

葛花中鸢尾苷元定性定量方法研究

裴香萍, 裴妙荣, 张淑蓉

(山西中医学院, 太原 030024)

摘要 目的: 研究葛花中鸢尾苷元定性定量方法。方法: 采用薄层色谱法对葛花进行鉴别; 采用高效液相色谱法对葛花中鸢尾苷元进行含量测定, 色谱柱为 AichromBond-AQ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸 (48:52), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 265 nm, 柱温 35℃。结果: 葛花中鸢尾苷元的薄层色谱鉴别特征明显, 专属性强; 鸢尾苷元在 0.2~2.0 μg 范围内有良好的线性关系 ($r=0.9999$), 平均加样回收率为 101.8% ($n=9$)。结论: 方法准确、简便, 可进行葛花中鸢尾苷元定性定量。

关键词: 定性定量; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 葛花药材; 鸢尾苷元

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-1004-03

Study on the methods of qualitation and quantitation of tectorigenin in *Pueraria lobata* flowers

PEIXiang-ping PEIMiao-rong ZHANGShu-rong

(Shanxi university of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024 China)

Abstract objective To study the methods of qualitation and quantitation of tectorigenin in flowers of *Pueraria lobata*. **Method:** TLC was used for identification of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; tectorigenin was determined by HPLC, AichromBond-AQ C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was adopted and the mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid (48:52) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 265 nm and column temperature was 35℃. **Result** The feature of tectorigenin was obvious by TLC. The linear range of tectorigenin was 0.2-2.0 μg ($r=0.9999$); The average recovery was 101.8% ($n=9$). **Conclusion** the method is accurate, simple and convenient for control the standard of flowers of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi.

Key words qualitation and quantitation, TLC; HPLC; flowers of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; tectorigenin

葛花为豆科植物葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的花, 异名葛条花, 性味甘凉, 其功用为解酒醒脾, 治伤酒发热烦渴, 不思饮食, 呕逆吐酸, 吐血, 肠风下血^[1], 长期以来被用于缓解酒后呕吐等症状, 其主要有效成分是异黄酮化合物。日本科学家最近揭示了葛花的解酒机制, 认为葛花中含有的皂角苷和异黄酮分别在免疫系统和内分泌系统发挥协调作用, 它们共同作用可以改善酒精引起的新陈代谢异常症状^[2-3]。异黄酮类化合物具有多种生物活性, 具有改善心肌缺血症状, 扩张血管、抑制血小板聚集, 降低血中胆固醇和甘油三酯含量, 并有抗心律失常作用, 在内分泌系统方面异黄酮化合物主要表现为雌激素样作用, 与雌激素一样有兴奋和抑制双重

作用^[4-5]。据文献报道葛花中主要含有尼泊尔鸢尾异黄酮、尼泊尔鸢尾异黄酮 7-O-8-D-葡萄糖苷、葛花苷、染料木素、刺芒柄花素、大豆苷元和 8-C-芹菜糖 (1→6)-葡萄糖大豆苷等成分^[6-7]。葛花药材现收载于卫生部药品标准中药材分册第一册, 只收载了药材的性状鉴别项^[8], 为进一步完善和提高药材的质量标准, 参考有关文献报道^[9], 本试验以鸢尾苷元为指标性成分, 增加了葛花药材的薄层色谱鉴别和含量测定项。

1 仪器与试剂

Waters 2690 系列高效液相色谱仪; 2996 二极管阵列检测器; Empower pro 色谱工作站。循环水式多用真空泵 SHB-III A (上海豫康科教仪器设备有限

公司); 数显恒温水浴锅 (上海申胜生物技术有限公司); ZF-90型暗箱式紫外透射仪 (上海顾村电光仪器厂); 薄层层析聚酰胺薄膜 (浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂);

葛花 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 购于河南省卢氏县山区。

对照品: 鸢尾苷元, 自行制备, 经 $^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$ 和 ESI-MS 鉴定, 高效液相色谱归一化法纯度 > 98%。

甲醇为色谱纯; 高纯水采用 RO-ZY-30 和 Milli-Q 纯水机二次制备。其他所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别 取葛花药材 0.5 g 粉碎 (过 40 目筛), 精密称定, 精密加入甲醇 10 mL, 称重, 超声处理 (功率 150 W, 频率 40 kHz) 20 min, 放至室温, 再称重, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 放置至室温, 取上清液作为供试品溶液; 精密称取鸢尾苷元对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.10 mg 的对照品溶液。分别吸取供试品溶液和对照品溶液各 5 μL , 点于同一张聚酰胺薄膜上, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水 (15: 40: 20: 10) 展开, 展距 14 cm, 在 365 nm 紫外灯下观察, 见图 1-A; 用 1% 三氯化铁乙醇溶液显色, 见图 1-2。

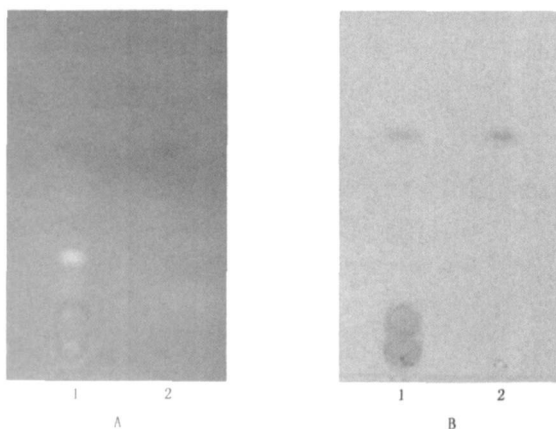


图 1 紫外光灯下 (A) 和 1% 三氯化铁乙醇溶液显色 (B) 的薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms tectorigenin under UV 365 nm (A) and coloration by 1% FeCl_3 -EtOH (B)

1. 样品 (sample) 2. 鸢尾苷元对照品 (tectorigenin reference substance)

2.2 含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取鸢尾苷元对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.10 mg 的溶液。

即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 按“2.1”项下方法制备供试品溶液。

2.2.3 色谱条件与系统适用性试验 Achrom Bond-AQ C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 甲醇-0.1% 磷酸 (48: 52) 为流动相, 流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$; 检测波长 265 nm; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按鸢尾苷元峰计算应不低于 3000。在本文色谱条件下的色谱图见图 2。

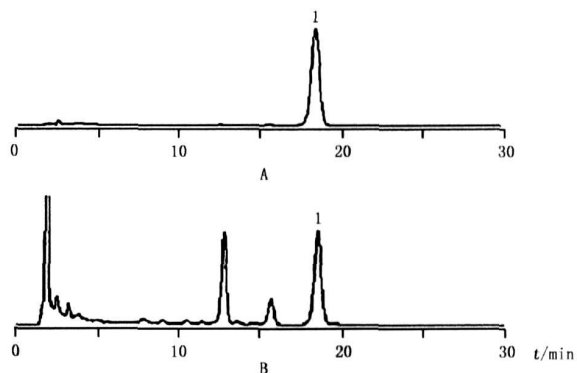


图 2 对照品 (A) 与样品 (B) 色谱图

Fig 2 Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)
1. 鸢尾苷元 (tectorigenin)

2.2.4 线性关系考察 精密称取鸢尾苷元对照品 4.99 mg 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液 (0.1996 mg \cdot mL $^{-1}$)。精密吸取对照品储备液 1, 2.5, 5.0, 7.5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 19.96, 49.9, 99.8, 149.7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列浓度对照品溶液。分别精密吸取上述系列浓度对照品溶液和对照品储备液 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定鸢尾苷元峰面积值。以进样量 (μg) 为横坐标, 峰面积值为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程:

$$Y = 7.389 \times 10^6 X - 4.936 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

结果表明鸢尾苷元的进样量在 0.2~2.0 μg 范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液 (药材批号 040310) 10 μL , 重复进样 6 次, 依法测定鸢尾苷元峰面积值, 计算 RSD 为 0.43%。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 (药材批号 040310) 10 μL , 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 依法测定鸢尾苷元峰面积值, 求得 RSD 为 1.2%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取样品 (药材批号 040310) 6 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定。

结果样品中鸢尾苷元含量平均值为 0.215%, RSD 为 1.0%。

2.2.8 加样回收试验 取已测知含量的样品(药材批号 040310) 0.25 g 研细, 精密称取 9 份, 分别精密加入 $113.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鸢尾苷元对照品溶液 2.5、5.0、7.5 mL 各 3 份, 按“2.1”项下方法制备所需溶液, 进样 10 μL 测定, 计算回收率。结果低、中、高 3 个加入量的回收率 ($n=3$) 分别为 102.2% (RSD = 1.6%), 102.1% (RSD = 0.41%), 101.2% (RSD = 0.69%); 平均回收率 ($n=9$) 为 101.8%。

2.2.9 含量测定 取样品, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样 10 μL , 以外标法计算含量。结果批号为 04031Q、050806、050809 的样品中鸢尾苷元含量 ($n=3$) 分别为 0.215%, 0.369%, 0.376%。

3 讨论

3.1 试验中比较了 95% 乙醇、无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯 4 种溶剂提取制备供试品溶液, 均采用超声处理 20 min, 表明甲醇提取率较高。试验还考察了回流提取及超声提取 2 种提取方法, 提取时间均为 20 min, 结果基本一致, 故选择了超声提取。

3.2 本试验采用 AichromBond-AQ C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm), 摸索比较了甲醇-1% 醋酸 (48:52)、甲醇-1% 醋酸 (45:55)、甲醇-0.1% 磷酸 (48:52) 等不同流动相系统, 综合峰形的对称性、保留时间以及与其他成分峰的分离效果, 选择甲醇-0.1% 磷酸 (48:52) 流动相系统; 经紫外扫描确定检测波长为 265 nm; 经考察, 柱温选择 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.3 由于目前国内尚无以鸢尾苷元作为指标性成分测定葛花药材中鸢尾苷元的含量。在试验中通过对药材中分离得到的化合物加以鉴定并确定为鸢尾苷元, 峰纯度检查结果为 99.38%。参考文献报道^[10-11], 以鸢尾苷元作为指标性成分进行了定性鉴别及定量分析研究, 方法简便、可靠, 为进一步完善葛花药材的质量标准提供依据; 并可为含同类成分的药材或制剂的定性鉴别及定量分析提供一定参考。

致谢: 本实验得到了中国药品生物制品检定所中药室鲁静、何轶、张聿梅等老师的大力支持和帮助, 在此深表感谢!

参考文献

- 1 Great Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典). Second Part (下册). Shanghai Shanghai Science and Technology Publisher (上海科学技术出版社), 1993. 2307
- 2 Junei K, Junichi F, Junko B *et al* Study on the Constituents of *Pueraria lobata* *Chem Pharm Bull*, 1987, 35: 4846
- 3 Park HJ Isoflavone glycosides from the flowers of *Pueraria thurberiana* *Phytochemistry*, 1999, 51: 147
- 4 MAO Hui (苗慧). The pharmacological action of compounds of isoflavone (异黄酮成分的药理作用). *Foreign Med Sci (sect Pharm)* (国外医药 药学分册), 1989, 16(6): 355
- 5 YN Chao-ling (尹朝玲). Recent advance of distribution, pharmacology and analytical method of isoflavone compounds in plant (异黄酮在植物界中的分布、药理及分析方法研究进展). *Lishichen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2003, 14(3): 178
- 6 MAO Jun-qin (毛峻琴), MI He-ming (宓鹤鸣). Recent advance on the Soy isoflavone (大豆异黄酮的研究进展). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(1): 61
- 7 ZHANG Shu-ping (张淑萍), ZHANG Zun-ting (张尊听). Studies on the chemical constituents of isoflavone from the flowers of *Pueraria lobata* (野葛花异黄酮化学成分研究). *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17(5): 595
- 8 Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health P R China Chinese Medicinal Material (卫生部药品标准 中药材分册). Vol 1 (第一册). 1991. 90
- 9 ZHANG Shu-ping (张淑萍), HE Yun (贺云), LU Bo-tao (刘柏涛). Determination of kakkalidone, kakkalidone and irisolidone in the flowers of *pueraria lobata* by RP-HPLC (RP-HPLC 测定野葛花中 3 种异黄酮). *Chin J Anal Lab* (分析试验室), 2006, 25(2): 74
- 10 ZHU Hua (朱华), LIU Xin-mei (刘芯蕊), WANG Xiao-yun (王孝勋). Development of studying *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi (葛花的研究进展). *Chin Arch Tradit Chin Med* (中医学刊), 2005, 23(12): 2273
- 11 YN Jun-ting (尹俊亭), ZHONG Ying (仲英), SUN Jing-yong (孙敬勇). Development of studying *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi (葛花的研究进展). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(12): 1905

(本文于 2008 年 5 月 13 日收到)