

# RP-HPLC 测定苗药黑白保肝清颗粒中槲皮素的含量

杨立昌, 乙引\*, 林俊清, 张习敏

(贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550001)

**[摘要]** 目的: 建立苗药黑白保肝清颗粒中槲皮素总量的测定方法。方法: 采用 RP-HPLC 法, Diamonsil(TM) 钻石 C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.2% 磷酸 (56:44) 为流动相, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 检测波长 370 nm。结果: 在 0.020 6 ~ 0.133 μg 进样量范围内, 槲皮素含量与峰面积呈很好的线性关系 ( $r = 0.997$ ), 平均回收率为 98.2%, RSD 为 1.70%。5 批样品中槲皮素总量均值为 1.44 mg·g<sup>-1</sup>。结论: 该方法简便, 准确, 重复性好, 可用于苗药黑白保肝清颗粒中槲皮素总含量测定。

**[关键词]** 黑白保肝清颗粒; 槲皮素; 含量测定; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0064-03

## Determination of Quercetin Content in Heibai Baoganqing Granules of Miao Ethnomedicine by RP-HPLC

YANG Li-chang, YI Yin\*, LIN Jun-qing, ZHANG Xi-min

(School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method to determine quercetin in Heibai Baoganqing Granules of Miao ethnomedicine by HPLC. **Method:** HPLC was used. The column was Diamonsil (TM) C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol-0.2% phosphoric acid (56:44), with the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the wavelength was at 370 nm. **Result:** Quercetin was linear in the range of 0.020 6 ~ 0.133 μg. The average recovery was 98.2%. The average content of quercetin in five samples was 1.44 mg·g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** This method is accurate, simple and reproducible, and can be used for the determination of quercetin in Heibai Baoganqing Granules.

**[Key words]** Heibai Baoganqing Granules; quercetin; content determination; RP-HPLC

黑白保肝清颗粒是由贵州苗族地区民间秘验方中筛选、组方而得到的苗药方制剂, 主要经由赶黄草、贯叶连翘和小花清风藤等主药材炮制提炼加工

组方而成。赶黄草又名扯根菜, 为虎耳草科植物扯根菜 *Penthorun chinense* Pursh 的干燥地上部分, 其提取物在体外具有较好的抗乙型肝炎病毒作用<sup>[1]</sup>, 其主要的抗病毒的活性成分为槲皮素和没食子酸<sup>[2-3]</sup>, 另有报道其活性成分槲皮素具有修复肝损伤的作用<sup>[4]</sup>。贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 为藤黄科金丝桃属多年生草本植物, 其主要抗病毒活性成分为金丝桃素<sup>[5]</sup>, 研究表明槲皮素与金丝桃素的共存可以明显减小金丝桃素的光敏性损伤<sup>[6]</sup>。小花清风藤 *Sabia parviflora* Wall. ex Roxb 为清风藤科清风藤属藤本植物, 具有一定的保肝功效<sup>[7]</sup>。槲皮素为该苗药方制剂中含量较高的活性成分, 可作为苗药黑白保肝清颗粒质量控制的重要标准之一。

**[收稿日期]** 20100401(003)

**[基金项目]** 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(黔科合社字[2009]5043号); 贵州省科技创新人才团队建设项目(黔科合人才团队[2009]4007号)

**[第一作者]** 杨立昌, 讲师, 硕士学位, 主要从事中草药分析研究工作, E-mail: yangtanglichang@163.com, Tel: 0851-6702541

**[通讯作者]** \*乙引, 博士, 教授, 主要从事药用植物开发与利用研究, E-mail: yiyin@gznu.edu.cn

目前,槲皮素的含量测定方法有紫外-可见分光光度法、荧光光度法、薄层扫描法、高效液相色谱法等<sup>[8-10]</sup>。以上方法均存在操作繁琐、费时等缺点。为有效控制产品质量,建立高效准确槲皮素测定方法,本文采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定苗药黑白保肝清颗粒中的总槲皮素含量,方法专属性强、灵敏度高、干扰小、结果可靠。

### 1 材料

**1.1 仪器** HPLC-6A 型高效液相色谱(日本岛津)、TCQ-250 型超声波清洗仪(北京医疗设备二厂)、AEG-220 型电子天平(日本岛津)、紫外分光光度仪(日本岛津)。

**1.2 试剂** 槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,00081-19905);甲醇为色谱纯;水为重蒸水;盐酸、乙醇、磷酸均为市售分析纯。黑白保肝清颗粒由贵州苗山医药开发公司提供。

### 2 方法与结果

#### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精确称取槲皮素对照品 3.3 mg 置 250 mL 量瓶中,加甲醇溶解稀释至刻度,摇匀,制成槲皮素 13.2 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 精密称取黑白保肝清颗粒 0.600 0 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加入提取溶剂,水浴回流水解,过滤,滤液于旋转蒸发仪浓缩,转移至 50 mL 量瓶中,甲醇定容,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤。

**2.1.3 阴性对照品溶液的制备** 取黑白保肝清颗粒剂中除赶黄草以外的原料药材,按黑白保肝颗粒的制备方法制成阴性制剂。精密称取阴性制剂 0.60 g,按照 2.1.2 项下方法制备。

**2.2 测定波长条件选择** 取对照品 3 mL,加入流动相 3 mL,于紫外分光光度仪测定其吸光度,在 370 nm 处有最大吸收峰,故选择 370 nm 作为检测波长。

#### 2.3 样品提取水解条件选择

**2.3.1 提取溶剂选择** 采用 5 种混合试剂进行提取,水浴回流水解 2 h。结果表明,提取溶剂 I 提取的槲皮素含量最高,为 0.029%,见表 1。因此,选用提取溶剂 I 作为提取溶剂。

**2.3.2 水解时间选择** 参照冯长根等<sup>[11]</sup>方法,精密称取黑白保肝清颗粒 0.60 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加入甲醇提取 36 h,定容至 250 mL 量瓶中,摇匀,精密吸取 10 mL 样品液共 4 份,分别加入提取溶

提取溶剂	化学组成	槲皮素
I	50 mL 甲醇 + 12.5 mL 25% 盐酸	0.029
II	50 mL 乙醇 + 12.5 mL 25% 盐酸	0.012
III	25 mL 甲醇 + 12.5 mL 25% 盐酸	0.020
IV	50 mL 甲醇 + 5 mL 25% 盐酸	0.010
V	50 mL 甲醇 + 25 mL 25% 盐酸	0.018

剂水浴回流水解 0.5, 1, 1.5, 2 h, 测定槲皮素含量。结果表明,随着水解时间的延长,槲皮素含量逐步上升,并在 1 h 时达到最大值,继续水解,槲皮素含量未见增加,因此,确定水解时间为 1 h。

**2.4 流动相的考察** 比较甲醇-0.2% 磷酸(56:44)和甲醇-0.4% 磷酸(50:50)2 种流动相,发现前者出峰时间短,能很好地分离对照品,且峰形较好。因此,选择甲醇-0.2% 磷酸(56:44)作为槲皮素提取的流动相。

**2.5 色谱柱的考察** 取 10.0 μL 对照品溶液,分别注入 2 根色谱柱中。1 根为大连依利特分析仪器有限公司生产的 Hypersil BOD C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);另 1 根为迪马公司生产的 Diamonsil(TM) 钻石 C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。结果表明,由 Hypersil BOD C<sub>18</sub> 柱洗脱的峰有少许拖尾现象,而由 Diamonsil(TM) 钻石 C<sub>18</sub> 柱洗脱的峰不仅无拖尾现象,而且峰形好。因此,选用 Diamonsil(TM) 钻石 C<sub>18</sub> 柱进行洗脱。

**2.6 色谱条件** Diamonsil(TM) 钻石 C<sub>18</sub> 柱;流动相 甲醇-0.2% 磷酸(56:44);流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 35 ℃;检测波长 370 nm。HPLC 色谱见图 1。

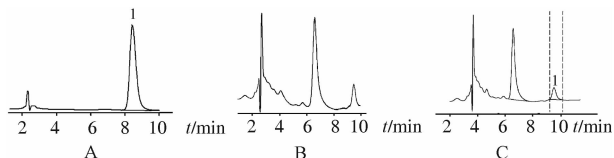


图 1 黑白保肝清颗粒 HPLC 色谱图

A. 对照品; B. 阴性对照品; C. 样品; 1. 槲皮素

**2.7 线性范围实验** 精密吸取对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μL 进样,记录色谱图测定槲皮素峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品进样量为横坐标,建立回归方程为  $Y = 1.50 \times 10^5 X + 3.77 \times 10^3$  ( $r = 0.997$ ),表明在 0.020 6 ~ 0.133 μg 槲皮素含量与峰面积呈良好的线性关系。

**2.8 精密度试验** 精密吸取对照品溶液 10 μL,连续进样 5 次。结果,槲皮素峰面积平均值为

834 308.6, RSD 值 < 2.0%, 表明色谱条件具有较好的精密度。

**2.9 供试品稳定性试验** 精密吸取供试品溶液, 分别在 0, 1, 2, 4, 6 h 后重复进样。结果, 供试品溶液中槲皮素峰面积的 RSD 1.37%, 表明供试品溶液在 6 h 内稳定。

**2.10 重复性试验** 精密称取黑白保肝清颗粒样品 0.6 000 g, 共 5 份, 分别进行测定。结果, 槲皮素平均含量为 1.45 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 1.76%, 表明该方法重复性良好。

**2.11 回收试验** 精密称取已知含量的样品, 加入槲皮素对照品配制成供试品溶液共 5 份, 按 2.12 项下方法测定槲皮素含量, 计算回收率, 结果见表 2。槲皮素平均回收率为 98.2%, RSD 1.70%。

表 2 槲皮素加样回收率实验结果 (n = 5)

No.	样品中量 /mg	添加量 /mg	测出量 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1	0.631 2	0.552 4	1.174	98.334		
2	0.654 2	0.635 8	1.289	99.842		
3	0.610 2	0.598 9	1.183	95.742	98.2	1.70
4	0.625 8	0.612 4	1.236	99.640		
5	0.640 7	0.594 2	1.221	97.660		

**2.12 样品含量测定** 按 2.1 方法下制备供试品溶液共 5 批, 分别精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μL, 按上述色谱条件测试, 结果见表 3。

表 3 黑白保肝清颗粒样品的槲皮素含量 (n = 5)

No.	样品量 /g	槲皮素含量 /mg·g <sup>-1</sup>	槲皮素含量 平均值/mg·g <sup>-1</sup>	RSD /%
1	0.608 1	1.46		
2	0.604 5	1.47		
3	0.600 7	1.41	1.44	1.80
4	0.609 1	1.45		
5	0.604 2	1.42		

### 3 结论

采用 RP-HPLC 法可以测定黑白保肝清颗粒中槲皮素总含量。测定结果为苗药黑白保肝清颗粒总

槲皮素含量均值为 1.44 mg·g<sup>-1</sup>。在本品含量测定方法中, 通过供试品及对照品制备方法、测定条件的研究, 经系统适应性、精密度试验、稳定性试验、重复性试验及加样回收率试验等方法学考察, 证明确定的苗药黑白保肝清颗粒槲皮素总含量测定方法精密度、重复性好, 分离度符合规定, 方法稳定, 能有效的控制药品质量。

### [参考文献]

[1] 赵建勤, 杨明, 赵连三, 等. 黑白保肝清颗粒及其系统提取物抗乙型肝炎病毒体外实验研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2002, 12(1): 26.

[2] 张旭, 杨明. 赶黄草有效成分的研究[J]. 成都中医药大学学报, 2002, 25(4): 46.

[3] 冯浩, 王智民, 董歌扬, 等. 赶黄草化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(4): 260.

[4] Tieppo J, Vercelino R, Dlas A S, et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome[J]. Food Che Tox, 2007, 45: 1140.

[5] 肖志勇, 穆青. 金丝桃属植物化学成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2007(19): 344.

[6] Beneli J, Arroyo R, Romero C, et al. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells[J]. Life Sciences, 2004, 75: 1263.

[7] 刘易蓉, 邱晓春, 陈惠. 小花清风藤保肝作用实验研究[J]. 中国药房, 2008, 19(30): 2341.

[8] 周伟, 蔡光明, 黄鹤慧, 等. 高效液相色谱法测定小叶黑柴胡中槲皮素与异鼠李素的含量[J]. 中国药房, 2007, 18(9): 693.

[9] 张集盘, 叶国梁, 石晶萍, 等. RP-HPLC 法测定金钱草中槲皮素和山奈素两种黄酮成分的含量[J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13(1): 31.

[10] 长根, 汪洪武, 任启生. 赶黄草挥发油化学成分的气相色谱-质谱分析[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(5): 340.

[11] 冯长根, 汪洪武, 任启生. RP-HPLC 测定赶黄草中的槲皮素的含量[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(2): 97.

[责任编辑 顾雪竹]