

HPLC 测定葛花中 6"-O-木糖鸢尾苷的含量

姚美村, 廖祎婷, 袁月梅, 高 越, 汤 毅*

中山大学药学院药, 广州 510006

摘要: 本文建立了葛花中 6"-O-木糖鸢尾苷含量测定的 HPLC 方法。采用 GRACE C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 紫外检测波长为 265 nm, 柱温为室温。6"-O-木糖鸢尾苷的峰面积 (Y) 与浓度 (X) 在 10.33 ~ 185.99 μg/mL 范围内线性关系良好, $Y = 30731X - 216635$, $r = 0.9992$ ($n = 7$); 平均回收率为 100.2%, RSD < 2% ($n = 9$); 测得 8 批葛花药材中 6"-O-木糖鸢尾苷含量为 11.08 ~ 48.23 mg/g。方法学验证结果表明该法准确、可靠, 可用于葛花中主要成分 6"-O-木糖鸢尾苷的含量测定。

关键词: 葛花; 6"-O-木糖鸢尾苷; 高效液相色谱法; 解酒; 不同产地

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

Determination of 6"-O-xylosyl-tectoridin in Flos Puerariae by HPLC

YAO Mei-cun, LIAO Yi-ting, YUAN Yue-mei, GAO Yue, TANG Yi*

School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: An HPLC method for determination of 6"-O-xylosyl-tectoridin in Flos Puerariae was developed. The samples were separated on a C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with the mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution). Flow rate was 0.8 mL/min. The detection wavelength was set at 265 nm. Column temperature was ambient temperature. The linear range of 6"-O-xylosyl-tectoridin was 10.33-185.99 μg/mL, and the linear function was $Y = 30731X - 216635$ ($r = 0.9992$). The average recovery was 100.2%, and RSD was less than 2% ($n = 9$). The contents of 6"-O-xylosyl-tectoridin in Flos Puerariae was 11.08-48.23 mg/g. The method was accurate and reliable, which can be used to evaluate the qualities of Flos Puerariae.

Key words: Flos Puerariae; 6"-O-xylosyl-tectoridin; HPLC; hangover alleviating; different origins of production

葛花又名葛条花, 是豆科 (Leguminasae) 植物野葛 (*Pueraria Lobata* (Willd.) Ohwi) 或干葛藤 (*P. thomsonii* Benth.) 的干燥花, 中医主要用于解酒醒脾, 是很具代表性的解酒药物^[1], 著名解酒方剂“葛花解醒汤”已流传使用数百年。现代研究已证实葛花确有解酒和护肝作用^[2], 近年来的相关研究多集中于异黄酮成分方面, 认为该类成分是解酒的主要药效物质基础^[3,4]。目前, 葛花质量控制常采用葛根素为对照品, 以紫外分光光度法测定总黄酮含量^[5]; 也有报道以葛花苷等为对照品, 采用高效液相色谱法测定了其中的部分黄酮类成分^[6]。本研究在对不同来源葛花药材分析中发现葛花苷和葛根素的含量非常低, 而另外两种异黄酮成分——鸢尾

苷和 6"-O-木糖鸢尾苷的含量则相对较高。本文建立了葛花中 6"-O-木糖鸢尾苷含量测定的 HPLC 方法, 并对 8 批不同产地葛花中的该成分进行了分析。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱系统 (含 Waters 1525 泵, Waters 2487 双通道紫外检测器, Waters 717plus 自动进样器, Breeze 色谱工作站, 美国 Waters 公司); 电子恒温水浴锅 (广东省汕头市医用设备厂); DZF-6051 型真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司); SB25-42D 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

甲醇 (分析纯, 江苏汉邦科技有限公司), 乙腈 (色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司), 超纯水; 6"-O-木糖鸢尾苷 (自制, 经 HPLC 归一化法测定纯度为 99.1%); 8 批葛花药材 (广州市药材公司), 经中山

收稿日期: 2009-12-14

接受日期: 2010-04-08

基金项目: 中山大学 2008 年实验室开放基金项目“葛花异黄酮类成分的药动/药效学研究”资助

* 通讯作者 E-mail: Tigertang@21cn.com

大学药学院天然药物化学王军副教授鉴定为野葛 (*Pueraria Lobata* (Willd.) Ohwi) 的干燥花, 标本存于中山大学药学院 (No. 20071019)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

GRACE C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (美国格雷斯公司) 色谱柱, 流动相: 乙腈 (A)-水 (B), 线性梯度洗脱, (A: B: 0 min 15: 85; 35 min 50: 50; 36 min 15: 85; 40 min 15: 85; v/v); 流速: 0.8 mL/min; 紫外检测波长: 265 nm; 室温。

1.2.2 供试品溶液的制备

取葛花药材约 50 g, 精密称定, 以 70% 乙醇 500 mL 浸泡 1 h 后, 在水浴中回流提取 1 h。药渣用 70% 乙醇 400 mL, 在同样条件下提取两次, 每次 1 h, 合并提取液。将提取液减压回收乙醇后, 残余物置真空干燥箱中干燥, 称重。精密称取干燥提取物约 20 mg, 用 80% 甲醇少量超声溶解后, 以 80% 甲醇定容于 50 mL 量瓶中, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液。

1.2.3 对照品溶液的制备

精密称取 6"-O-木糖鸢尾苷对照品 9.3 mg, 以少量 80% 甲醇超声溶解, 置于 50 mL 量瓶中, 以 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成含量为 185.99 μg/mL 的对照品溶液。

1.2.4 系统适用性试验

取按“1.2.2”和“1.2.3”项下制备的供试品溶液和对照品溶液, 按“1.2.1”项下色谱条件进行测定。

1.2.5 线性关系考察

精密吸取上述 185.99 mg/mL 的对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL 和 10.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇至刻度, 得到质量浓度分别为 10.33、30.99、61.99、92.99、124.00、155.00 μg/mL 和 185.99 μg/mL 的对照品溶液; 分别精密吸取上述 7 个不同浓度的对照品溶液 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 以峰面积 (Y) 对 6"-O-木糖鸢尾苷的浓度 (X) 进行线性回归。

1.2.6 精密度试验

准确吸取对照品溶液 10 μL, 在同一条件下重复进样 5 次, 测定 6"-O-木糖鸢尾苷的吸收峰面积。

1.2.7 重复性试验

取同一批号的葛花样品, 平行称定 6 份, 分别按

“1.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 每份精密吸取 10 μL, 测定峰面积并计算 6"-O-木糖鸢尾苷的含量, RSD 为 0.88%, 表明本法重复性较好。

1.2.8 加样回收试验

取已测定 6"-O-木糖鸢尾苷含量的葛花样品适量, 精密称定 9 份, 每 3 份加入相同量的 6"-O-木糖鸢尾苷对照品, 分别按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液, 取续滤液 10 μL 进行测定。

1.2.9 样品测定

取 8 批不同来源的葛花样品, 按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 10 μL, 测定 6"-O-木糖鸢尾苷的峰面积, 并计算各样品中 6"-O-木糖鸢尾苷的含量。

2 结果与讨论

2.1 6"-O-木糖鸢尾苷理论塔板数为 11732, 6"-O-木糖鸢尾苷峰与各相邻峰的分度均大于 1.5, 对应图谱见图 1。

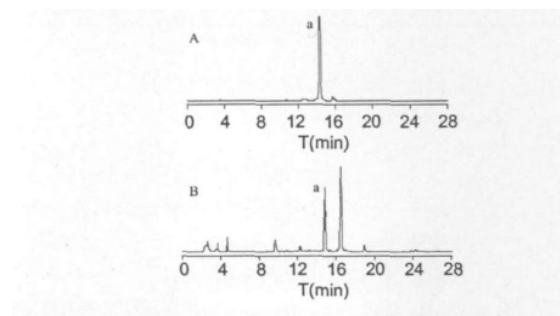


图 1 6"-O-木糖鸢尾苷对照品 (A) 及葛花药材 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 The representative HPLC chromatograms of (A) 6"-O-xylosyl-tectoridin standard and (B) a 70% ethanol extract of Flos Pueraria from Jiangsu province
a. 6"-O-木糖鸢尾苷; a. 6"-O-xylosyl-tectoridin

2.2 6"-O-木糖鸢尾苷回归方程为 $Y = 30731X - 216635$, $r = 0.9992$ ($n = 7$), 表明其浓度在 10.33 ~ 185.99 μg/mL 与峰面积呈良好线性关系。精密度试验结果 RSD 为 0.78%, 表明精密度良好。重复性试验结果 RSD 为 0.88%, 表明本法重复性较好。加样回收试验结果见表 1, 平均回收率为 100.2%, RSD 为 2.4%。

2.3 样品测定结果表明, 不同产地葛花药材中均检测到 6"-O-木糖鸢尾苷, 其含量随产地不同而有变化。8 批葛花样品中 6"-O-木糖鸢尾苷的含量见表 2

表 1 加样回收试验结果 (n = 9)

Table 1 Recoveries of 6''-O-xylosyl-tectoridin in Flos Pueraria samples (n = 9)

样品量 Amount of sample (g)	样品含量 Contained (mg)	加入量 Added (mg)	测得量 Found (mg)	回收率 Recovery (%)	平均值 Mean (%)	RSD (%)
0.041	1.7175	0.2811	1.9855	105.0		
0.041	1.7175	0.2811	1.9895	103.5		
0.040	1.6756	0.2811	1.9536	101.1		
0.041	1.7175	0.6918	2.4105	99.9		
0.040	1.6756	0.6918	2.3666	100.1	100.2	2.4
0.041	1.7175	0.6918	2.3775	104.9		
0.041	1.7175	1.3404	1.8585	95.0		
0.040	1.6756	1.3404	1.8166	95.3		
0.041	1.7175	1.3404	1.8565	96.8		

表 2 不同产地样品测定结果 (n = 3)

Table 2 The contents of 6''-O-xylosyl-tectoridin in Flos Pueraria samples from 8 origins of production in China (n = 3)

编号 No.	产地 Producing area	6''-O-木糖鸢尾苷(mg/g) 6''-O-xylosyl-tectoridin	RSD (%)
1	河南	38.43	2.13
2	河北	39.03	1.97
3	湖北	48.23	1.97
4	山西	41.89	1.77
5	江苏	32.69	1.32
6	安徽	30.63	2.06
7	湖南	25.91	1.20
8	广西	11.08	2.26

2.4 讨论

2.4.1 在对不同来源葛花样品进行 HPLC 分析的过程中,发现鸢尾苷和 6''-O-木糖鸢尾苷的含量非常高,远远超出了葛花苷的含量,为了更好的测定葛花中异黄酮成分的含量,本研究建立了葛花药材中主要异黄酮类成分 6''-O-木糖鸢尾苷的 HPLC 测定方法,并对不同产地的葛花中的 6''-O-木糖鸢尾苷进行了含量测定。结果表明,该方法中 6''-O-木糖鸢尾苷的色谱峰面积与其浓度具有良好的线性关系,精密度和重复性都较好,平均加样回收率为 100.2%;8 批不同来源的葛花药材中均明显检测到有较高含量的 6''-O-木糖鸢尾苷存在,其含量在 11.08 ~ 48.23 mg/g 范围内。

2.4.2 现代药理学研究已证实,葛花发挥解酒作用的主要有效成分是异黄酮化合物^[1],其中的主要成

分为葛花苷。然而本研究在对不同来源葛花样品的 HPLC 分析中,即使采用文献^[4]报道的分析方法,也没有检测到有明显的葛花苷存在。Kim CS 等^[5]的研究结果表明,在储放 5 年以内的葛花中几乎检测不到葛花苷,而主要为鸢尾苷和 6''-O-木糖鸢尾苷等成分^[6],本研究结果也表明,放置时间较短的葛花药材中的鸢尾苷和 6''-O-木糖鸢尾苷确实含量比较高,而葛花苷和葛根素几乎检测不到。因此,本研究在建立了鸢尾苷含量测定方法之外,又建立了葛花中另外一种主要成分 6''-O-木糖鸢尾苷的含量测定方法,为更全面评价葛花的质量提供了方法学基础。

2.4.3 本研究建立了葛花中 6''-O-木糖鸢尾苷的含量测定方法,可用于葛花药材中此类成分的定量分析。然而,与已有文献中认为葛花苷为葛花特异性成分相比,6''-O-木糖鸢尾苷是否可以单独作为葛花的定量分析指标,或者是否可以与另外一种主要成分鸢尾苷共同作为质量评价指标,仍有待通过对更多不同产地的葛花样品,结合相应的药理药效实验进行全面综合考察和评价。

参考文献

1 Yin JT(尹俊亭),Zhong Y(仲英),Sun JY(孙敬勇). Re-view of researches progress on *Pueraria lobata*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2005,36: 1905-1906.

2 Chinese Materia Medica Editorial Board in State Administration of Traditional Chinese Medicine (国家中医药管理局《中华本草》编委会). *Chinese Materia Medica 4* (中华本草 4). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999. 619.

(下转第 938 页)

明微波对番茄红素热处理异构化过程有影响,为了使得此进程进一步加快,我们研究了此方法对异构化的影响。

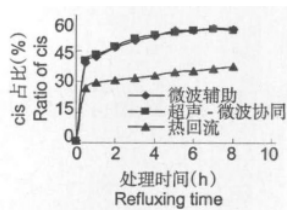


图8 超声-微波协同与微波处理、热回流处理比较

Fig. 8 Comparison to microwave, ultrasound-microwave and refluxing in ethyl acetate

从上图可以看出,超声-微波协同法较之热回流法,可以使番茄红素异构化进程加快,所得顺式异构体的占比也较高。但是,超声-微波协同法与微波单独使用相比,无明显差异。

3 结论

试验得出,乙酸乙酯热回流处理后 6% 番茄红素油脂中顺式异构体占比高于 90% 高纯番茄红素中顺式异构体占比;氮气保护对番茄红素的异构化无明显影响;乙酸乙酯热回流处理 8 h 左右,顺式异构体占比可达 37.2%。微波对番茄红素异构化进程有较强的促进作用,超声-微波协同也可以明显加快此进程,但是和微波法相比,作用效果不明显,二者在处理 5 h 后顺式异构体占比均可以达到 54% 左右。所以获得较高顺式占比的高顺番茄红素产品,微波处理的方法比较适用。

目前,高顺番茄红素产品的保藏问题是制约此

种产品推向市场的主要症结所在,如何提高高顺番茄红素产品的稳定性仍然是一个亟待解决的问题。

参考文献

- 1 Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53: 194S-200S.
- 2 Mayne ST, Cartmel B, Lin H, et al. Low plasma lycopene concentration is associated with increased mortality in a cohort of patients with prior oral, pharynx or larynx cancers. *J Am Coll Nutr*, 2004, 23: 34-42.
- 3 Zechmeister L. *Cis-trans Isomeric Carotenoids Vitamin A and Arylpolynes*. New York: Academic Press, 1962.
- 4 Steven KC, Curt E, Steven JS, et al. *Cis-trans* lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1996, 5: 823-833.
- 5 Boileau TWM, Boileau AC, Erdman JW. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Exp Biol Med*, 2002, 227: 914-919.
- 6 Bohm V, Puspitasari-Nienaber NL, Ferruzzi MG, et al. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 221-226.
- 7 Frank HA, Young AJ, Britton G, et al. *The Photochemistry of Carotenoids*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. 161-188.
- 8 Di Mascio P, Kaiser S. Lycopene as the most effective biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 274: 532-538.
- 9 Mortensen A, Skibsted LH, Sampson J, et al. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett*, 1997, 418: 91-97.

(上接第 900 页)

- 3 Lee HW, Choo MK, Bea EA. β -Glucuronidase inhibitor tectorigenin isolated from the flower of *Pueraria thunbergiana* protects carbon tetrachloride induced liver injury. *Liver Int*, 2003, 23: 221.
- 4 Han YO, Han MJ, Park SH, et al. Protective effects of kakkalide from *Flos Puerariae* on ethanol-induced lethality and hepatic injury are dependent on its biotransformation by human intestinal microflora. *J Pharmacol Sci*, 2003, 93: 331-336.

- 5 Li W(李文), He D(贺殿), Wang X(王晓), et al. Determination of total flavonoids in *Flos Puerariae*. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2005, 20: 14-15.
- 6 Zhang SP(张淑萍), He Y(贺云), Liu BT(刘柏涛). Determination of kakkalide, kakkalidone and irisolidone in the flowers of *Pueraria lobata* by RP-HPLC. *Chin J Anal Lab* (分析实验室), 2006, 25: 74-76.
- 7 Kim CS, Shin SM, Ha HK, et al. Study of substance changes in flowers of *Pueraria thunbergiana* Benth. during storage. *Arch Pharm Res*, 2003, 26: 210-213.