

doi: 10.3969/j.issn.1672-3678.2017.01.006

高聚物型色谱柱在高效液相色谱法中一步分析制备葛根素及大豆苷元的应用

夏明¹, 刘晓宁¹, 魏荣卿¹, 郑涛²

(1. 南京工业大学 生物与制药工程学院, 江苏 南京 211800;

2. 中国科学院 广州能源研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 建立了使用以聚苯乙烯-二乙烯基苯(PS-DVB)为基质的高聚物型色谱柱一步分离制备葛根提取液中的葛根素和大豆苷元的方法。采用MKF-RP-HH色谱柱(300 mm×7.8 mm 8 μm),葛根提取液经70%乙醇溶解稀释,以水(A)和甲醇(B)为流动相进行梯度洗脱,流速1.0 mL/min,检测波长250 nm,柱温30℃。结果表明:葛根提取液中的2种有效成分葛根素和大豆苷元均与杂质达到了较好的分离效果,且柱效大于2 100 N/m,优于常规的C-18硅胶色谱柱(柱效:1 000 N/m)。该高聚物型色谱柱不仅可用于上述分析,还可用作半制备柱制备得葛根素和大豆苷元纯品,葛根素在2~50 μg/mL范围内线性关系良好,回归方程为 $y_{\text{葛根}} = 1.342 2x - 1.018 4$,线性相关系数为0.999;大豆苷元在2~20 μg/mL范围内线性关系良好,回归方程为 $y_{\text{大豆}} = 2.275x + 0.869 5$,线性相关系数为0.999;葛根素和大豆苷元的纯化得率分别可达95.9%和78.5%。

关键词: 聚苯乙烯-二乙烯基苯;高聚物型色谱柱;反相高效液相色谱法;葛根素;大豆苷元

中图分类号: O65; TQ464.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3678(2017)01-0037-06

One-step determination and preparation of puerarin and daidzein by polymer column in HPLC

XIA Ming¹, LIU Xiaoning¹, WEI Rongqing¹, ZHENG Tao²

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, China;

2. Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Polymeric chromatographic column with polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) packing materials (MKF-RP-HH, 300 mm×7.8 mm 8 μm) was established to determine and prepare puerarin and daidzein. The kudzu extraction dissolved and diluted by 70% ethanol. Water (A) / methanol (B) was served as mobile phase at the rate of 1.0 mL/min. Detection was done at the wavelength of 250 nm at 30℃. Two active ingredients (puerarin and daidzein) and impurities have achieved effective separation. Column efficiency reached 2 100 N/m that is superior than conventional silica column (1 000 N/m). This polymeric column can be used as semi-preparative column to prepare puerarin and daidzein. The selected chromatographic conditions led to effectively determining puerarin with good linearity within 2–50 μg/mL, the regression equation was $y(\text{puerarin}) = 1.342 2x - 1.018 4$ and the regression coefficient was 0.999; the selected chromatographic conditions were found to effectively determine daidzein with good

收稿日期: 2016-04-26

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2013CB733504); 国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA021203)

作者简介: 夏明(1991—),女,安徽合肥人,研究方向:仪器分析; 刘晓宁(联系人),教授, E-mail: xiaoningliu@163.com

linearity within 2–20 $\mu\text{g/mL}$, the regression equation was $y(\text{daidzein}) = 2.275x + 0.8695$, and the regression coefficient was 0.999. The purification efficiency of puerarin and daidzein could reach to 95.9% and 78.5%.

Keywords: polystyrene-divinyl-benzene; polymeric chromatographic column; reversed phase high-performance liquid chromatography; puerarin; daidzein

葛根是豆科植物野葛、甘葛藤的干燥根,早在《本草纲目》中就有葛根可入药的记载^[1],在现代医学中较多权威资料如《中药大辞典》等著述,它具有以下药理作用:扩张冠状动脉和脑血管、降血糖血脂、抗脂质过氧化和消除自由基、预防老年痴呆等^[1-4]。葛根提取液中的主要有效成分为葛根素和 大豆苷元等异黄酮类化合物,纯度较高的异黄酮类化合物更具有药用价值,但各类天然葛根中除了异黄酮类化合物,还含有其他有毒成分^[5]。为了得到纯度较高的异黄酮类化合物,葛根素的检测、分离技术得到研发人员的广泛关注。通常分离分析葛根提取液是用反相高效液相色谱法^[6],而其色谱柱多为十八烷基硅烷键合的硅胶填料,该基质填料不耐酸碱、不耐水、易污染、难以清洗和再生^[7],易对样品造成不可逆吸附而拖尾^[8],更难以用于大量制备。高聚物型色谱柱填料的结构聚苯乙烯二乙烯基苯(PS-DVB),其结构耐酸、碱和耐水,易清洗再生^[9],且无不可逆吸附。特别是在优良溶剂作用下也可抗溶胀,耐 40 MPa 的压力。文献中多为使用硅胶型色谱柱分离分析葛根提取液,而纯化制备时却更换另类填料及重新优化选择流动相条件,极为繁琐。

因此,笔者选用 PS-DVB 为基质的高聚物型色谱柱(MKF-RP-HH)对葛根提取液进行分离条件的研究并优化,以期达到更好的分离效果,并可直接应用于纯化制备。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(配备 P680 HPLC 泵、UVD-170U 型可变波长紫外检测器,AT-330 柱温箱、8125 型进样装置),美国 Dionex 公司; PS-DVB 高聚物色谱柱(MKF-RP-HH),南京麦科菲高效分离载体有限公司;葛根提取原液(葛根提取液-I),南京工业大学沼气站;甲醇(色谱纯),美国 TEDIA 公司; Milli-Q Plus 超纯水仪,Millipore 公司;葛根素(批号: YM0510YA14)、大豆苷元(批号: GR-133-

131014) 美国 Sigma 公司。

1.2 液相色谱检测条件

色谱柱: MKF-RP-HH (300 mm \times 7.8 mm, 8 μm); 流动相: A 为水, B 为甲醇; 检测波长: 250 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL ; 流动相在使用前分别用 0.45 μm 的混合纤维膜和尼龙膜过滤,超声 30 min。

1.3 葛根素与大豆苷元的混合对照品溶液、葛根提取液的配制

葛根素(6.25 mg/mL)和大豆苷元(5 mg/mL)混合对照品储备液:精密称取葛根素 62.5 mg 和大豆苷元 50.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。

葛根素(0.0625 mg/mL)与大豆苷元(0.05 mg/mL)的混合对照品溶液:精密量取葛根素(6.25 mg/mL)和大豆苷元(5 mg/mL)混合对照品储备液 1 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,用 0.45 μm 的尼龙滤头过滤,备用。

葛根提取液-II:精密量取 2.5 mL 葛根提取液-I,置于 10 mL 容量瓶中,用 70%乙醇定容至刻度(即稀释 4 倍),用 0.45 μm 的尼龙滤头过滤,备用。

葛根提取液-III:精密量取 1 mL 葛根提取液-II,置于 10 mL 容量瓶中,用 70%乙醇定容至刻度(即稀释 10 倍),用 0.45 μm 的尼龙滤头过滤,备用。

1.4 标准品储备液及标准品溶液的配制

精密称取葛根素 20.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,制得质量浓度为 2 mg/mL 的葛根素标准品溶液。

精密称取大豆苷元 20.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,制得质量浓度为 2 mg/mL 的大豆苷元标准品溶液。

精密量取 1.25 mL 葛根素标准品溶液(2 mg/mL),置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,制得质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的葛根素标准品储备液。

精密量取 1.25 mL 大豆苷元标准品溶液 (2 mg/mL), 置于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制得质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的大豆苷元标准品储备液。

精密量取 6.0、4.0、2.0、1.0 和 0.4 mL 葛根素标准品储备液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 分别制得质量浓度为 30、20、10、5 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葛根素标准品溶液。

精密量取 4.0、3.2、2.4、1.6、0.8 和 0.4 mL 大豆苷元标准品储备液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 分别制得质量浓度为 20、16、12、8、4 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的大豆苷元标准品溶液。

1.5 葛根素和大豆苷元的收集和浓缩

高聚物型色谱柱 MKF-RP-HH (300 mm \times 7.8 mm 8 μm) 可用作半制备柱纯化制备葛根素和大豆苷元。在液相条件下分离葛根提取液-II, 手动收集葛根素峰和大豆苷元峰, 得到葛根素收集液和大豆苷元收集液。

将葛根素和大豆苷元收集液分别置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 和 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 经旋转蒸发仪浓缩, 得到葛根素浓缩收集液和大豆苷元浓缩收集液。

2 结果与讨论

2.1 流动相中甲醇含量对葛根提取液分离效果的影响

在文献 [6] 中, 色谱柱为 Symmetry C18 (150 mm \times 3.9 mm 5 μm), 流动相为甲醇和醋酸水溶液梯度条件洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为室温, 检测波长为 250 nm。虽然待测组分与相邻组分可达到基线分离, 理论塔板数仅大于 1 000 N/m。葛根提取液是成分复杂的混合物, 其中, 含有多种含氧杂环、氨基、羧基和醛基等极性基团, 宜与硅胶型色谱柱填料中残存的硅羟基发生非特异性吸附。另外, 硅胶型色谱柱不耐酸、碱和水, 易污染, 难清洗和再生^[7], 而高聚物型色谱柱填料无残留羟基, 无此非特异性吸附, 且耐酸、碱和水, 易清洗和再生^[9], 故先借鉴文献 [6] 流动相体系, 用高聚物型色谱柱测定葛根提取液-II, 但结果比文献 [6] 的结果差。这是由于高聚物型色谱柱填料与硅胶型色谱柱填料存在结构差异, 其最适流动相也必然有差别, 故下文将对适合高聚物型色谱柱分离葛根提取液-II 的最佳液相条件进行优化。

不同体积分数甲醇含量的等度流动相对葛根

提取液-II 分离的影响见图 1。

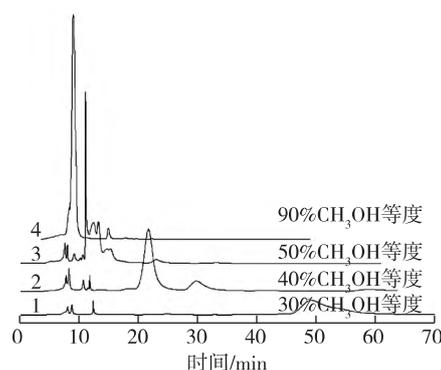


图 1 不同等度甲醇流动相条件下葛根提取液-II 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of different methanol gradient of kudzu extraction-II

由图 1 可知, 在谱线 4 中, 流动相为 90%B 时, 出峰很快, 分别在 10 min 和 16 min 处出了两个峰。降低甲醇体积分数至 50% 时 (谱线 3), 出峰时间延迟, 但分离度增大, 即在 90%B 中, 8~15 min 处的单峰可被分出多个连续的未分离的峰, 说明随着甲醇浓度降低, 分离度可改善。谱线 2 为继续降低甲醇体积分数至 40%, 除 10 min 处的一组峰外, 其他出峰时间都进一步延迟, 分离度进一步增大, 分别在 10、22 和 30 min 出了 3 组相互分离的峰。再降低至 30%B (谱线 1), 10 min 处的一组峰仍然存在, 而第 2 个峰延至 50 min 处, 第 3 个峰 70 min 时仍未出现, 其余各峰出峰时间均随甲醇浓度降低而延迟。甲醇体积分数低至 30% 时, 虽然分离度最好, 但出峰速度太慢, 因此认为 40%B 为较好等度条件。

以上述不同等度流动相条件的结果, 测定葛根素和大豆苷元的混合物对照品溶液, 以确定在不同等度甲醇浓度中葛根素和大豆苷元在提取液-II 中的归属, 结果见图 2。

根据文献 [10-12] 可知, 葛根素出峰早于大豆苷元; 葛根素在较低甲醇浓度下出峰, 大豆苷元在较高甲醇浓度下出峰。故由图 2 可知, 谱线 7 流动相为 90% 等度甲醇体积分数时, 混合对照品溶液在 9 min 和 15 min 各出一个峰, 分别为葛根素和大豆苷元。降低甲醇体积分数至 50% 时 (谱线 6), 混合对照品溶液只在 13 min 有一个葛根素峰, 而大豆苷元 70 min 仍未出峰。谱线 5 中, 在 40% 等度甲醇体积分数下葛根素在 20 min 出峰, 大豆苷元更不出

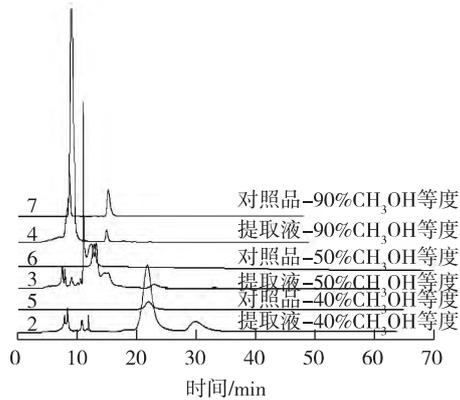
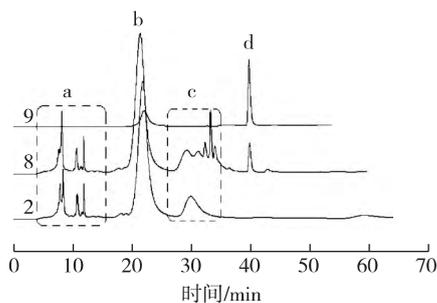


图2 不同甲醇等度条件下葛根提取液-II和对照品溶液的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of different methanol gradient of the control and kudzu extraction-II

峰。由上述结果可知,葛根素及杂质峰随甲醇浓度降低而推迟出峰;而大豆苷元除在流动相为90%等度甲醇体积分数中出峰,低于50%B在70 min内皆不出峰。

为了使葛根提取液-II中成分既有良好的分离度,又使大豆苷元出峰,进一步改进流动相洗脱方式为梯度洗脱,洗脱结果见图3。

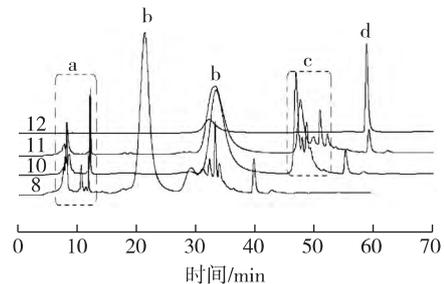


a 为杂质一; b 为葛根素; c 为杂质二; d 为大豆苷元
谱线 2 为提取液-II-40%CH₃OH 等度
谱线 8 为提取液-II-40%CH₃OH(0~20 min) 40→
90%CH₃OH(20~25 min)
谱线 9 为对照品-40%CH₃OH(0~20 min) 40→
90%CH₃OH(20~25 min)

图3 不同条件洗脱葛根提取液-II和对照品的HPLC色谱图
Fig. 3 HPLC chromatogram of kudzu extraction-II and standard samples by different methanol gradient

由前文可知,在等度40%B条件下,虽然大豆苷元不出峰,但提取液-II中各峰出峰时间和分离度较好;另又可知大豆苷元在90%B时可出峰。结合两

者,先在等度40%B流动相中洗脱20 min,而后在20~25 min提升甲醇体积分数至90%B,即谱线8。比较谱线2与谱线8可知,30 min前各峰的分离度在谱线2、8中均相当,即10 min处有一组峰a,22 min处有一尖峰b;当30 min后,谱线8在30~35 min处出了一组峰c,在40 min出了一个独立的尖峰d。以谱线8的流动相条件测定葛根素和大豆苷元混合对照品溶液,即谱线9。由此可知,葛根素和大豆苷元分别在22、40 min出峰,即谱线8中b、d分别是葛根素和大豆苷元,a和c分别为提取液-II中的杂质峰。此结果表明,经谱线8条件洗脱后,葛根素和大豆苷元都有出峰,且均与杂质峰达到基线分离。另由前文可知,分离度随甲醇浓度降低而增大,故进一步优化降低0~20 min的等度甲醇浓度,洗脱结果见图4。



a 为杂质一; b 为葛根素; c 为杂质二; d 为大豆苷元
谱线 8 为提取液-II-40%CH₃OH(0~20 min) 40→
90%CH₃OH(20~25 min)
谱线 10 为提取液-II-35%CH₃OH(0~35 min) 35→
90%CH₃OH(35~40 min)
谱线 11 为提取液-II-35%CH₃OH(0~35 min) 35→
90%CH₃OH(35~45 min)
谱线 12 为对照品-35%CH₃OH(0~35 min) 35→
90%CH₃OH(35~45 min)

图4 不同条件洗脱葛根提取液-II的HPLC色谱图
Fig. 4 HPLC chromatogram of kudzu extraction-II by different methanol gradient

由前图1可知:葛根素在等度40%B、30%B流动相中分别在22 min和50 min出峰,可推测,若在等度35%B流动相中,葛根素约在35 min出峰。谱线10为先在等度35%B流动相中洗脱35 min,而后在35~40 min提升甲醇体积分数至90%B。对比谱线8与10,10 min的杂质出峰时间仍然不变。谱线10中,葛根素出峰时间延迟至35 min,杂质二延迟至45~50 min,大豆苷元延迟至55 min,葛根素峰与

杂质一分离度增大至 4.5, 谱线 8、10 中, 大豆苷元与杂质二的分离度相当。

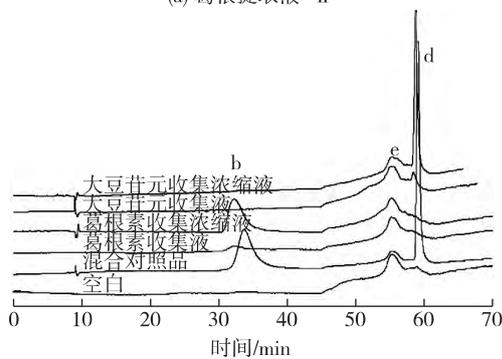
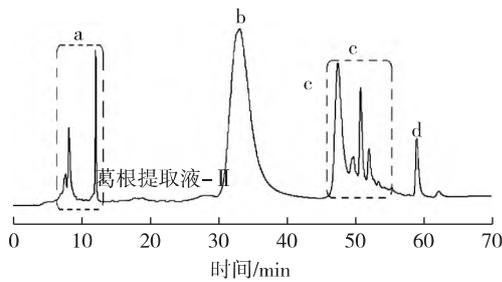
为制备纯净的葛根素和大豆苷元, 需增加大豆苷元与杂质二的分离度。根据大豆苷元在低浓度下不出峰, 可推测, 减缓提升甲醇浓度的速率, 从而延迟大豆苷元出峰, 达此目的。谱线 11 为先在等度 35%B 流动相中洗脱 35 min, 而后再在 35~45 min 提升甲醇体积分数至 90%B。由谱线 10 与 11 比较可知, 两者葛根素峰与杂质一分离度相当, 均大于等于 4.5, 且谱线 11 中大豆苷元峰与杂质二的分离度由 5.1 增至 7.8, 至此, 为纯化制备建立了较可靠的谱线基础。

2.2 半制备柱收集葛根素和大豆苷元

高聚物型色谱柱 MKF-RP-HH (300 mm × 7.8 mm 8 μm) 可用作半制备柱一步纯化制备葛根素和大豆苷元。通过对葛根素和大豆苷元收集液浓缩后的再测定, 可评价纯化制备的效果。

2.2.1 葛根素和大豆苷元的定性

用半制备柱在谱线 11 条件下分别测定葛根素、大豆苷元的收集液和浓缩收集液, 结果见图 5。



a 为杂质一; b 为葛根素; c 为杂质二;
d 为大豆苷元; e 为流动相所出峰

图 5 各样品在谱线 11 条件下洗脱的 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of condition 11 gradient of samples

由图 5 可知: 在流动相空白中, 56 min 处出现峰 e, 此峰为流动相梯度改变所出; 而混合对照品除流动相空白峰 e 外, 33 min 处峰 b 和 60 min 处峰 d 分别为葛根素和大豆苷元; 与图 5(a) 葛根提取液-II 比较, 葛根素收集液和其浓缩收集液则在 33 min 处出葛根素峰 b, 而无杂质峰 a、c, 即其中无杂质一和杂质二, 说明该收集液为葛根素纯品, 即此收集过程已一步达到了对葛根素的分离纯化。另两峰面积的大小则是因浓度不同, 即浓缩收集液中的峰 b 面积大于收集液; 同样, 大豆苷元收集液和浓缩收集液中除峰 e 外, 只有峰 d, 其面积的大小也说明此收集过程已一步且同时达到了对大豆苷元的分离纯化及浓缩。

2.2.2 标准曲线绘制

按谱线 11 条件测定葛根素及大豆苷元标准品溶液, 其葛根素、大豆苷元峰面积分别见表 1、2。

表 1 不同浓度葛根素标准品的峰面积

Table 1 Peak area of puerarin at different concentration

$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	2	5	10	20	30	50
峰面积	1.96	5.87	11.29	25.83	40.36	65.62

表 2 不同浓度大豆苷元标准品的峰面积

Table 2 Peak area of daidzein at different concentration

$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	2	4	8	12	16	20
峰面积	5.09	10.30	19.57	25.58	37.11	46.62

由表 1 和表 2 可知: 由峰面积 y 对浓度 x 回归, 得其线性相关系数 R^2 , 用加权法处理得到葛根素的回归方程 $y_{\text{葛根}} = 1.342 2x_{\text{葛根}} - 1.018 4$, $R^2 = 0.999$ 在 2~50 μg/mL 浓度范围内线性关系良好; 大豆苷元的回归方程 $y_{\text{大豆}} = 2.275x_{\text{大豆}} + 0.869 5$, $R^2 = 0.999$, 在 2~20 μg/mL 浓度范围内线性关系良好。

2.2.3 收集液中葛根素和大豆苷元得率的考察

以谱线 11 条件分离葛根提取液-II 并收集葛根素和大豆苷元。单次分别收集葛根素及大豆苷元收集液 9 和 2 mL, 重复 4 次 (共进样 80 μL) 并合并其收集液, 经旋蒸浓缩, 得到葛根素浓缩收集液 5 mL, 大豆苷元浓缩收集液 0.15 mL。

用谱线 11 条件对葛根提取液-III 和葛根素浓缩收集液进行高效液相色谱测定, 两者的葛根素峰面积分别为 71.517 和 10.118, 由葛根素标准曲线的回归方程可知:

葛根提取液-III 中葛根素质量浓度为 54.04 μg/

mL, 则葛根素提取液-II 中葛根素质量浓度为 540.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4 次/80 μL 葛根提取液-II 中葛根素量为 540.4 $\mu\text{g}/\text{mL} \times (80/1000) \text{ mL} = 43.23 \mu\text{g}$; 葛根素浓缩收集液中葛根素质量浓度为 8.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 mL 葛根素浓缩收集液中葛根素量: 8.30 $\mu\text{g}/\text{mL} \times 5 \text{ mL} = 41.50 \mu\text{g}$ 。葛根素收集得率: $(41.50 \mu\text{g}/43.23 \mu\text{g}) \times 100\% = 95.9\%$ 。

用谱线 11 条件对葛根提取液-II 和大豆苷元浓缩收集液进行 HPLC 测定, 两者的大豆苷元峰面积分别为 34.755 和 15.033, 由大豆苷元标准曲线的回归方程可知葛根提取液-II 中大豆苷元质量浓度为 14.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 次/80 μL 葛根提取液-II 中大豆苷元总量: 14.89 $\mu\text{g}/\text{mL} \times (80/1000) \text{ mL} = 1.1912 \mu\text{g}$; 大豆苷元浓缩收集液中大豆苷元质量浓度为 6.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.15 mL 大豆苷元浓缩收集液中大豆苷元含量: 6.23 $\mu\text{g}/\text{mL} \times 0.15 \text{ mL} = 0.9345 \mu\text{g}$, 故收集大豆苷元得率为 $(0.9345 \mu\text{g}/1.1912 \mu\text{g}) \times 100\% = 78.5\%$ 。

由上可知, 用 MKF-RP-HH 高聚物色谱柱对葛根提取液-II 中的葛根素和大豆苷元进行一步法分离纯化和半制备, 其得率分别可达 95.9% 和 78.5%。

3 结论

以 PS-DVB 高聚物填料装填的半制备型色谱柱为研究对象, 对葛根提取液-II 中的葛根素和大豆苷元进行一步分离纯化和半制备。色谱检测条件: 色谱柱规格为 (300 mm \times 7.8 mm, 8 μm), 流动相为甲醇和水, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 使用分段梯度法洗脱 (35% CH_3OH (0~35 min) 35 \rightarrow 90% CH_3OH (35~45 min)) 可将葛根素、大豆苷元与杂质达到有效分离并收集得葛根素和大豆苷元纯品。在该检测条件下可以实现对葛根素和大豆苷元的一般检测, 并一步得到葛根素和大豆苷元纯品, 葛根素在 2~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好, 回归方程为 $y_{\text{葛根}} = 1.3422x - 1.0184$, 线性相关系数为 0.999; 大豆苷元在 2~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好, 回归方程为 $y_{\text{大豆}} = 2.275x + 0.8695$, 线性相关系数为 0.999。

综上所述, 本实验采用高 PS-DVB 聚合物色谱柱一步分离纯化和半制备葛根素和大豆苷元, 方法

简单, 葛根素和大豆苷元的得率分别可达 95.9% 和 78.5%, 为制备葛根素和大豆苷元纯品提供了新方法。

参考文献:

- [1] 苏春晖. 临证巧用葛根[J]. 中医杂志, 1999, 40(3): 135.
- [2] CHANG B Y, LEE D S, LEE J K, et al. Protective activity of kudzu (*Pueraria thunbergiana*) vine on chemically-induced hepatotoxicity: in vitro and in vivo studies [J]. BMC Complement Altern Med 2016, 16: 39.
- [3] SHIH C H, CHANG T Y, KO W C. Interaction between daidzein and hesperetin on antispasmodic action in isolated sensitized and non-sensitized guinea-pig tracheas [J]. Front Pharmacol 2016, 7: 75. doi: 10.3389/fphar.2016.00075.
- [4] LIU X C, MO Y Z, GONG J B, et al. Puerarin ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Metab Brain Dis 2016, 31(2): 417-423.
- [5] WANG D Y, QIU L W, WU X L, et al. Evaluation of kudzu root extract-induced hepatotoxicity [J]. J Ethnopharmacol 2015, 176: 321-326.
- [6] 金文姍, 谈钰元, 陈有根, 等. 高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素、大豆苷及大豆苷元的含量 [J]. 中国中药杂志 2003, 28(1): 49-51.
- [7] SYCHOV C S, JLYIN M M, DAVANKOV V A, et al. Elucidation of retention mechanisms on hypercrosslinked polystyrene used as column packing material for high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A 2004, 1030(1/2): 17-24.
- [8] 魏荣卿, 杨洋, 张婷婷, 等. 国产氢型阳离子交换(磺酸型) HPLC 色谱柱在利巴韦林注射液分析中的应用 [J]. 离子交换与吸附 2007, 23(2): 119-128.
- [9] LLOYD L L. Rigid macroporous copolymers as stationary phases in high-performance liquid-chromatography [J]. J Chromatogr A, 1991, 544(1/2): 201-217.
- [10] 周红英, 王建华, 闫凤云. RP-HPLC 分离测定甘葛藤茎叶中葛根素、大豆苷和大豆苷元的含量 [J]. 中国中药杂志 2007, 32(10): 937-939.
- [11] WU S, XU W, WANG F R, et al. Study of the biotransformation of Tongmai Formula by human intestinal flora and its intestinal permeability across the Caco-2 cell monolayer [J]. Molecules, 2015, 20(10): 18704-18716.
- [12] WANG Y J, WANG N, WU L, et al. Simultaneous determination of four components in Baige capsule by HPLC: application to pharmacokinetics and tissue distribution of normal and middle cerebral artery occlusion rats [J]. Biomed Chromatogr 2014, 28(4): 541-547.

(责任编辑 荀志金)