

葛根中异黄酮含量的薄层光密度法测定

赵世萍* 章育中**

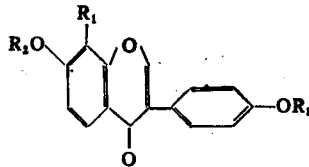
(中国医学科学院药物研究所, 北京)

摘要 本文报道了葛根中异黄酮成分含量的薄层光密度测定法。用甲苯—甲醇—10% 甲酸 (7:3:0.02) 和乙醇—乙醚—甲醇—50% 甲酸 (8:2:0.2) 为展开剂, 在硅胶 G 薄层上分离了大豆甙元、大豆甙、葛根素和大豆甙元-4', 7-二葡萄糖甙, 并用 CS-910 双波长薄层扫描仪进行了定量测定。变异系数为 1.5~1.6%, 采用本法测定了生药和片剂样品的含量。

关键词 葛根; 薄层光密度法; 大豆甙元; 大豆甙; 葛根素; 大豆甙元-4', 7-二葡萄糖甙

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的根, 是中医常用的祛风解表药。近年来, 采用葛根乙醇浸膏片和葛根总黄酮注射液治疗伴有颈项强痛和头痛、头晕的高血压病、心绞痛和突发性耳聋等均有显著疗效⁽¹⁾。药理实验指出, 大豆甙元具有罂粟碱样作用, 葛根总黄酮可使麻醉狗的冠状动脉血流量增加, 心肌耗氧量减少和改善脑循环等^(2,3)。

方起程等⁽⁴⁾指出葛根中的有效成分是异黄酮类化合物, 并分离得到主要成分大豆甙元 (daidzein)、大豆甙 (daidzin)、葛根素 (puerarin) 和大豆甙元-4', 7-二葡萄糖甙 (daidzein-4', 7-diglucoside), 其结构如下:



		R ₁	R ₂	R ₃
I	Daidzein	H	H	H
II	Daidzin	H	Glucose	H
III	Puerarin	Glucose	H	H
IV	Daidzein-4', 7-diglucoside	H	Glucose	Glucose

此外, 柴田承二等^(5,6)从本属植物 *P. thunbergiana* Benth 等品种中除了分离出上述前三种成分外, 还得到葛根素-7-木糖甙 (puerarin-7-xyloside)。Bhutain 等⁽⁷⁾从 *P. tuberosa* 中也分离得到上述前三种成分, 另外得到一新的成分, 4', 6''-二乙酰基葛根素 (4', 6''-di-O-acetyl puerarin)。

关于葛根中异黄酮成分的含量测定法, 已见报道的有库伦滴定法测定大豆甙元 and 葛根素^(8,9), 比色法测定葛根素⁽¹⁰⁾, 高效液相层析法测定大豆甙⁽¹¹⁾和异黄酮⁽¹²⁾以及紫外分光光度法测定总黄酮⁽¹³⁾等。此外, 柴田承二⁽¹⁴⁾曾用薄层光密度法对葛根中的异黄酮成分进行定性定量分析, 但未见详细报道。本文采用薄层光密度法对葛根中的大豆甙元、大豆甙、葛根

本文于 1984 年 11 月 26 日收到

*现在工作单位 中日友好医院临床医学研究所

**现在工作单位 中医研究院中药研究所

素和大豆甾元-4',7-二葡萄糖甙等成分的提取、薄层层析和含量测定方法进行了研究,并应用于生药和浸膏片剂的测定。

实 验 部 分

仪器和药品 双波长薄层扫描仪 日本岛津 CS-910 型,带有数据处理机 C-EIB 型;点样管 (microcap) 0.5~2 μ l, 美国 Drummond 厂; 硅胶 G 青岛海洋化工厂 薄层层析用; 所用试剂和药品均用 AR 级。纯品、生药样品和片剂样品分别由本所植化室、植物室和制药厂供给。生药样品由本所植物室连文琰鉴定和供给,产地见表 4。

(一) 薄层层析

薄层板的制备 6g 硅胶 G 加 24 ml 蒸馏水,充分调匀后,用涂铺器在玻璃板 (15×20 cm) 上涂铺成三块薄层板,室温干燥备用。

展开剂

I. 甲苯—甲醇—10%甲酸*(7:3:0.02)

II. 乙酸乙酯—甲醇—50%甲酸*(8:2:0.2)

展开 将一定量纯品溶液和样品溶液分别用点样管间隔地点于同一块薄层板上,点样原点直径应一致,为 3 mm,然后放入预先用展开剂饱和 1 小时的层析槽内,上行展开 13.5 cm,取出挥干溶剂,在 254 nm 紫外灯下观察荧光。结果如图 1, 2 及表 1。

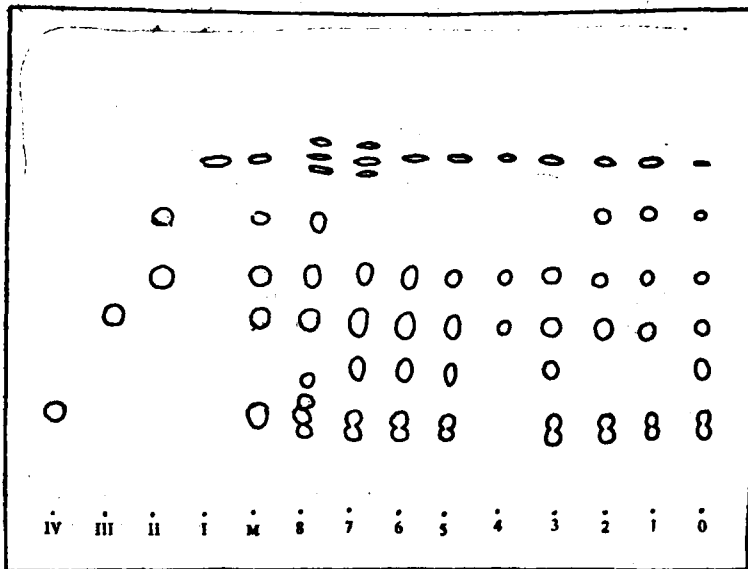


Fig 1. Chromatogram of standard and samples (developing solvent system I, UV254 nm)
I. Daidzein; II. Daidzin; III. Puerarin; IV. Daidzein-4', 7-diglucoside; M. Mixture of standard; 0~8. Samples from different growing area; O. Shandong; 1. Guangxi Guilin; 2. Guangxi Jinxian; 3. Beijing Huairou; 4. Guangdong; 5. Hunan Changsha; 6. Hebei Xinglong; 7. Gansu; 8. Sichuan Emeishan

(二) 光密度法扫描测定

根据各成分的紫外吸收图谱,四个成分的最大吸收峰均在 250 nm 处,而在 360 nm 处

* 10%和50%的甲酸是分别用 1 ml 和 5 ml 含量不低于 88%的甲酸分别加丙酮和水至 10 ml 配制而成

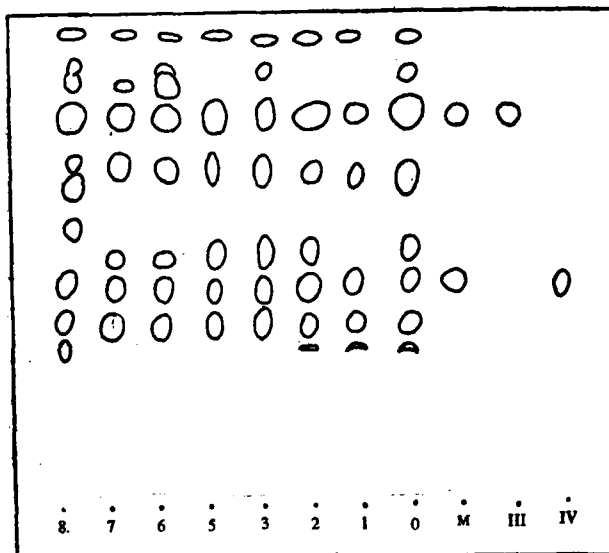


Fig 2. Chromatogram of standard and samples (developing solvent system II, UV254 nm) III. Puerarin; IV. Daidzein-4', 7-diglucoside; M. Mixture of standard; 0~8. Samples from different growing area; O. Shandong; 1. Guangxi Guilin, 2. Guangxi Jinxian, 3. Beijing Huairou, 4. Guangdong, 5. Hunan Changsha, 6. Hebei Xinglong. 7. Gansu, 8. Sichuan Emeishan

Tab 1. Chromatographic behavior of isoflavone in *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi

Compound	Rf		Fluorescence (254 nm UV lamp)
	Developing solvent I	Developing solvent II	
Daidzein	0.60		Blue
Daidzin	0.48		Light orange
Puerarin	0.40	0.76	Blue
Daidzein-4', 7-diglucoside	0.20	0.44	Blue

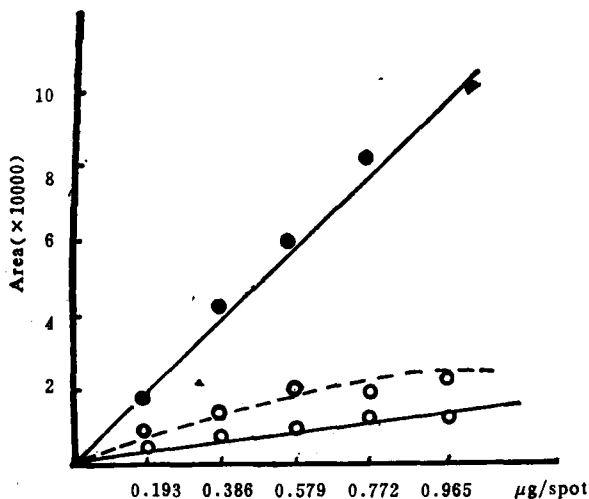


Fig 3. Working curve of daidzein
 ○ — Linearizer CH₁, SX=3;
 ○ — Linearizer CH₂, SX=3;
 ○ ···· No linearizer.

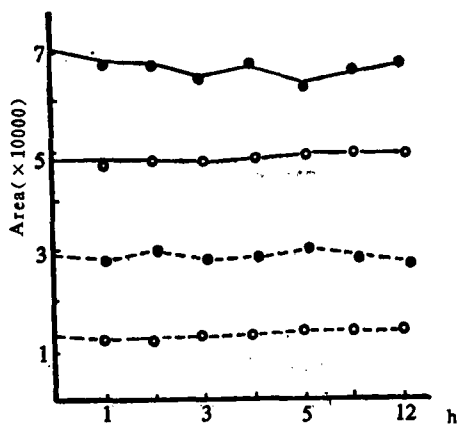


Fig 4. Stability curve of isoflavone in *Pueraria*
 ○ — Daidzein, ····· Daidzin, - - - Puerarin, - · - · Daidzein-4', 7-diglucoside

无吸收, 因此选用 $\lambda_s = 250 \text{ nm}$, $\lambda_R = 360 \text{ nm}$ 。

绘制大豆甙元标准曲线, 用线性仪 CH_1 , CH_2 及不用线性仪三种方式进行扫描, 结果如图 3。由图可见, 用线性仪 CH_2 , 散射参数 $\text{SX} = 3$ 和锯齿扫描, 可以得到一条通过原点的高灵敏度的直线。随后用同样条件作了大豆甙和葛根素的标准曲线。大豆甙元-4', 7-二葡萄糖甙因纯品太少, 未做标准曲线。为了减少误差, 在点样品的同时要纯品点一同扫描, 然后测定和计算。

在同一块薄层板上, 分别点同样量的大豆甙和葛根素几个点, 展开后测定面积值, 结果如表 2。大豆甙和葛根素的变异系数分别为 1.61% 和 1.51%

同一个点重复扫描数次, 变异系数为 0.6%。

各成分在薄层上的稳定性见图 4。在 12 小时内较稳定。

(三) 样品测定

生药的提取和测定 分别精密称取 0.1g 干燥生药粉末 (80 目); 试验以下各种提取方法:

1. 加 10 ml 甲醇或 10 ml 不同浓度 (50, 70, 95%) 的乙醇回流提取 1 小时;
2. 加 70% 乙醇冷浸过夜;
3. 沙氏提取器中热回流 12 小时。

Tab 3. Comparison of extraction methods

Compound	Extraction using Soxhlet apparatus	Reflux for 1 hour				Immersion in 70% ethanol
		Methanol	70% Ethanol	50% Ethanol	95% Ethanol	
Daidzein	0.0395		0.0397			
Daidzin	0.537	0.444	0.531	0.405	0.382	0.338
Puerarin	4.584		4.540			4.086
Daidzein-4', 7-diglucoside	0.548		0.558			

将提取液分别点在薄层上进行分析, 结果见表 3。结果表明, 70% 乙醇热回流提取 1 小时的结果与在沙氏提取器中提取的结果一致, 因此选用 70% 乙醇热回流提取 1 小时。拟定分析方法如下: 精密称取 0.1 g 干燥生药粉末 (80 目), 精密加 10.0 ml 70% 乙醇回流提取 1 小时, 放冷, 将上清液和混合标准溶液各 2 μl 间隔地点在薄层板上。原点直径 3 mm, 间距 1.3 cm; 层析槽先用展开剂饱和 1 小时, 上行展开, 挥去溶剂后扫描测定, 根据标准品与样品的面积值, 计算样品含量 (大豆甙元-4', 7-二葡萄糖甙因纯品太少, 故用葛根素为标准品乘以校正因子 0.7517 进行计算; 大豆甙因纯品中含有杂质, 用光密度法扫描, 测得纯度为 92.67%, 将纯品重量按此折算后进行计算)。

用以上方法分析了本属两个种不同产地样品的四种异黄酮成分含量, 结果见表 4。

片剂测定 取愈风宁心片 (葛根浸膏片) 20 片, 去糖衣, 称重, 求出平均片重。研细, 精密称取 0.3 g 片粉, 精密加 2 ml 70% 乙醇浸泡, 密塞, 随时振摇直至膏状物完全溶解, 取一定量上清液按生药测定法操作 (必要时可将样品溶液稀释), 计算含量。

Tab 2. Precision of spotting

Compound	Puerarin	Daidzin
Area	11922	53510
	11726	54840
	11014	55791
	11559	54040
	11078	53964
	12030	55296
Average	11805	54574
SX	178	879
CV%	1.51	1.61

Tab 4. Results of sample analysis

Scientific name	Growing area	Time of collection (year)	Content (%)			
			Daidzein	Daidzin	Puerarin	Daidzein-4',7-diglucoside
<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	Beijing Huairou		0.09	0.52	2.74	0.13
<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	Hebei Xinglong	1978	0.13	0.27	2.49	0.10
<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	Gansu	1973	0.21	1.22	5.48	0.23
<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	Sichuan Emeishan	1973	0.12	0.86	1.05	0.28
<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	Guangxi Guilin	1958	0.09	0.14	0.54	0.07
<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	Guangxi Jinxian	1958	0.02	0.35	5.45	0.26
<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	Hunan Changsha	1959	0.06	0.19	1.90	0.19
<i>Pueraria thomsonii</i> Benth	Guangdong	1959	0.03	0.04	0.07	Trace

测定五批片剂的结果见表 5。

Tab 5. Results of tablet analysis

Batch number	Weight of tablet (mg)	Content per tablet			
		Daidzein	Daidzin	Puerarin	Daidzein-4',7-diglucoside
1	333.8	0.747	4.79	44.79	2.62
2	311.8	0.932	3.33	29.86	2.39
3	299.5	0.730	4.20	31.42	2.43
4	170.9	0.565	2.89	21.28	0.86
5	272.0	0.986	3.20	32.58	2.34

参 考 文 献

1. 中国医学科学院药物研究所. 葛根的临床应用和实验研究. 医药研究通讯 1972;(2):14.
2. 曾贵云等. 葛根的药理研究 I. 中华医学杂志 1974;54:265.
3. 范礼理等. 葛根的药理研究 II. 同上 1975;55:724.
4. 方起程等. 葛根黄酮的研究. 同上 1974;54:271.
5. Shibata S, et al. Constituents of Japanese and Chinese crude drugs: 1. On the constituents of *Pueraria* root. *Yakugaku Zasshi* 1959;79:757.
6. Murakamin T, et al. Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs: IV. On the constituents of *Pueraria* root. *Chem Pharm Bull* 1960;8:685.
7. Bhutain SP, et al. Component of the root of *Pueraria tuberosa*: isolation of a new isoflavone-C-glucoside (di-O-acetyl puerarin). *Indin J Chem* 1969;7:210.
8. 徐礼棠等. 黄酮类化合物库伦滴定法——大豆甙元的库伦滴定. 药理学报 1979;14:35.
9. 徐礼棠等. 葛根素的库伦滴定. 分析化学 1976;4:372.
10. 徐礼棠等. 葛根素的比色测定. 中草药通讯 1975;6:9.
11. Yoshinobu A, et al. High-speed liquid chromatographic analysis of drugs. XIII. Determination of daidzin in *Pueraria* radix. *Yakugaku Zasshi* 1980;100:1057.
12. 章育中等. 高效液相色谱法测定葛根及其片剂中异黄酮的含量. 药物分析杂志 1984;4:67.
13. 徐礼棠等. 葛根及其制剂——愈风宁心片. 药学通报 1980;15:40.
14. 柴田承二. 生药分析. ふんせき 1978;7:472.

QUANTITATIVE TLC-DENSITOMETRY OF ISOFLAVONES IN *PUERARIA LOBATA* (WILLD.) OHWI

ZHAO Shi-Ping and ZHANG Yu-Zhong

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT This paper reports a TLC-densitometric method to determine the isoflavones content in the *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and its extract tablets. The developing solvent toluene-methanol-10% formic acid (7:3:0.02) was used for separation of daidzein, daidzin and puerarin, and ethyl acetate-methanol-50% formic acid (8:2:0.2) for daidzein-4',7-diglucoside. The densitometric determination was carried out with a Shimadzu TLC-scanner CS-910. The parameter for the linearization of the working curves were: $\lambda_s=250\text{nm}$, $\lambda_R=360\text{nm}$, reflectance mode, zig-zag scanning, SX=3. The working curves were obtained, all passing through the origin.

The four isoflavones content in *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi for two species from eight areas were determined.

The coefficient of variation was 1.5~1.6%.

Key words *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; TLC-densitometry; Daidzin; Daidzein; Puerarin; Daidzein-4',7-diglucoside