

# HPLC 法同时测定热淋清制剂中没食子酸 和槲皮素的含量

李艳芳<sup>1</sup>, 夏泉<sup>2</sup>, 许风清<sup>1</sup>, 刘金旗<sup>1\*</sup>

(1. 安徽中医学院/安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230031;  
2. 安徽医科大学第一附属医院, 安徽 合肥 230022)

[摘要] 目的: 采用 HPLC 法同时测定热淋清制剂中没食子酸和槲皮素的含量。方法: 采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2% 磷酸溶液梯度洗脱, 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 254 nm。结果: 没食子酸在 0.204~ 1.22 μg (r = 0.999 7), 槲皮素在 0.058~ 0.35 μg (r = 0.999 5) 范围内呈良好的线性关系; 没食子酸回收率为 98.5%, RSD 为 1.4%, 槲皮素回收率为 97.8%, RSD 为 1.6%。结论: HPLC 法简便可行、重复性好, 适用于热淋清制剂两种有效成分的同时测定, 可用于热淋清制剂的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 热淋清制剂; 没食子酸; 槲皮素

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)12-0015-03

## Determination of Gallic Acid and Quercetin in Relinqing Preparations by HPLC

LI Yanfang<sup>1</sup>, XIA Quan<sup>2</sup>, XU Feng-qing<sup>1</sup>, LIU Jin-qi<sup>1\*</sup>

(1. Anhui Key Laboratory of Chinese Medicine Research and Development, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the determination of gallic acid and quercetin in Relinqing preparations. **Method:** A Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, and the mobile phases were acetonitrile and 0.2% phosphoric acid solution with the gradient elution. The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was 254 nm. **Results:** The linear ranges of gallic acid and quercetin were 0.204~ 1.22 μg (r = 0.999 7), 0.058~ 0.35 μg (r = 0.999 5) respectively. The average recoveries were 98.5% (RSD = 1.4%), 97.8% (RSD = 1.6%) respectively. **Conclusion:** The method can be used to control the quality of Relinqing preparations. It is simple, accurate, reproducible and suitable for simultaneous determination of two active constituents in Relinqing preparations.

[Key words] HPLC; relinqing preparations; gallic acid; quercetin

热淋清片、热淋清颗粒<sup>[1]</sup>及热淋清胶囊<sup>[2]</sup>为单味药材头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch. Ham. ex D. Don 经提取后制成的制剂,具有清热泻火、利尿通淋之功效,临床上用于尿路感染、急慢性肾盂肾炎等疾病的治疗。方中头花蓼的主要有效成分为没食子酸和槲皮素<sup>[3,4]</sup>。部颁标准中后两种制剂项下仅有薄层鉴别,无含量测定项。文献曾对没食子酸和槲皮素分别进行含量测定,但未见用 HPLC 法同时测定热淋清制剂中没食子酸和槲皮素含量的报道。因此本文建立了 HPLC 法同时测定热淋清制剂中没食子酸和槲皮素的含量。本法准确,简便,可节约时间,降低分析成本,适用于热淋清制剂的质量控制。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(真空脱气机、四元泵、二极管阵列检测器、自动进样器、智能恒温柱温箱 ChemStation 化学工作站); SB 3200 超声清洗仪 (BRN SON); AB135-S 电子天平(十万分之一, METTLER TOLEDO)。

没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 110831-200302); 槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 100081-200406); 样品热淋清片、热淋清颗粒及热淋清胶囊为市场购得; 乙腈为色谱纯; 水为纯净水; 其余试剂为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取没食子酸和槲皮素对照品适量,用 80% 甲醇溶解并稀释成没食子酸  $1.020 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和槲皮素  $0.292 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备溶液。精密吸取适量储备溶液并稀释成没食子酸  $30.60 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和槲皮素  $8.76 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液。

**2.2 供试品溶液的制备** 取热淋清片 10 片,研细,取约 1.7 g(相当于没食子酸约 10 mg、槲皮素约 2.5 mg),精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1) 25 mL,称定重量,置水浴中加热回流 60 min,取出,冷却至室温,再称定重量,用提取液补足,摇匀,滤过,精密量取续滤液 2 mL,置 25 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ ) 滤过,取续滤液,作为供试品溶液。取热淋清胶囊约 1.0 g,热淋清颗粒约 3.5 g 按上述方法制得胶囊及颗粒的供试品溶液。

**2.3 色谱条件与系统适用性试验** 色谱柱: Kromosil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈

0.2% 磷酸溶液梯度洗脱,洗脱梯度见表 1; 检测波长: 254 nm; 流速为  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ 。

在上述色谱条件下,分别取对照品和供试品溶液 20  $\mu\text{L}$  进样。结果表明,三种热淋清制剂图谱基本一致,没食子酸和槲皮素峰形良好,保留时间适中,分离度大于 1.5,理论塔板数不低于 5 000 和 20 000,25 min 内可完成分离分析过程,因此该色谱条件适合于热淋清制剂的分析。色谱图见图 1。

表 1 热淋清制剂中没食子酸和槲皮素的 HPLC 测定梯度洗脱条件

洗脱时间(min)	乙腈(%)	0.2% 磷酸溶液(%)
0~ 6	8	92
6~ 9	8~ 30	92~ 70
9~ 25	30	70

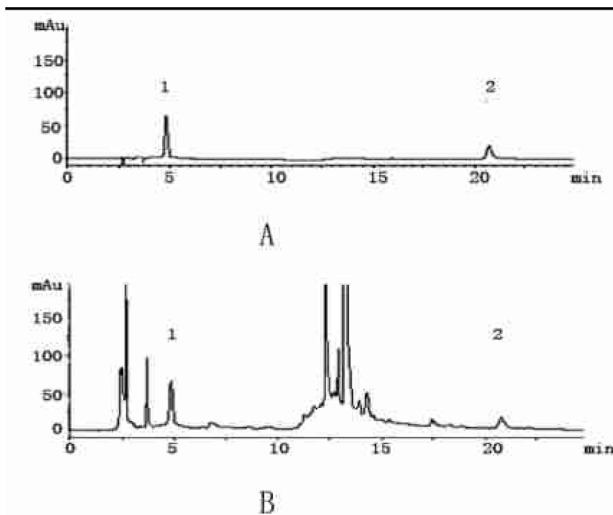


图 1 对照品溶液(A)、供试品溶液(B)的 HPLC 图  
1-没食子酸 2-槲皮素

**2.4 线性关系的考察** 取“2.1”项下的储备溶液适量,并稀释成含没食子酸  $102.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和槲皮素  $29.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,分别精密吸取该溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL 移入到 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成不同浓度梯度的对照品溶液,分别进样 20  $\mu\text{L}$ ,记录色谱图。以对照品进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归。得到没食子酸、槲皮素回归方程分别为:  $Y = 24.491X - 59.968$  ( $r = 0.9997$ ) 和  $Y = 44.012X + 19.912$  ( $r = 0.9995$ ) 结果表明:在 0.204~ 1.22  $\mu\text{g}$  范围内,没食子酸进样量与峰面积值呈良好线性关系;在 0.058~ 0.35  $\mu\text{g}$  范围内,槲皮素进样量与峰面积值呈良好线性关系。

**2.5 精密度试验** 取“2.1”项下的对照品溶液连续进样 5 次,每次 20  $\mu\text{L}$ ,没食子酸和槲皮素的峰面积

RSD 分别为 0.65% 和 0.79%，表明进样精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取“2.2”项下的供试品溶液在 0, 4, 8, 12, 24 h 分别进样 20 μL, 没食子酸和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 0.90% 和 1.1%，表明供试品至少在 24 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 按“2.2”项下方法制备样品溶液 5 份, 每次进样 20 μL, 测定没食子酸和槲皮素的平均含量分别为 5.72 mg·g<sup>-1</sup> 和 1.38 mg·g<sup>-1</sup>, 其 RSD 分别为 1.0% 和 1.2%，结果表明重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取已知含量的热淋清片 0.85 g, 取 6 份, 精密加入“2.1”项下的对照品储备溶液适量, 按供试液制备方法, 制成加样供试品溶液, 分别进样 20 μL, 记录色谱图, 计算没食子酸和槲皮素的回收率分别为 98.5% 和 97.8%, RSD 分别为 1.4% 和 1.6%，表明本试验方法回收良好(见表 2)。

表 2 加样回收率试验结果(n=6)

	样品量 (g)	原有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
没 食 子 酸	0.860 0	4.919	4.080	8.887	97.2	98.5	1.4
	0.855 0	4.891	4.080	8.901	98.3		
	0.854 3	4.887	5.100	9.826	96.9		
	0.833 4	4.767	5.100	9.779	98.3		
	0.848 3	4.852	6.120	11.014	100.7		
	0.845 5	4.836	6.120	10.930	99.6		
槲 皮 素	0.860 0	1.187	1.168	2.312	96.4	97.8	1.6
	0.855 0	1.180	1.168	2.311	96.9		
	0.854 3	1.179	1.460	2.634	99.7		
	0.833 4	1.150	1.460	2.569	97.2		
	0.848 3	1.171	1.752	2.870	97.0		
	0.845 5	1.167	1.752	2.917	99.9		

**2.9 样品测定结果** 按上述方法和色谱条件测定供试品溶液和对照品溶液, 计算含量。结果热淋清片没食子酸和槲皮素平均含量为 2.91 mg/片和 0.70 mg/片; 热淋清胶囊中没食子酸和槲皮素平均含量为 3.14 mg/粒和 0.76 mg/粒; 热淋清颗粒中没食子酸和槲皮素平均含量为 2.40 mg·g<sup>-1</sup> 和 0.65 mg·g<sup>-1</sup>。

### 3 讨论

**3.1 提取方法的选择** 由于头花蓼中槲皮素多以槲皮苷的形式存在, 而没食子酸也常与鞣质结合在

一起, 故根据文献[5, 6]中的提取溶剂和水解条件, 采用甲醇-25% 盐酸溶液(4: 1)混合液回流提取。

**3.2 检测波长的选择** 采用二极管阵列检测器, 对“2.1”项下的混合对照品溶液, 在 190~ 400 nm 的范围内进行扫描, 没食子酸在 218 nm 272 nm 处出现 2 个吸收峰; 槲皮素在 202 nm 254 nm 370 nm 处出现 3 个吸收峰。故选择 254 nm 260 nm 272 nm 3 个检测波长进行比较, 在 254 nm 波长下, 没食子酸和槲皮素峰形均良好, 干扰最少。因为在 254 nm 波长下槲皮素为最大吸收, 没食子酸在 254 nm 下虽未达到最大吸收, 但吸收较强, 峰形最好, 最终选择 254 nm 作为检测波长。

**3.3 流动相的选择** 实验中, 曾选择不同比例的甲醇-水, 甲醇-0.2% 磷酸, 发现磷酸的加入可以改变两个峰的峰形, 甲醇的增加可以使得两个峰的保留时间缩短, 但这两个系统的没食子酸峰始终包含另一色谱峰。后来使用了乙腈-0.2% 磷酸系统, 可以使得没食子酸峰和另一色谱峰达到了很好的分离效果, 并且在 DAD 检测下为一单峰。由于没食子酸和槲皮素极性相差很大, 故选择了梯度洗脱的方法。该方法测定时间短, 能够使没食子酸、槲皮素与其他组分良好分离, 符合定量分析要求, 保留值适宜, 分析成本低。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂[S]. 第12册, 1997. 151.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂[S]. 第17册, 1998. 219.

[3] 李勇军, 骆宏丰, 王永林, 等. 头花蓼黄酮类化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 35(5): 300-302.

[4] 孙长生, 梁 斌, 王佳芳. 头花蓼研究进展[J]. 中药研究与信息, 2005, 7(4): 26-28.

[5] 龙凤荣, 孙 敏. HPLC 测定热淋清胶囊中槲皮素的含量[J]. 中成药, 2007, 29(4): 613-615.

[6] 王祥培, 万德光, 王 强, 等. HPLC 测定不同产地的头花蓼中没食子酸的含量[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(2): 204-205.