

葛花中异黄酮含量及其酸水解转化率的检测^Δ

王金凤*, 杨翠燕, 王国玉, 王芳, 魏颖, 张艳萍(解放军第208医院心血管内二科, 长春 130062)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3490-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.10

摘要 目的:建立检测葛花中异黄酮含量及其酸水解转化率的方法。方法:以葛花为原料,采用乙醇提取、乙酸乙酯萃取、乙醇重结晶纯化制备以鸢尾苷为主要成分的葛花异黄酮,经盐酸水解转化为鸢尾苷元。通过筛选溶剂和波长建立测定鸢尾苷与苷元的紫外分光光度(UV)法,计算葛花异黄酮含量及鸢尾苷酸水解转化率(以鸢尾苷元的相对百分含量表示),并与高效液相色谱法(HPLC)检测结果进行比较,评价UV法的准确性。结果:UV法溶剂选择含有1%三乙胺的70%乙醇溶液,波长选择339、274 nm,鸢尾苷元在8.80~29.33 nmol/mL浓度范围内线性关系良好($r=0.9999$);精密度($n=6$)、稳定性($n=5$)、重复性($n=6$)试验的RSD均小于1.94%,平均加样回收率为99.7%(RSD=1.77%, $n=9$)。UV法与HPLC法比较,总黄酮含量(17.64~25.55 nmol/mL vs. 17.39~24.40 nmol/mL)、鸢尾苷元的相对百分含量(57.65%~87.59% vs. 55.62%~91.14%)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:本研究建立的方法准确、可靠,可用于鸢尾苷酸水解转化率的快速检测。

关键词 葛花;异黄酮;鸢尾苷;鸢尾苷元;紫外分光光度法

Decoction of Isoflavone Content and Its Acid Hydrolysis Conversion Rate in the Flower of *Pueraria lobata*

WANG Jinfeng, YANG Cuiyan, WANG Guoyu, WANG Fang, WEI Ying, ZHANG Yanping (Second Division, Dept. of Internal Medicine, No. 208 Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the decoction of isoflavone content and its acid hydrolysis conversion rate in the flower of *Pueraria lobata*. METHODS: Using the flowers of *Pueraria lobata* as raw material, the isoflavone with main component of tectoridin in the flower of *P. lobata* was prepared with ethanol, ethyl acetate extracted, ethanol recrystallized and purified, and it was converted to tectorigenin with hydrolysis in hydrochloric acid. By screening the solvent and wavelength, UV spectrophotometry was established to determine tectovidin and tectorigenin, and calculate the isoflavone content and acid hydrolysis con-

本试验的研究结果为课题组后续开展的三药合煎液有效成分分离纯化及活性评价工作奠定了基础,为阐明三药合煎液的药效物质基础提供了科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:125-126.
- [2] 王宏洁, 金亚红, 李鹏跃, 等. 鲜、生、熟地黄药材中3种活性成分含量的比较[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1923-1925.
- [3] 胡律江, 胡志方, 王小平, 等. 江西建昌帮炒熟地黄的HPLC指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(23): 33-36.
- [4] 李龙宣, 赵斌, 许志恩, 等. 熟地黄抑制阿尔茨海默病样大鼠海马神经元凋亡的作用[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(1): 10-13.
- [5] 曹玉净, 崔瑛, 侯士良, 等. 熟地黄对拟痴呆模型小鼠记忆力的影响及机制研究[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(4): 67-68.
- [6] 吴小慧, 段忠心, 匡小霞, 等. 泽泻提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤氧化应激的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2014, 33(7): 795-798.
- [7] Pant N, Misra H, Jain DC. Phytochemical investigation of ethyl acetate extract from *Curcuma aromatica* Salisb. rhizomes[J]. *Arab J Chem*, 2013, 6(3): 279-283.
- [8] Pan R, Qiu S, Lu DX, et al. Curcumin improves learning and memory ability and its neuroprotective mechanism in mice[J]. *Chin Med J*, 2008, 121(9): 823-829.
- [9] 高莉, 彭晓明, 霍仕霞, 等. 毛蕊花糖苷改善D-半乳糖致亚急性衰老小鼠脑损伤的作用[J]. 中草药, 2014, 45(1): 81-85.
- [10] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1104-1108.
- [11] 祝魏, 张玉萍. HPLC法测定地黄不同炮制品中梓醇的含量[J]. 江西中医药, 2008, 39(31): 71-72.
- [12] 赵玲, 张兰, 李雅莉, 等. 5-羟甲基糠醛对脑缺血再灌注模型小鼠学习记忆及脑部自由基的影响[J]. 中国药房, 2007, 18(13): 974-976.
- [13] 高虹, 胡应和. 用毒蕈胆碱M₁受体激动剂筛选技术发现的泽泻的新用途:中国, CN 1615981[P]. 2005-05-18.
- [14] 廖涛, 王飞, 张占军, 等. 姜黄素对痴呆模型小鼠学习记忆能力的改善作用及对细胞凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(10): 1359-1363.

Δ 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.20140204040YY)

* 主任医师, 硕士生导师。研究方向:血管疾病的新药研发。电话:0431-86988951。E-mail:13944927368@139.com

(收稿日期:2016-12-09 修回日期:2017-01-27)

(编辑:刘萍)

version rate of tectoridin (expressed by the relative percentage of tectorigenin). It was compared with HPLC detection results, the accuracy of UV method was evaluated. RESULTS: The solvent was 70% ethanol solution containing 1% triethylamine, and the isoflavone content was detected at wavelength of 339, 274 nm. The linear range of tectoridin was 8.80-29.33 nmol/mL ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision ($n=6$), stability ($n=5$) and reproducibility ($n=6$) tests were lower than 1.94%; average recovery was 99.7% (RSD=1.77%, $n=9$). There were no statistical significances in the contents of total flavonoids (UV: 17.64-25.55 nmol/mL vs. HPLC: 17.39-24.40 nmol/mL) and the relative percentage of tectorigenin (UV: 57.65%-87.59% vs. HPLC: 55.62%-91.14%). CONCLUSIONS: The established method is accurate, reliable, and can be used for the rapid determination of acid hydrolysis conversion rate of tectoridin.

KEYWORDS Flowers of *Pueraria lobata*; Isoflavone; Tectoridin; Tectorigenin; UV spectrophotometry

葛花(Flos Puerariae)为豆科植物野葛[*Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi]或甘葛藤(*P. thomsonii* Benth)的花,研究发现葛花中含有多种异黄酮类化合物^[1-3],具有抗氧化损伤、降脂、保肝、抗菌、抗病毒、预防和治疗心血管疾病等多种功效。葛花异黄酮中以糖苷为其主要成分^[4],由于糖苷需经肠道细菌作用转换为苷元方能吸收入血,故其生物利用度低^[5-6]。将糖苷水解为苷元是提高黄酮类化合物生理活性的有效手段。异黄酮药用时需通过酸或酶水解将糖苷转化为苷元。其中酸水解较酶水解经济、方便,应用更广泛。酸水解即是将异黄酮糖苷溶液置于一定浓度的盐酸或硫酸溶液中加热,将葡萄糖苷基水解为羟基而转化为苷元。一定条件下糖苷转化率与加热时间成正比,时间短则转化不完全,但时间过长又可导致异黄酮被破坏。因此,酸水解过程中糖苷转化率的监测十分重要。检测糖苷水解转化率常采用高效液相色谱(HPLC)法或薄层层析法,而能否采用操作更简单、更快速的紫外分光光度(UV)法检测其转化率尚未见文献报道。因此,作者在本研究中以HPLC法测定结果为参照,以鸢尾苷元为对照品,评价UV法测定鸢尾苷酸水解转化率(以鸢尾苷元相对百分含量表示)的可行性,为鸢尾苷酸水解转化率的快速检测提供试验基础。鸢尾苷和鸢尾苷元的化学结构式见图1。

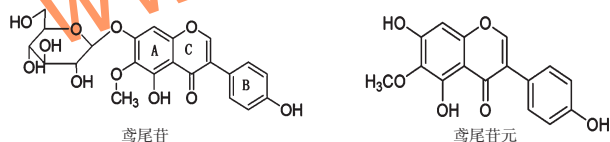


图1 鸢尾苷和鸢尾苷元的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of tectoridin and tectorigenin

1 材料

1.1 仪器

LC-10AVT型HPLC仪,包括SPD-10AV型紫外检测器(日本岛津公司);N-2000型色谱数据工作站(浙江大学智能信息工程有限公司);UV-3200S型UV仪(上海美谱达仪器有限公司);CPA2P-F型电子天平(德国赛多利斯股份公司)。

1.2 药品与试剂

葛花药材(河南广安堂贸易有限公司,批号:20140817),经我院药剂科孙国才主任药师鉴定为真品;鸢尾苷和鸢尾苷元对照品(我院自制,批号:20140611,20140708,经质谱、氢谱和碳谱鉴定,纯度均大于

99.0%);水为双蒸水;甲醇、乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取鸢尾苷和鸢尾苷元对照品各11.0 mg,用70%乙醇定容于50 mL量瓶中,即得鸢尾苷和鸢尾苷元质量浓度均为220 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备液。取贮备液适量置于50 mL量瓶中,用含或不含1%三乙胺(TEA)的70%乙醇溶液定容,即得鸢尾苷95.24 nmol/mL、鸢尾苷元146.67 nmol/mL的对照品检测液。精密量取不同体积的鸢尾苷和鸢尾苷元对照品检测液,制成含鸢尾苷元相对百分含量(即苷元占苷与苷元总量的百分比, mol/mol)分别为40%、50%、60%、65%、70%、80%、85%、90%、100%(鸢尾苷相对百分含量则相应为60%、50%、40%、35%、30%、20%、15%、10%、0)的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取葛花药材500 g制成粗粉,过50目筛,70%乙醇回流提取,减压回收乙醇。以乙酸乙酯萃取、乙醇重结晶纯化,制得葛花异黄酮。取葛花异黄酮500 mg加入70%乙醇500 mL溶解后,加入浓盐酸25 mL,摇匀,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热不同时间后取样用于测定。

2.2 溶剂及测定波长的选择

取鸢尾苷与鸢尾苷元对照品贮备液适量,分别置于10 mL量瓶中,分别加入体积分数为35%、50%、60%、70%、含1% TEA的乙醇溶液中,摇匀,室温放置5 min;以相应的溶剂作空白,于200~400 nm波长区间内扫描,波长间隔1 nm,测其最大吸收峰。结果,在70%乙醇溶液中,鸢尾苷和鸢尾苷元的最大吸收峰(带II)分别在264、265 nm波长处,鸢尾苷有一小肩峰(带I),在334 nm波长处,鸢尾苷元则无带I;而在含1% TEA的70%乙醇溶剂中,两者带II均红移约10 nm至274 nm,鸢尾苷带I消失,鸢尾苷元带I吸收明显增强并红移至339 nm。因此,可通过检测274、339 nm波长处的吸光度(A)值,以 A_{339}/A_{274} 对鸢尾苷元的百分含量进行计算。鸢尾苷与鸢尾苷元的紫外光谱测定结果见图2~图4。

由图2~图4可见,溶剂不含TEA时,鸢尾苷元带I消失,无法满足测定需要;含1% TEA的溶剂中,随乙醇体积分数增加,鸢尾苷元带I峰升高幅度增大,含1% TEA的70%乙醇溶液中鸢尾苷元带I峰升高幅度最明

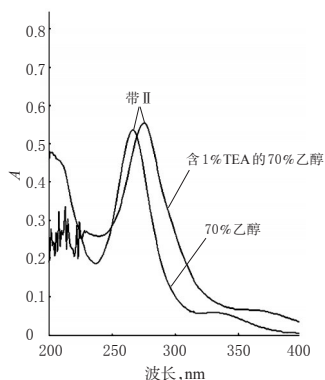


图2 鸢尾苷紫外光谱

Fig 2 UA spectrum of tectoridin

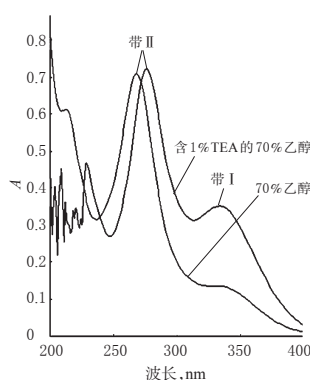


图3 鸢尾苷元紫外光谱

Fig 3 UA spectrum of tectorigenin

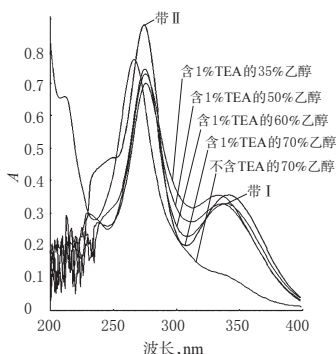


图4 鸢尾苷元在不同溶剂中的紫外光谱

Fig 4 UA spectrum of tectorigenin in different solvents

显。因此,选择含1% TEA的70%乙醇溶液为溶剂。

取鸢尾苷与鸢尾苷元对照品贮备液适量,分别置于10 mL量瓶中,制得的10 nmol/mL等浓度的鸢尾苷和鸢尾苷元的带II峰高相近,因此可于274 nm波长处准确检测葛花异黄酮鸢尾苷和鸢尾苷元的浓度,详见图5。

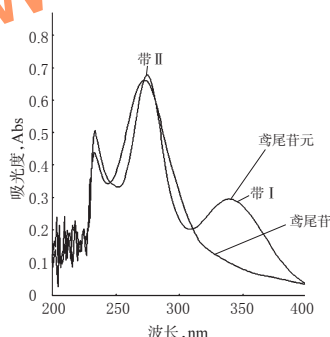


图5 等浓度鸢尾苷和鸢尾苷元在含1% TEA的70%乙醇中的紫外光谱

Fig 5 UA spectrum of tectoridin and tectorigenin with equal concentration in 70% ethanol containing 1% TEA

2.3 线性关系考察

2.3.1 鸢尾苷元浓度标准曲线的建立 精密量取鸢尾苷元对照品检测液0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mL置于10 mL量瓶中,加入含1% TEA的70%乙醇定容,混

匀,于274 nm波长处测定A值。以鸢尾苷元对照品检测液浓度(nmol/mL)为横坐标(x)、A为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程 $y=0.029 6x+0.030 1$ ($r=0.999 9$)。结果表明鸢尾苷元在8.80~29.33 nmol/mL浓度范围内线性关系良好。

2.3.2 鸢尾苷元相对百分含量标准曲线的建立 取“2.1.1”项下混合对照品溶液1 mL,分别置于10 mL量瓶中,加入含1% TEA的70%乙醇定容,摇匀,以对应溶剂作为空白参比,在274、339 nm波长处测定A值,计算 A_{339}/A_{274} 。以鸢尾苷元相对百分含量为横坐标(x)、 A_{339}/A_{274} 为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程 $y=0.002 1x+0.232 3$ ($r=0.999 5$)。鸢尾苷元相对百分含量小于50%时,带I不明显,故其相对百分含量在50%~100%内线性关系良好。

2.4 精密度和稳定性考察

以含1% TEA的70%乙醇溶液为溶剂,精密量取鸢尾苷元对照品贮备液1.0、1.4、1.8 mL置于10 mL量瓶中制备低、中、高浓度(14.67、20.53、26.40 nmol/mL)鸢尾苷元对照品溶液;另取含有鸢尾苷元相对百分含量为60%、70%、90%的混合对照品溶液,各6份,分别于室温放置0、2、4、6、8 h,于274、339 nm波长处测定A值,计算 A_{339}/A_{274} 比值,考察日内精密度和溶液中鸢尾苷和苷元的稳定性。结果,鸢尾苷元及其相对百分含量的日内精密度RSD分别小于1.72%、1.83% ($n=6$),表明仪器精密度良好;稳定性RSD分别小于0.81%、0.86% ($n=5$),表明供试品溶液在室温下8 h内稳定。

2.5 重复性考察

分别取5、7、9 h 3个酸解时间点的供试品溶液,各6份,按“2.3.2”项下方法操作后,分别在274、339 nm波长处测定其A值,计算 A_{339}/A_{274} 。结果,重复性试验RSD均小于1.94% ($n=6$),表明该方法重复性较好。

2.6 加样回收率考察

取已知含量的葛花异黄酮5.0 mg,置于50 mL量瓶中,加入含1% TEA的70%乙醇溶解定容。精密量取2.0、3.0、4.0 mL置于10 mL量瓶中,各3份,分别精密加入鸢尾苷元相对百分含量为80%的对照品混合液0.8、1.0、1.2 mL,用含1% TEA的70%乙醇定容至刻度,按“2.3.2”项下方法测定。结果,3个水平溶液的加样回收率分别为98.6%、101.0%、99.5% (RSD分别为0.94%、1.90%、1.92%, $n=3$),平均加样回收率为99.7% (RSD=1.77%, $n=9$)。

2.7 含量测定

2.7.1 HPLC法检测 HPLC法检测及方法学考察参考文献[7]。色谱条件:色谱柱为Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-乙腈-水(2:1:2, V/V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为264 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μL。精密量取“2.1.2”项下供试品溶液1.0 mL,置于10 mL量瓶中,加入流动相超声(功率:250 W;频率:40 kHz)10 min,混匀,稀释至刻度,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取滤液,进样测定,结果见图6。总异黄酮含量

及鸢尾苷元相对百分含量测定结果见表1。

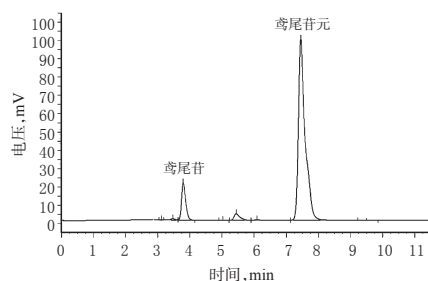


图6 高效液相色谱图

Fig 6 HPLC chromatograms

表1 HPLC法与UV法测定葛花中总异黄酮含量及鸢尾苷元相对百分含量的结果

Tab 1 Determination results of total flavonoids content and relative tectorigenin percentage content in flower of *Pueraria lobata* by HPLC and UV

样品编号	总异黄酮含量, nmol/mL			鸢尾苷元相对百分含量, %		
	HPLC	UV	差值	HPLC	UV	差值
1	24.40	25.09	0.69	55.62	57.65	2.03
2	20.67	22.00	1.33	71.83	73.63	1.80
3	18.86	18.41	-0.45	84.18	81.07	-3.11
4	20.69	23.11	2.42	81.70	83.59	1.89
5	24.17	25.55	1.38	91.14	87.59	-3.55
6	17.39	17.64	0.25	85.47	83.09	-2.38

2.7.2 UV法检测 精密量取“2.1.2”项下供试品溶液1.0 mL,共6份,分别置于10 mL量瓶中,加入含1% TEA的70%乙醇定容,摇匀,分别于274、339 nm波长处测定A值。根据“2.3.1”“2.3.2”项下结果计算总异黄酮含量和鸢尾苷元相对百分含量,结果见表1。以HPLC测定结果为标准,使用SPSS 18.0统计学软件,采用配对t检验对所得结果进行分析。结果发现两种方法测定结果差异无统计学意义($P>0.05$),表明UV法可用于葛花总异黄酮含量及鸢尾苷元相对百分含量的快速检测,并以此监测鸢尾苷水解转化率。

3 讨论

异黄酮作为天然活性成分,其分离提取工艺步骤繁多、影响因素复杂,对其分离纯化方法的合理选择尤为重要。尤其是分析样品量较大时,寻求操作简便、快速准确的评价方法具有重要的现实意义。薄层色谱法可进行异黄酮的定性和半定量分析^[9],不适合提取条件的研究。HPLC法具有准确、灵敏、快速的特点,但分析时间长、费用高。异黄酮在紫外区有特征吸收,峰的数目少,以带II为主,多数异黄酮有一小的肩峰即带I,这使紫外吸收作为分析方法成为可能^[9]。

分子中取代基的性质、位置和数目决定吸收带的波长、强度和峰形。当羟基位于A环(见图1)时,使带II红移、强度增强,并随羟基数目的增多而增强,但是7-羟基取代则对光谱影响不大^[10]。鸢尾苷元的7-羟基被葡萄糖取代成为鸢尾苷,本研究亦显示两者的紫外光谱极其相近,证明7位羟基或是糖基对波峰波幅的影响甚微,但是

糖的分子量远远大于羟基。试验结果表明,吸收带的强度与鸢尾苷和鸢尾苷元的总浓度具有良好的线性关系($r=0.9999$),因此用浓度可以准确测得总异黄酮的含量。

UV法可以测定总异黄酮含量,但不能区分糖苷和苷元。本研究发现,葛花异黄酮在含TEA的介质中苷元的带I峰明显升高并红移,而糖苷的带I消失。苷元的含量与其带I的A值在一定范围内有很好的线性关系,但因波幅小,在有糖苷存在时,准确性差,因此不宜直接用于苷元的定量检测。此外,带I与带II吸光度之比与苷元的相对百分含量在50%~100%区间内线性关系良好($r=0.9995$)。本研究所制备的葛花异黄酮主要成分为鸢尾苷和鸢尾苷元,可通过UV法检测苷元的相对百分含量,与HPLC法比较无显著差异,为糖苷水解制备苷元提供了简便、可靠的监测手段。

异黄酮的酚羟基在碱性介质中发生解离,显色作用增强,导致吸收红移。本研究以TEA为位移试剂,克服了在强碱条件下显色溶液稳定性差的弊端^[11]。本研究建立的方法用于葛花总异黄酮和苷元相对百分含量的检测,操作方便快捷、准确可靠、重复性好,为葛花异黄酮的研究提供了有力的手段。

参考文献

- [1] Mosihuzzman M, Naheed S, Hareem S. Studies on α -glucosidase inhibition and anti-glycation potential of *Iris loczyi* and *Iris unguicularis*[J]. *Life Sci*, 2013, 92(3): 187-192.
- [2] Zhang H, Liu XF, Chen S. Tectorigenin inhibits the in vitro proliferation and enhances miR-338 expression of pulmonary fibroblasts in rats with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(1): 165-173.
- [3] 陈可, 燕宪亮. 葛根素注射液治疗老年女性骨质疏松症合并不稳定型心绞痛的疗效分析[J]. *中国药房*, 2017, 28(12): 1644-1647.
- [4] 张杰, 常义生, 曾钺, 等. 葛花化学成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(23): 65-67.
- [5] Thilakarathna SH, Rupasinghe HP. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement[J]. *Nutrients*, 2013, 5(9): 3367-3387.
- [6] 何佳珂, 于洋, 陈西敬, 等. 黄酮类化合物的药物代谢研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(21): 2789-2794.
- [7] 王金凤, 魏颖, 王芳, 等. HPLC法快速测定葛花提取物中4种异黄酮类化合物的含量[J]. *中国药师*, 2014, 17(9): 1496-1498.
- [8] 裴香萍, 裴妙荣, 张淑荣. 葛花中鸢尾苷元定性定量方法研究[J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(6): 1004-1006.
- [9] 张海军, 王英, 王庆钰. 大豆异黄酮检测方法研究概述[J]. *粮食与油脂*, 2011(3): 39-42.
- [10] 陈晓青, 蒋新宇, 刘佳佳, 等. 中草药成分分离分析技术与方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 74-89.
- [11] 池玉梅, 居羚, 邓海山, 等. 分光光度测定总异黄酮法的适用性[J]. *分析化学*, 2010, 38(6): 893-896.

(收稿日期: 2016-12-13 修回日期: 2017-06-13)

(编辑: 刘明伟)