

双波长反相高效液相色谱法同时测定葛根姜黄胶原蛋白片中葛根素、芍药苷和姜黄素

苏昭仑*, 黄康惠, 张喜金, 陈彩云, 陈宏壁, 林贤邦

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立一种同时测定葛根姜黄胶原蛋白片中葛根素、芍药苷和姜黄素的反相高效液相色谱法。**方法** 样品经50%乙醇超声提取, 经SUPELCO-C₁₈柱分离, 流动相为甲醇-水, 采用梯度洗脱, 在0~25 min之间波长为230 nm, 在25.01~39 min之间波长为430 nm条件下检测。**结果** 葛根素、芍药苷和姜黄素在上述色谱条件下能完全分离。葛根素、芍药苷和姜黄素的线性范围为0.01~0.1 mg/mL; 平均回收率96.3~103.3%, RSD<2.0%。**结论** 该方法操作简便, 精密度和回收率高, 重复性好, 可同时测定葛根姜黄胶原蛋白片中葛根素、芍药苷和姜黄素。

关键词: 葛根素; 芍药苷; 姜黄素; 反相高效液相色谱法; 葛根姜黄胶原蛋白片

Determination of puerarin, paeoniflorin and curcumin in radix puerariae turmeric collagen tablets by reversed-phase high performance liquid chromatography with dual-wavelength

SU Zhao-Lun*, HUANG Kang-Hui, ZHANG Xi-Jin, CHEN Cai-Yun,
CHEN Hong-Bi, LIN Xian-Bang

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of puerarin, paeoniflorin and curcumin in radix puerariae turmeric collagen tablets by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Methods** Samples were ultrasonically extracted with 50% ethanol. The extracts were separated by SUPELCO-C₁₈ column with gradient elution and methanol-water as the mobile phase, then samples were detected between 0~25 min at a wavelength of 230 nm and 25.01~39 min at a wavelength of 430 nm. **Results** Puerarin, paeoniflorin and curcumin could be completely separated by the conditions. The linear range was 0.01~0.1 mg/mL, and the average recovery was 93.5%~103.8%, RSD<2.0%. **Conclusion** The method is simple, and has a high precision, recovery rate and good repeatability. It can simultaneously determine puerarin, paeoniflorin and curcumin in radix puerariae turmeric collagen tablets.

KEY WORDS: puerarin; paeoniflorin; curcumin; reversed-phase high performance liquid chromatography; radix puerariae turmeric collagen tablets

*通讯作者: 苏昭仑, 执业中药师, 主要研究方向为中药和保健食品安全检测。E-mail: suwheel@126.com

*Corresponding author: SU Zhao-Lun, Licensed Pharmacist, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: suwheel@126.com

1 引 言

葛根姜黄胶原蛋白片是由葛根、白芍、姜黄、胶原蛋白粉等经提取加工制成的复方制剂。葛根和白芍具有解肌发表、生津除热、透疹、合营泄热的功效^[1]；姜黄具有活血行气、痛经止痛的功效^[2]，其主要活性成分姜黄素具有利胆、抗炎^[3]、抗病毒^[4]、降血脂^[5]、抗氧化^[6]、抗肿瘤^[7]和延年益寿^[8]等多方面的药理作用。

葛根素、芍药苷和姜黄素单一成分的含量测定已有较多报道^[9-15]，主要采用反相高效液相色谱法进行测定。复方中药制剂中该 3 种有效活性成分的同时测定尚未见报道。本实验采用双波长反相高效液相色谱法对葛根姜黄胶原蛋白片中葛根素、芍药苷和姜黄素同时进行含量测定和质量控制，具有一定的研究价值和经济效益。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

仪器：高效液相色谱仪(美国安捷伦公司，型号：1260，配 VWD)；分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司，型号：XP205)。

材料：葛根姜黄胶原蛋白片(汤臣倍健股份有限公司)。

试剂与对照品：甲醇(色谱纯，德国 CNW 公司)；乙醇(分析纯，广州化学试剂厂)；纯化水；葛根素(上海同田生物技术股份有限公司，批号：14013031，纯度：98.0%)；芍药苷(中国食品药品检定研究院，批号：110736-201337，纯度：94.9%)；姜黄素(成都曼思特生物科技有限公司，批号：MUST-13042801，纯度：98.0%)。

2.2 仪器条件

色谱柱：SUPELCO-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流速：1.0 mL/min；柱温：30 ℃；进样量：5 μL；波长：0~25 min 为 230 nm，25.01~39 min 为 430 nm；流动相：A 为水，B 为甲醇，梯度洗脱见表 1。

2.3 标准溶液的制备

2.3.1 标准储备液的配制

精密称取葛根素、芍药苷、姜黄素对照品 10 mg，分别置于 50 mL 棕色容量瓶，加 50%乙醇溶液溶解

并定容至刻度(浓度约为 0.2 mg/mL)，储备液于 4 ℃中储存备用。

表 1 梯度洗脱比例
Table 1 Gradient elution ratio

时间(min)	A(%)	B(%)
0.00	75	25
18.00	75	25
22.00	65	35
24.00	25	75
34.00	25	75
36.00	75	25
39.00	75	25

2.3.2 标准工作溶液配制

分别精密移取葛根素、芍药苷、姜黄素的储备液 0.50、1.00、2.00、4.00、5.00 mL 于 10 mL 容量瓶中，用 50%乙醇溶液定容至刻度，摇匀，得到 0.01、0.02、0.04、0.08、0.10 mg/mL 的混合标准工作溶液。

2.4 样品前处理

精密称取 0.1 g 样品于 150 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 50.00 mL 50%乙醇溶液，称重，超声提取 30 min，冷却至室温，加 50%乙醇溶液补足重量，摇匀，过滤后备用。

3 结果与分析

3.1 方法专属性实验

在 2.2 色谱条件下，葛根素、芍药苷和姜黄素的保留时间分别为 14.96、20.70、31.80 min。葛根素与芍药苷以及姜黄素的分离度良好，无干扰。见图 1~5。

3.2 方法的确认

在实验条件下，对混合标准工作溶液进行测定，结果表明，葛根素、芍药苷和姜黄素在 0.01~0.10 mg/mL 范围内有良好的线性关系， $r > 0.9995$ 。见表 2。

3.3 精密度实验

在实验条件下，对同一混合标准工作溶液进行重复进样 6 次测定，结果，其保留时间稳定，葛根素、芍药苷和姜黄素的峰面积 RSD 分别为 0.5%、1.4%、0.6%。见表 3。

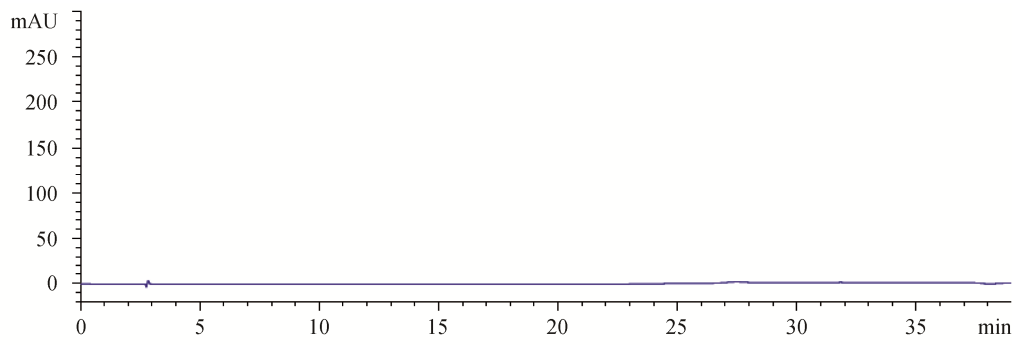


图 1 空白样品的色谱图
Fig. 1 The chromatogram of blank samples

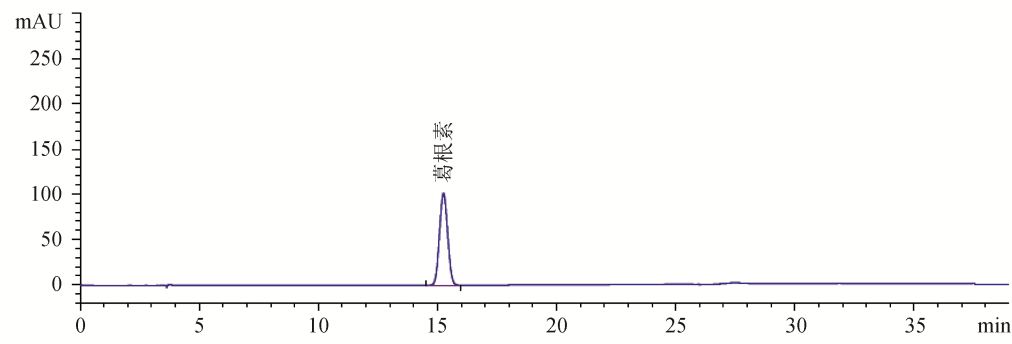


图 2 葛根素对照的色谱图
Fig. 2 The chromatogram of puerarin contrast

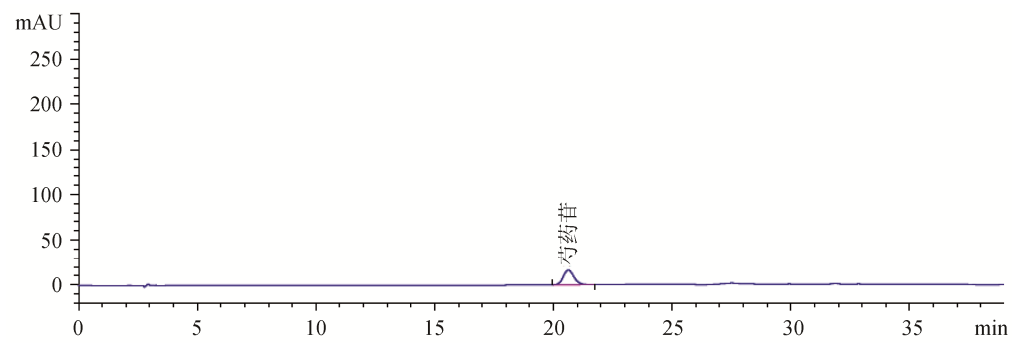


图 3 芍药苷对照的色谱图
Fig. 3 The chromatogram of paeoniflorin contrast

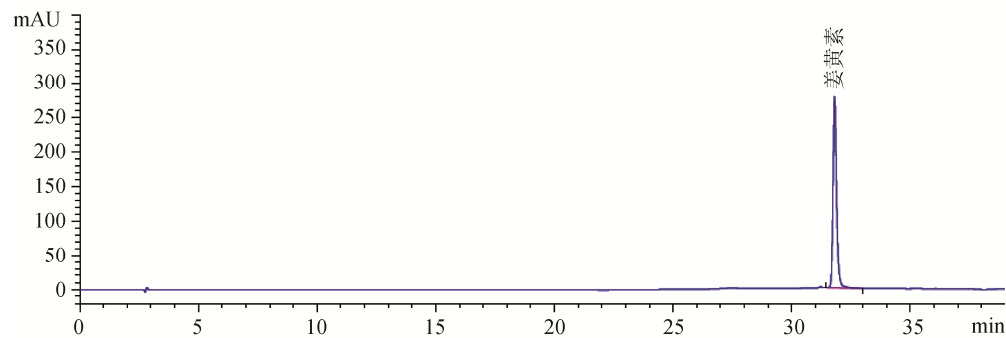


图 4 姜黄素对照的色谱图
Fig.4 The chromatogram of curcumin contrast

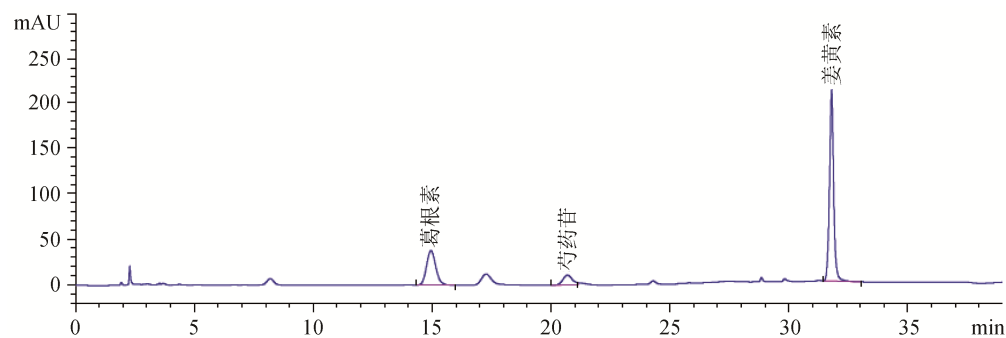


图 5 样品溶液的色谱图
Fig.5 The chromatogram of samples

表 2 三种成分的线性关系
Table 2 Linearity of three components

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围(mg/mL)
葛根素	$Y=21914.82882X+5.35854$	1.00000	0.01034~0.1034 mg/mL
芍药苷	$Y=6609.25466X+1.55087$	0.99994	0.009825~0.09825 mg/mL
姜黄素	$Y=37120.48594X+19.72498$	0.99998	0.01081~0.1081 mg/mL

表 3 三种成分的精密密度(*n*=6)
Table 3 Precision of three components (*n*=6)

成分	峰面积	RSD(%)
葛根素	2049.27515~2073.46709	0.5
芍药苷	638.38263~659.89523	1.4
姜黄素	2899.98511~2936.83677	0.6

3.4 稳定性实验

取 201401 批次的葛根姜黄胶原蛋白片, 按 2.4 方法制得供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、24 h 进样, 测定葛根素、芍药苷和姜黄素的峰面积, 其 RSD 分别为 0.2%、0.6%、0.4%。见表 4。

表 4 三种成分的稳定性(n=5)
Table 4 Stability of three components (n=5)

成分	峰面积	RSD(%)
葛根素	1014.90265~1019.04586	0.2
芍药苷	301.37836~306.68999	0.6
姜黄素	2570.8091~2593.45408	0.4

3.5 重复性实验

取同批次葛根姜黄胶原蛋白片, 按 2.4 方法制得 6 份供试品溶液, 测定葛根素、芍药苷和姜黄素的含量, 其 RSD 分别为 0.3%、0.5%、0.2%。见表 5。

表 5 三种成分的重复性(n=6)
Table 5 Repeatability of three components (n=6)

成分	含量(g/100g)	RSD(%)
葛根素	2.02~2.03	0.3
芍药苷	2.31~2.34	0.5
姜黄素	2.56~2.57	0.2

3.6 方法的回收率实验

精密称取已测定含量的同一样品 9 份样品, 分别添加 1.00、2.00、3.00 mL 各标准储备液进行加标回收实验, 结果见表 6。本方法平均回收率 96.3%~103.3%, 且 RSD < 2.0%, 说明该方法准确度可以满足葛根素、芍药苷和姜黄素的检测要求。

3.7 样品的测定

取 3 个不同批次的样品, 按 2.4 方法制备供试品溶液, 按 2.2 色谱条件测定, 按外标法计算。结果见表 7。

表 6 加标回收率和相对标准偏差(n=3)
Table 6 The recovery and relative standard deviation (n=3)

组分	加标量(mL)	平均回收率(%)	RSD(%)
葛根素	1.00	99.3	0.2
	2.00	100.8	1.6
	3.00	99.5	0.9
芍药苷	1.00	103.3	1.2
	2.00	101.8	0.7
	3.00	99.4	0.4
姜黄素	1.00	96.7	1.9
	2.00	98.8	0.6
	3.00	96.3	0.9

表 7 样品葛根素、芍药苷和姜黄素的含量(n=3)
Table 7 The content of puerarin, paeoniflorin and curcumin (n=3)

批次	葛根素	芍药苷	姜黄素
	含量(g/100 g)	含量(g/100 g)	含量(g/100 g)
201401	2.15±0.03	2.54±0.02	2.61±0.04
201402	2.03±0.02	2.31±0.01	2.56±0.01
201403	1.92±0.04	2.44±0.03	2.65±0.03

4 讨论

本实验采用反相高效液相色谱法, 梯度洗脱同时变波长, 成功地同时测定了葛根姜黄胶原蛋白片中上述 3 种成分的含量, 为该制剂质量标准的制定提供了定量依据。

本实验采用 25%、50%、75%、95%乙醇为提取溶剂, 提取时间为 30 min, 结果表明, 25%乙醇提取得率最低, 50%乙醇提取得率明显升高, 但当含乙醇量升值 75%时其得率与 50%乙醇并无明显差别, 95%乙醇提取得率有所降低, 因此, 采用 50%乙醇作为提取溶剂。

本实验中有 3 个待测组分, 检测波长的选择至关重要。全波长扫描显示葛根素、芍药苷和姜黄素分别在 250 nm、230 nm 和 430 nm 处有最大吸收。若采用 430 nm 作为检测波长, 仅适合于姜黄素, 葛根素和芍药苷在此波长处无吸收; 若采用 230 nm 和 250 nm, 仅适合葛根素和芍药苷, 姜黄素在这两个波长处均无吸收。由于 230 nm 既是芍药苷的最大吸收波长, 有对葛根素有较好吸收, 故本实验选择 230 nm 测定葛

根素和芍药苷, 430 nm 测定姜黄素。

采用甲醇-水(V:V=30:70)等度洗脱, 葛根素和芍药苷保留时间缩短, 以至于芍药苷与杂质峰难以分离, 姜黄素保留时间太长, 以至于单次分析时间超过60 min。因此, 选用甲醇-水(V:V=25:75)为初始流动相, 梯度洗脱, 在此条件下, 3 个待测组分均不受杂质干扰, 整个运行时间缩短至39 min 以内。从以上数据来看, 本方法的专属性、线性、精密度、稳定性、重复性和回收率都符合相关要求, 能满足葛根姜黄胶原蛋白片的日常检验。

参考文献

- [1] 李仲文. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005.
Li ZW. Pharmacy [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2005.
- [2] 中华人民共和国药典第一部 2010 版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010
“Pharmacopoeia of the People's Republic of China”2010 edition [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010.
- [3] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 854–857.
Di JB, Gu ZL, Zhao XD, *et al.* Progress curcumin antioxidant and anti-inflammatory effects [J]. Chin Tradit Drug, 2010, 41(5): 854–857.
- [4] 刘红艳, 王海燕, 叶松, 等. 姜黄素药理作用及其机制研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(6): 48–51.
Liu HY, Wang HY, Ye S, *et al.* Advances in pharmacological effects and mechanism of curcumin [J]. Chin J Mod Med, 2012, 22(6): 48–51.
- [5] 杨俊卿, 周岐新, 李远宗. 姜黄提取物对实验性动物高脂血症的防治作用研究[J]. 中国药房, 2004, 15(10): 600–602.
Yang JQ, Zhou QX, Li YZ. Research on control of experimental hyperlipidemia with turmeric extract [J]. J Chin Pharm, 2004, 15(10): 600–602.
- [6] 王笑晴. 基于 DPPH 自由基清除能力的姜黄提取物抗氧化活性评价[J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 360–363.
Wang XQ. Antioxidant activity evaluation based on DPPH radical scavenging capacity of turmeric extract [J]. Eval Drug, 2011, 34(5): 360–363.
- [7] 沃兴德, 丁志山, 袁巍, 等. 姜黄素及其衍生物抑制肿瘤作用的实验研究[J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(2): 53–57, 61.
Wo XD, Ding ZS, Yuan W, *et al.* Experimental study of curcumin and its derivatives in inhibit tumor effect [J]. Zhejiang Med Coll, 2005, 29(2): 53–57, 61.
- [8] 张炎强. 姜黄活性成分的提取、纯化及鉴定分析[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2007.
Zhang YQ. Turmeric active ingredients of extraction, purification and identification [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2007.
- [9] 王巧, 刘荣霞, 毕开顺, 等. HPLC 法测定白芍总苷胶囊中芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1630–1632.
Wang Q, Liu RX, Bi KS, *et al.* Determination of total glucosides of paeony capsules Albiflorin, paeoniflorin and benzoyl paeoniflorin by HPLC [J]. Chin Tradit Drug, 2005, 36(11): 1630–1632.
- [10] 刘新元, 何永志, 王倩. HPLC 法测定葛根素氯化钠注射液中的葛根素的含量 [J]. 中草药, 2001, 32(9): 795–796.
Liu XY, He YZ, Wang Q. Determination of puerarin in sodium chloride injection puerarin by HPLC [J]. Chin Tradit Drug, 2001, 32(9): 795–796.
- [11] 刘春旭, 张颖, 刘东春, 等. HPLC 快速测定通脉颗粒中葛根素和阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 44–46.
Liu CX, Zhang Y, Liu DC, *et al.* Determination of puerarin in Tongmai granules and ferulic acid by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2011, 17(7): 44–46.
- [12] 李雪晴, 文爱东. HPLC 测定康尔肤胶囊中葛根素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 137–139.
Li XQ, Wen AD. Determination of puerarin in Kang skin capsules by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2011, 17(8): 137–139.
- [13] 谭安军, 李卿, 秦剑. 高效液相色谱法测定心舒片中葛根素含量[J]. 中国药业, 2010, 20(7): 23–24.
Tan AJ, Li Q, Qin J. Determination of puerarin Xinshu Tablets by HPLC [J]. China Pharm, 2010, 20(7): 23–24.
- [14] 张韻慧, 张丹, 王妍, 等. HPLC 内标法测定姜黄中姜黄素类成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(8): 1423–1425.
Zhang YH, Zhang D, Wang Y, *et al.* Determination of turmeric curcumin ingredient by HPLC with internal standard method [J]. Chin Pharm J, 2009, 44(8): 1423–1425.
- [15] 李明, 周欣, 赵超, 等. HPLC 同时测定姜黄中3种姜黄素的含

量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11): 1810-1814.

Li M, Zhou X, Zhao C, *et al.* Simultaneous determination of the three kinds of curcumin turmeric by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 28(11): 1810-1814.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



苏昭仑, 执业中药师, 主要研究方向为中药和保健食品安全检测。

E-mail: suwheel@126.com

“食品加工与贮藏保鲜新技术”专题征稿函

民以食为天。食品的安全与质量, 直接关系到民族的健康和体质, 影响到国家或地区的政治安定和社会进步。而食品的加工质量与贮藏安全性与食品加工与贮藏保鲜技术的成熟与革新息息相关。近年来, 基因工程、酶工程、发酵工程、细胞工程、辐照技术、超临界流体萃取技术、微胶囊技术、膜分离技术、超高压技术、脉冲电场技术等被广泛应用于食品的加工与贮藏保鲜, 为食品工业的发展注入了新活力。

鉴于此, 本刊特别策划“食品加工与贮藏保鲜新技术”专题, 由江南大学的张慤教授担任专题主编。专题将围绕食品工业中食品微细化处理、食品混合、食品干燥、食品成分提取与分离、食品浓缩与结晶、食品膨化、食品杀菌、食品低温处理与贮藏保鲜、食品包装等各个环节中的高新技术展开, 探讨技术原理、技术特点、优势与局限性、影响因素、工艺及设备、应用实践等各个方面展开讨论, 计划在 2015 年 11 月正式出版。

本刊主编 **吴永宁 研究员**与 **张慤 教授** 与本刊特邀请您撰稿, 展示您的研究成果与学术发现, 以期食品加工与贮藏保鲜新技术的推广应用、科研开发提供理论和实践指导。请您请在 2015 年 10 月 15 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoods@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部