

## 清平片中黄酮类成分定量分析

张海弢, 付娟, 李曼曼, 徐振秋, 王振中, 萧伟\*

(江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

**[摘要]** 目的:建立清平片中黄酮类成分槲皮素、葛根素、芦丁的含量测定方法,为清平片质量控制研究提供参考。方法:超声提取方法处理样品,采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.05% 三氟乙酸进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,检测波长 247 nm。结果:葛根素在 0.003 6 ~ 0.114 0 g·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999 8$ ),芦丁在 0.003 3 ~ 0.105 0 g·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999 6$ ),槲皮素在 0.003 2 ~ 0.102 0 g·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999 7$ ) 呈良好的线性关系,葛根素,芦丁,槲皮素平均回收率分别为 99.60%, 99.86%, 99.94%, RSD 分别为 0.4%, 0.3%, 0.2%。结论:该方法快速、简便、重复性好,稳定,可控,可用于清平片黄酮类成分的含量测定。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 清平片; 槲皮素; 葛根素; 芦丁

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0067-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020067

## Determination of Flavonoids in Qingping Tablet

ZHANG Hai-tao, FU Juan, LI Man-man, XU Zhen-qiu, WANG Zhen-zhong, XIAO Wei\*

(Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for the determination of quercetin, puerarin, and rutin in flavonoids of Qingping tablet, and provide a reference for the quality control of Qingping tablet. **Method:** The samples were extracted with ultrasonic extraction method. The Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of methyl alcohol-0.05% TFA for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, with column temperature of 30 °C and the detection wavelength was 247nm. **Result:** Puerarin, rutin and quercetin showed good linear relationship within the range of 0.003 6-0.114 0 g·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999 8$ ), 0.003 3-0.105 0 g·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999 6$ ) and 0.003 2-0.102 0 g·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999 7$ ) respectively. The average recovery rate of three components was 99.60% with RSD 0.4%, 99.86% with RSD 0.3% and 99.94% with RSD 0.2% respectively. **Conclusion:** The method is sensitive, simple, repeatable and controllable. It is a better method for determination of flavonoids content in Qingping tablet.

**[Key words]** HPLC; Qingping tablet; quercetin; puerarin; rutin

糖尿病是一种内分泌代谢疾病,它是由于体内胰岛素绝对或相对不足,引起糖、脂肪、蛋白质的代谢紊乱。保健食品针对的主要是 2 型糖尿病,服用辅助降血糖保健食品的目的不是为了治疗糖尿病,主要是为了改善症状,预防和尽量延缓并发症的发生<sup>[1]</sup>。

清平片由葛根、桑叶等中药组成,是具有辅助降

血糖功能的保健食品。黄酮类化合物是一类生物活性很强的化合物,研究表明,黄酮类化合物对糖尿病及其并发症具有显著的防治作用,已成为糖尿病防治和植物资源利用研究的热点<sup>[2]</sup>。葛根的主要成分为葛根黄酮,已有实验证明葛根黄酮具有降低血压、舒张脑血管、降糖降脂、提高免疫功能、解酒和抗氧化作用等功效<sup>[3-4]</sup>,葛根黄酮类化合物作为药物

**[收稿日期]** 20150104(009)

**[第一作者]** 张海弢,助理研究员,从事中药新药的研究与开发, E-mail: zht716@126.com

**[通讯作者]** \* 萧伟,研究员级高级工程师,博士,从事中药新药的研究与开发, Tel: 0518-8115236, E-mail: Kanionlunwen@163.net

和保健食品的应用也越来越广泛<sup>[5-7]</sup>。现代药理学研究结果显示桑叶中多糖、黄酮等成分能够降低血糖、消除氧自由基以及延长寿命等多方面的作用<sup>[8]</sup>。葛根素、芦丁、槲皮素为本品主要有效成分,因此,本实验着重对清平片中黄酮类成分葛根素、槲皮素、芦丁进行定量研究,达到同时测定的目的,提高质量控制的水平。

### 1 材料

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (Thermo Fisher); BP211D, XP6 型电子分析天平 (梅特勒-托利多国际股份有限公司)。槲皮素 (批号 100081-200907, 纯度 95.5%), 葛根素 (批号 110752-201313, 纯度 95.5%), 芦丁 (批号 100080-201408, 纯度 90.2%) 均购自中国食品药品检定研究院。清平片 (批号 20140101, 20140102, 20140103, 20140104) 由江苏康缘药业股份有限公司提供, 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

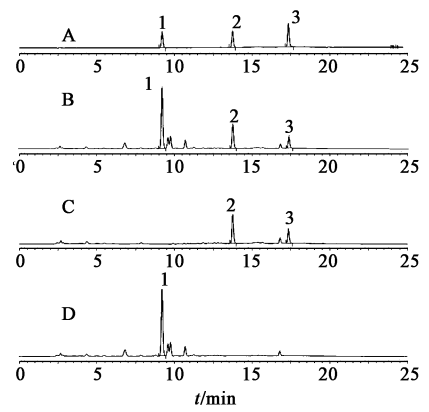
**2.1 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇 (A) - 0.05% 三氟乙酸 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 3 min, 25% A; 3 ~ 15 min, 25% ~ 65% A; 15 ~ 25 min, 65% ~ 25% A), 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 247 nm, 进样量 10 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 取葛根素、芦丁、槲皮素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制得含葛根素、芦丁、槲皮素各 0.100 g · L<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液。

**2.3 供试品溶液制备** 取本品 (批号 20140101), 除去薄膜衣, 研细, 取 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 分别回流提取、超声处理 (40 kHz, 250 W) 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。

**2.4 专属性试验** 取本品 (批号 20140101)、缺葛根和缺桑叶的阴性制剂, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液和阴性样品溶液。分别精密吸取葛根素、芦丁、槲皮素混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 项下方法测定峰面积。结果表明, 供试品色谱中呈现与对照品色谱峰保留时间一致的色谱峰, 阴性无干扰。表明本方法有良好的专属性。见图 1。

**2.5 线性关系考察** 分别取葛根素、芦丁、槲皮素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制得含葛根素、芦丁、槲皮素分别为 0.114, 0.105, 0.102 g · L<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液。将对照品储备液等比稀释, 即制得系



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺葛根阴性供试品; D. 缺桑叶阴性供试品; 1. 葛根素; 2. 芦丁; 3. 槲皮素

图 1 清平片 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Qingping tablet

列对照品溶液。分别吸取上述对照品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 项下方法测定, 记录色谱峰峰面积。以对照品溶液质量浓度 (mg · L<sup>-1</sup>) 为横坐标 (X), 峰面积值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得葛根素、芦丁、槲皮素回归方程, 分别为  $Y = 33.916X + 9.3433$  ( $r = 0.9998$ ),  $Y = 35.584X - 2.6368$  ( $r = 0.9996$ ),  $Y = 33.004X + 59.577$  ( $r = 0.9997$ )。葛根素、芦丁、槲皮素分别在进样量 0.036 ~ 1.140, 0.033 ~ 1.050, 0.032 ~ 1.020 μg 呈良好的线性关系。

**2.6 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 (葛根素 28.50 mg · L<sup>-1</sup>, 芦丁 26.25 mg · L<sup>-1</sup>, 槲皮素 25.50 mg · L<sup>-1</sup>) 各 10 μL, 连续进样 6 次, 按 2.1 项下色谱条件测定峰面积, 葛根素、芦丁、槲皮素峰面积 RSD 分别为 1.1%, 1.5%, 1.0%, 结果表明仪器精密度良好。

**2.7 重复性试验** 取本品 (批号 20140101) 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别进样 10 μL, 按 2.1 项下方法测定, 样品中葛根素质量分数为 20.18 μg · g<sup>-1</sup>, RSD 1.1%, 芦丁质量分数为 18.02 μg · g<sup>-1</sup>, RSD 1.6%, 槲皮素质量分数为 16.27 μg · g<sup>-1</sup>, RSD 1.1%。结果表明该方法重复性良好。

**2.8 稳定性试验** 取本品 (批号 20140101), 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下方法测定, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 16 h 进样, 每次进样 10 μL, 测定峰面积, 葛根素、芦丁、槲皮素 RSD 分别为 1.0%, 1.2%, 1.1%。结果表明供试品溶液在 16 h 内基本稳定。

**2.9 回收率试验** 取已知含量的样品 (批号 20140101, 葛根素质量分数为 20.18 μg · g<sup>-1</sup>, 芦丁质

量分数为  $18.02 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 槲皮素质量分数为  $16.27 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )  $0.5 \text{ g}$ , 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入葛根素、芦丁、槲皮素混合对照品溶液(质量浓度分别为  $10.53, 9.56, 8.51 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1.0 \text{ mL}$ , 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 分别按 2.1 项下方法测定并计算 3 种成分的回收率, 结果见表 1~3。

表 1 葛根素加样回收率试验

Table 1 Results of puerarin recovery test

称样量 /g	样品中量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.5017	10.12	20.58	99.34	99.60	0.4
0.5028	10.15	20.69	100.09		
0.5004	10.10	20.54	99.15		
0.5038	10.17	20.71	100.09		
0.5094	10.28	20.74	99.34		
0.4953	10.00	20.49	99.62		

注: 加入量均为  $10.53 \mu\text{g}$ 。

表 2 芦丁加样回收率试验

Table 2 Results of rutin recovery test

称样量 /g	样品中量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.5017	9.04	18.59	99.90	99.86	0.3
0.5028	9.06	18.59	99.69		
0.5004	9.02	18.59	100.10		
0.5038	9.08	18.57	99.27		
0.5094	9.18	18.75	100.10		
0.4953	8.93	18.50	100.10		

注: 加入量均为  $9.56 \mu\text{g}$ 。

表 3 槲皮素加样回收率试验

Table 3 Results of quercetin recovery test

称样量 /g	样品中量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.5017	8.16	16.65	99.76	99.94	0.2
0.5028	8.18	16.67	99.76		
0.5004	8.14	16.65	100.00		
0.5038	8.20	16.69	99.76		
0.5094	8.29	16.82	100.24		
0.4953	8.06	16.58	100.12		

注: 加入量均为  $8.51 \mu\text{g}$ 。

**2.10 样品测定** 取 4 批清平片, 按 2.3 项下色谱条件制备供试品溶液, 每批平行操作 2 份, 分别按 2.1 项下方法测定 3 种成分的含量, 结果见表 4。

### 3 讨论

在供试品溶液的制备时, 考察回流和超声处理两种提取方式, 结果表明槲皮素、芦丁、葛根素含量无显著差异, 但是超声提取操作简便, 因此选择超声提取。

表 4 清平片样品中 3 种成分含量测定

Table 4 Determination results of Qingping tablet

批号	槲皮素 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	葛根素 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	芦丁 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
20140101	16.27	20.18	18.02
20140102	17.14	18.99	17.96
20140103	16.06	19.54	17.54
20140104	16.93	19.22	17.81

高血糖已成为人类身体健康的杀手, 控制血糖势在必行。清平片具有辅助降血糖的功能, 对此进行深入研究具有重要意义。现在还不清楚辅助降血糖保健食品其功能的作用机制, 因为糖尿病本身的发病机制也没有完全搞清楚。一直以来, 糖尿病的治疗就以饮食控制为主, 所以只要饮食控制得当, 加上其他的一些措施, 如服用降血糖类保健品等, 可以起到控制血糖的目的。

黄酮类化合物是植物中一类重要的次生代谢产物, 在植物体内大部分与糖结合成苷类或碳糖基的形式存在, 部分以游离形式存在。研究表明, 黄酮类化合物对糖尿病及其并发症具有显著的防治作用, 已成为糖尿病防治和植物资源利用研究的热点。清平片就是从中药葛根、桑叶中提取的黄酮类活性物质, 以达到辅助降血糖的目的。

本实验采用 HPLC-UV 法同时测定清平片中 3 种黄酮类成分的含量, 该方法灵敏度高, 专属性强, 所用流动相系统和预处理方法简便, 能准确有效地测定清平片中 3 种黄酮类成分的含量, 为清平片及含有葛根桑叶药对的中成药质量研究提供实验依据。

#### [参考文献]

- [1] 王枫. 降血糖保健食品-膳食纤维、黄酮类[J]. 家庭医学·新健康, 2006(12): 7-8.
- [2] 程素娇, 张英, 王立, 等. 天然资源功能因子降血糖研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 387-391.
- [3] 吕鹏, 黄晓舞, 吕秋军. 黄酮类化合物吸收、分布和代谢的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 1961-1964.
- [4] 郭喆, 吕秋军, 郭建平, 等. 葛根黄酮的辐射防护及其机制的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2006, 26(6): 579-582.
- [5] 李国辉, 张庆文, 王一涛. 葛根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23): 3156-3159.
- [6] 王苏静, 赵新杰. 葛根素的药理作用研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(2): 107-108.
- [7] 张鹏斐, 吴卫国. 葛根黄酮类化合物的研究进展[J]. 农产品加工·学刊, 2012(3): 114-116.
- [8] 孙莲, 孟磊, 阎超, 等. 桑叶的降血糖活性成分和药理作用[J]. 中草药, 2002, 33(5): 471-473.

[责任编辑 顾雪竹]