

粉葛 HPLC 指纹图谱研究中 有效成分提取条件的优化

王黎¹ 高苏亚¹ 李华²

(1. 西安医学院 药学院, 陕西 西安 710021; 2. 西北大学 分析科学研究所, 陕西 西安 710069)

摘要: 为了优化粉葛 HPLC 指纹图谱研究中有效成分的提取条件, 采用梯度洗脱(0~50 min A 相由 20% 升为 55%) 流动相甲醇-乙腈(70:30) (A) 和水(B) 柱温 35 °C, 流速 0.6 mL/min, 检测波长 268 nm 的色谱条件监测, 比较方法、溶剂种类及浓度、时间、溶剂用量比例等提取条件。结果表明, 以 30% 甲醇溶液作为溶剂, 超声 30 min (40 °C, 70 Hz), 125 倍溶剂用量比例时, 提取稳定性好、提取效率高, 可作为粉葛 HPLC 指纹图谱分析的较优条件。
关键词: 粉葛; 提取条件; HPLC 指纹图谱

中图分类号: TQ 460.7⁺2; R 931.6 文献标识码: A 文章编号: 1671-3206(2011)05-0754-03

Optimization for the extraction condition of *Pueraria thomsonii* for HPLC fingerprints

WANG Li¹, GAO Su-ya¹, LI Hua²

(1. School of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China;
2. Institute of Analytical Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: To optimize the extraction condition of *Pueraria thomsonii* for HPLC fingerprints, HPLC was applied to determine the effective components in different extraction methods. The separation mobile phase was methanol-acetonitrile (v/v, 70/30) (A) and water (B). The A elution rose to 55% from 20% (0~50 min) at the column temperature of 35 °C and the detection wavelength of 268 nm. The extraction method, solvent and concentration, extraction time and extraction solution ratio were investigated, respectively. When 30% methanol aqueous and extraction solution ratio of 125:1 were applied to extract for 30 min at 40 °C in ultrasonic extraction with 70 Hz, the results were stable and good. This extraction condition can be used for HPLC fingerprints analysis.

Key words: *Pueraria thomsonii*; extraction condition; HPLC fingerprints

葛根(*Radix Puerariae*)又名葛藤、葛麻叶等,市售葛根药材主要为粉葛(*Pueraria thomsonii*),具有解肌退热、生津透疹等功能^[1]。近年来指纹图谱技术应用到中药材质量评价越来越广^[2-3],中药材 HPLC 指纹图谱研究中需要预先提取有效成分,除去干扰色谱分离的物质。粉葛中有效成分葛根素、大豆苷元、大豆苷等均是异黄酮类化合物,应用冷浸、热回流、超声提取的方法居多^[4]。本文以葛根素、大豆苷元为提取指标,优化粉葛提取条件,为其提取工业化及指纹图谱研究提供一定工艺参数。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

粉葛对照药材(批号为 1175-200001)购于中国药品生物制品检定所;粉葛药材样品购于西安宝芝堂医药超市(产地为四川);葛根素、大豆苷元对照品购于陕西省药品检验所(纯度均>98.6%);甲醇、乙腈均为色谱纯;水为超纯水。

SB-5200DT 超声波清洗机; Anke TGL-46G 高速台式离心机; BS210S 型电子天平; DZG-303A 艾柯超纯水机; LC-40AT vp 高效液相色谱仪; SCL-40A vp

收稿日期: 2011-02-28 修改稿日期: 2011-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20975081)

作者简介: 王黎(1978-),女,河南新密人,西安医学院讲师,硕士,主要从事药物质量评价研究。电话: 029-86172835, E-mail: t_lizi@sina.com

多通道系统控制器; CTO-40AS vp 柱温箱; SPD-M10A vp 二极管阵列检测器; CLASS vp 色谱工作站。

1.2 实验方法

将粉葛药材烘干,粉碎,过 60 目筛,称取 0.2 g 粉末,加入 30% 甲醇 25 mL,回流提取 1 h,放冷,称重,补足失去溶剂量,离心 5 min(3 500 r/min)后取上清液,经 0.2 μm 微孔滤膜过滤,以葛根素、大豆苷元为提取指标,采用 HPLC 监测,以优化提取条件。

色谱条件: Kromasil5 C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),采用梯度洗脱 0 ~ 50 min A 相由 20% 升为 55% 流动相甲醇-乙腈(70 : 30) (A) 和水(B) 柱温 35 °C,流速 0.6 mL/min,检测波长 268 nm,进样量 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 提取方法

准确称取 0.2 g 粉葛药材样品粉末 3 份,加入 30% 甲醇溶液 25 mL,分别采用热回流 1 h、超声 30 min、冷浸 10 h 的方法进行提取,按 1.2 节条件进样,测得 3 份试样中葛根素的峰面积分别为 1 049 484、1 251 750、1 115 532。结果表明,与传统的热回流和冷浸的方法相比,超声提取具有操作简单、提取时间短、提取效率高的优点。

2.2 提取溶剂种类及浓度的选择

2.2.1 甲醇浓度的选择 准确称取 0.2 g 粉葛药材样品粉末 6 份,分别加入浓度为 10%、20%、30%、40%、50%、60% 的甲醇溶液 25 mL,超声提取,按 1.2 节条件处理、进样,色谱分离情况见图 1,分别以试样中葛根素、大豆苷元的峰面积对甲醇浓度作图,结果见图 2。

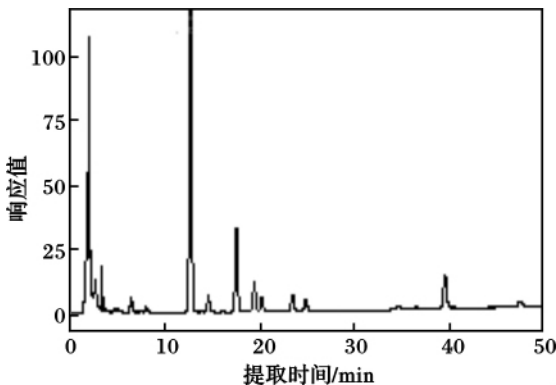


图 1 甲醇提取粉葛药材的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Pueraria thomsonii* extracted by methanol

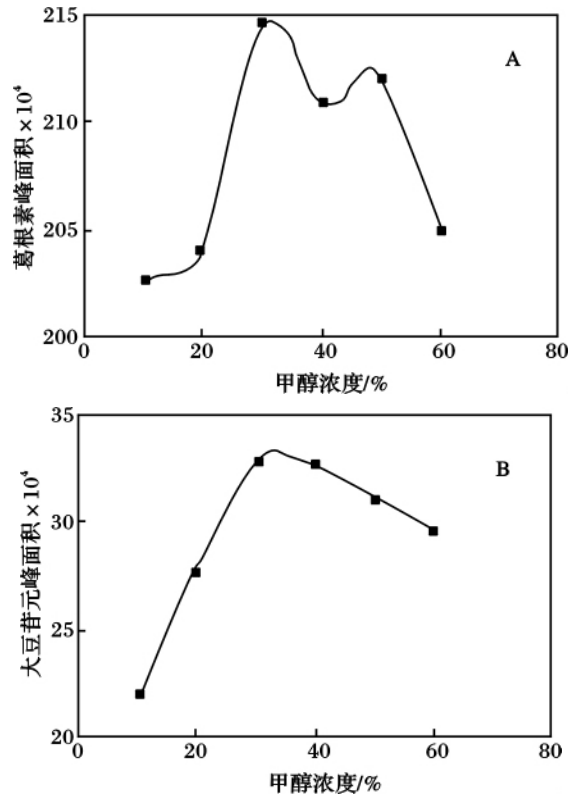


图 2 不同浓度甲醇提取葛根素(A)、大豆苷元(B)的提取效率

Fig. 2 The extraction efficiency of puerarin (A) and daidzein (B) with different methanol concentrations

2.2.2 乙醇浓度的选择 准确称取 0.5 g 粉葛药材样品粉末 6 份,分别加入浓度为 10%、20%、30%、40%、50%、60% 的乙醇溶液 25 mL,超声提取,按 1.2 节条件处理、进样,色谱分离情况见图 3,分别以试样中葛根素、大豆苷元的峰面积对乙醇浓度作图,结果见图 4。

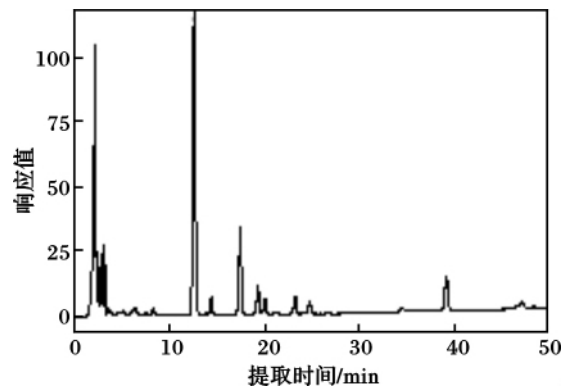


图 3 乙醇提取粉葛药材的色谱图

Fig. 3 The chromatogram of *Pueraria thomsonii* extracted by ethanol

上述实验表明,提取溶剂的浓度对粉葛药材中有效成分的提取效率有一定影响,由非极性和极性两类基团构成的葛根素分子,其非极性基团在溶剂含水量低时易溶解,极性基团在溶剂含水量高时易溶解,采用 30% 甲醇溶液、20% 乙醇溶液的提取效率最高,虽然用 40% 乙醇溶液的提取效率也较高,

但葛根素可能已发生水解,葛根素峰不能和相邻峰完全分离;比较30%甲醇溶液、20%乙醇溶液的提取所得的色谱图及有效成分的峰面积(葛根素和大

豆苷元的峰面积分别为:2 147 610,2 138 515,327 596 287 752),说明用30%甲醇溶液的提取效率最高,且峰形、基线的情况也较好。

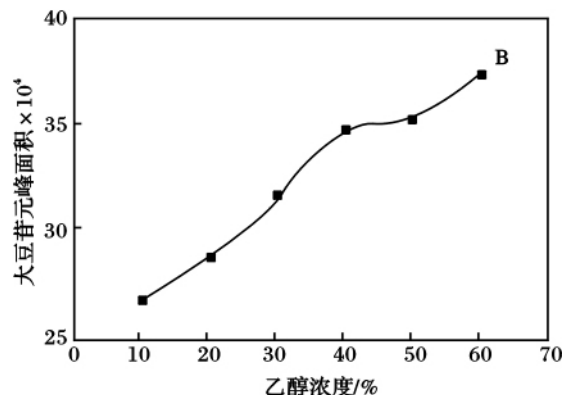
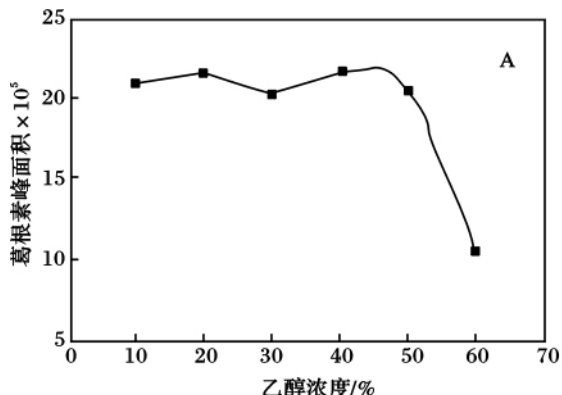


图4 不同浓度乙醇提取葛根素(A)、大豆苷元(B)的提取效率

Fig. 4 The extraction efficiency of puerarin(A) and daidzein(B) with different ethanol concentrations

2.3 提取时间的选择

准确称取0.2 g粉葛药材样品粉末6份,加入30%甲醇溶液25 mL,超声(40 °C、70 Hz)提取10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 min,按1.2节条件处理、进样,以试样中葛根素、大豆苷元的峰面积对提取时间作

图,结果见图5。

由图5可知,对粉葛药材超声30 min,有效成分已经基本提取完全,提取时间的延长并不能增加提取效率。

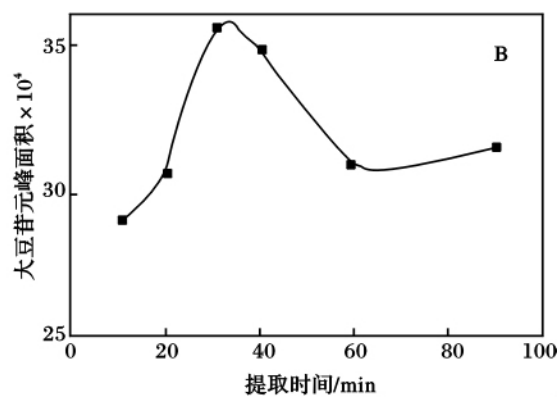
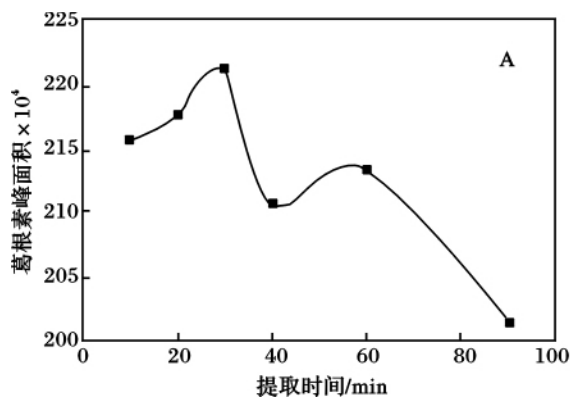


图5 不同超声时间提取葛根素(A)、大豆苷元(B)的提取效率

Fig. 5 The extraction efficiency of puerarin(A) and daidzein(B) with different ultrasonic extraction times

2.4 提取溶剂用量

准确称取0.25 g、0.20 g、0.125 g粉葛药材样品粉末,分别加入30%甲醇溶液25 mL,溶剂用量分别为100, 125, 200倍,超声提取30 min,按1.2节条件处理、进样,测得3份试样中葛根素的峰面积分别为1 326 232, 1 977 527, 1 115 532,大豆苷元的峰面积分别为201 981, 253 355, 166 350。结果表明,采用125倍溶剂量的提取效率、基线效果是比较好的。

3 结论

提取粉葛药材有效成分的优化提取条件为:用30%甲醇溶液作为提取溶剂,在40 °C、70 Hz超声提取30 min,提取溶剂用量比例为125倍。该条件

操作简单、快速,提取稳定性好,提取效率高,适用于粉葛药材的HPLC指纹图谱分析。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 203.
- [2] 易伦朝, 吴海, 梁逸曾. 色谱指纹图谱与中药质量控制[J]. 色谱, 2008, 26(2): 166-171.
- [3] 邵建强. 中药指纹图谱的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(6): 994-998.
- [4] 赵浩如, 郝凤香. 葛根总黄酮的提取方法研究[J]. 中成药, 2000, 22(11): 756-758.