

HPLC法测定不同生长年限的葛根不同部位中葛根素的含量^Δ

刘计权*, 宋 强, 杨文珍, 任剑锋, 宋晓春(山西中医学院中药学院, 太原 030024)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0366-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.24

摘要 目的:建立测定不同生长年限的葛根不同部位中葛根素含量的方法。方法:采用高相液相色谱法。色谱柱为Dikma Diamonsil C₁₈,流动相为甲醇-水(25:75, V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为室温,检测波长为250 nm。结果:葛根素的进样量在0.18~1.98 μg范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999\ 8$);精密性、稳定性试验的RSD<2%,重复性试验的RSD<3%;平均加样回收率为97.01%,RSD=1.71%($n=6$)。葛根木质部与韧皮部的葛根素含量相近,茎部最少,且三年生葛根的葛根素含量最高。结论:葛根素含量与生长年限及不同部位有关。该方法操作简单、结果可靠,适用于葛根药材的质量控制。

关键词 葛根;葛根素;高效液相色谱法;年限;木质部;韧皮部;茎部

Content Determination of Puerarin in Different Parts of *Pueraria lobata* with Different Growth Periods by HPLC

LIU Ji-quan, SONG Qiang, YANG Wen-zhen, REN Jian-feng, SONG Xiao-chun(College of TCM, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030024, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of puerarin in different parts of *Pueraria lobata* with different growth periods. METHODS: The sample was determined by HPLC. The determination was performed on Dikma Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water (25:75, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was ambient temperature and the detection wavelength was 250 nm. RESULTS: The linear range of puerarin was 0.18-1.98 μg with an average recovery ($r=0.999\ 8$) of 97.01% (RSD=1.71%, $n=6$). RSDs of precision, stability tests were lower than 2%, and that of reproducibility test was lower than 3%. The content of puerarin in xylem of *P. lobata* was similar to that in phloem of *P. lobata*. The content of puerarin was the highest in triennial *P. lobata*. CONCLUSIONS: The content of puerarin is affected by different growth periods and different parts. The method is simple and reliable, and can provide reference for standard cultivation and utilization of *P. lobata*.

KEYWORDS *Pueraria lobata*; Puerarin; HPLC; Growth periods; Xylem; Phloem; Stem

量差异显著;在早春采集的样品中含量较高,在夏末时含量普遍较低(除H2-J中的桑皮黄素外);不同品种间的含量也有较大差异:H1~H3品种早春采集的样品中的两种成分含量较高。分析过程还发现,桑皮苷A等白藜芦醇苷类成分作为一种强抗氧化剂,在日照和长期保存中容易氧化降解,这与文献报道^[8-10]相符,因而药材采集后应阴干、低温保存。

综上所述,该方法操作简便、结果准确,可为桑枝的合理采收和开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:279-280.
- [2] 顾关云. 桑的化学成分和生物活性研究进展[J]. 国外医药植物药分册, 2007, 22(1):12.
- [3] 姜乃珍, 薄铭, 吴志平. 中药桑枝化学成分及药理活性研究进展[J]. 江苏蚕业, 2006, 34(2):4.
- [4] 阚启明, 康宁, 田海涛, 等. 桑皮苷的镇咳平喘作用[J]. 沈

阳药科大学学报, 2006, 23(6):388.

- [5] 王元成, 伍春, 陈虎, 等. 桑白皮中白藜芦醇、氧化白藜芦醇和桑皮苷的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(15):135.
- [6] 周吉银, 王稳, 周世文. 桑药用资源的降糖作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11):204.
- [7] Zheng ZP, Cheng KW, Zhu Q, et al. Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(9):5 368.
- [8] 朱祥瑞, 费建明, 杨逸文, 等. 桑椹和桑枝中白藜芦醇的提取及含量测定[J]. 蚕业科学, 2007, 33(1):110.
- [9] 罗隽, 刘韶, 李新中. 高效液相色谱法测定桑树各部位及其配方颗粒中桑皮苷A的含量[J]. 中南药学, 2011, 9(1):11.
- [10] 方婧, 高霏, 吴宏伟, 等. 桑枝中桑皮苷A的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5):80.
- [11] 周林, 徐立, 伍春, 等. 桑枝皮总黄酮提取工艺条件的优化试验[J]. 蚕业科学, 2010, 36(3):491.

(收稿日期:2014-07-18 修回日期:2014-10-17)

(编辑:孙 冰)

^Δ 基金项目:国家科技支撑计划项目(No.2011BAI07B05);山西省卫生厅科技攻关计划项目(No.20100223);山西省中药材、中药饮片地方标准研究项目(No.2011003B)

* 副教授, 博士。研究方向:中药材规范化种植和质量控制。电话:0351-2272269。E-mail: Liujiqian2008@163.com

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) 的干燥根,味甘、辛、凉,归脾、胃经,具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻、通经活络、解酒毒等功效^[1]。葛根的主要有效成分葛根素有多重药理作用。现代药理及临床研究表明,葛根素具有明显的扩张血管作用,临床上广泛应用于治疗缺血性心脏病、脑血栓、视网膜动静脉栓塞^[2-3],以及由糖尿病引起的微循环障碍等^[4-8]。葛根有效成分的形成和积累,不仅受其遗传基因、生长环境的影响,同时也与其生长年限、器官与组织部位有着密切关系^[9]。本研究采用高效液相色谱(HPLC)法测定了不同生长年限的葛根不同部位中葛根素的含量,以期为葛根药材的规范化栽培和加工利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

515型HPLC仪,包括515型输液泵、2996型紫外检测器(美国Waters公司);EL204型万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ3200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH.S21-6型数显恒温水浴锅(上海申胜生物技术有限公司)。

1.2 试剂

葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110752-200912);甲醇为色谱纯,乙醇为分析纯,水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.3 药材

葛根药材采自山西省平陆县葛根种植基地,经山西中医药大学刘计权副教授鉴定为豆科植物野葛 *P. lobata* (Willd.) 的根和茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diakma Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(25:75, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:室温;检测波长:250 nm。高效液相色谱见图1。

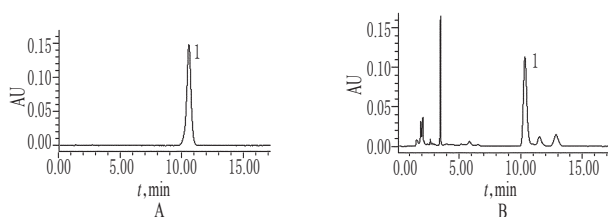


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;1.葛根素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; 1. puerarin

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取葛根素对照品1.8 mg,置于10 ml量瓶中,加30%乙醇溶解并定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过后密封,得质量浓度为0.18 mg/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取葛根样品适量,粉碎,过3号筛,精密称取约0.2 g,置于圆底烧瓶中,精密加入30%乙醇50 ml,称定质

量,加热回流30 min,放冷,再次精密称定,用30%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液1、3、5、8、11 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以葛根素的进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=768\ 452x-316\ 936$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,葛根素的进样量在0.18~1.98 μg范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.4 精密度试验

取葛根素对照品适量,按“2.2.1”项下方法制备对照品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,葛根素峰面积的RSD为1.88%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,分别于放置0、2、4、6、8、10 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,葛根素峰面积的RSD为1.08%,表明供试品溶液在10 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取同一批葛根样品(一年生葛根韧皮部)约0.2 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,葛根素峰面积的RSD为2.39%,表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的葛根样品(一年生葛根韧皮部)约0.1 g,共6份,分别精密加入葛根素对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

编号	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
1	3.007 8	3.06	6.066 2	99.95		
2	2.878 7	3.06	5.825 5	96.30		
3	2.801 2	3.06	5.707 8	94.99	97.01	1.71
4	2.810 7	3.06	5.772 6	96.79		
5	2.996 1	3.06	5.979 6	97.50		
6	2.890 3	3.06	5.843 5	96.51		

2.8 样品含量测定

分别取不同的葛根样品粉末适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,重复3次,记录峰面积,计算葛根素的质量分数,结果见表2。

由表2可以看出,总体来讲,木质部中葛根素的质量分数>韧皮部>茎部,木质部与韧皮部中葛根素的质量分数比较接近,而茎部质量分数显著低于木质部与韧皮部;但二年生葛根韧皮部中葛根素的质量分数高于四、五年生葛根木质部。对于不同生长年限的葛根,木质部中葛根素的质量分数随着生长年限有增长之势;但到第三年时,质量分数达到最大,四

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3)

样品名称	取样量,g	质量分数,%
一年生葛根木质部	0.202 7	3.33
二年生葛根木质部	0.201 8	3.69
三年生葛根木质部	0.205 9	3.74
四年生葛根木质部	0.200 3	3.18
五年生葛根木质部	0.201 4	3.16
一年生葛根韧皮部	0.206 6	2.91
二年生葛根韧皮部	0.205 4	3.20
三年生葛根韧皮部	0.200 0	3.09
四年生葛根韧皮部	0.203 5	2.83
五年生葛根韧皮部	0.200 5	2.81
一年生茎部	0.202 0	0.39
二年生茎部	0.203 1	0.72
三年生茎部	0.202 8	0.85
四年生茎部	0.200 7	0.89
五年生茎部	0.201 5	1.12

到五年生葛根木质部中的质量分数有所下降;韧皮部中葛根素的质量分数与木质部呈现出相似的变化趋势,但韧皮部中葛根素的质量分数从第3年开始有所下降;葛根茎部中葛根素的质量分数随着生长年限的增长一直呈现增长趋势。

3 讨论

笔者在进行样品提取时发现,葛根韧皮部提取液的颜色较木质部深,但含量测定结果显示木质部中葛根素的平均质量分数高于韧皮部,可见提取液颜色的深浅与质量分数没有必然联系。

在提取过程中考虑到不同浸泡时间可能会导致葛根素在乙醇中的浸出率不同,为此笔者进行了不同浸泡时间(直接提取、浸泡 20 min、浸泡 40 min)对葛根素质量分数影响的对比研究。结果,葛根素的质量分数分别为 2.91%、2.93% 和 2.94%,以浸泡 40 min 后葛根素的质量分数最高,但差异不大。考虑到提取效率,本研究最终确定采用直接提取的方式。

同一生长年限的葛根木质部中葛根素的质量分数高于葛根韧皮部,分析其原因可能是葛根韧皮部外围的木栓层在总

质量中占有一定的比例,从而导致韧皮部中葛根素的质量分数偏低。因此,在葛根初加工时,将葛根表面的粗皮(木栓层)刮去,可提高葛根中葛根素的质量分数^[10]。

综上所述,该方法操作简单、结果可靠,适用于葛根药材的质量控制。由含量测定结果可知,葛根适宜的采收期应确定在第 2~3 年;葛根茎部中葛根素的含量较少,不宜入药。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:312.
- [2] 刘圣, 张小力, 余娜, 等. 葛根素对早期糖尿病肾病大鼠肾组织病理变化与 BMP-7 蛋白及 mRNA 表达的影响[J]. 中国药房, 2013, 24(3):196.
- [3] 刘计权, 刘亚明, 裴香萍, 等. 山西产葛根总黄酮及 3 种异黄酮含量的测定[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(2):309.
- [4] 杨志勇. 葛根醇提取物对糖尿病模型大鼠血脂与血管的保护作用[J]. 中国药房, 2013, 24(43):4 063.
- [5] 唐洪梅, 柴玉娜, 涂星, 等. 丹参联合葛根对糖尿病眼病模型大鼠的协同作用[J]. 中国药房, 2014, 25(11):977.
- [6] 李燕燕, 边宝林, 杨健, 等. 葛根丹参胶囊成型工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(4):22.
- [7] 王金萍, 曾明, 边佳明, 等. 葛根复方对创伤应激大鼠神经内分泌的调整作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(3):50.
- [8] 陈丽红, 唐于平, 王强. 葛根苓连配方颗粒提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14):4.
- [9] 郭巧生. 药用植物栽培学[M]. 北京:高等教育出版社, 2004:45.
- [10] 王书林. 药用植物栽培技术[M]. 北京:中国中医药出版社, 2006:443.

(收稿日期:2013-10-24 修回日期:2014-08-20)

(编辑:孙冰)

崔丽副主任会见台湾联合报社社长项国宁一行

本刊讯 2014年12月22日下午,国家卫生计生委副主任崔丽在京会见了来访的台湾联合报社社长项国宁一行,并见证了健康报社与台湾联合报社签署合作协议。

崔丽在会见中表示,大陆许多民众对健康素养的认知率较低,健康行为习惯和生活方式有待提高。大陆与台湾媒体间开展健康教育、健康宣传、健康促进等活动,有利于普及健康知识。健康报社与台湾联合报社签署合作协议,利用各自媒体特点,发挥行业优势和自身影响力,相信会开启两岸卫生媒体间合作的新篇章。台湾在医院管理、医院文化、医患沟通方面有较为成熟的模式,期望两家报社联手,信息共享,推动两岸健康信息的传播。目前,两岸在卫生领域有很多合作机制,传染病疫情信息交换、食品安全信息沟通、紧急事件的处理等

越来越受到两岸的关注。期待两社围绕健康合作的主题,利用平面媒体、电视传媒、新媒体等多种手段,准确、有效、正面、务实地分享两岸卫生领域的重要信息。台湾联合报社社长项国宁表示,两岸医疗养生保健合作资源充实,台湾联合报是台湾最大的平面媒体,除传统媒体外,近年来特别投入了新媒体、电视媒体等方面的开发建设,此外还与台湾医疗机构合办各类健康论坛。期待未来健康报社与联合报充分利用现代传媒手段,开发制作两岸民众喜爱的健康节目。

随后,崔丽副主任见证了健康报与台湾联合报签署合作协议。

国家卫生计生委港澳台办、宣传司、健康报等相关负责人参加了会见。