

骨疏颗粒由狗脊、骨碎补、淫羊藿、熟地黄、杜仲、知母、黄芪、白术、苍术、三七、羌活、独活等组成。方中狗脊、骨碎补、淫羊藿、熟地黄、杜仲、知母补肾壮骨，黄芪、白术、苍术补益脾气，三七、羌活、独活活血通络止痛，共奏补肾健脾，活血通络止痛之功。现代药理学研究显示，淫羊藿总黄酮能有效防止维甲酸造成的鼠骨量丢失，改善骨组织显微结构，调节骨生成与骨破坏的紊乱状态，从而有效对抗骨质疏松的发生^[6]。谢雁鸣等^[6]研究发现，骨碎补总黄酮能调节细胞因子血清白细胞介素(IL)-6、IL-4、肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平，显著提高大鼠股骨、腰椎骨密度。杜仲叶醇提取物具有类激素作用，能增进大白鼠骨髓生成和增加其骨质的强度^[7]。黄芪水提液防止去卵巢大鼠骨丢失的效应与乙烯雌酚相近，但机制不同。黄芪水提液不仅抑制去卵巢后的骨吸收，且能增加体重^[8]。

综上，本研究提示了骨疏颗粒治疗OP的一部分作用机制，今后将继续研究骨疏颗粒治疗OP的其他可能机制。

[参考文献]

[1] 杜义斌, 徐翔峰, 彭江云. 骨疏颗粒治疗老年性骨质疏松症30例疗效观察[J]. 云南中医中药杂志, 2006, 27(5): 15.

- [2] 杜义斌, 吴洋, 段艳蕊, 等. 骨疏颗粒治疗绝经后骨质疏松症临床观察[J]. 新中医, 2013, 45(8): 76-78.
- [3] 张军, 张鹏, 刘忠厚. 绝经后骨质疏松症中医领域存在问题及解决途径[J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(5): 460-461.
- [4] 中华医学会骨质疏松与骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症防治指南(2011年)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(1): 2-11.
- [5] 回连强, 曹春雨, 刘婷, 等. 黔岭淫羊藿总黄酮对抗维甲酸致大鼠骨质疏松作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 170-174.
- [6] 谢雁鸣, 许勇钢, 赵晋宁, 等. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和细胞因子IL-6、IL-4、TNF- α 水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(1): 34-37.
- [7] 李亚平. 杜仲叶提取物治疗骨质疏松浅见[J]. 四川中医, 1996, 14(9): 16.
- [8] 李朝阳, 吴铁, 黄连芳, 等. 黄芪水提液与己烯雌酚对去卵巢大鼠骨代谢的影响[J]. 中草药, 1998, 29(1): 27-30.

(责任编辑: 骆欢欢)

高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素、大豆苷元的含量

倪从蓉

乐清市中医院, 浙江 乐清 325600

[摘要] 目的: 建立采用高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素、大豆苷元含量的方法, 为控制药材治疗提供参考。方法: 采用 Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱, 流动相为水-甲醇, 梯度洗脱, 流速: 1 mL/min; 检测波长为 250 nm, 柱温为室温。结果: 葛根素在 0.020~10.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度范围内呈现良好的线性关系, 平均回收率为 99.8%, 相对标准偏差 (RSD) 为 3.25%; 大豆苷元在 0.013~6.56 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度范围内呈现良好的线性关系, 平均回收率为 98.9%, RSD 为 2.43%。结论: 该方法可用于不同产地葛根药材中葛根素、大豆苷元的含量测定, 且具有简便、快捷、重复性好等特点, 可为不同产地葛根质量的控制提供依据。

[关键词] 高效液相色谱法; 葛根; 葛根素; 大豆苷元

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 02-0215-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.02.101

葛根为豆科植物甘葛藤(Puerariu thomsonil Benth)的干燥根, 在我国南方地区分布较广, 具有解肌退热、生津止渴、

通经活络的功效, 临床主要用于外感发热、麻疹不透、眩晕头痛、中风偏瘫等^[1-3]。现代研究表明, 葛根中含有大量的葛根

[收稿日期] 2014-09-25

[作者简介] 倪从蓉 (1974-), 女, 主管中药师, 研究方向: 中药调剂。

素、大豆苷元等黄酮类成分,另含有胡萝卜素、氨基酸、香豆素类等,具有较大的药用价值^[4]。不同产地葛根中含有的葛根素、大豆苷元、大豆苷等存在较大的差异,直接入药有可能影响临床治疗的效果^[5]。笔者建立高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素、大豆苷元含量的方法,为控制葛根的治疗提供参考,现报道如下。

1 材料与仪器

1.1 材料 葛根素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111005-201108);大豆苷元对照品(中国药品生物制品检定所,批号:120916-201106);不同产地葛根原药材均购自安徽亳州中药材市场,经鉴定均为葛根;甲醇(上海振兴化工一厂,色谱纯,批号:201213104);水为超纯水;其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器 超声波清洗器(上海必能信超声有限公司);Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent 1100 色谱泵,Agilent 1100 自动进样器紫外检测器,Agilent 1100 色谱工作站);AL104/01 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 参考文献[6]:色谱柱为大连伊力特公司生产的 Hypersil ODS2 C¹⁸ 色谱柱;流动相为水(A)-甲醇(B),梯度洗脱。

2.2 洗脱程序 见表1。流速:1 mL/min;检测波长为250 nm,柱温为室温,进样体积为20 μL。

表1 梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~15	70	30
15~25	70~45	30~55
25~35	45	55
35~45	45~70	55~30

2.3 对照品溶液的制备 精密称取葛根素对照品及大豆苷元对照品适量,置于10 mL量瓶中,加30%甲醇溶液适量溶解并定容至刻度,得到葛根素浓度为0.502 mg/mL及大豆苷元浓度为0.328 mg/mL的混合对照品溶液,备用。

2.4 供试品溶液的制备 称取葛根粉末(过三号筛)0.8 g,置于100 mL的具塞锥形瓶中,精密加入30%的乙醇50 mL,称定重量后超声提取30 min,趁热过滤,80℃水浴中蒸干,用50%甲醇将其转溶于50 mL的量瓶中,定容即得供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系的考察 精密吸取混合对照品溶液0.02、0.05、0.1、0.2、0.5置于10 mL的量瓶中,定容。精密吸取各对照品溶液及对照品母液20 μL,测定,以浓度(X)与峰面积(Y)作图得标准曲线,经回归得葛根素及大豆苷元线性方程分别为: $Y_{\text{葛根素}} = 1.1973X + 6.3165$, $R^2 = 0.9968$; $Y_{\text{大豆苷元}} =$

$1.3625X + 7.0082$, $R^2 = 0.9982$ 。结果表明,葛根素在0.020~10.1 μg/μL的浓度范围内呈现良好的线性关系;大豆苷元在0.013~6.56 μg/μL的浓度范围内呈现良好的线性关系。

2.5.2 精密度实验 取供试品溶液,连续进样5次,每次进样量均为20 μL,测定葛根素及大豆苷元的峰面积,计算RSD值。结果显示葛根素及大豆苷元的RSD值分别为1.96%、1.28%,表明精密度良好,符合含量测定的要求。

2.5.3 稳定性实验 取供试品溶液,每隔2 h精密吸取20 μL注入高效液相色谱仪,连续进样7次,按照色谱条件测定葛根素及大豆苷元的峰面积,计算RSD值。结果显示葛根素及大豆苷元的RSD值分别为1.52%、1.41%,表明供试品溶液中葛根素及大豆苷元在12 h内基本稳定。

2.5.4 重复性实验 取同一批样品,平行制备5份供试品溶液,分别精密吸取20 μL注入高效液相色谱仪,按照色谱条件测定葛根素及大豆苷元的峰面积,计算含量。结果显示葛根素及大豆苷元的RSD值分别为1.78%、1.36%,表明用此方法测定葛根素及大豆苷元的含量重现性良好。

2.5.5 加样回收实验结果 见表2、表3。精密称取已知含量的同一批葛根药材粉末(过三号筛)样品6份,每份0.2 g,按比例加入葛根素及大豆苷元对照品制备溶液,分别精密吸取20 μL注入高效液相色谱仪,根据色谱条件测定葛根素及大豆苷元的峰面积,计算回收率。

表2 葛根素加样回收实验结果 (n=6)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加 入量(mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
0.2001	1.661	1.665	3.239	94.8		
0.2082	1.728	1.665	3.429	102.2		
0.2066	1.665	1.665	3.303	98.4	99.8	3.25
0.2047	1.699	1.665	3.375	100.7		
0.2058	1.667	1.665	3.323	99.5		
0.2063	1.712	1.665	3.446	104.2		

表3 大豆苷元加样回收试验结果 (n=6)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加 入量(mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
0.2001	0.1201	0.122	0.2431	100.8		
0.2082	0.1249	0.122	0.2445	98.1		
0.2066	0.1239	0.122	0.2474	101.3	98.9	2.43
0.2047	0.1228	0.122	0.2391	95.4		
0.2058	0.1234	0.122	0.2471	101.4		
0.2063	0.1237	0.122	0.2428	97.7		

2.4.6 不同产地葛根样品含量测定 见表4。制备供试品溶液,根据色谱条件测定6个不同产地葛根样品中葛根素、大豆苷元的峰面积,按照线性回归方程,计算各样品中葛根

素、大豆苷元的含量。

表4 不同产地葛根样品含量 %

编号	产地	葛根素	大豆苷元
1	安徽	0.96	0.23
2	江西	1.38	0.46
3	湖南	0.84	0.19
4	浙江	6.84	1.65
5	江苏	1.32	0.52
6	广州	2.26	1.04

3 讨论

葛根在我国大部分地区均有分布,尤其在南方地区,如湖南、江西、广东等,因其具有解表退热、生津止渴、止泻等功效,常作为药食同源的药材。现代研究表明,葛根中含有丰富的葛根素、大豆苷元、大豆苷、香豆素、胡萝卜苷及大量的微量元素,具有重要的药理活性,如葛根素具有提高免疫、增强心肌收缩力、保护心肌细胞、降低血压、抗血小板聚集等药理活性,临床常用于各种类型心血管疾病的治疗;大豆苷元可扩张血管、增加冠脉流量、降低血压、减慢心律和降低心肌耗氧量及抗心律失常作用,临床常用于治疗妇女更年期综合征、前列腺癌、乳腺癌、心脏病、心血管病等。目前为控制葛根药材的质量,常将葛根素、大豆苷元等主要活性成分作为控制药材质量标准的依据^[7]。

文献报道关于葛根素及大豆苷元的提取方法比较多,如考察乙醇、石油醚的提取效果,结果显示不同浓度的乙醇对葛根素及大豆苷元的提取率较高,而石油醚的提取率则几乎为零,可能与葛根素及大豆苷元分子的极性有较大的关系^[8]。笔者在此基础上,分别考察了提取溶剂(水、30%乙醇、50%乙醇、75%乙醇)及提取方法(回流提取、超声提取)的提取效果,结果显示以30%乙醇为提取溶剂,超声30 min可获得较为满意的提取效果。

因葛根素、大豆苷元极性差别比较大,同时药材提取物中还含有大量的其它成分,含量测定时对其色谱条件进行了优化。为了能够获得较好的分离效果,笔者考察了洗脱溶剂及洗脱的程序对含量测定结果的影响,结果表明,以水-甲醇为流动相,同时采用梯度洗脱方法对药材提取物进行分离,可获得较好的分离效果,且基线较为稳定、出峰时间适当,符合含量测定的基本要求^[9]。

本论文建立了葛根素及大豆苷元的高效液相色谱检测方法,研究显示葛根素在0.020~10.1 μg/μL的浓度范围内呈现良好的线性关系,大豆苷元在0.013~6.56 μg/μL的浓度范围

内呈现良好的线性关系,因此该方法可用检测葛根药材中葛根素、大豆苷元的含量测定,且具有简便、快捷、重复性好等特点。

经对不同产地葛根中所含有的葛根素及大豆苷元的含量测定,发现葛根素及大豆苷元含量的差别比较大,来自于浙江产地的葛根中葛根素和大豆苷含量高达6.84%和1.65%,其含量分别为湖南产地的葛根的8.1倍和8.7倍。不同产地葛根中葛根素和大豆苷含量差异显著的原因可能与不同产地的环境因素、田间管理、采收加工程序等因素有关。葛根为豆科植物,其生长与有效成分的积累与豆腐菌的关系较为密切,由于不同产地的环境差异较大,会对豆腐菌等微生物的生长繁殖等产生较大的影响。由于葛根素和大豆苷含量有可能影响临床治疗的效果,故为了能够获得质量较为稳定、药效较好的药材,应该尽量坚持药材的道地性。

[参考文献]

- [1] 黄建锋,周清,威海英,等. 广东不同产地葛根中葛根素和大豆苷元的含量测定[J]. 广东药学院学报, 2013, 29(4): 392-395.
- [2] 迟霁菲,张国刚. 高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素的含量[J]. 中南药学, 2012, 4(4): 307-309.
- [3] 蒲艳春,吴方评,杨宏健. 固相萃取-高效液相色谱法测定葛根中葛根素含量[J]. 中国药业, 2012, 21(11): 19-20.
- [4] 杨海丽,李志浩. 高效液相色谱法测定表虚感冒颗粒中葛根素的含量[J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(6): 39-41.
- [5] 陈凤春,张亦红,刘芳,等. 高效液相色谱法测定葛根类保健食品中葛根素、大豆苷、大豆苷元及染料木素[J]. 解放军预防医学杂志, 2013, 31(5): 425-427.
- [6] 李翔,刘毓阳,马建丽,等. 高效液相色谱法测定葛根姜黄口服液中葛根素的含量[J]. 解放军医药杂志, 2014, 26(6): 97-99.
- [7] 裴明日,王苗苗,姜丽. 高效液相色谱法测定红宝散中葛根素含量[J]. 中国药业, 2014, 23(10): 41-42.
- [8] 高俊,王彩琴. 反相高效液相色谱法测定甘肃栽培葛根中葛根素的含量[J]. 甘肃中医学院学报, 2012, 29(4): 64-66.
- [9] 任晓明,赵辉,夏洪颖. HPLC法测定降压平片中葛根素的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(10): 1510-1511.

(责任编辑:骆欢欢)