

HPLC 法测定乙肝清胶囊中槲皮素的含量

王敏智, 王兴*, 杨立, 谭尧峰, 包涛 (西南交通大学药学院, 四川峨眉山 614202)

摘要 [目的] 建立乙肝清胶囊中槲皮素含量的 HPLC 测定方法。[方法] 采用高效液相色谱法, 色谱条件为: 色谱柱, Phenomenex Luna C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相, 甲醇 0.4% 磷酸 (50:50); 流速, 1 ml/min; 检测波长 360 nm; 柱温 30℃。[结果] 槲皮素在 0.054~1.08 μg 范围内与峰面积有良好的线性关系, 相关系数 $r = 0.99988$, 平均回收率 99.15%, RSD 1.42% ($n = 6$)。[结论] 该方法简便、准确、可靠, 可作为乙肝清胶囊中槲皮素含量的测定方法。

关键词 高效液相色谱法; 槲皮素; 乙肝清胶囊; 含量测定

中图分类号 O657.7+2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)22-09347-02

Determination of Quercetin in Yi Gan Qing Capsule by HPLC

WANG Min-zhi et al (College of Pharmacy, Southwest Jiaotong University, Emeishan, Sichuan 614202)

Abstract [Objective] The research aimed to establish the determination method of quercetin in Yi Gan Qing capsule by HPLC. [Method] HPLC was used for determination, the chromatographic conditions were as follows: Phenomenex Luna C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), methanol-0.4% H₃PO₄ (50:50) as mobile phase, the detection wavelength of 360 nm, the flowrate of 1 ml/min and the column temperature of 30℃. [Result] Quercetin had good linear relationship with the peak area within the range of 0.054-1.08 μg, the correlation coefficient (r) was 0.99988, the average recovery was 99.15% with RSD of 1.42% ($n = 6$). [Conclusion] This determination method is simple, accurate and reliable, so it could be used as the determination method of quercetin content in Yi Gan Qing capsule.

Key words HPLC; Quercetin; Yi Gan Qing capsule; Content determination

乙肝清胶囊由赶黄草、贯叶连翘组方而成。赶黄草又名扯根菜, 为虎耳草科植物扯根菜 (*Penthorum chinense Pursh*) 的干燥地上部分, 其抗病毒的活性成分为槲皮素和没食子酸^[1], 另有报道其活性成分槲皮素具有修复肝损伤的作用^[2]。现代研究表明, 赶黄草有治疗各种肝炎的作用, 能退黄疸、保肝降酶。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^[3]。现代研究表明, 贯叶连翘具有抗抑郁、抗病毒、抗菌、镇痛等作用^[4]。

临床实验表明, 乙肝清胶囊有良好的治疗各种肝炎的作用, 槲皮素为其药效成分之一。笔者采用 HPLC 法测定乙肝清胶囊中槲皮素的含量, 在药典方法基础上对流动相进行改进, 同时考察了样品的不同处理方法对含量测定结果的影响。

1 试验材料

1.1 仪器 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪 (岛津 SPD-20A 紫外可见检测器, 岛津 Chromato solution Light 色谱工作站); Phenomenex Luna C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); BP211D 分析天平 (德国 SARTORIUS 公司); G&G T-200 电子天平 (美国双杰兄弟集团公司); AS5150A 超声机 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试药 槲皮素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 100081-200406); 乙肝清胶囊 (西南交通大学药学院中药研究中心制备); 甲醇为色谱纯; 水为三蒸水; 其他原料和试剂均为分析纯。

2 测定方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Luna C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 0.4% 磷酸 (50:50); 检测波长 360 nm; 流速 1.0 ml/min; 柱温 30℃。

2.2 溶液配置

2.2.1 对照品溶液的配制。 精密称取在 105℃ 烘干至恒重的槲皮素对照品 2.7 mg, 加适量甲醇溶解于 25 ml 容量瓶中, 摇匀, 然后继续加甲醇至刻度, 再充分摇匀, 即得。槲皮素对照品的 HPLC 图谱见图 1, 槲皮素保留时间约 14 min。

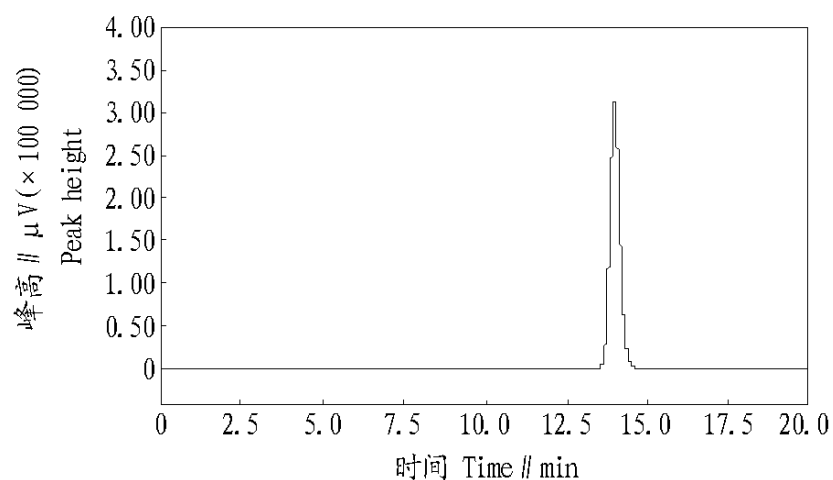


图1 槲皮素 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of quercetin

2.2.2 供试品溶液制备方法考察。 取乙肝清胶囊 10 粒, 取其内容物, 研细后称取约 0.5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 按照表 1 的组合精密加入相应溶剂 100 ml, 密塞, 称定重量, 超声或 90℃ 回流, 处理 30 min, 取出冷却, 再称定重量, 用相同溶剂补重, 摇匀, 滤纸滤过, 精密取续滤液 10 ml, 精密加入盐酸 1 ml, 置于 90℃ 水浴回流 60 min, 取出冷却。转移至 25 ml 容量瓶中, 用 80% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。不同提取方法的测定结果见表 1。结果表明采用甲醇作为提取溶媒, 在 90℃ 回流 30 min 提取效果最好, 下文所述的提取均按该法进行^[5]。

2.3 标准曲线绘制及线性关系的考察 取对照品溶液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜。分别进样 0.5、1、3、5、8、10 μg, 测定峰面积。以峰面积 y 对槲皮素对照品进样量 x (μg) 进行线性回归, 得回归方程为: $y = 1318920x + 3383.84519$ ($r = 0.99988$, $n = 6$)。线性范围为 0.054~1.08 μg。

2.4 稳定性考察 取过 0.45 μm 微孔滤膜的样品溶液, 按

基金项目 西南交通大学峨眉校区科技资助项目。

作者简介 王敏智 (1987-), 男, 湖南衡阳人, 本科生, 专业: 中药学。

* 通讯作者, 副教授, E-mail: wshing@263.net。

收稿日期 2008-05-19

样品测定方法分别在0~8 h 时间内,每2 h 进样10 μ l,测定其峰面积,计算5次测定结果的RSD为1.84%,表明供试品在8 h 内稳定。

表1 不同提取方法对胶囊中槲皮素含量的影响

Table 1 Effects of different extraction methods on quercetin content in the capsule

编号 Code	提取方法 Extraction methods	峰面积 Peak area	胶囊中槲皮素含量 Quercetin content in the capsule ng/g
1	甲醇,超声提取30 min	1 239 894	44.9
2	乙醇,超声提取30 min	274 029	10.3
3	80%甲醇,超声提取30 min	1 273 156	47.3
4	甲醇,90 回流30 min	1 176 609	49.6
5	80%甲醇,90 回流30 min	1 146 674	44.9

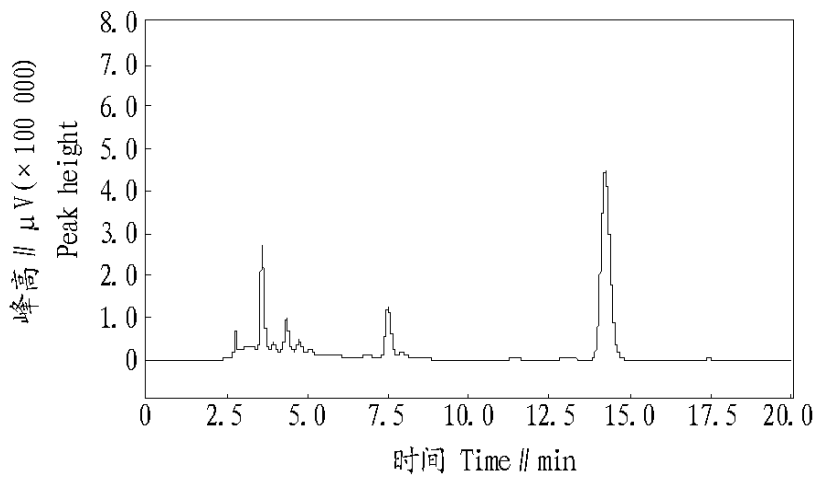


图2 乙肝清胶囊提取液HPLC 图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of the extract from Yi Gan Qing capsule

2.5 精密度考察 取过0.45 μ m 微孔滤膜的对照品溶液10 μ l,重复进样,测定5次,测定峰面积,计算5个数据的RSD为1.57%,结果表明该法精密度良好。

2.6 重现性考察 取同一批次乙肝清胶囊内容物5份,按供试品溶液配制法配制5份溶液,按样品测定方法,分别测定峰面积,计算5个数据的RSD为2.21%,结果表明该方法重现性良好。

2.7 加样回收率考察 精密称取在105 $^{\circ}$ C 烘干至恒重的槲皮素对照品52 ng,加甲醇超声溶解,并定容至100 ml。制成1 ml 中含有0.52 ng 槲皮素的对照品溶液。

取乙肝清胶囊内容物颗粒10粒,研细,取粉末约0.1 g,精密称定,共6份,分别精密加入0.52 ng/ml 槲皮素对照品溶液10 ml,按“2.2.2”方法制备供试品并测定其槲皮素含量,计算回收率,结果见表2。由表2 算得加样回收率为99.15%,RSD为1.42%。

(上接第9343页)

参考文献

- [31] ZWETERING M H, JONGENBURGER I, ROMBOUIS F M, et al. Modeling of the bacterial growth curve[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 1875-1881.
- [32] RAIKOWSKY D A, OLLEY J, MEMEEKINT A, et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures[J]. *J Bacteriol*, 1982, 149:

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Table 2 The results of the addition recovery test (n=6)

试验号 Est No.	测得含量 ng Determined content	回收率 % Recovery
1	10.18	100.4
2	10.05	97.9
3	10.03	97.5
4	10.14	99.6
5	10.21	101.0
6	10.08	98.5

注:加入对照品量均为5.2 ng。

Note: The addition amount in control is 5.2 ng.

2.8 样品测定 取本品3批,每批3份,按“2.2.2”制备样品溶液,过0.45 μ m 微孔滤膜,以10 μ l 进样,测定槲皮素含量,结果表明,3批样品槲皮素含量分别为49.8、50.6和49.1 ng/g,平均含量49.83 ng/g, RSD为1.51%。

3 结论与讨论

通过考察不同的提取溶媒和提取方式对胶囊前处理效果的影响,结果表明,采用甲醇作为提取溶媒,回流提取30 min 的效果优于采用乙醇作为提取溶剂和采用甲醇的超声提取方式。

该制剂处方中赶黄草和贯叶连翘中均含有槲皮素成分,因此,该制剂方法测得的槲皮素含量是方中槲皮素含量的总和。结合相关文献的报道,赶黄草和贯叶连翘治疗乙肝的共性可能提示了其共有成分槲皮素是抗乙肝病毒和修复肝损伤的活性成分之一。另有一些文献证实了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,这更加证实了赶黄草与贯叶连翘组方的合理性^[6]。

参考文献

- [1] 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):46-47.
- [2] TIEPOJ, VERCHINO R, DAS AS, et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45: 1140-1146.
- [3] 刘金钊,王晓里,张俊宋,等.贯叶连翘在癌症治疗中应用前景的研究[J].*中国现代中药*,2006,8(2):22-24.
- [4] 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):344-355.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:化学工业出版社,2005:47,74,147,152.
- [6] BENEDI 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: 1263-1276.

1-5.

- [33] DALGAARD P, BUEH P, SILBERG S. Seafood spoilage predictor development and distribution of a product specific applications software[J]. *Int J Food Microbiol*, 2002, 73: 343-349.
- [34] KOUTSOURNANIS K, GANNAKOUROU MC, Toulis P S, et al. Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality[J]. *Int J Food Microbiol*, 2002, 73: 375-382.