

## HPLC 法测定蒲黄炭中槲皮素、异鼠李素和山柰素

黄海燕, 丁安伟\*, 张 丽

(南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

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。具有止血、化瘀、通淋等作用。蒲黄的应用记载始于《神农本草经》, 经炮制后用药首载于《日华子本草》, 《中国药典》2005 年版仅对蒲黄生品作了限量限定<sup>[1]</sup>。本课题组通过药效学实验筛选发现蒲黄炭的总黄酮是其止血的主要活性部位。因此本实验采用 HPLC 法对蒲黄炭酸水解后的 3 种黄酮苷元槲皮素、异鼠李素、山柰素进行了测定<sup>[2,3]</sup>。

## 1 仪器与材料

Waters 515 高效液相色谱仪, Waters 2487 双波长紫外检测器, Empower 色谱工作站; 日本岛津 AY220 电子天平, KQ-500 型超声波清洗器;

蒲黄药材分别购自南京医药股份有限公司、安徽省亳州市永刚饮片有限公司、上海华宇药业有限公司, 产地分别为江苏、内蒙、宁夏, 经本院中药鉴定教研室吴启南教授鉴定均为水烛香蒲 *T. angustifolia* L. 的干燥花粉。药材 210 °C 炒制 8 min 得到蒲黄炭。

异鼠李素(批号 110860-200205)、槲皮素(批号 10081-9905)、山柰素(批号 100861-200303)对照品均购自中国药品生物制品检定所。甲醇、三氟乙酸为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件: Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 3.9 mm, 5 μm)(美国 Waters 公司); 柱温: 30 °C; 流动相: 甲醇-0.05% 三氟乙酸水溶液-四氢呋喃(19 : 61 : 20); 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 360 nm。

2.2 供试品溶液的制备: 取蒲黄炭样品 1.5 g, 精密称定, 置 250 mL 烧瓶中, 精密加入甲醇-25% 盐酸(4 : 1) 100 mL, 密塞, 称定质量, 于沸水浴中回流 1 h, 取出, 放冷, 再称定质量, 以甲醇补足损失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液用 0.45 μm 滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备: 取 120 °C 减压干燥至恒重的槲皮素、异鼠李素、山柰素对照品适量, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得槲皮素、异鼠李素、山柰素质量浓度分别为 3.3、17.8、3.9 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.4 线性关系的考察: 取混合对照品溶液依次对半稀释, 得到 5 个质量浓度水平的混合对照品溶液, 其中槲皮素 6.6、3.3、1.7、0.8、0.4 μg/mL, 异鼠李素 35.6、17.8、8.9、4.5、2.2 μg/mL, 山柰素 7.8、3.9、2.0、1.0、0.5 μg/mL, 精密量取 10 μL 进样测定峰面积。以峰面积均值为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 其线性范围、回归方程和相关系数见表 1。

表 1 3 种黄酮苷元的线性回归方程

Table 1 Linear regression equation for three flavonoid glycosides

| 组 分  | 线性范围/(μg · mL <sup>-1</sup> ) | 回归方程                    | r       |
|------|-------------------------------|-------------------------|---------|
| 槲皮素  | 0.4~6.6                       | A=27 017 396 C-1 124.99 | 0.999 8 |
| 异鼠李素 | 2.2~35.64                     | A=30 345 933 C+2 409.06 | 0.999 9 |
| 山柰素  | 0.5~7.8                       | A=32 618 838 C+214.48   | 0.999 7 |

2.5 精密度试验: 取槲皮素、异鼠李素、山柰素质量浓度分别为 1.7、8.9、2.0 μg/mL 的混合对照品溶液重复进样 5 次, 槲皮素、异鼠李素、山柰素峰面积的积分值 RSD 分别为 0.80%、1.93%、1.10%。

2.6 稳定性试验: 取室温贮存的内蒙产蒲黄炭供试品溶液分别于 0、4、8、12、16、24 h 测定槲皮素、异鼠李素、山柰素的峰面积, 计算质量分数。结果供试品溶液在 24 h 内基本稳定, 3 个成分质量分数的 RSD 分别为 2.81%、2.87%、1.88%。

2.7 重现性试验: 取同一样品粉末(内蒙产样品), 精密称取 5 份, 制备供试品溶液, 进样测定槲皮素、异鼠李素、山柰素的峰面积, 计算质量分数。结果 3 个成分质量分数的 RSD 分别为 0.40%、0.43%、1.85%。

2.8 加样回收率试验: 取内蒙产黄炭 6 份, 每份各 0.75 g, 精密称定, 两份 1 组, 各组分别加入槲皮素、

收稿日期: 2006-04-02

基金项目: “十五”国家科技攻关项目(2001BA701A55-27)

作者简介: 黄海燕(1981-), 女, 江苏南通人, 2004 级中药学硕士, 主要从事中药炮制及复方研究。

Tel: (025)86060702 E-mail: nzydahuang@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 丁安伟 Tel: (025)51997178 E-mail: awding@hotmail.com

异鼠李素、山柰素质量浓度分别为 44.8、353.2、94.9  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 制备供试品溶液, 进样测定。结果槲皮素、异鼠李素、山柰素的平均回收率分别为 98.0%、98.0%、100.9%,

RSD 分别为 1.70%、2.50%、2.19%。  
2.9 样品的测定: 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 进样测定, 以峰面积按外标法计算, 结果见表 2, 色谱图见图 1。

表 2 蒲黄炭中槲皮素、异鼠李素和山柰素的测定结果 ( $n=2$ )  
Table 2 Quercetin, isorhamnetin, and kaempferol in *Pollen Typhae Carbonisatus* ( $n=2$ )

| 产地 | 批号   | 质量分数/( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |         |         | 产地 | 批号   | 质量分数/( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |         |         |
|----|------|-------------------------------------------|---------|---------|----|------|-------------------------------------------|---------|---------|
|    |      | 槲皮素                                       | 异鼠李素    | 山柰素     |    |      | 槲皮素                                       | 异鼠李素    | 山柰素     |
| 内蒙 | nm11 | 0.038 1                                   | 0.408 3 | 0.082 4 | 江苏 | js10 | 0.127 2                                   | 0.715 2 | 0.172 0 |
| 内蒙 | nm12 | 0.074 9                                   | 0.645 7 | 0.074 2 | 江苏 | js20 | 0.133 1                                   | 0.719 0 | 0.173 0 |
| 内蒙 | nm13 | 0.053 2                                   | 0.416 8 | 0.048 7 | 宁夏 | nx10 | 0.081 1                                   | 0.474 1 | 0.127 2 |
| 内蒙 | nm20 | 0.039 9                                   | 0.359 4 | 0.125 3 | 宁夏 | nx20 | 0.072 8                                   | 0.502 3 | 0.152 7 |
| 内蒙 | nm30 | 0.066 5                                   | 0.414 5 | 0.099 4 | 宁夏 | nx30 | 0.117 2                                   | 0.664 8 | 0.171 1 |

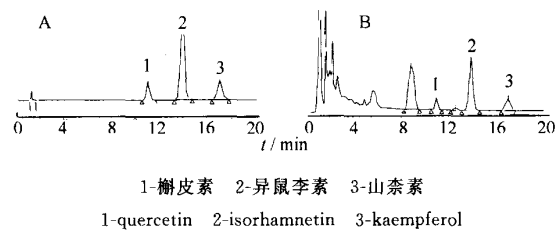


图 1 混合对照品(A)和蒲黄炭样品 nm11(B)HPLC 图谱  
Fig. 1 HPLC Chromatogram of mixed reference substances (A) and *Pollen Typhae Carbonisatus* sample nm11 (B)

3 讨论

3.1 对供试品溶液制备条件进行了考察。考察了取样量 1.0、1.5、2.0 g, 发现 1.0、1.5 g 取样量下黄酮水解都较完全, 但 1.0 g 取样量的峰面积较小, 不在线性范围内, 故确定取样量为 1.5 g。同时比较了不同加热温度 (80、90、100  $^{\circ}\text{C}$ ) 和不同水解时间 (30、60、90 min), 结果表明 100  $^{\circ}\text{C}$ , 60 min 条件下可将蒲黄中黄酮水解完全, 故选择 100  $^{\circ}\text{C}$  回流 1 h。另外对水解酸度的考察时, 对  $\text{CH}_3\text{OH}$ -25% $\text{HCl}$  比较了

(7 : 1)、(5 : 1)、(4 : 1)、(3 : 1)、(2 : 1), 结果发现 (4 : 1)、(3 : 1)、(2 : 1) 对黄酮苷水解程度相当, 但高酸度对色谱柱和管路都有损害, 故选择了  $\text{CH}_3\text{OH}$ -25% $\text{HCl}$  (4 : 1) 比例。

3.2 本实验建立的 3 种黄酮苷元的 HPLC 测定方法, 可作为考察工艺的指标, 同时可作为控制炒蒲黄的内在质量。

3.3 通过药效学实验筛选发现炒蒲黄的总黄酮是其止血的主要活性部位, 10 批炒蒲黄的 HPLC 测定结果表明, 产自内蒙的黄酮苷元的量相对较高, 因此止血疗效较好。

References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.  
[2] Liu B, Shi R B, Wang W. Study on the method for the quantitative determination of total flavone in *Pollen Typhae* [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2001, 24(4):23-25.  
[3] Gao G Y, Liao M C, Feng Y X. Determination of flavonoids and quality evaluation of Chinese traditional drug "puhuang" [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33(4):300-303.  
[4] Liu B, Lu Y R. HPLC Determination of two flavonoids in *Pollen Typhae* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18(2):80-83.

HPLC 法测定舒筋活血片中杠柳毒苷

杨 虹, 刘 虹, 孙 巍 王 萌, 何 俊, 高秀梅

(天津中医药大学 中医药研究中心, 天津 300193)

舒筋活血片由红花、泽兰叶、香附、香加皮等 10 味药组成, 具有舒筋活络、活血散瘀之功效, 用于筋骨疼痛、肢体拘挛、腰背酸痛、跌打损伤。该药作为一

种治疗跌打损伤的内服药物, 在临床上有一定应用范围。本制剂中含有香加皮 *Periploca sepium* Bunge, 又名北五加皮、杠柳皮, 祛风湿、强筋骨, 主

收稿日期: 2006-04-03  
基金项目: 天津市高等学校科技发展基金项目 (20050310); 天津市卫生局中医、中西医结合科研基金 (2005072); 天津市科委应用基础研究计划项目 (05YFJZJC01102)  
作者简介: 杨 虹 (1981—), 女, 天津人, 天津中医药大学中医药研究中心硕士研究生, 毕业于天津医科大学药物制剂专业, 研究方向为中药化学。 Tel: (022) 23051114 E-mail: yangwawa811228@163.com