

- 1733-1736.
- [13] 杨 菲, 冯伟红, 王智民, 等. 一测多评法测定银黄制剂中4种黄酮类成分含量[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(12): 984-989.
- [14] 罗祖良, 仇 峰, 韦日伟, 等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.
- [15] 李 倩, 刘 伟, 罗祖良, 等. 一测多评法测定丹参中丹参酮II_A、隐丹参酮、丹参酮I、二氢丹参酮I的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(6): 824-828.

葛花质量标准的研究

马奋刚, 张永萍*, 徐 剑, 杨立勇, 赵 南
(贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 目的 建立葛花 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的质量标准。方法 对葛花性状、显微特征进行鉴别后, TLC 法作定性鉴别, HPLC、紫外分光光度法分别测定葛花苷、总黄酮含量, 《中国药典》方法测定水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物含量。结果 TLC 斑点清晰, 重复性好, 阴性无干扰。葛花苷、总黄酮分别在 2.34 ~ 234 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r = 0.9998$)、0.3368 ~ 1.3472 mg/mL ($r = 0.9997$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率 (RSD) 分别为 100.66% (1.73%)、99.77% (2.2%)。10 批样品中, 水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物含量范围分别为 12.40% ~ 14.70%、8.16% ~ 10.13%、0.40% ~ 0.70%、20.25% ~ 29.5%。结论 该方法稳定可靠, 可用于葛花的质量评价。

关键词: 葛花; 葛花苷; 总黄酮; TLC; HPLC; 紫外分光光度

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)08-1762-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.08.018

Quality standard for *Pueraria lobata*

MA Fen-gang, ZHANG Yong-ping*, XU Jian, YANG Li-yong, ZHAO Nan

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the quality standard for *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. **METHODS** The characteristic and microscopic features of *P. lobata* were identified, after which TLC was used for qualitative identification, HPLC and UV spectrophotometry were adopted in the content determination of kakkalide and total flavonoids, respectively, and the contents of water, total ash, acid-insoluble ash and extracts were determined by Chinese Pharmacopoeia methods. **RESULTS** The clear TLC plots displayed good reproducibility without negative interference. Kakkalide and total flavonoids showed good linear relationships within the ranges of 2.34 – 234 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r = 0.9998$) and 0.3368 – 1.3472 mg/mL ($r = 0.9997$), whose average recoveries (RSDs) were 100.66% (1.73%) and 99.77% (2.2%), respectively. In ten batches of samples, the content ranges of water, total ash, acid-insoluble ash and extracts were 12.40% – 14.70%, 8.16% – 10.13%, 0.40% – 0.70% and 20.25% ~ 29.5%, respectively. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the quality control of *P. lobata*.

KEY WORDS: *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; kakkalide; total flavonoids; TLC; HPLC; UV spectrophotometry

收稿日期: 2018-01-15

基金项目: 贵州省教育厅普通高等学校中药民族药(苗药)新剂型新制剂工程研究中心项目(黔教合KY字[2014]22); 贵州省科技计划重大专项项目(黔科合重大专项字[2015]6010); 国家苗药工程技术研究中心项目(2014FU125Q09); 贵州省贵阳中医学院院士工作站黔科合院士站([2014]4013)

作者简介: 马奋刚(1992—), 男, 硕士生, 从事中药、民族药新制剂与新剂型研究。Tel: 18786016885

* **通信作者:** 张永萍(1965—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药、民族药新制剂与新剂型研究。Tel: (0851) 85652056

葛花又名葛条花，为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥花，性味甘凉，入阳明经，始载于《名医别录》，在《神农本草经》、《本草纲目》等书中也有记载，具有解酒醒脾之功效，主治不思饮食、呕逆吐酸、伤酒发热，烦渴、吐血、肠风下血，等症^[1-2]，是最具代表性的解酒药物之一^[3]。目前，葛花被收载于《卫生部药品标准》中药材分册第一册，但仅有来源、性状、显微鉴别等项目，无检查、浸出物、薄层鉴别、含量测定方法等^[4]。因此，本实验将建立葛花质量标准，为有效控制其质量提供理论依据，并为相关产品开发奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器 LC-20AT 高效液相色谱仪、AUY220 电子天平（日本岛津公司）；AE240 电子天平（梅特勒-托利多仪器上海有限公司）；SK8200H 超声波清洗仪（上海科导超声仪器有限公司，功率 500 W、频率 53 kHz）；TU-1810PC 紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）；DG/20-002 台式干燥箱（中华人民共和国重庆试验设备厂）。

1.2 试药 葛花苷对照品（贵州迪大生物科技有限责任公司，批号 2355-160401）；芦丁对照品（中国食品药品检定研究院，批号 100080-201610）。硅胶 GF254 薄层板（青岛海洋化工厂分厂，批号 20150915）。乙腈（批号 20161116）、甲醇（批号 20160901）为色谱纯、乙醇（批号 20170117）、乙醚（批号 20150811）为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；NaNO₂ 为分析纯（重庆江川化工集团有限公司，批号 20140917）；Al(NO₃)₃（批号 20140521）、NaOH（批号 20151111）为分析纯（天津市科密欧化学试剂有限公司）；水为娃哈哈纯净水。

1.3 药材 10 批葛花均采自贵州省，经贵阳医学院魏升华教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥花，具体见表 1。

2 方法与结果

2.1 性状鉴别^[4] 葛花呈扁长圆形。开放的花皱缩，花萼灰绿色至灰黄色，萼 5 齿，披针形，约与萼筒等长或稍长，上面裂片先端二分裂，长 8 ~ 11 mm，下面裂片最长 1 片可达 15 mm，其余 2 裂片长 5 ~ 7 mm，内外均有灰白色毛。花冠蓝色至蓝紫色，久置则呈灰黄色；旗瓣近圆形或长圆形，长 6 ~ 15 mm，宽 6 ~ 12 mm，先端中央缺刻，深

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	产地	批号
1	观山湖	16070301
2	观山湖体育中心旁	16070802
3	乌当区平阳县边境	16071503
4	开阳县南江镇	16071804
5	龙里县羊场	16072405
6	修文县扎佐镇	16072906
7	云岩区水东路桃花源村	16080107
8	清镇云归大山	16080908
9	南明区	16081309
10	贵阳其他地区	16081710

0.5 ~ 1 mm；翼瓣窄三角形，长 6 ~ 12 mm，宽 2 ~ 5 mm，基部附属体一侧甚小或缺，弦侧附属体明显长大于宽；龙骨瓣长 5 ~ 13 mm，宽 3 ~ 5 mm，弦侧基部有三角形附属体。花药长 0.6 ~ 0.9 mm，宽 0.3 ~ 0.5 mm。无臭，味淡。

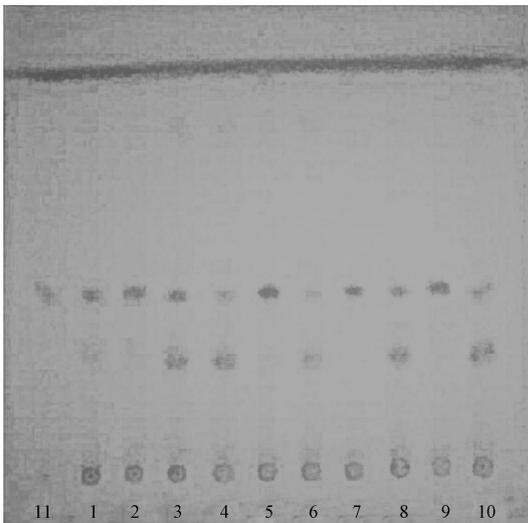
2.2 显微鉴别^[4] 葛花粉末呈灰棕蓝色。萼片上下表皮均着生非腺毛及腺毛，非腺毛单列，基部 2 个细胞小型，先端细胞细长，末端锐尖；腺毛多细胞头，内含浅黄色物质；上表皮细胞内侧有含 1 个单棱晶的厚壁细胞。旗瓣上表皮细胞壁方形，呈乳突状，外覆有厚瘤状角质层；中央部的上表皮细胞长 19 ~ 26 μm，下表皮细胞长 18 ~ 24 μm，宽 8 ~ 14 μm，表面有厚 9 ~ 11 μm 的角质层。花粉粒长 20 ~ 24 μm，宽 22 ~ 24 μm，表面网眼较小，点状或孔状，网眼内颗粒状纹饰少。

2.3 TLC 定性鉴别^[5]

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取葛花苷对照品 5.85 mg，置于 5 mL 量瓶中，甲醇超声溶解并稀释至刻度，摇匀，即得（每 1 mL 含葛花苷 1.17 mg），根据需要稀释成不同质量浓度。

2.3.2 供试品溶液制备 精密称取 10 批药材粉末各 1 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 75% 乙醇 50 mL，静置 30 min 后称定质量，超声 1 h，放冷，75% 乙醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3.3 鉴别方法 按照 2015 年版《中国药典》四部薄层色谱法（通则 0502），取对照品、供试品溶液各 2 μL，点于同一硅胶 GF254 薄层板上，以三氯甲烷-甲醇-水（10 : 5 : 2）为展开剂，展开距离约 8 cm，使其成条状，展开，取出，晾干，置于紫外光灯（254 nm）下检视，结果见图 1。可知，对照品、供试品在相应位置上显示相同颜色荧光斑点。



1~10. 样品 11. 对照品

1-10. samples 11. reference substance

图1 葛花苷 TLC 色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of kakkalide

2.4 检查项^[6]

2.4.1 水分 按照2015年版《中国药典》四部通则0832第二法进行测定，平行3次，结果见表2。

2.4.2 总灰分、酸不溶性灰分 按照2015年版《中国药典》四部通则2302总灰分和酸不溶性灰分测定法进行测定，平行3次，结果见表2。

表2 水分、总灰分、酸不溶性灰分含量测定结果(n=3)

Tab. 2 Results of content determination of water, total ash and acid-insoluble ash (n=3)

编号	水分/%	总灰分/%	酸不溶性灰分/%
1	12.40	9.11	0.68
2	13.10	8.16	0.51
3	13.40	8.66	0.64
4	12.50	8.59	0.70
5	13.60	8.43	0.64
6	14.40	10.13	0.50
7	14.20	9.40	0.48
8	12.70	9.42	0.40
9	14.70	9.08	0.57
10	13.30	8.97	0.65
平均值	13.43	9.00	0.58

2.5 浸出物^[6] 按照2015年版《中国药典》四部通则2201水溶性浸出物和醇溶性浸出物测定法进行测定，平行3次，结果见表3。

2.6 含量测定^[7-8]

2.6.1 色谱条件 Odyssil C₁₈ 色谱柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相乙腈-0.4% 磷酸 (30 : 70); 检测波长 265 nm; 柱温 30 °C; 体积流量

1.0 mL/min; 进样量 10 μL。

表3 浸出物含量测定结果 (n=3)

Tab. 3 Results of content determination of extracts (n=3)

编号	水浸出物/%		醇浸出物/%	
	热浸出物	冷浸出物	热浸出物	冷浸出物
1	27.5	29.5	22	23
2	20.75	27.375	22.5	23
3	26.5	26.25	21	20.25
4	25	24.75	22	21.5
5	27.75	26.375	23.5	24.75
6	27.5	24.75	26.25	24
7	25.25	25.5	24.75	22.75
8	23.25	24	24.5	22.75
9	24.75	23.5	22.25	24.5
10	21.25	25.25	28.25	27.75
平均值	24.95	25.725	23.7	23.425

2.6.2 溶液制备

2.6.2.1 对照品溶液 同“2.3.1”项。

2.6.2.2 供试品溶液 精密称取药材粉末 (过3号筛) 0.3 g, 精密加入75%乙醇50 mL, 称定质量, 超声 (功率500 W、频率53 kHz) 1 h, 放冷, 75%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.6.3 方法学考察

2.6.3.1 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液、空白溶剂进样, 按“2.6.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图2。由图可知, 对照品、供试品中各组分色谱峰均可达到基线分离 (分离度均大于1.5), 空白无干扰, 理论塔板数均大于3000。

2.6.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项下对照品溶液1 mL, 定容至50 mL量瓶中, 稀释至0.0234 mg/mL, 分别取0.1、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL, 甲醇定容至10 mL量瓶中, 摇匀, 得系列质量浓度溶液, 过滤, 精密吸取续滤液10 μL, 在“2.6.1”项色谱条件下进样测定。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 得回归方程为 $Y = 25\,474X + 29\,263$ ($r = 0.9998$), 在2.34 ~ 234 μg/mL范围内线性关系良好。

2.6.3.3 精密度试验 精密吸取“2.3.1”项下对照品溶液10 μL, 在“2.6.1”项色谱条件下进样测定6次, 测得葛花苷峰面积RSD为0.92% (n=6), 表明仪器精密度良好。

2.6.3.4 稳定性试验 取“2.6.2.2”项下供试品溶液10 μL, 室温下于0、2、4、8、12、24 h在“2.6.1”项色谱条件下进样测定, 测得葛花苷峰

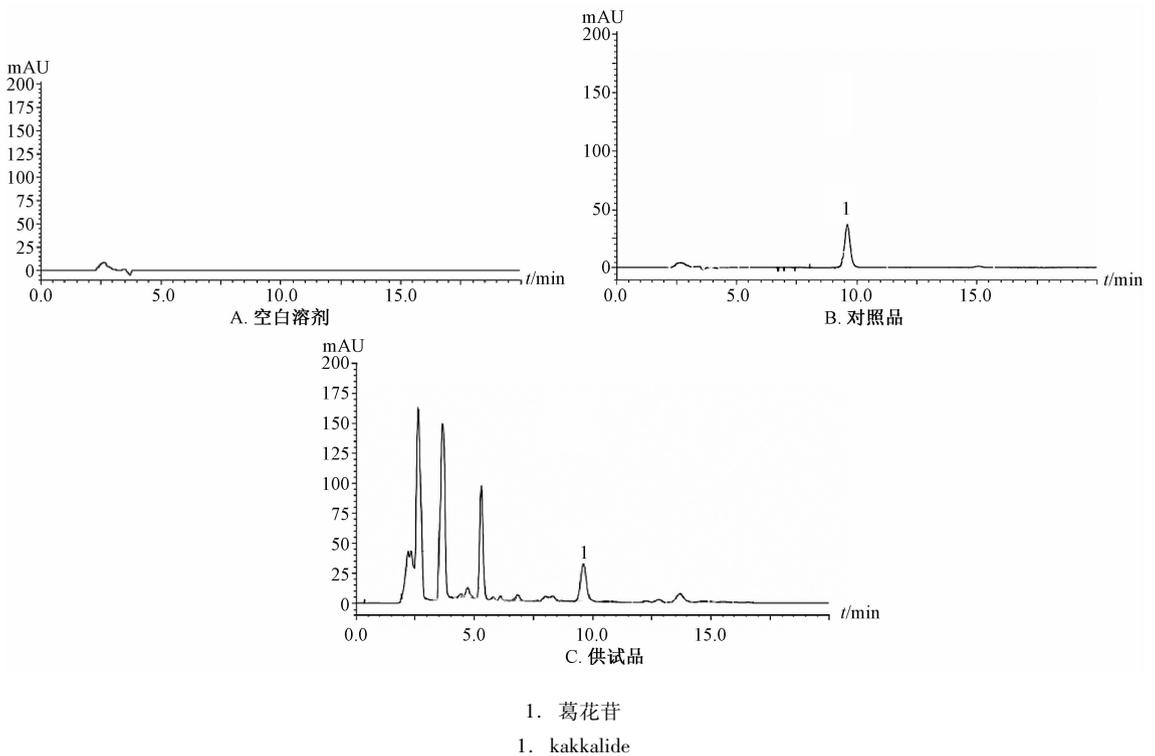


图2 葛花苷 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of kakkalide

面积 RSD 为 0.78% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.3.5 重复性试验 精密称取同一批药材粉末 6 份, 按“2.6.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.6.1”项色谱条件下进样测定, 测得葛花苷含有量 RSD 为 1.37% ($n = 6$), 表明该方法重复

性良好。

2.6.3.6 加样回收率试验 精密称取含有量已知的药材 (批号 16080908) 6 份, 加入适量对照品, 按“2.6.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.6.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率, 结果见表 4。

表 4 葛花苷加样回收率试验结果 ($n = 6$)

Tab. 4 Results of recovery tests for kakkalide ($n = 6$)

称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/(RSD/%)
0.150 2	0.535 8	0.585	1.125 9	100.87	
0.149 7	0.534 0	0.585	1.105 1	97.62	
0.150 8	0.537 9	0.585	1.138 6	102.68	100.66
0.150 2	0.535 8	0.585	1.122 3	100.26	(1.73)
0.151 0	0.538 6	0.585	1.134 8	101.91	
0.150 2	0.535 8	0.585	1.124 3	100.60	

2.6.4 样品含有量测定 取 10 批药材, 按“2.6.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.6.1”项色谱条件下进样测定, 计算含有量, 结果见表 5。

2.7 总黄酮含有量测定^[9]

2.7.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品 16.84 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 70% 乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.7.2 供试品溶液制备 精密称取 10 批药材粉末

各 2 g, 乙醚超声脱脂 2 h, 称定质量, 挥去乙醚, 100 mL 70% 乙醇回流提取 2 h 后冷却, 70% 乙醇补足减少的质量, 过滤, 续滤并定容至 100 mL, 即得。

2.7.3 测定方法 精密吸取供试品溶液 2 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 先加入 5% NaNO₂ 溶液 1 mL, 摇匀, 静置 6 min, 再加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1 mL, 摇匀, 静置 6 min, 最后加入 4% NaOH 10 mL, 70% 乙醇定容至 25 mL, 摇匀, 静置 15 min, 以

表5 葛花苷含有量测定结果 (n=3)

Tab. 5 Results of content determination of kakkalide (n=3)

编号	批号	葛花苷/(mg·g ⁻¹)
1	16070301	19.949
2	16070802	23.078
3	16071503	3.759
4	16071804	3.053
5	16072405	32.042
6	16072906	3.654
7	16080107	21.453
8	16080908	3.567
9	16081309	25.137
10	16081710	3.577

70%乙醇为空白,于506 nm波长处测定吸光度。

2.7.4 检测波长确定 吸取芦丁对照品溶液2 mL,按“2.7.3”项下方法测定吸光度,在200~800 nm范围内扫描,发现最大吸收波长为506 nm,故选择其作为检测波长。

2.7.5 线性关系考察 精密吸取芦丁对照品溶液1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL,置于25 mL量瓶中,按“2.7.3”项下方法测定吸光度。以质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(A)

进行回归,得回归方程为 $A = 0.5534X - 0.0015$ ($r = 0.9997$),在0.3368~1.3472 mg/mL范围内线性关系良好。

2.7.6 方法学考察

2.7.6.1 精密度试验 精密吸取“2.7.2”项下供试品溶液2 mL,按“2.7.3”项下方法测定吸光度,平行6次,测得其RSD为0.3% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7.6.2 重复性试验 精密称取同一批药材粉末6份,按“2.7.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.7.3”项下方法测定吸光度,测得其RSD为1.2% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.7.6.3 稳定性试验 精密吸取“2.7.2”项下供试品溶液2 mL,按“2.7.3”项下方法测定吸光度,测得其2 h内RSD为2.7%,表明该方法在2 h内稳定性良好。

2.7.6.4 加样回收率试验^[10] 精密吸取含有量已知的供试品溶液(批号16080908)2 mL,加入适量对照品溶液,在506 nm波长处测定吸光度,平行6次,计算回收率,结果见表6。

表6 总黄酮加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 6 Results of recovery tests for total flavonoids (n=6)

原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/(RSD/%)
0.6663	0.6736	1.3332	99.01	
0.6674	0.6736	1.3451	100.62	
0.6671	0.6736	1.3513	101.57	99.77
0.6667	0.6736	1.3086	95.30	(2.2)
0.6680	0.6736	1.3488	101.06	
0.6661	0.6736	1.3469	101.08	

2.7.7 样品含有量测定 取10批药材,按“2.7.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.7.3”项下方法测定吸光度,计算含有量,结果见表7。

表7 总黄酮含有量测定结果 (n=3)

Tab. 7 Results of content determination of total flavonoids (n=3)

编号	批号	总黄酮/%
1	16070301	6.23
2	16070802	6.41
3	16071503	6.38
4	16071804	6.82
5	16072405	6.85
6	16072906	7.47
7	16080107	5.57
8	16080908	6.88
9	16081309	5.20
10	16081710	6.97

3 讨论

进行TLC定性鉴别时,选择醋酸乙酯-甲醇-水、醋酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水、氯仿-甲醇-水、氯仿-甲醇-甲酸、苯-丙酮-甲醇-甲酸等^[5,11]展开剂进行考察,最终选择了图谱清晰、专属性强、重复性好、分离度高的氯仿-甲醇-水(10:5:2)作为展开剂。

测定葛花苷含有量时,选择甲醇-水、甲醇-磷酸、乙腈-水、乙腈-磷酸等流动相进行考察,发现仅以水为流动相时,色谱峰拖尾现象明显;加入磷酸后,其拖尾现象明显改善,并可提高峰形对称性和分离效果,最终选择乙腈-0.4%磷酸作为流动相进行等度洗脱。同时,还优化了提取方法^[12-13],考察提取方式(回流、超声)、提取溶剂(甲醇、乙醇、水)、提取溶剂体积分数(30%、50%、

75%、95%)、提取时间(0.5、1、2 h),确定最佳提取条件为75%乙醇超声1 h。

然后,以芦丁为指标性成分测定总黄酮含量。首先利用黄酮类成分易溶于乙醇而难溶于乙醚的特点^[14],用乙醚脱脂,以排除脂溶性成分的干扰,并考察提取方式、溶剂、时间等影响因素,还比较了 $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{AlCl}_3$ 、 $\text{NaNO}_2-\text{Al}(\text{NO}_3)_3-\text{NaOH}$ 的显色效果^[10],最终选择“2.7.2”项下供试品溶液制备方法。

含有量测定结果表明,不同产地葛花中葛花苷含有量差异较大,这是否与药材采收时间、采收地点、烘干方法,等因素有关还需作进一步研究。葛花具有保护心肌,扩张脑血管、心血管、外周血管,抗氧化,降血糖,解酒,等药理活性,尤其对酒精引起的肝细胞损害有保护作用^[15-18],故本实验建立其质量标准具有较大意义。

参考文献:

[1] 裴香萍,裴妙荣,申昕,等. 葛花的生药学研究[J]. 山西中医, 2010, 26(4): 48-49.

[2] 裴香萍,裴妙荣,丁海琪. 葛花化学成分的研究[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2010, 33(3): 423-424.

[3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999: 619.

[4] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药材第一册)[S]. 1992: 90.

[5] 常欣. 葛花药材质量标准与葛花苷原料药的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2009.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版四部

[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 57, 103, 204.

[7] 王正军,吕明. 武当山产葛花中葛花苷的含量测定[J]. 儿科药学杂志, 2014, 20(3): 51-53.

[8] 赵楠,刘丹,王艳萍,等. HPLC法测定葛花中鸢尾苷和鸢尾苷元的含量[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(3): 226-228.

[9] 谭娟,刘良科,谢梦涵,等. 不同花期野葛花总黄酮、花青素和总多酚含量的研究[J]. 怀化学院学报, 2015, 34(11): 12-14.

[10] 骆珍,李振东,吕思思,等. 连翘花总黄酮含量的分光光度法测定及其对 NO_2^- 清除作用[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2017, 34(1): 60-65.

[11] 刘立辉. 葛花药材的药学研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2010.

[12] 华卡,黄宇. 高效液相色谱法测定不同产地葛花中葛花苷的含量[J]. 中南药学, 2012, 10(6): 435-437.

[13] 陈玉兰,蒲清荣,魏岫,等. HPLC法测定葛花药材中鸢尾苷含量[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(8): 22-23.

[14] 边永玲,甄攀,李焕芬,等. 葛花中总黄酮含量测定[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2007, 23(6): 33-34, 38.

[15] 谭珍媛,梁秋云,黄兴振. 葛花的化学成分及其醒酒功能开发利用研究进展[J]. 广西中医药大学学报, 2017, 20(1): 72-75.

[16] 王旭,陈绍红,钟赣生,等. 葛花、枳椇子配伍对慢性酒精性肝损伤大鼠海马7种单胺类神经递质及代谢产物含量水平的影响[J]. 中国现代中药, 2016, 18(5): 558-562, 594.

[17] 张伟. 用葛花解酒汤治疗酒精性肝病的效果研究[J]. 当代医药论丛, 2016, 14(8): 19-20.

[18] 戴雨霖,郑飞,黄鑫,等. 葛花入参配伍的解酒护肝机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(4): 45-49.