

HPLC 同时测定蒙药材黄花铁线莲中 4 种黄酮含量

刘婷^{1,2}, 李红娇¹, 孙兴姣¹, 特布沁^{1*}, 李骁^{1*} (1.内蒙古医科大学, 呼和浩特 010110; 2.乌兰察布市中心医院, 内蒙古 乌兰察布 012000)

摘要: 目的 通过对蒙药材黄花铁线莲中 4 种黄酮的 HPLC 含量测定, 建立黄花铁线莲质量控制方法。方法 采用 YMC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 甲醇-0.04%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 350 nm, 柱温 25 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果 木犀草苷、金丝桃苷、芦丁和槲皮素分别在 0.021 37~0.427 4, 0.010 85~0.217 0, 0.021 41~0.428 2, 0.017 46~0.349 2 μg 内与峰面积线性关系良好; 精密度、重复性、稳定性的 RSD 均<2%, 平均回收率为 97.4%~102.3%。结论 该方法简便、准确、可靠, 重复性好, 可用于蒙药材黄花铁线莲的质量评价与控制。

关键词: 黄花铁线莲; 蒙药材; 木犀草苷; 金丝桃苷; 芦丁; 槲皮素; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101 **文献标志码:** B **文章编号:** 1007-7693(2017)10-1365-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.10.001

引用本文: 刘婷, 李红娇, 孙兴姣, 等. HPLC 同时测定蒙药材黄花铁线莲中 4 种黄酮含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1365-1368.

Simultaneous Determination of Four Kinds of Flavonoids in *Clematis Intricata* Bunge of Mongolian Medicinal Herb by HPLC

LIU Ting^{1,2}, LI Hongjiao¹, SUN Xingjiao¹, Borjigin Tebuqin^{1*}, LI Xiao^{1*} (1.Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2.Ulanqab Central Hospital, Ulanqab 012000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method to control the quality of *Clematis intricata* Bunge through the content determination of the four kinds of flavonoids in *Clematis intricata* Bunge of Mongolian medicinal herb. **METHODS** The HPLC analysis was carried out on YMC C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a methanol-0.04 % phosphoric acid solution as the mobile phase for gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 350 nm, and the column temperature was 25 ℃. **RESULTS** Luteoloside, hyperoside, rutin and quercetin exhibited good linear relationships within the ranges of 0.021 37–0.427 4, 0.010 85–0.217 0, 0.021 41–0.428 2, 0.017 46–0.349 2 μg, respectively. The RSD of precision, repeatability and stability tests were <2%, the average recoveries were ranged in 97.4%–102.3% . **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reliable with food repeatability, which can be used for the quality evaluation and control of *Clematis intricata* Bunge of Mongolian crude drugs.

KEY WORDS: *Clematis intricata* Bunge; Mongolian medicinal herb; luteoloside; hyperoside; rutin; quercetin; content determination; HPLC

黄花铁线莲(*Clematis intricata* Bunge)为毛茛科铁线莲属草本植物, 别名狗豆蔓和萝萝蔓, 为透骨草类药材^[1], 分布于甘肃、河北、辽宁、内蒙古、青海、陕西、山西、河南和蒙古^[2-3]。

黄花铁线莲在中药、蒙药、藏药^[4]中作为一种重要的药用植物被利用, 有抗炎和镇痛活性, 且毒性很小^[5-8], 外用主治风湿性关节炎, 四肢麻木, 拘挛疼痛, 牛皮癣, 民间常用鲜草捣烂外敷治疗关节、软组织肿痛^[9]。其作为蒙药“阿拉格-特木尔-敖日阳古”收载于多部蒙医药书籍中^[10-13]。蒙医用于干

燥带花叶枝条入药, 治疗寒痞、“吾雅曼”病、疮疡、寒疾、肿瘤^[14]。如在六味光明盐散中, 作为主药与光明盐、蛇床子、萆薢、干姜和诃子等量配伍用于温中、破痞、治食痞和胃痞^[15]。

现代研究表明, 黄花铁线莲含有黄酮类^[16-17]、皂苷类^[18]、生物碱、有机酸、甾体化合物、脂肪醇、香豆素^[19-21]等, 其中黄酮类化合物中的芦丁、槲皮素及其苷类、木犀草苷、芹菜素及其苷类和山奈酚及其苷类为其主要活性成分, 具有明显的抗肿瘤作用^[17]。另有研究表明, 木犀草苷具有止咳、祛痰、

基金项目: 国家自然科学基金项目(81641144); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2014MS0853); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY14156); 内蒙古自治区蒙医药协同创新培育中心研究项目(MYYXT201605)

作者简介: 刘婷, 女, 硕士 Tel: 15560976047 E-mail: 1224206078@qq.com *通信作者: 特布沁, 男, 硕士, 副教授 Tel: 13644889124 E-mail: tebuqin@imu.edu.cn 李骁, 男, 博士, 副教授 Tel: 18547120785 E-mail: lx_leexiao@163.com

平喘、杀菌消炎,解热镇痛、抗病毒和保护血管的功效^[22],金丝桃苷具有抗急性肝损伤、抗抑郁、抗炎症、抗血栓、抗菌、抗氧化应激和抗细胞凋亡等药理作用^[23],芦丁具有抗氧化、抗炎、抗高血压、抗凋亡、抗糖尿病、抗神经变性以及血管保护等功能^[24],槲皮素具有抗炎、抗病毒、抗氧化、保护心血管、免疫抑制和降糖降压等生物活性^[25]。

目前,有关蒙药材黄花铁线莲的质量研究仅涉及到黄花铁线莲中槲皮素的含量测定^[26],并且在《蒙药质量标准化研究》一书中,仅以槲皮素含量作为质量标准^[27],难以全面反映其质量情况。因此,本试验以4个黄酮类成分(木犀草苷、金丝桃苷、芦丁、槲皮素)为指标,建立HPLC同时测定蒙药材黄花铁线莲中这4个成分的方法,为进一步完善其质量控制与品质评价提供依据,同时对内蒙古8个地区的蒙药材黄花铁线莲进行含量测定,为该资源的进一步开发利用提供参考。

1 仪器与试剂

日立 L-2000 型高相液相色谱仪(日本日立公司),色谱柱为 YMC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); AL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); HH-S₂ 型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂)。

木犀草苷(批号: MUST-16012405, 纯度: 99.77%)、金丝桃苷(批号: MUST-15091408, 纯度: 99.41%)、芦丁(批号: MUST-15081407, 纯度: 99.69%)、槲皮素(批号: MUST-15090717, 纯度: 99.35%)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司; 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司), 其他试剂均为分析纯。黄花铁线莲采自内蒙古8个地区, 经内蒙古医科大学药学院李骁副教授鉴定为毛茛科铁线莲属黄花铁线莲 *Clematis intricata* Bunge 的干燥全草, 粉碎过60目筛备用, 见表1。

表1 黄芪铁线莲采集情况

Tab. 1 Collection of *Clematis intricate* Bunge

编号	来源	批号
1	凉城蜜汉山	20140810
2	内医大金山校区	20160722
3	呼市内大宿舍区	20160817
4	准格尔旗薛家湾	20160820
5	土左旗牛牛营村	20160919
6	乌拉特中旗	20161005
7	兴和县长胜天村	20161006
8	乌海市雀儿沟	20161006

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取木犀草苷、金丝桃苷、芦丁、槲皮素对照品适量, 分别置于25 mL量瓶中, 加60%甲醇溶解并定容, 摇匀, 制成每1 mL含木犀草苷213.7 μg、金丝桃苷21.7 μg、芦丁142.7 μg、槲皮素116.4 μg的对照品贮备液。再分别量取1, 5, 1.5, 1.5 mL, 置于10 mL量瓶中, 60%甲醇定容, 摇匀, 即得混合对照品溶液, 4℃冰箱中保存。

2.1.2 供试品溶液的制备 取药材粉末约0.5 g, 精密称定, 置平底烧瓶中, 精密加入60%甲醇20 mL, 称定质量, 加热回流1.5 h, 放冷, 再称定质量, 用60%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2 色谱条件^[26]

YMC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-0.04%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 27%→30% A; 5~20 min, 30%→36% A; 20~40 min, 36%→45% A; 40~50 min, 45%→49% A; 50~60 min, 49%→60% A; 60~70 min, 60%→65% A); 柱温25℃; 流速1.0 mL·min⁻¹; 检测波长350 nm; 进样量20 μL。混合对照品和供试品色谱图见图1。

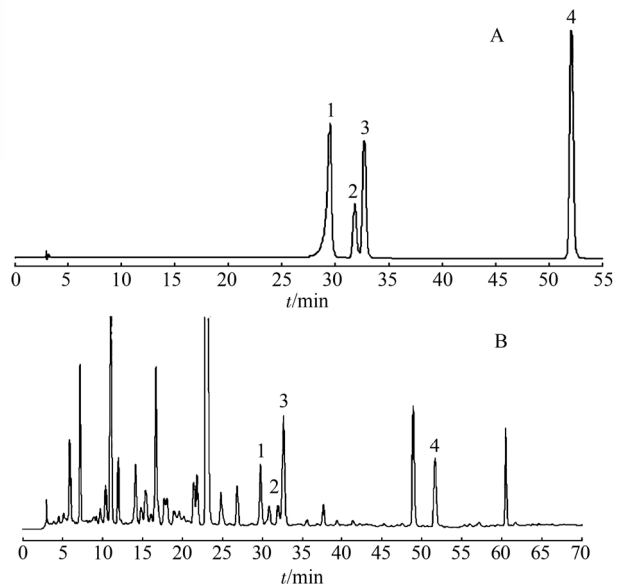


图1 HPLC 色谱图

A-混合对照品; B-黄花铁线莲样品; 1-木犀草苷; 2-金丝桃苷; 3-芦丁; 4-槲皮素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed reference substances; B-samples; 1-luteoloside; 2-hyperoside; 3-rutin; 4-quercetin.

2.3 线性关系考察

分别精密量取对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 μL , 按“2.2”项下色谱条件测定。以对照品的峰面积为纵坐标(Y), 对照品的进样量(μg)为横坐标(X), 制作标准曲线, 进行线性回归。结果见表 2, 表明各成分在相应范围内线性关系良好。

表 2 4 种成分的线性关系

Tab. 2 Linear relationships of four constituents

成 分	标准曲线	线性范围/ μg	r
木犀草苷	$Y=5\times 10^6 X+391\ 872$	0.021 37~0.427 4	0.999 6
金丝桃苷	$Y=9\times 10^6 X-26\ 316$	0.010 85~0.217 0	0.999 8
芦丁	$Y=7\times 10^6 X+270\ 988$	0.021 41~0.428 2	0.999 9
槲皮素	$Y=1\times 10^7 X-2\ 410.2$	0.017 46~0.349 2	0.999 5

2.4 仪器精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件重复进样 6 次, 每次 20 μL , 测得木犀草苷、金丝桃苷、芦丁和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 1.1%, 1.8%, 0.83%, 1.6%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件操作, 于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样, 测得木犀草苷、金丝桃苷、芦丁和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 0.97%, 1.2%, 1.7%, 1.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验

取同一产地(1号)药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 平行 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样 20 μL , 测得木犀草苷、金丝桃苷、芦丁和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 1.2%, 1.7%, 0.81%, 1.1%, 表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取 9 份同一产地(1号)的药材粉末, 每份约 0.25 g, 精密称定, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样 20 μL , 分别按含有量的 80%, 100%, 120% 加入对照品溶液, 平行 3 份, 计算加样回收率, 结果见表 3。

2.8 样品测定

取 8 批药材粉末, 每批 3 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样 20 μL 测定, 结果见表 4。

表 3 加样回收率试验结果

Tab. 3 Results of recovery tests

成 分	含有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	RSD/ %
木犀草苷	0.501 0	0.401 0	0.904 4	100.6	1.6
	0.499 6	0.401 0	0.916 2	103.9	
	0.502 4	0.401 0	0.911 4	102.0	
	0.500 4	0.501 6	1.008 5	101.3	
	0.501 6	0.501 6	1.014 7	102.3	
	0.501 2	0.501 6	1.015 3	102.5	
	0.499 6	0.602 0	1.117 9	102.7	
	0.499 0	0.602 0	1.099 8	99.8	
金丝桃苷	0.499 8	0.602 0	1.094 6	98.8	1.7
	0.111 4	0.088 65	0.202 8	100.2	
	0.111 1	0.088 65	0.199 5	99.7	
	0.111 8	0.088 65	0.200 8	100.4	
	0.111 3	0.112 0	0.228 1	102.8	
	0.111 6	0.112 0	0.227 0	103.0	
	0.111 5	0.112 0	0.222 9	99.5	
	0.111 1	0.134 0	0.243 0	98.4	
芦丁	0.111 0	0.134 0	0.242 2	97.9	0.73
	0.111 2	0.134 0	0.244 8	99.7	
	0.749 2	0.599 0	1.363 2	102.5	
	0.747 1	0.599 0	1.364 7	103.1	
	0.751 3	0.599 0	1.354 5	100.7	
	0.748 3	0.745 6	1.512 5	102.5	
	0.750 1	0.745 6	1.516 6	102.8	
	0.749 5	0.745 6	1.513 0	102.4	
槲皮素	0.747 1	0.895 8	1.668 9	102.9	1.3
	0.746 3	0.895 8	1.657 3	101.7	
	0.747 4	0.895 8	1.663 8	102.3	
	0.346 9	0.275 2	0.613 3	96.8	
	0.345 9	0.275 2	0.609 8	95.9	
	0.347 8	0.275 2	0.610 3	95.4	
	0.346 5	0.346 5	0.688 5	98.7	
	0.347 3	0.346 5	0.685 1	97.5	

表 4 样品中 4 个化合物的含有量($n=3$)

Tab. 4 Contents of four compounds in samples($n=3$)

编号	木犀草苷	金丝桃苷	芦丁	槲皮素	总含有量 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1.995 8	0.443 7	2.984 8	1.382 2	6.806 5
2	1.123 3	1.133 3	4.904 7	0.049 93	7.211 2
3	0.478 1	0.646 3	3.420 0	0.045 64	4.590 0
4	0.744 6	0.137 9	3.167 7	0.159 2	4.209 4
5	0	0.164 8	0.221 1	0.035 13	0.421 0
6	0.017 26	0.152 7	0.918 3	0.259 9	0.259 9
7	0.070 74	0.133 0	1.663 1	0.050 73	1.917 6
8	0.030 00	0.166 8	0.793 1	0.381 6	1.371 5

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择

本试验比较了回流提取法和超声提取法,结果表明回流提取法提取的 4 种黄酮类成分的总含量更高。又考察提取溶剂(乙醇、甲醇、50%甲醇、60%甲醇、70%甲醇、80%甲醇);溶剂倍数(20, 30, 40 倍);回流提取时间(1, 1.5, 2 h)。结果表明,采用 60% 甲醇回流提取 1.5 h, 4 种化学成分提取效率最高。

3.2 内蒙古地区蒙药材黄花铁线莲的含量测定

在本试验中,对内蒙古 8 个地区的蒙药材黄花铁线莲进行了含量测定,以 4 种黄酮类成分的总含量为指标计算,2 号内医大金山校区黄酮类总含量最高,其次是凉城蛮汉山、呼市内大宿舍区和准格尔旗薛家湾。不同产地、不同采收时间蒙药材黄花铁线莲中 4 种黄酮的总含量差异明显,可能由于采收地点与季节的不同,生长过程中光照、温度、CO₂ 浓度、矿质营养和土壤水分等有很大差异,这样的环境和气候因素对黄酮类物质的积累存在一定的影响^[28]。

3.3 小结

目前,有关蒙药材黄花铁线莲的研究主要有化学成分的分离鉴定和药理方面的研究,质量研究仅涉及到槲皮素的含量测定^[26-27],难以全面反映其质量情况。本试验首次采用 HPLC 建立了同时测定蒙药材黄花铁线莲中木犀草苷、金丝桃苷、芦丁和槲皮素含量的方法,该方法简便、准确、可靠,重复性好,为蒙药材黄花铁线莲质量标准的建立提供了一定的科学依据。

REFERENCES

- [1] 金延明,李胜华,楼之岑. 中药透骨草的形态组织学研究[J]. 药学报,1982,17(12): 928-941.
- [2] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志(第二卷) [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社,1990: 531.
- [3] YAN S X. Sect. *Meclatis* (Spach) Tamura—A new record section of the genus *Clematis* L. from Henan of China [J]. Henan Sci(河南科学), 2008, 26(4): 423-424.
- [4] LI M, LEI Z Q, ZHONG G Y. Analysis of varieties and standards of Ranunculaceae medicinal plants used in Tibetan medicine [J]. Tradit Chin Drug Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2015, 26(1): 133-137.
- [5] YANG X J, GAO F, TU Y H, et al. Study on anti-inflammatory effect of ethylacetate extract from *Clematis intricata* Bunge [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2012, 40(29): 14231, 14262.
- [6] TU Y H, YANG X J. Study on anti-inflammatory activity of coumad in acetic acid in *Clematis intricata* [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2013, 15(1): 18-21.

- [7] WANG X, CUI J R, XIAO Z P, et al. Comparative studies of Chinese drug *Tougucao* on anti-inflammatory and analgesic effects [J]. J Beijing Med Univ(北京医科大学学报), 1998, 30(2): 145-147, 168.
- [8] 王璇,张玉华,蔡少青,等. 来源于铁线莲属透骨草的鉴别研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(4): 198-203.
- [9] 王国强. 全国中草药汇编(卷二)[G]. 北京: 人民卫生出版社,2014: 860.
- [10] 占布拉道尔吉. 无误蒙药鉴[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社,1998: 145.
- [11] 中国医学百科全书编辑委员会. 中国医学百科全书(蒙医学)[M]. 上海: 上海科学技术出版社,1992: 218.
- [12] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(蒙药卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社,2004: 353-354.
- [13] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志(第 I 卷) [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社,2000: 392.
- [14] 布和巴特尔,额尔敦宝力高. 蒙药手册[M]. 沈阳: 辽宁民族出版社,1995: 345.
- [15] ZHANG P, JIRIMUBATU, JO D, et al. Research progress in Mongolian medicinal material *Temuri-aoriyanggu* [J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2013, 28(3): 435-440.
- [16] 石钺,王慧丽. 黄花铁线莲化学成分研究[J]. 中草药,1997,28(6): 329-330.
- [17] JO D, FU M H, A L S, et al. Study on the antitumor constituents from a traditional Mongolian medical herb *Clematis intricata* Bunge [J]. China Health Care Nutr(中国保健营养), 2012(4): 297-299.
- [18] SONG Z H, ZHANG J L, LI Y M, et al. Studies on the chemical constituents of *Clematis intricata* Bunge (II) [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 1997, 9(2): 11-16.
- [19] 宋志宏,赵玉英,段京莉. 黄花铁线莲化学成分研究[J]. 中国中药杂志,1995,20(10): 613-614.
- [20] YANG X J, TU Y H. Chemical constituents from fresh *Clematis intricata* Bunge [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2011, 23(6): 1052-1054.
- [21] YANG X J, TU Y H. Chemical constituents from the root of *Clematis intricata* Bunge [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2011, 42(2): 112-114.
- [22] GUAN R W, QU Y S, GU Z W, et al. Studies on pharmacological effects of luteoloside [J]. Chin Wild Plant Resources(中国野生植物资源), 2014, 3(1): 1-3.
- [23] LI J S, CHEN J H, MENG M J. Progress on the pharmacological effects and mechanism of hyperoside [J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药学院学报), 2015, 31(2): 269-272.
- [24] SHARMA S, ALI A, ALI J, et al. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery [J]. Exp Opin Invest Drugs, 2013, 22(8): 1063-1079.
- [25] 孙涓,余世春. 槲皮素的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-88.
- [26] 常福厚,齐君,范蕾,等. 高效液相色谱法测定蒙药黄花铁线莲中槲皮素的含量[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 911-912.
- [27] 毕立夫. 蒙药质量标准化研究(上)[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社,2007: 180-181.
- [28] XU W Y, GAO W W, HE C N. The influences of environmental factors on flavonoid biosynthesis [J]. World Sci Techno/Mod Tradit Chin Med Mater Med(世界科学技术—中医药现代化), 2006, 8(6): 68-72.

收稿日期: 2017-06-20

(本文责编: 曹粤锋)