

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.19.008

高效液相色谱法测定不同产地蒲黄药材中3种黄酮苷元含量

杨棣华, 梁文能

(广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 建立测定不同产地蒲黄药材中槲皮素、山柰素和异鼠李素3种黄酮苷元含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱采用Hypersil BDS-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(50:50, V/V), 流速为1.0 mL/min, 柱温为30℃, 检测波长为360 nm, 进样量为10 μL。结果 蒲黄药材中槲皮素、山柰素、异鼠李素进样量线性范围分别为40.12~1 002.89 ng($r=1.000\ 0$), 21.70~542.42 ng($r=0.999\ 9$), 59.90~1 497.38 ng($r=1.000\ 0$), 平均回收率分别为96.45%, 94.08%, 99.11%, RSD分别为2.49%, 1.25%, 1.32% ($n=6$)。不同产地蒲黄中3种黄酮苷元的含量差异较大, 其中广西桂林产最高, 槲皮素为0.372 1 mg/g, 山柰素为0.417 3 mg/g, 异鼠李素为1.702 8 mg/g; 内蒙古包头和宁夏固原产相对较低。结论 该方法快速、准确, 可用于蒲黄药材中3种黄酮苷元的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 蒲黄; 产地; 槲皮素; 山柰素; 异鼠李素; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)19-0027-03

Content Determination of Three Flavonoid Aglycones in *Typhae Pollen* from Different Habitats by HPLC

YANG Dihua, LIANG Wenneng

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510405)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of three flavonoid aglycones(querletin, kaempferin and isorhamnetin) in *Typhae Pollen* from different habitats by HPLC. **Methods** The chromatographic column was Hypersil BDS-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid solution(50:50, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30℃, the detection wavelength was 360 nm, and the sample size was 10 μL. **Results** The linear range was 40.12-1 002.89 ng($r=1.000\ 0$) for querletin, 21.70-542.42 ng($r=0.999\ 9$) for kaempferin and 59.90-1 497.38 ng($r=1.000\ 0$) for isorhamnetin. The average recoveries of querletin, kaempferin and isorhamnetin were 96.45%, 94.08% and 99.11%, and their RSDs were 2.49%, 1.25% and 1.32% ($n=6$). The contents of three flavonoid aglycones in *Typhae Pollen* from different habitats were quite different. Among them, the contents of three flavonoid aglycones in *Typhae Pollen* from Guilin, Guangxi were the highest; the content of querletin was 0.372 1 mg/g, the content of kaempferin was 0.417 3 mg/g, and the content of isorhamnetin was 1.702 8 mg/g. The contents of flavonoid aglycones in *Typhae Pollen* from Baotou, Inner Mongolia and Guyuan, Ningxia were relatively low. **Conclusion** The method is rapid and accurate, which can be used for the content determination of three flavonoid aglycones in *Typhae Pollen*.

Key words: HPLC; *Typhae Pollen*; habitats; querletin; kaempferol; isorhamnetin; content determination

蒲黄为香蒲科植物水烛香蒲 *Typha angustifolia* L.、东方香蒲 *T. orientalis* Presl 或同属植物的干燥花粉, 通常夏季采收, 筛取花粉, 作为药用^[1]。临床主要用生品蒲黄和蒲黄炭, 二者作用稍有不同, 生品主要用于活血化瘀, 蒲黄炭主要用于外伤出血^[2-3]。蒲黄的主要活性成分为黄酮苷及苷元^[4-5]。2015年版《中国药典(一部)》中采用薄层色谱和液相色谱对其苷元香蒲新苷和异鼠李素-3-O-新橙皮苷进行测定^[1]。黄酮苷和苷元在药理中都具有活性, 黄酮苷类化合物也具有活血化瘀作用^[6-7]。目前, 对于黄酮苷类的测定方法主要有紫外光谱法^[8-9]、毛细管电泳法^[10]、高效液相色谱法^[11-12]等, 本研究中根据黄酮苷的化学性质并参考文献^[13]建立高效液相色谱法, 测定不同产地蒲黄中3种黄酮苷元的

含量并比较其差异, 为优化蒲黄的质量和临床使用提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ultimate3000 型高效液相色谱仪, 包括四元洗脱泵, DAD 检测器和变色龙工作站(美国赛默飞世尔仪器公司); BSA-124S 型电子天平(十万分之一, 德国赛多利斯公司)。

1.2 试剂

槲皮素对照品(批号为100081-201408, 质量分数为99.1%), 山柰素对照品(批号为110861-201310, 质量分数为93.2%), 异鼠李素对照品(批号为110860-201109, 质量分数为99.0%), 均购于中国食品药品检

定研究院;甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);水为超纯水(美国 Milli-Q 公司);磷酸(分析纯,国药试剂化学有限公司);蒲黄药材分别来源于江苏、内蒙古、陕西、安徽、宁夏、湖北、四川、广西 8 个不同产地的 12 批药材(见表 1),经我院梁文能副主任药师鉴定为香蒲科植物水烛香蒲 *Typha angustifolia* L. 的干燥花粉,均符合药典要求。

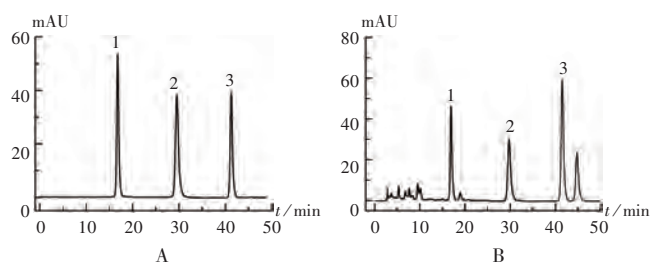
表 1 不同产地蒲黄药材样品

编号	产地	生长方式	来源	编号	产地	生长方式	来源
1	浙江湖州	野生	水烛香蒲	7	安徽亳州	野生	水烛香蒲
2	江苏盐城	野生	水烛香蒲	8	四川绵阳	野生	水烛香蒲
3	江苏南京	野生	水烛香蒲	9	宁夏固原	野生	水烛香蒲
4	内蒙古包头	野生	水烛香蒲	10	湖北宜昌	野生	水烛香蒲
5	陕西汉中	野生	水烛香蒲	11	广西百色	野生	水烛香蒲
6	陕西商洛	野生	水烛香蒲	12	广西桂林	野生	水烛香蒲

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Hypersil BDS-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.4% 磷酸溶液(50:50, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:360 nm;进样量:10 μL。在此色谱条件下,理论板数按槲皮素峰计不低于 3 690,拖尾因子为 0.95~1.05,各色谱峰分离度均大于 1.5。色谱图见图 1。



1. 槲皮素 2. 山柰素 3. 异鼠李素

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

2.2 溶液制备

取置五氧化二磷干燥 12 h 以上的槲皮素 10.12 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,山柰素 5.82 mg 置 25 mL 容量瓶中,异鼠李素 6.05 mg 置 50 mL 容量瓶中,加甲醇分别稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。分别精密吸取上述槲皮素对照品贮备液 1 mL、山柰素对照品贮备液 1 mL 和异鼠李素对照品贮备液 5 mL,置同一 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品混合溶液(每 1 mL 含槲皮素 40.48 μg、山柰素 23.28 μg、异鼠李素 60.50 μg)。取浙江湖州产的蒲黄药材粉碎,过 4 号筛,取粉末 1.0 g,精密称定,精密加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1, V/V)的混合溶液 25 mL,加热回流提取 1 h,迅速冷却至室温,转移至 50 mL 容量瓶

中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:精密吸取对照品混合溶液 1, 2, 5, 10, 25 μL, 分别注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定,以进样量(X, ng)为横坐标、相对应的峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 2。

表 2 方法学考察结果

成分	线性方程	r(n=5)	线性范围(ng)	RSD(%, n=6)		
				精密性	稳定性	重复性
槲皮素	$Y=3.9427X-2.7167$	1.000 0	40.12~1 002.89	0.87	1.02	2.03
山柰素	$Y=4.0874X+9.0776$	0.999 9	21.70~542.42	1.28	2.17	2.68
异鼠李素	$Y=3.8479X-4.1961$	1.000 0	59.90~1 497.38	0.66	0.93	1.36

精密性试验:取对照品混合溶液,按拟订色谱条件进样 10 μL,重复 6 次,记录峰面积。结果见表 2,表明仪器精密性良好。

稳定性试验:取同一供试品(批号为 180501)溶液,按拟订色谱条件分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样测定,进样量为 10 μL,记录色谱峰面积。结果见表 2,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:取同一批蒲黄药材(批号为 180501),依法制备供试品溶液,平行 6 份,按拟订色谱条件进样测定。结果见表 2,表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密称取已知含量的蒲黄药材(批号为 180501)粉末 0.50 g,平行制备 6 份供试品;分别精密吸取槲皮素贮备液 3 mL,置 10 mL 容量瓶中(每 1 mL 含槲皮素 0.121 4 mg)作为待加溶液,分别精密量取上述槲皮素待加对照品溶液 1 mL,山柰素对照品贮备液 1 mL,异鼠李素对照品贮备液 3 mL,加入 6 份供试品中,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,分别计算回收率。结果见表 3。

2.4 样品含量测定

取上述不同产地的样品,依法制备供试品溶液并测定,用标准曲线法计算含量(以干燥品计)。结果见表 4。

3 讨论

按《中国药典(一部)》蒲黄含量测定的取样量进行考察,分别取样 0.5, 1.0, 2.0 g。当取样量少时,色谱峰面积较小,基线噪音干扰较大;取样量太大,则对照品称样需要增大,易造成对照品浪费。故选择 1.0 g 作为取样量。参照银杏叶中 3 种黄酮苷的测定方法对供试品溶液的制备方法进行考察,考察了盐酸的不同比例(甲醇-10% 盐酸溶液、甲醇-25% 盐酸溶液、甲醇-35% 盐酸溶液)、不同提取方式(超声、回流、索氏提取)、不同提取时间(30, 60, 90 min)。结果发现,甲醇和盐酸的用量对 3 种黄酮苷元的含量影响很大。盐酸浓度低,水解不

表3 3种黄酮苷元的加样回收结果($n=6$)

称样量(mg)			样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.502 3	0.502 3	0.502 3	0.122 1	0.204 0	0.358 5	0.121 4	0.232 8	0.363 0	0.239 6	0.421 8	0.710 2	96.79	93.56	96.89	96.45	94.08	99.11	2.49	1.25	1.32
0.501 5	0.501 5	0.501 5	0.121 9	0.203 7	0.358 0	0.121 4	0.232 8	0.363 0	0.235 6	0.419 6	0.715 6	93.66	92.74	98.51						
0.500 9	0.500 9	0.500 9	0.121 7	0.203 5	0.357 5	0.121 4	0.232 8	0.363 0	0.241 2	0.420 7	0.720 8	98.43	93.30	100.08						
0.503 1	0.503 1	0.503 1	0.122 3	0.204 4	0.359 1	0.121 4	0.232 8	0.363 0	0.238 9	0.423 5	0.718 3	96.05	94.12	98.95						
0.504 6	0.504 6	0.504 6	0.122 6	0.205 0	0.360 2	0.121 4	0.232 8	0.363 0	0.236 7	0.425 6	0.722 1	93.99	94.76	99.70						
0.502 7	0.502 7	0.502 7	0.122 2	0.204 2	0.358 8	0.121 4	0.232 8	0.363 0	0.243 3	0.427 7	0.723 7	99.75	96.01	100.52						

注:A为槲皮素,B为山柰素,C为异鼠李素。

表4 不同产地蒲黄药材中3种黄酮苷含量测定结果(mg/g, $n=2$)

产地	槲皮素	山柰素	异鼠李素	产地	槲皮素	山柰素	异鼠李素
浙江湖州	0.243 0	0.406 2	0.713 8	安徽亳州	0.252 6	0.305 2	1.027 1
江苏盐城	0.356 2	0.356 4	1.553 6	四川绵阳	0.291 8	0.332 7	0.832 4
江苏南京	0.332 5	0.258 2	1.321 8	宁夏固原	0.190 3	0.212 5	0.721 5
内蒙古包头	0.265 8	0.176 3	0.992 6	湖北宜昌	0.361 5	0.361 6	1.502 3
陕西汉中	0.312 7	0.228 1	1.312 3	广西百色	0.345 7	0.335 8	1.378 2
陕西商洛	0.300 4	0.236 7	1.285 9	广西桂林	0.372 1	0.417 3	1.702 8

完全,提取率低;盐酸浓度大,对液相色谱的管路有腐蚀作用,同时酸浓度过大对色谱柱的要求较高,影响其适用性。综合考虑,采用25%盐酸溶液进行水解,同时对甲醇-25%盐酸溶液不同体积比(1:1,2:1,4:1,8:1,10:1, V/V)进行考察,结果甲醇-25%盐酸溶液(4:1, V/V)提取效率最高,回流和索氏提取效率基本一致,均高于超声,由于回流方法简单,故采用回流提取。提取时间在60 min以后含量基本不变,故采用提取时间为60 min,综合考虑选择甲醇-25%盐酸溶液(4:1, V/V),回流提取60 min作为供试品溶液的制备方法。

参考2015年版《中国药典(一部)》银杏叶药材及其制剂^[13]项下含量测定条件,对色谱条件中的流动相和检测波长进行了考察,采用DAD检测器在200~400 nm波长内进行全波长扫描,分别结合槲皮素、山柰素和异鼠李素3种对照品的光谱图进行比较,最后选择检测波长为360 nm。考察流动相的组分,分别以甲醇-0.4%磷酸溶液、乙腈-0.4%磷酸溶液、乙腈-水和甲醇-水作为流动相,结果发现以甲醇-水和乙腈-水作为流动相时,异鼠李素的峰均有拖尾现象,对称因子较低,而采用甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相时,供试品中3种成分的色谱法峰形良好,基线平稳,对称因子为0.95~1.05内,理论板数高,阴性对照无干扰。故确定甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相,检测波长为360 nm,与《中国药典(一部)》中银杏叶项下色谱条件一致。

本研究结果显示,不同产地的蒲黄药材中3种黄酮苷的含量差异较大,广西桂林产的蒲黄药材中3种黄酮苷类成分含量最高,槲皮素为0.372 1 mg/g,山柰素为0.417 3 mg/g,异鼠李素为1.702 8 mg/g,这可能与当

地气候和生长环境有关。蒲黄多生长在沼泽湖泊周围等水量充足的地方,宁夏固原产和内蒙古包头产的蒲黄药材中3种黄酮苷元成分含量最低,可能与当地降雨量少有关。可见,不同产地蒲黄药材中3种黄酮苷类成分差异较大,故建议增加黄酮苷类化合物作为蒲黄药材的质控指标。不同产地蒲黄药材对其临床使用具有一定影响,临床使用蒲黄药材应多采购广西、江苏、湖北等地的,可保证药效的最大限度发挥,同时为开发和利用蒲黄药材的药用价值提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:353.
- [2] 齐玉歌. 生蒲黄与炒蒲黄止血作用的药理实验研究[J]. 山西职工医学院学报,2000,10(2):7-8.
- [3] 陈彩莲,王桃林,朱流财. 蒲黄的药理作用及临床应用研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志,2016,3(8):1577-1578.
- [4] 王俐莹,牛立营,潘英妮,等. UPLC法测定蒲黄提取物中总黄酮醇苷的含量[J]. 中国现代中药,2014,16(9):755-758.
- [5] 胡立宏,房士明,刘虹,等. 蒲黄的化学成分和药理活性研究进展[J]. 天津中医药大学学报,2016,35(2):136-140.
- [6] 陈佩东,孔祥鹏,李芳,等. 蒲黄炒炭前后化学组分的变化及谱效相关性研究[J]. 中药材,2012,35(8):1221-1224.
- [7] 高颖,房德敏. 黄酮类化合物在骨性疾病中的药理作用研究进展[J]. 天津药学,2014,26(6):55-57.
- [8] 郑抗生,李计萍,韩炜,等. 紫外-可见分光光度法测定总黄酮含量的方法学考察要点[J]. 中成药,2008,30(9):1364-1365.
- [9] 陈佩东,严辉,丁安伟. 不同产地蒲黄中总黄酮的含量测定[J]. 江苏中医药,2007,39(6):55-56.
- [10] 杨永华,王实强. HPLC法和HPLC法测定蒲黄中黄酮苷的含量[J]. 中国中药杂志,1999,24(11):682-684.
- [11] 黄海燕. HPLC法测定炒蒲黄中3种黄酮苷元的含量[J]. 江苏中医药,2007,39(3):43-44.
- [12] 黄海燕,丁安伟,张丽. HPLC法测定蒲黄炭中槲皮素、异鼠李素和山柰素[J]. 中草药,2007,38(2):213-214.
- [13] 刘斌,石任兵,王伟. 蒲黄总黄酮含量测定方法研究[J]. 北京中医药大学学报,2001,24(4):23-25.

(收稿日期:2018-12-24)