

文章编号:1001-6880(2015)1-0099-05

6 种晋产野生葛根中葛根素、大豆昔和总黄酮含量比较

张 静¹,郝建平^{1*},王 峰¹,魏文恺¹,宋 强²¹山西大学生命科学学院,太原 030006; ²山西中医学院,太原 030024

摘要:采用高效液相色谱法对山西省5地6处野生葛根中主要有效成分葛根素、大豆昔及总黄酮含量进行了分析,并对HPLC法的测定条件(流动相和洗脱程序)进行了优化。结果表明,6种晋产野生葛根中主要有效成分含量差异显著,葛根素的含量为1.46%~4.48%,大豆昔的含量为0.11%~0.62%,总黄酮的含量为11.19%~26.14%。葛根素、总黄酮含量与纬度高低呈正相关。晋南绛县么里镇小北山与夏县泗交镇太宽河自然保护区的野生葛根中葛根素含量低于《中国药典》规定的2.4%,而晋北灵丘县的野生葛根中葛根素含量则高达4.48%。

关键词:葛;种质资源;葛根素;大豆昔;总黄酮

中图分类号:Q949.95

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.021

Determination of Puerarin, Daidzin and Total Flavonoids in Six Wild *Pueraria lobata* from Shanxi

ZHANG Jing¹, HAO Jian-ping^{1*}, WANG Feng¹, WEI Wen-kai¹, SONG Qiang²¹School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;²Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China

Abstract: In this study, the content of main effective ingredients including puerarin, daidzin and total flavonoids of *Pueraria lobata* from 5 areas of Shanxi were investigated by HPLC. In addition, the HPLC analysis conditions were optimized. The results showed that: there was a significant difference in the content of puerarin, daidzin and total flavonoids of 6 samples of *P. lobata*. The contents of puerarin, daidzin and total flavonoids were 1.46%~4.48%, 0.11%~0.62% and 11.19%~26.14%, respectively. Puerarin and total flavonoids had positive correlation with the cultivation latitude of *P. lobata*. The contents of puerarin in *P. lobata* samples from Xiaobei Mountain, Meli town, Jiangxian and Taikuan river Nature Reserve, Sijiao town, Xiaxian were not match up with the standard (2.4%) required by Chinese Pharmacopoeia, while the content of puerarin from Panjiapu, Xiaguan, Lingqiu was determined to be 4.48%.

Key words: *Pueraria lobata*; germplasm resources; daidzin; puerarin; total flavonoids

葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 为豆科多年生草本植物。葛根是我国的传统中药材,其主要有效成分为葛根总黄酮,其中葛根素、大豆昔是最重要的异黄酮类化合物,常用于高血压、冠心病、心绞痛等疾病的治疗,在肌体抗氧化、降低血黏度、防治老年性痴呆症、改善妇女更年期综合征等方面作用显著^[1-4]。不同的生长环境、不同的采收季节对葛根中有效成分的含量影响很大。近年来,关于云南、河南、江西、湖南等地的葛属植物中葛根素、大豆昔含量的测定已有报道。刘计权等测定了山西省平陆县

人工种植的葛根中的总黄酮含量^[5]。本实验应用HPLC法与分光光度法对山西省内生长的6种野生葛根中的主要有效成分葛根素、大豆昔与总黄酮含量进行了分析和比较,旨在为晋产野生葛种质资源的开发利用及药材的质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

6种类型的野生葛根分别采自山西省运城市绛县么里镇后沟口和小北山、夏县泗交镇太宽河自然保护区、运城盐湖区席张乡张家窑,晋城市泽州县坚水村和大同市灵丘县下关潘家铺,由山西省药物培植场赵玉臣副主任药师鉴定。5地6处采集地分别位于山西南部、东南部和北部,纬度36°44'38.89"~

39°06'19.86"。

1.2 主要仪器

高效液相色谱仪(大连依利特公司,UV230⁺紫外可见检测器,P230高压恒流泵,LU低压梯度混合器,EC2000色谱工作站,2W色谱柱恒温箱);UV-2100紫外分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)等。

1.3 试剂药品

葛根素对照品(批号G-0008-130521)和大豆昔对照品(批号D-013-130511)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度>98.0%;甲醇为色谱纯;水为娃哈哈纯净水;其它试剂均为分析纯。

1.4 测定方法

1.4.1 HPLC法测定葛根素、大豆昔的含量

1.4.1.1 色谱条件

色谱柱:Hyper ODS-2 C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流速为0.8 mL/min,柱温为室温,检测波长为250 nm,流动相甲醇(A)和水(B)。梯度洗脱程序为:0~9 min,25%~32% A;9~24 min,32% A;24~30 min,32%~25% A;30~35 min,25% A。葛根素、大豆昔混合对照品及葛根样品的HPLC色谱图见图1。按葛根素峰计算,理论塔板数不低于4000。

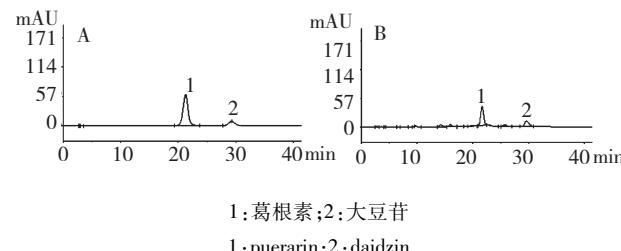


图1 葛根素、大豆昔混合对照品(A)及2号葛根样品(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards (A) and *P. lobata* sample (No. 2, B)

1.4.1.2 对照品溶液的制备

精密称取葛根素15 mg、大豆昔1.5 mg,置于25 mL容量瓶中,甲醇溶解后定容,4℃保存备用。

1.4.1.3 样品溶液的制备

将所采集的野生葛根样品经55℃烘干,粉碎后过3号筛,分别精密称取0.2 g并置于具塞的三角瓶中,加入30%甲醇25 mL,称重,50℃超声处理30 min。放冷后用30%甲醇补足失去的溶剂量,摇匀、离心,取上清液过0.45 μm微孔滤膜,4℃保存待

测。

1.4.1.4 线性关系考察

分别精密吸取“1.4.1.2”项制备的混合对照品储备液625 μL、1250 μL、1875 μL、2500 μL、3750 μL和5000 μL并置于5 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度线,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜过滤。得到葛根素、大豆昔浓度分别为0.0750~0.6000 mg/mL、0.0075~0.0600 mg/mL的对照品溶液,按“1.4.1.1”项色谱条件分别进样20 μL,测定其峰面积,以对照品浓度X(mg/mL)为横坐标,以峰面积Y为纵坐标,绘制标准曲线,得到葛根素、大豆昔线性回归方程:葛根素Y=39080X-291.86,r=0.9996;大豆昔Y=30969X+11.499,r=0.9997。葛根素、大豆昔进样量分别在1.5~12 μg,0.15~1.2 μg范围内与各自峰面积呈良好线性关系。按三倍基线噪音计算最低检出限分别为0.121 μg和0.075 μg。

1.4.1.5 精密度实验

精密吸取同一份混合对照品溶液20 μL,在“1.4.1.1”项色谱条件下连续进样5次,测得葛根素、大豆昔的峰面积的RSD值分别为1.8%和2.7%,表明精密度良好。

1.4.1.6 稳定性实验

将待测样品溶液在0、2、4、6、8、10、12 h分别进样20 μL,应用HPLC法测出葛根素、大豆昔的峰面积的RSD值分别为1.07%和0.92%,表明葛根样品溶液在12 h内稳定性良好。

1.4.1.7 重复性试验

精密称取同一份葛根样品5份各0.2 g,按“1.4.1.3”项下方法平行制备5份样品溶液,并在“1.4.1.1”项下记录各峰面积,葛根素与大豆昔的RSD值分别为2.30%和2.43%,说明重复性良好。

1.4.1.8 加标回收率测定

精密称取已知葛根素、大豆昔含量的葛根样品粉末3份,各0.1 g,分别加入葛根素对照品粉末3 mg、大豆昔1.36 mg,按“1.4.1.3”项下方法制备样品溶液,按“1.4.1.1”项下色谱条件分别进样20 μL,测出葛根素、大豆昔的平均回收率(结果见表1)。

1.4.2 分光光度法测定不同产地葛根中总黄酮的含量

1.4.2.1 对照品溶液的制备

精密称取葛根素对照品5 mg,置于25 mL的容量瓶中,加95%的乙醇溶解并定容,作为对照品溶液。

表 1 加标回收率试验结果($n=3$)
Table 1 Results of recovery test ($n=3$)

检测物质 Tested substance	样品含量 Original content (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Measured amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
葛根素 Puerarin	4.88	3	7.79	97.00		
	4.84	3	7.83	99.67	99.78	
	4.76	3	7.84	102.67		2.84
大豆昔 Daidzin	0.68	1.36	2.03	99.24		
	0.64	1.36	2.07	105.14	102.45	
	0.65	1.36	2.05	102.94		2.90
总黄酮 Total flavonoids	11.19	5	16.18	98.80		
	12.13	5	17.05	98.41	98.00	
	12.14	5	17.93	95.83		2.07

1.4.2.2 样品溶液的制备

将野生葛根样品烘干后粉碎,过3号筛。精密称取各产地葛根样品粉末0.125 g,置具塞三角瓶中,加入80%的乙醇25 mL,70 ℃超声处理45 min,待冷却后过滤,等浓度的乙醇定容至25 mL容量瓶中,4 ℃保存备用。

1.4.2.3 标准曲线的绘制

精密吸取对照品溶液0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 mL分别置于10 mL的容量瓶中,各加入95%乙醇1 mL,加水定容至刻度线,摇匀。以1 mL 95%的乙醇加蒸馏水至10 mL的溶液作空白对照,于250 nm测定吸光度。以葛根素浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 135.01X - 0.0242$, $r = 0.9995$ 。结果显示,总黄酮在0.001~0.008 mg/mL浓度范围内线性关系良好。

1.4.2.4 精密度试验

取同一浓度对照品溶液,重复5次测定其吸光度,RSD为0.18%,表明精密度良好。

1.4.2.5 稳定性试验

取同一样品溶液分别在0、2、4、6、8、10、12 h测定其吸光度,RSD为0.45%,表明总黄酮在12 h内稳定。

1.4.2.6 重复性试验

精密称取5份同一产地葛根样品粉末各0.125 g,按照“1.4.2.2”项下方法平行制备样品溶液,在250 nm条件下测定其吸光度,RSD为2.45%,表明重现性良好。

1.4.2.7 回收率试验

精密称取3份已知含量的葛根样品粉末各0.1

g,分别加入5 mg对照品粉末,按“1.4.2.2”项下制备样品溶液,测定其RSD为2.07%,结果见表1。

2 实验结果

晋产野生葛根中葛根素、大豆昔与总黄酮含量差异显著(表2)。在5地6处采集的野生葛根中,葛根素含量为1.46%~4.48%,大豆昔含量为0.11%~0.62%,总黄酮含量为11.19%~26.14%。除了产自山西绛县么里镇小北山、夏县泗交镇太宽河保护区的葛根中葛根素含量未达到《中国药典》^[1]规定的2.4%外,其他产地的葛根均达标,其中产自山西灵丘下关潘家铺的野生葛根中葛根素含量高达4.48%。

3 讨论

3.1 葛根中总黄酮的提取

在野生葛根总黄酮的提取中比较了加热回流与超声波浸提两种方法。结果表明超声波浸提法省时,操作简单,产品纯度高。从单组分溶剂(乙醇)与混合组分溶剂(30%乙醇、50%乙醇、80%乙醇)对葛根总黄酮的浸提效果看,80%乙醇的混合溶剂不仅可以很好地利用水的高渗透性进入细胞,还可以利用有机溶剂能够共溶极性与非极性总黄酮的特点,更为有效地浸出葛根中的总黄酮^[6]。在葡萄种子浸提总酚时也发现,与单组分溶剂系统相比,乙醇、甲醇和丙酮的水溶液提高了浸取得率^[7]。

3.2 HPLC 分析条件的优化

本项研究比较了甲醇-水^[8]、甲醇-0.1%醋酸水溶液^[9]、乙腈-0.2%醋酸水溶液^[10]3种流动相体系。

表 2 晋产野生葛根中葛根素、大豆昔与总黄酮含量

Table 2 The content of puerarin, daidzin and total flavonoids of wild *P. lobata* from Shanxi

编号 No.	产地 Place	葛根素 Puerarin (%)	大豆昔 Daidzin (%)	总黄酮 Total flavonoids (%)
1	运城市绛县么里镇后沟口	2.79	0.43	15.93
2	运城市绛县么里镇小北山	2.15	0.49	11.19
3	运城市盐湖区席张乡张家窑	3.25	0.12	16.69
4	运城市夏县泗交镇太宽河保护区	1.46	0.11	12.15
5	大同市灵丘县下关潘家铺	4.48	0.62	26.14
6	晋城市泽州县坚水村	3.54	0.28	21.70

结果表明,甲醇-水作为流动相时,葛根素、大豆昔分离度好,出峰完全且峰形良好,无基线漂移。根据能用甲醇不用乙腈、能用纯水不加离子的原则,我们选择甲醇-水作为流动相,同时对 HPLC 梯度洗脱条件进行了优化。在初始的 0~9 min 内采用梯度洗脱,可以有效缩短保留时间;在出峰密集区域即 9~24 min 内采用等度洗脱;在保持甲醇浓度为 32% 不变时,由于增加了葛根素与大豆昔的平均容量因子,因而可以有效地提高葛根素、大豆昔的分离度。

3.3 山西不同产地野生葛根中葛根素、大豆昔和总黄酮含量比较

粉葛是葛的变种,主要分布于我国广东、广西、湖南、湖北、江西、云南、贵州等地,以栽培为主,以其高淀粉含量被赋予了较高的食用价值。野生葛根是常用中药材,其中所含的异黄酮含量为粉葛的 8~10 倍^[1]。野葛在山西南部、中部和北部均有分布,但山西省葛资源的开发利用近乎空白^[5]。

从 6 种晋产野生葛根中葛根素与总黄酮的含量来看,产于晋南地区夏县、绛县、盐湖区的野生葛根中葛根素与总黄酮的含量最低;产于晋东南地区泽州县的居中;产于晋北地区灵丘县的最高,为 4.48%,高于河南、陕西、山东、安徽、河北等地产的葛根^[8],也高于《中国药典》规定的葛根素含量不低于 2.4% 的葛根药材质量控制标准^[1]。此外,晋产野生葛根中葛根素与总黄酮的含量呈正比关系;葛根素、大豆昔与总黄酮三者之间不存在明显的相关性,即葛根素与总黄酮含量低的类型其大豆昔不一定低,反之亦然。综合评价药材质量,晋北灵丘产野葛是可以优先开发、利用和选育、驯化的优良药用葛根类型。

在野葛产地中,灵丘县的纬度最高,为 39°06' 19.86";年平均气温最低,为 6.8 °C;年日照时数最

长,为 2800 h。由此可见较高的纬度、较低的气温和较长的日照时数有利于葛根素的积累。低温、光照、水分等环境因素会对植物生长产生不同影响,甚至是胁迫。而植物次生代谢产物的产生,是植物应对环境胁迫的一种防御性反应。低温促进葛根中的总黄酮的积累,可能是由于低温会造成活性氧在植物体内大量的积累,而植物通过利用产生的次生代谢产物黄酮类物质上羟基的强供电子能力,清除超氧负离子或其他自由基,从而保护机体免受损伤^[12,13]。长日照时数增加了植物次生代谢产物的产生,可能是由于 UV-B 辐射增加了植物叶片中的紫外吸收物质主要是酚类化合物的产生。林桂权^[14]观察到在 UV-B 辐射下,类黄酮合成途径的苯丙氨酸解氨酶和查尔酮合成酶以及其它分支点酶的酶量会增加的现象也证明了这一点。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 312.
- 2 Song HJ (宋洪杰), Zeng M (曾明), Hu JH (胡晋红). Determination and chromatographic identification of isoflavones of Pueraria plants. *Chin J Pharm Anal*, 2000, 20: 223-226.
- 3 Nestel P, Fujii A, Zhang L. An isoflavone metabolite reduces arterial stiffness and blood pressure in overweight men and postmenopausal women. *Atherosclerosis*, 2007, 192: 184-189.
- 4 He WS (何惟胜). Progress in pharmacological and clinical research of Radix Puerariae and extract in the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Chin Med Res*, 2000, 17: 58-59.

(下转第 133 页)