根总黄酮, 其中葛根素、大豆苷和大豆苷元是葛根总黄酮中最主要的异黄酮化合物<sup>[2]</sup>。现代医学研究证明: 葛根素、大豆苷和大豆苷元具有预防和治疗心脑血管疾病和激素依赖性肿瘤<sup>[3]</sup>, 以及预防骨质疏松<sup>[4]</sup>和雌激素样<sup>[5]</sup>等多种药理作用。不同产地的药材, 其活性成分的种类及含量会有所不同。目前有关湖南、山东和广西等地的葛属植物中葛根素、大豆苷和大豆苷元的HPLC法含量测定已有报道<sup>[6-8]</sup>, 而HPLC法测定江苏茅山地区的野葛根及其地上部分野葛藤中葛根素、大豆苷和大豆苷元的含量研究还未见报道。此外, 葛根中测定葛根素的前处理2005版药典方法采用的是30%乙醇回流提取, 而该前处理方法对同时测定葛根素、大豆苷和大豆苷元的适用性还有待研究。为此, 本实验拟对野葛根的根、茎和叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元含量测定的方法进行考察, 并测定茅山地区野葛中三种活性成分的含量, 以期对茅山野葛的开发利用及其葛根产品质量标准的建立提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

野葛根样品: 2007年12月采集于江苏省茅山地区, 切成1~2mm的薄片, 60℃烘干, 粉碎, 过60目筛, 贮存于干燥器中备用; 野葛藤样品: 2007年10月采集于江苏省茅山地区, 分成葛茎和葛叶两部分: 葛茎, 60℃烘干, 粉碎, 过60目筛, 贮存于干燥器中备用; 葛叶, 60℃烘干, 粉碎, 过60目筛, 贮存于干燥器中备用。以上野葛样品均由镇江缘源葛业开发有限公司提供, 经镇江市药品检验所陈黎主任药师鉴定。

葛根素(批号: 110752-200511)、大豆苷(批号: 111738-200501)和大豆苷元(批号: 111502-200402)对照品购自中国药品生物制品检定所; 甲醇(色谱纯) 江苏汉邦科技有限公司; 为娃哈哈纯净水。

### 1.2 仪器与设备

0.45 μm 滤膜 江苏汉邦科技有限公司; 高效液相色谱仪(配有LC-10ATvp, SPD-M10Avp, CTO-10Asp, Class-VP色谱工作站)、UV2450紫外分光光度计 日本岛津公司; KQ-250B超声清洗器 昆山市超声仪器有限

公司; 电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司; RE-52C旋转蒸发器 巩义市予华仪器有限责任公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 色谱条件

Hypersil ODS-2 色谱柱(4.6mm × 250mm, 5 μm), 流动相采用甲醇(A):水(B), 梯度洗脱, 流速为0.8ml/min, 柱温35℃, 检测波长250nm。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序  
Table 1 Program of gradient elution

保留时间(min)	A(%)	B(%)
0~4	25	75
4~7	25~32	75~68
7~9	32	68
9~11	32~50	50~68
11~24	50	50
24~24.01	50~25	50~75
24.01~30.00	25	75

#### 1.3.2 对照品溶液的制备

精密称取葛根素对照品10.7mg, 甲醇溶解, 定容至10ml, 作为葛根素对照品溶液; 精密称取大豆苷对照品3.7mg, 甲醇溶解, 定容至25ml, 作为大豆苷对照品溶液; 精密称取大豆苷元对照品4.6mg, 甲醇溶解, 定容至25ml, 作为大豆苷元对照品溶液。分别精密量取葛根素对照品溶液2.5ml、大豆苷对照品溶液1.5ml和大豆苷元对照品溶液0.3ml置于25ml量瓶中, 加5.7ml甲醇溶解, 并用水定容, 摇匀, 作为葛根素、大豆苷和大豆苷元对照品混合液。

#### 1.3.3 样品溶液的制备

精密称取各葛根样品30mg, 加入15ml 70%乙醇, 50℃超声提取20min, 放冷, 摇匀滤过。取滤液减压浓缩至干, 40%甲醇溶解, 定容至25ml, 经0.45 μm的滤膜过滤, 密封备用。

#### 1.3.4 样品提取率的计算公式

$$E_1(\%) = \frac{25C_1}{M} \times 100$$

$$E_2(\%) = \frac{25C_2}{M} \times 100$$

$$E_3(\%) = \frac{25C_3}{M} \times 100$$

式中： $E_1$ 、 $E_2$ 、 $E_3$  分别葛根素，大豆苷和大豆苷元提取率(%)； $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$  分别为葛根素、大豆苷和大豆苷元的进样浓度(mg/ml)(根据 2.4.1 节的标准曲线计算)； $M$  为葛根样品质量(mg)。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

取葛根素对照品溶液 0.1ml 置 10 ml 容量瓶中，用甲醇定容，摇匀，在 200~400nm 波长范围内测定葛根素对照品的紫外吸收光谱，见图 1。可见葛根素对照品在 250 和 310nm 处有最大吸收。本实验选择 250nm 为检测波长。

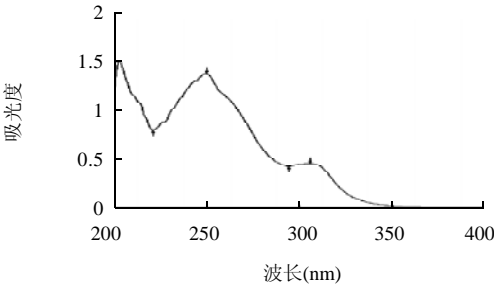
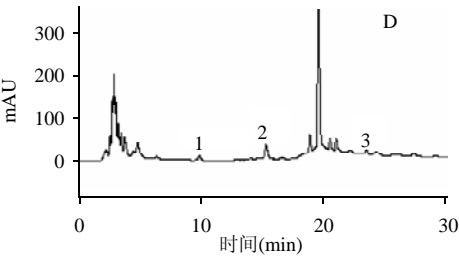
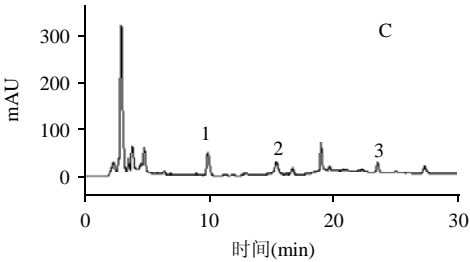
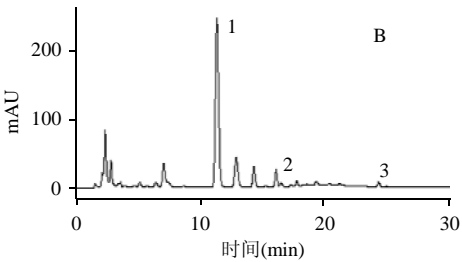
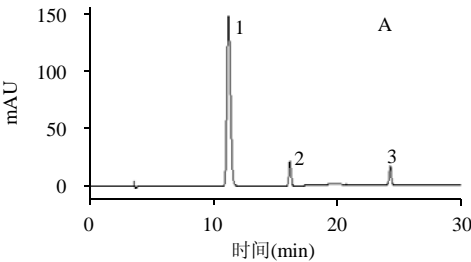


图 1 葛根素对照品甲醇溶液的紫外光谱图

Fig.1 Ultraviolet spectrum of puerarin reference standard in methanol

2.2 色谱条件的选择

本实验选用 Hypersil ODS-2 色谱柱(4.6mm × 250mm, 5 μm)，在该色谱柱条件下选择洗脱条件。由于葛根素、大豆苷和大豆苷元的极性相差较大，既要保证葛根素、大豆苷和大豆苷元的良好分离度，又要尽可能提高分析效率。当使用甲醇-水(30:70, V/V)等度洗脱，大豆苷元的保留时间为 51min，出峰时间太迟；当使用甲醇-水(50:50, V/V)等度洗脱，葛根素和大豆苷的保留时间分别为 2min 和 3min，出峰时间太早，容易受其他峰的干扰，分离度也很差。故本方法采用梯度洗脱，使样品各物质达到良好的基线分离，峰形良好，且基线漂移幅度小。在该条件下，对照品溶液和样品溶液的色谱图见图 2。



A. 对照品混合液；B. 葛根；C. 葛茎；D. 葛叶。1. 葛根素；2. 大豆苷；3. 大豆苷元。

图 2 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of mixed puerarin, daidzin and daidzein standard solution (A), 70% ethanol extracts of roots (B), stems (C) and leaves (D) of *Pueraria lobata* (wild) Ohwi

2.3 前处理条件的选择

2.3.1 提取溶剂

在提取温度为 50℃ 和超声时间为 20min 的条件下，研究了提取溶剂对葛根中葛根素、大豆苷和大豆苷元提取率的影响。结果表明：70% 乙醇超声提取，获得的葛根异黄酮类物质的提取率均为最大(表 2)。

表 2 提取溶剂对葛根中葛根素、大豆苷和大豆苷元提取率的影响(n=3)  
Table 2 Extraction yields of puerarin, daidzin and daidzein from roots of *Pueraria lobata* (wild) Ohwi (n = 3) using water or different aqueous solutions of ethanol

提取溶剂	葛根素(%)	大豆苷(%)	大豆苷元(%)
水	3.16	0.25	0.026
30% 乙醇	3.55	0.28	0.032
50% 乙醇	3.60	0.33	0.034
70% 乙醇	3.98	0.36	0.039
95% 乙醇	3.26	0.36	0.039

2.3.2 提取温度

温度对葛根中葛根素、大豆苷和大豆苷元提取率的影响见图3(提取溶剂70%乙醇,超声时间20min)。可见,在提取温度为50℃时异黄酮类物质的提取率最高。

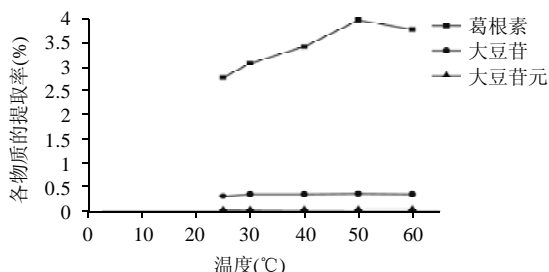


图3 温度对葛根中葛根素、大豆苷和大豆苷元提取率的影响  
Fig.3 Effects of temperature on extraction yields of puerarin, daidzin and daizein from roots of *Pueraria lobata* (wild) Ohwi

### 2.3.3 超声时间

在提取溶剂为70%乙醇和提取温度为50℃的条件下,考察了超声时间对葛根素、大豆苷和大豆苷元提取率的影响,见图4。结果表明,异黄酮类物质提取率随时间增加而增大,超声20min时达最大,超过20min,葛根素、大豆苷和大豆苷元含量不再增加。

为此,本实验选择前处理条件为:提取溶剂70%乙醇,提取温度50℃和超声时间20min。

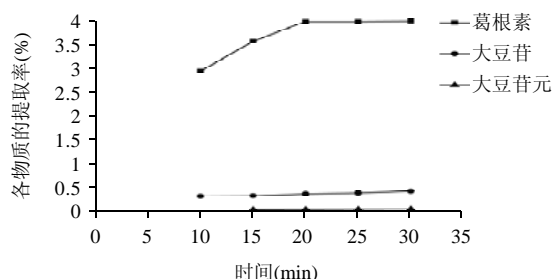


图4 超声时间对葛根中葛根素、大豆苷和大豆苷元提取率的影响  
Fig.4 Effects of ultrasonic treatment time on extraction yields of puerarin, daidzin and daizein from roots of *Pueraria lobata* (wild) Ohwi

### 2.3.4 药典方法

按照中国药典2005版的要求,取葛根粉末30mg,精密称定,置锥形瓶中,精密加入30%乙醇15ml,称定重量,加热回流30min,放冷称定重量,用30%乙醇补足减失的重量,摇匀滤过,取滤液,经0.45 μm的水系滤膜过滤,进样10 μl,测定葛根中葛根素、大豆苷和大豆苷元的含量分别为3.28%、0.26%和0.028%(n=3),RSD分别为2.01%、4.73%和3.02%。

2005版药典中,葛根的活性成分分析只测定了葛根素含量,未测定大豆苷及大豆苷元含量。由于这三种活性成分的极性相差很大,尤其是大豆苷元的极性很小,因此本实验对提取溶剂进行了考察。通过对不同

乙醇浓度的考察,选择70%乙醇作为最适的提取溶剂。超声提取法作为现代分离的一种新型辅助技术,利用超声波所产生的强烈机械振动及空化效应等作用,达到缩短提取时间、降低提取温度和提高提取率的目的。用超声提取法从野葛中提取葛根素、大豆苷和大豆苷元,与传统的药典方法相比,三种不同极性的化合物提取率高且重现性好。

### 2.4 方法学考察

#### 2.4.1 标准曲线

分别精密量取对照品混合液1、2、3、4、5和6ml,分别置于10ml容量瓶中,40%甲醇定容,进样20 μl,在1.3.1节色谱条件下测定峰面积积分值,以进样量X(mg/ml)为横坐标、峰面积Y为纵坐标制作标准曲线,得葛根素、大豆苷、大豆苷元的线性回归方程分别为: $Y = 1 \times 10^8 X + 97719 (r = 0.9998)$ ,  $Y = 1 \times 10^8 X + 6493.2 (r = 0.9997)$ 和  $Y = 1 \times 10^8 X - 3720.3 (r = 0.9994)$ ,线性范围分别为11.87~73.91、1.00~6.48和0.28~1.53 μg/ml;按三倍基线噪音计算得检出限分别为0.43、0.24、0.18 μg/ml。

#### 2.4.2 精密度实验

对照品混合液进样20 μl,测定峰面积。重复进样5次,测得葛根素、大豆苷和大豆苷元峰面积的RSD值分别为0.57%、0.67%和0.87%,表明精密度良好。

#### 2.4.3 稳定性实验

葛根样品溶液于0、2、4、6和8h分别进样20 μl,HPLC测定,葛根素、大豆苷和大豆苷元的峰面积积分值的RSD值分别为0.86%、2.22%和2.04%,可见样品溶液在8h内稳定性良好。

#### 2.4.4 重现性实验

精密称取适量葛根样品5份,按1.3.3节方法制备样品溶液并进行HPLC测定,葛根素、大豆苷和大豆苷元峰面积的RSD值分别为1.54%、1.28%和3.73%,结果表明重现性良好。

#### 2.4.5 回收率实验

精密称取已知含量的葛根(葛根素3.98%,大豆苷0.036%,大豆苷元0.039%)样品30mg,精密加入对照品混合液1ml(相当于葛根素107 μg,大豆苷8.88 μg,大豆苷元2.21 μg),按1.3.3节方法制备样品溶液,平行5份,HPLC测定。葛根素、大豆苷和大豆苷元的5次平均回收率分别为99.78%、102.61%和105.57%,RSD分别为1.6%、2.8%和3.4%。

#### 2.4.6 样品测定

在1.3.1节色谱条件下,进样20 μl,测定样品中葛根素、大豆苷和大豆苷元的含量,平行测定3次,野葛的根、茎和叶中该三种物质的平均百分含量见表3,

可见茅山野葛的根、茎和叶中葛根素含量分布为葛根>葛茎>葛叶,而大豆苷和大豆苷元含量分布为葛根>葛叶>葛茎,葛茎和葛叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元的含量大大低于葛根。

表3 HPLC分析结果( $n=3$ )

Table 3 HPLC analytical results of puerarin, daidzin and daizein in roots, stems and leaves of *Pueraria lobata* (wild) Ohwi ( $n=3$ )

编号	样品	葛根素(%)	大豆苷(%)	大豆苷元(%)
1	葛根	3.98	0.36	0.039
2	葛茎	0.004	0.0032	0.0007
3	葛叶	0.0016	0.005	0.0012

### 3 结 论

采用超声提取前处理,反相高效液相法同时测定野葛样品中葛根素、大豆苷和大豆苷元含量,操作简单、准确、快速,该法可用于野葛的根、茎和叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元含量测定。葛根适合在丘陵地区生长,在茅山地区资源丰富,而葛藤中葛根素、大豆苷

和大豆苷元含量均大大低于葛根中的含量。可见葛藤异黄酮的开发利用价值低,但葛藤中是否含有其他活性成分还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 中国药典委员会. 中国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社, 2005: 233-234.
- [2] 宋洪杰, 曾明, 胡晋红, 等. 葛属植物中3种异黄酮成分分析[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(4): 223-226.
- [3] 郭建平, 孙其荣, 周全. 葛根药理作用研究进展[J]. 中草药, 1995, 26(3): 163-165.
- [4] 任萍, 季晖, 陈秀英, 等. 大豆苷元磺酸钠对维甲酸诱导大鼠骨质疏松的保护作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(6): 623-626.
- [5] 郑高利, 张信岳, 郑经伟, 等. 葛根素和葛根总异黄酮的雌激素样活性[J]. 中药材, 2002, 25(8): 566-568.
- [6] 周红英, 王建华, 严凤云. RP-HPLC法测定不同栽培品种粉葛中葛根素、大豆苷和大豆苷元的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(11): 1668-1670.
- [7] 周红英, 王建华, 闫凤云. RP-HPLC分离测定甘葛藤茎叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 937-939.
- [8] 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): 49-51.