

HPLC法同时测定蒙药棉团铁线莲中槲皮素和山柰素的含量

乌日汗¹ 包同力嘎² 额尔敦呼³ 白明君¹ 乌日汉¹ 苏 门¹ 包桂花^{1△}

1. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古通辽 028000; 2. 内蒙古民族大学附属医院临床蒙药剂部, 内蒙古通辽 028000; 3. 内蒙古自治区国际蒙医医院国家蒙药制剂中心, 内蒙古呼和浩特 010020

[摘要] 目的 通过分析不同产地棉团铁线莲中槲皮素和山柰素的含量, 为建立蒙药棉团铁线莲质量控制提供依据。方法 采用高效液相色谱法, 测定槲皮素和山柰素的含量。结果 槲皮素和山柰素分别在 0.0389 ~ 0.5835 μg 、0.0746 ~ 1.1190 μg 范围内与峰面积具有很好的线性关系, 回收率分别为 97.40% 和 94.30%, 相对标准偏差分别为 1.36% 和 1.29% ($n=6$)。结论 该方法分离度好, 精密度高, 可用于棉团铁线莲中槲皮素和山柰素的含量测定。

[关键词] 蒙药; 棉团铁线莲; 槲皮素; 山柰素; 高效液相色谱法

[中图分类号] R29 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-0616 (2025)05-0053-05

DOI: 10.20116/j.issn2095-0616.2025.05.13

Simultaneous determination of quercetin and kaempferol in Mongolian medicine *Clematis hexapetala* by HPLC method

WURIHAN¹ BAOTONGLIGA² ERDUNHU³ BAI Mingjun¹ WURIHAN¹ SU Men¹ BAO Guihua¹

1. Mongolian Medical College, Inner Mongolia Minzu University, Inner Mongolia, Tongliao 028000, China; 2. Department of Clinical Mongolian Medicine, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Minzu University, Inner Mongolia, Tongliao 028000, China; 3. Preparation Center of National Mongolian Medicine, International Mongolian Hospital of Inner Mongolia, Inner Mongolia, Hohhot 010020, China

[Abstract] Objective To provide a basis for establishing quality control of Mongolian medicine *Clematis hexapetala* by analyzing the content of quercetin and kaempferol in *Clematis hexapetala* from different origins. **Methods** High performance liquid chromatography was used to determine the content of quercetin and kaempferol. **Results** Quercetin and kaempferol showed good linear relationships with peak area in the ranges of 0.0389–0.5835 μg and 0.0746–1.1190 μg , respectively. The recovery rates were 97.40% and 94.30%, and the relative standard deviations were 1.36% and 1.29% ($n=6$), respectively. **Conclusion** This method has good separation accuracy and high precision, and can be used for the determination of quercetin and kaempferol content in *Clematis hexapetala*.

[Key words] Mongolian medicine; *Clematis hexapetala*; Quercetin; Kaempferol; High performance liquid chromatography method

铁线莲属为毛茛科中的一属, 由 Linnaeus 于 1753 年建立, 在全世界各大洲分布约有 300 种植物, 主要分布于热带、亚热带地区, 在寒带地区也有少部分存在。我国约有 108 种铁线莲属植物, 分布于全国各地, 尤其以西南地区分布种类较多。该属植物多数为木质藤本, 少数为多年生的草本、亚灌木或灌木。

毛茛科铁线莲属棉团铁线莲 (*Clematis hexapetala*)

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2023LHMS08047); 内蒙古自治区蒙医药标准化项目 (2023-MB030)。

△通讯作者

Pall.) 的根及根茎为中药威灵仙, 载入《中国药典》(2020 年版)^[1]; 棉团铁线莲的地上部分为特色蒙药材, 药材名为棉团铁线莲^[2-3], 异名为伊日给、哈代仁-查干-额布斯^[4-6]。主要分布于内蒙古、东北、华北、朝鲜、蒙古国等地; 生于典型草原、森林草原及山地草原带的草原及灌丛群落中, 是草原杂类草层的常见种, 亦生长于固定沙丘或山坡林缘、林下。《蒙药学》^[7]中载: “曾经在内蒙古通辽市、内蒙古赤峰市以及蒙古国等地代替芹叶铁线莲(查干叶孟)用, 内蒙古锡林郭勒盟地区代替大瓣铁线莲(哈日-叶孟)用。” 其后《内蒙古植物志·第一卷》^[8]《内蒙

古植物志·第二卷》^[9]《辽宁植物》^[10]中均有记载棉团铁线莲。

棉团铁线莲具有破痞、温胃、止腐、引协日乌素、消肿、止泻等功能,在蒙医临床上主要用于治疗寒痞、消化不良、寒性疾病、水肿、寒泻以及清除各种肿块等^[11];该类药材主含槲皮素和山柰素等黄酮类成分^[12-13],具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、心肌保护、肝肾脏保护等药理活性^[14-15]。

本研究以蒙药棉团铁线莲为研究对象,采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法同时测定不同产地棉团铁线莲中槲皮素和山柰素的含量,为建立蒙药棉团铁线莲质量控制标准提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

实验药材采集时间为2023年7—9月,由内蒙古民族大学蒙医药学院包桂花教授鉴定为毛茛科铁线莲属棉团铁线莲(*Clematis hexapetala* Pall.)的地上部分,样品信息见表1。槲皮素对照品(批号:100081-201610)、山柰素对照品(批号:110861-202013)纯度>98%,购自中国食品药品检定研究院,甲醇为色谱纯,水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

UltiMate 3000全自动高效液相色谱仪(美国赛默飞),SHIMSEN superb II C₁₈(日本岛津,4.6 mm×250 mm,5 μm),AUW220D电子分析天平

表1 蒙药棉团铁线莲样品来源

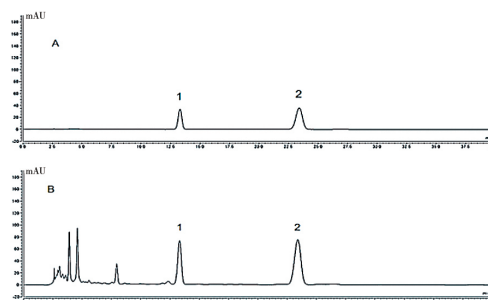
样品	编号	采集地	经度	纬度	海拔(m)
棉团铁线莲	M1	内蒙古通辽市科尔沁区	122° 14' 54"	43° 37' 45"	170
	M2	内蒙古通辽市科左后旗	122° 10' 08"	42° 54' 51"	249
	M3	内蒙古特金罕山自然保护区	119° 49' 26"	45° 09' 27"	290
	M4	内蒙古高格斯台罕乌拉自然保护区	119° 32' 21"	44° 57' 52"	1510
	M5	内蒙古赤峰市克什克腾旗	116° 21' 32"	42° 23' 54"	1100
	M6	内蒙古赛罕乌拉自然保护区	118° 44' 21"	44° 27' 52"	1056
	M7	内蒙古兴安盟科右前旗察尔森保护区	121° 55' 14"	46° 17' 22"	332
	M8	内蒙古蒙格罕山自然保护区	121° 20' 13"	45° 06' 39"	721
	M9	内蒙古兴安盟科右前旗乌兰毛都景区	120° 35' 46"	46° 20' 13"	628
	M10	内蒙古西乌珠穆沁旗	116° 21' 13"	43° 57' 23"	1957
	M11	内蒙古大青山自然保护区	112° 04' 38"	41° 04' 53"	1536
	M12	河北秦皇岛市青龙县木头凳镇	119° 32' 99"	40° 45' 84"	301
	M13	河北承德宽城峪耳崖镇	118° 54' 39"	40° 53' 57"	481
	M14	黑龙江省哈尔滨市香坊区	126° 65' 10"	45° 72' 53"	127
	M15	辽宁朝阳市凌源市大河北镇	118° 93' 15"	40° 08' 23"	763
	M16	辽宁省鞍山市千山风景区	123° 14' 20"	41° 05' 11"	109
	M17	内蒙古呼伦贝尔额尔古纳河自然保护区	120° 61' 40"	48° 43' 97"	868
	M18	内蒙古锡林浩特市乌拉盖湖景区	119° 28' 34"	45° 53' 09"	840
	M19	内蒙古赤峰市巴林右旗	118° 21' 52"	43° 23' 13"	620

(Max 21 g d=0.01 mg,北京赛多利斯仪器系统有限公司),KQ-250DB超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),DZKW-S-6电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为SHIMSEN superb II C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.5%磷酸水(47:53),检测波长为360 nm,流速为1.0 ml/min,柱温40℃,样品进样量为10 μl。在此条件下槲皮素和山柰素的分离度均大于1.5,对照品与供试品的色谱图见图1。



注 1: 槲皮素; 2: 山柰素

图1 混合对照品(A)及样品(B)HPLC色谱图

2.2 对照品溶液的制备

分别取槲皮素和山柰素对照品适量,精密称定,

加甲醇制成每毫升含槲皮素 0.0389 mg 和山柰素 0.0746 mg 的混合溶液,即得对照品溶液。

2.3 制备供试品溶液

取本品粉末(过 3 号筛)约 2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 ml, 密塞,称定重量,加热回流 1 h,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足失量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 25 ml,再加入盐酸 5 ml,置 90℃ 水浴锅中水解 1 h,取出,立即冷却至室温,转移至 50 ml 量瓶中,用 70% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下制备的混合对照品溶液 1、3、5、10、13、15 μl,依次注入液相色谱仪中测定,记录其色谱峰面积值。以对照品溶液的进样量质量浓度 $C(x)$ 为横坐标,色谱峰面积积分值 $A(y)$ 为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归得,依次为: $y_1=616.617x_1+396.14 (r_1=0.9999)$, $y_2=605.786x_2-237.65 (r_2=0.9999)$,结果显示,槲皮素在 0.0389 ~ 0.5835 μg、山柰素在 0.0746 ~ 1.1190 μg 范围内与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密称取同一批样品约 2.0 g,以“2.3”项下的方法制备供试品溶液,在本次实验的色谱条件下重复进样 6 次($n=6$),记录待测成分峰面积值。结果显示,槲皮素和山柰素的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值分别为 0.20% 和 0.24%,结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密称取同一批样品约 2.0 g,以“2.3”项下的方法制备供试品溶液,在本实验的色谱条件下分别于 0、2、4、8、12、24 h ($n=6$) 注入液相色谱仪,测定其峰面积积分值并记录色谱图。结果显示,槲皮素和山柰素的 RSD 值分别为 1.57% 和 1.40%。表明供试品溶液制备后在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品 6 份(约 2.0 g),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在本实验的色谱条件下重复进样 6 次($n=6$),测定峰面积值。结果显示,槲皮素和山柰素的 RSD 值分别为 0.64% 和 0.65%,表明该含量测定方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

称取已知含量的样品 9 份(约 1.0 g),精密称取,分三组按对照品加入量-样品中含量 0.5 : 1、1 : 1、1.5 : 1 的要求分别依次精密加入槲皮素和山柰素对照品溶液,以“2.3”项下方法操作,制备供

试品溶液,进样,测定峰面积,并计算回收率及 RSD 。结果表明,槲皮素和山柰素的平均回收率分别为 97.40% 和 94.30%, RSD 值分别为 1.36% 和 1.29%,结果见表 2 ~ 3。

表2 槲皮素加样回收率实验结果 ($n=6$)

测定成分	比例	取样量 (g)	样品中含 量 (mg)	对照 品加 入量 (mg)	测得 量 (mg)	回收 率(%)	平均 值(%)	峰面 积 RSD (%)	
槲皮素	0.5 : 1	1.0009	2.1494	1.1000	3.2270	97.96	97.03	0.59	
			2.1376	1.1000	3.2092	97.42			
			1.0010	2.1183	1.1000	3.1803			96.55
			2.1223	1.1000	3.1864	96.73			
			1.0007	2.1176	1.1000	3.1793			96.52
			2.1258	1.1000	3.1916	96.89			
	1 : 1	1.0008	2.1802	2.2000	4.3638	99.26	99.31	0.24	
			2.1816	2.2000	4.3666	99.32			
			1.0012	2.1783	2.2000	4.3602			99.17
			2.1910	2.2000	4.3856	99.75			
			1.0011	2.1813	2.2000	4.3660			99.31
			2.1761	2.2000	4.3557	99.07			
1.5 : 1	1.0007	2.1181	3.3000	5.2991	96.39	95.98	0.34		
		2.1166	3.3000	5.2952	96.32				
		1.0011	2.0997	3.3000	5.2529			95.55	
		2.1049	3.3000	5.2660	95.79				
		1.0012	2.1067	3.3000	5.2705			95.87	
		2.1082	3.3000	5.2741	95.94				

表3 山柰素加样回收率实验结果 ($n=6$)

测定成分	比例	取样 量 (g)	样品 中含 量 (mg)	对照 品加 入量 (mg)	测得 量 (mg)	回收 率(%)	平均 值(%)	峰面 积 RSD (%)	
山柰素	0.5 : 1	1.0009	4.0331	2.1000	6.0552	96.29	96.02	0.25	
			4.0388	2.1000	6.0637	96.42			
			1.0010	4.0168	2.1000	6.0306			95.90
			4.0269	2.1000	6.0458	96.14			
			1.0007	4.0154	2.1000	6.0285			95.86
			4.0167	2.1000	6.0305	95.89			
	1 : 1	1.0008	3.9610	4.2000	7.9284	94.46	94.22	0.27	
			3.9696	4.2000	7.9455	94.67			
			1.0012	3.9533	4.2000	7.9130			94.28
			3.9515	4.2000	7.9094	94.23			
			1.0011	3.9399	4.2000	7.8861			93.96
			3.9440	4.2000	7.8942	94.05			
1.5 : 1	1.0007	3.9208	6.3000	9.8088	93.46	92.66	0.77		
		3.9211	6.3000	9.8096	93.47				
		1.0011	3.8640	6.3000	9.6667			92.11	
		3.8678	6.3000	9.6763	92.20				
		1.0012	3.8768	6.3000	9.6988			92.41	
		3.8782	6.3000	9.7022	92.44				

2.9 样品测定

精密称取不同采集地样品约 2.0 g, 各 6 份, 在“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 在本研究的色谱条件下重复进样 6 次, 测定色谱峰面积值并计算 19 个采集地样品的槲皮素和山柰素的平均含量, 结果见表 4。

表4 样品含量测定试验结果 (n=6)

样品编号	槲皮素平均含量 (%)	山柰素平均含量 (%)	总平均含量 (%)	峰面积 RSD (%)
M1	0.23	0.46	0.34	0.30
M2	0.12	0.22	0.17	0.27
M3	0.20	0.45	0.33	0.27
M4	0.21	0.45	0.33	0.22
M5	0.21	0.39	0.30	0.46
M6	0.22	0.52	0.38	0.28
M7	0.12	0.18	0.15	0.33
M8	0.25	0.29	0.27	0.18
M9	0.25	0.29	0.27	0.77
M10	0.27	0.48	0.38	1.34
M11	0.22	0.40	0.31	0.35
M12	0.11	0.18	0.15	0.76
M13	0.18	0.40	0.29	1.09
M14	0.17	0.30	0.23	0.26
M15	0.22	0.28	0.25	0.15
M16	0.20	0.32	0.26	0.18
M17	0.56	0.41	0.48	1.58
M18	0.40	0.48	0.44	0.22
M19	0.39	0.39	0.39	1.09

3 结论

本研究以棉团铁线莲为研究对象, 建立一种采用 HPLC 法同时测定槲皮素和山柰素含量的方法, 并分析不同产地棉团铁线莲中槲皮素和山柰素的含量。结果表明, 19 批样品中槲皮素和山柰素总含量依次为 M17>M18>M19>M10>M6>M1>M4>M3>M11>M5>M13>M9>M8>M16>M15>M14>M2>M7>M12。其中槲皮素含量较高的依次为 M17、M18、M19 样品, 山柰素含量较高的依次为 M10、M6、M1 样品, 而 M2、M7、M12 样品中两种成分含量均不高。这可能与药材地质环境、土壤环境、大气环境、水环境、群落环境等相关。

提取方法的考察, 分别采用加热回流提取法和超声波提取法进行了考察。结果, 加热回流提取 0.5、1、1.5 h 时, 1 h 的样品中槲皮素和山柰素的含量均高; 在加热回流过程中分别运用电热套和电热恒温水浴锅 90℃ 时, 运用电热套提取的槲皮素和山柰素

的含量均低, 原因可能是提取温度不均匀导致提取率低; 考察超声波提取 20、30、40、50 min 时, 50 min 的样品中槲皮素和山柰素的含量高, 但是分离度不佳, 故本研究应用电热恒温水浴锅 90℃ 加热回流处理 1 h 时槲皮素和山柰素的含量高并且分离度大于 1.5。

提取溶剂的考察, 分别选用 90%、80%、70%、60%、50% 的甲醇提取时, 70% 甲醇的提取率最高、槲皮素和山柰素的含量也最高, 故本研究利用 70% 甲醇为提取溶剂。

流动相中磷酸的浓度进行了对比研究, 结果 0.5% 磷酸水能较好的分离槲皮素和山柰素、拖尾因子在 1.05 ~ 0.95, 即好于 0.4%、0.3%、0.2%、0.1% 磷酸水, 故选用了甲醇-0.5% 磷酸水为流动相。通过优化流动相的比例, 最终选用比例为 47 : 53 甲醇-0.5% 磷酸水; 分别考察了柱温为 30℃、35℃、40℃, 柱温在 40℃ 时槲皮素和山柰素均基线分离。

在本研究所确定的色谱条件下, 该方法准确、重复性好, 可用于蒙药棉团铁线莲中槲皮素与山柰素的含量测定, 为建立蒙药棉团铁线莲质量标准提供依据。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 262.
- [2] 内蒙古自治区卫生局. 内蒙古草药 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1973: 573-574.
- [3] 内蒙古自治区卫生局. 中国蒙药名词规范 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2017: 12.
- [4] 内蒙古师范学院生物系, 内蒙古教育出版社自然科学编辑室. 种子植物图鉴 [M]. 呼和浩特: 内蒙古教育出版社, 1977: 574.
- [5] 万定荣. 中国毒性民族药志 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 245.
- [6] 中国大兴安岭蒙中药植物资源志编纂委员会. 中国大兴安岭蒙中药植物资源志 [M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2011: 142-143.
- [7] 罗布桑. 蒙药学 [M]. 北京: 民族出版社, 1986: 449.
- [8] 朱亚民. 内蒙古植物药志·第一卷 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1998: 396-397.
- [9] 赵利清, 曹瑞. 内蒙古植物志·第二卷 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2020: 173-174.
- [10] 张淑梅. 辽宁植物 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2021: 389-390.

(下转第 75 页)

此,应进一步加大相关领域研究,提供更真实、可靠的科学证据。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] Asher MI, Rutter CE, Bissell K, et al. Worldwide trends in the burden of asthma symptoms in school-aged children: global Asthma Network Phase I cross-sectional study[J]. Lancet, 2021, 398 (10311): 1569-1580.
- [2] Kobayashi T, Kouzaki H, Kita H. Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP[J]. J Immunol, 2010, 184 (11): 6350-6358.
- [3] Kool M, Willart MAM, van Nimwegen M, et al. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma[J]. Immunity, 2011, 34 (4): 527-540.
- [4] Stang A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses[J]. Eur J Epidemiol, 2010, 25 (9): 603-605.
- [5] Zeng Xt, Liu H, Chen X, et al. Meta-Analysis series IV: a quality assessment tool for observational studies [J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2012, 4 (4): 297-299.
- [6] 李婉莹, 宋春兰, 单照茜, 等. 不同控制水平哮喘患儿心血管代谢指标的变化及意义 [J]. 中国儿童保健杂志, 2022, 30 (11): 1246-1249.
- [7] 毕玉磊, 胡英华, 邱丽丽, 等. 职业性哮喘患者动脉粥样硬化相关指标的变化及临床意义 [J]. 职业与健康, 2021, 37 (1): 24-28.
- [8] 焦俊, 任娟, 韩博学, 等. 血清尿酸、Eotaxin 及 Periostin 表达特征与支气管哮喘急性发作的相关性分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41 (4): 423-426.
- [9] 陈硕, 聂汉祥. 血清尿酸与支气管哮喘急性发作的相关性 [J]. 临床肺科杂志, 2018, 23 (4): 722-724.
- [10] Abdalnaby NK, Sayed AO, Shalaby NM. Predictive value of serum uric acid in hospitalized adolescents and adults with acute asthma[J]. Ther Clin Risk Manag, 2016, 12: 1701-1708.
- [11] Li L, Wan C, Wen F. An unexpected role for serum uric acid as a biomarker for severity of asthma exacerbation[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2014, 32 (1): 93-99.
- [12] Al-Abdulla NO, Al Naama LM, Hassan MK. Antioxidant status in acute asthmatic attack in children[J]. J Pak Med Assoc, 2010, 60 (12): 1023-1027.
- [13] Del-Rio-Navarro BE, Castro-Rodriguez JA, Garibay Nieto N, et al. Higher metabolic syndrome in obese asthmatic compared to obese nonasthmatic adolescent males[J]. J Asthma, 2010, 47 (5): 501-506.
- [14] 和强, 廖志勤, 虞靖虹, 等. 支气管哮喘患儿血清尿酸水平变化及其临床意义 [J]. 中国基层医药, 2005, 12 (8): 986-987.
- [15] 亢相逢, 曹玲, 崔巍, 等. 哮喘患儿外周血 MMP-9、IFN- γ 及 MIP-1 α 水平变化及其与肺功能相关性研究 [J]. 陕西医学杂志, 2019, 48 (11): 1464-1467.
- [16] Wang H, Jia Y, Yi M, et al. High serum uric acid was a risk factor for incident asthma: an open cohort study[J]. Risk Manag Healthc Policy, 2020, 13: 2337-2346.

(收稿日期: 2024-06-02)

(上接第 56 页)

- [11] 巴达日呼, 房玉良. 蒙药才棉团铁线莲化学成分和药理研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2009, 18 (15): 129-130.
- [12] 曹坤, 刘瑶琦, 杨龙飞, 等. 棉团铁线莲的化学成分研究 [J]. 中药材, 2021, 44 (4): 858-862.
- [13] 曹坤. 棉团铁线莲中黄酮及三萜类成分分离纯化和生物活性研究 [D]. 成都: 成都大学, 2021.
- [14] 蔡鲁. 中药威灵仙基原品种之一棉团铁线莲的化学成分研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [15] 杨林, 钱娇玲, 蒲利红, 等. 棉团铁线莲总皂苷抗肿瘤活性研究 II [J]. 中医药学报, 2013, 41 (2): 51-53.

(收稿日期: 2024-10-17)