

## HPLC 测定降脂宁调脂抗氧化有效部位中槲皮素含量

徐冬艳, 姜艳艳, 刘斌\* (北京中医药大学, 北京 100102)

**摘要:** 目的 建立降脂宁调脂抗氧化有效部位中槲皮素的 HPLC 含量测定方法。方法 采用 SunFire C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(30 : 70), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 370 nm, 柱温 30 °C。结果 槲皮素在 0.052 2~0.313 2 μg 内线性关系良好, 回归方程为  $Y=3\ 231\ 057.74X-4\ 753.64$ ( $r=0.999\ 5$ ), 平均回收率为 99.36%, RSD=1.73%( $n=6$ )。结论 3 批样品测定结果表明, 该方法简便、准确, 可用于降脂宁有效部位中槲皮素的含量测定。

**关键词:** 降脂宁; 槲皮素; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)11-1021-04

### Quantitative Determination of Quercetin in the Lipid-regulation and anti-Oxidation Effective Fraction of Jiangzhining by HPLC

XU Dongyan, JIANG Yanyan, LIU Bin\* (Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method for the quantitative determination of quercetin in the lipid-regulation and anti-oxidation effective fraction of *Jiangzhining*. **METHODS** The determination was carried out with SunFire C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), using acetonitrile-0.1% phosphoric acid water solution (30 : 70) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and detected at the wavelength 370 nm, column temperature 30°C. **RESULTS** Quercetin had a good linear relationship in the range of 0.052 2~0.313 2 μg with the linear regression equation was  $Y=3\ 231\ 057.74X-4\ 753.64$ ( $r=0.999\ 5$ ), the average recovery was 99.36% with RSD=1.73%( $n=6$ ). **CONCLUSION** The determination results of three batches of samples showed that the method was easy and accurate which could be used to determine the content of quercetin in the effective fraction of *Jiangzhining*.

**KEY WORDS:** *Jiangzhining*; quercetin; quantitative determination; HPLC

降脂宁系由山楂、制首乌、决明子、荷叶 4 味中药制成的复方制剂, 收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》, 具有降血脂、软化血管作用<sup>[1]</sup>, 临床用于高脂血症, 疗效显著<sup>[2]</sup>。前期通过药理学筛选和大孔树脂吸附分离富集, 得到了降脂宁调脂抗氧化有效部位<sup>[3-4]</sup>。该有效部位含有多种黄酮类成分, 其苷元为槲皮素。本文参考相关文献<sup>[5-9]</sup>, 建立了酸水解 HPLC 法测定该有效部位中槲皮素含量的方法。3 批样品含量测定结果表明, 该方法可作为降脂宁调脂抗氧化有效部位质量控制方法之一。

#### 1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪, 包括 1525 型二元高压梯度泵, 2487 型紫外检测器, 1500 型柱温控制系统, Breeze 软件(美国 Waters 公司); 25μL 可调

进样器(哈密尔顿公司); Sartorius BT 25S 型十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司); KQ-500DE 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

制何首乌(产地: 湖北, 批号: 601100089)购自北京同仁堂医药集团北城批发部, 经鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb 的干燥块根; 荷叶(产地: 河北, 批号: 601000998)购自北京同仁堂医药集团北城批发部, 经鉴定为睡莲科植物莲 *Nelumbonucifera* Gaertn. 的干燥叶; 山楂(产地: 河北, 批号: 1601000906)购自北京同仁堂医药集团北城批发部, 经鉴定为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥成熟果实; 决明子(产地: 安徽, 批号: 70025002)购自北京同仁堂医药集

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划(2006BAI08B03-04)

作者简介: 徐冬艳, 女, 硕士生 Tel: (010)84738628 E-mail: jyyjm1129@163.com

E-mail: liubinyn67@163.com

\*通信作者: 刘斌, 男, 博士, 教授, 博士生导师

团北城批发部,经鉴定为豆科植物决明子 *Cassia obtusifolia* L.的干燥成熟种子。药材鉴定人北京中医药大学张贵君教授。槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100081-200846,供含量测定用)。

乙腈(Sigma-aldrich 公司,色谱纯);屈臣氏纯净水;其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 降脂宁有效部位制备

参照文献[3]方法,制备降脂宁调脂抗氧化有效部位。

### 2.2 对照品溶液制备

精密称取槲皮素对照品 2.61 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密移取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液制备

取降脂宁有效部位约 10 mg,精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇-25%盐酸(4:1)混合溶剂 15 mL,置水浴中加热回流 1 h,减压回收溶剂,残留物用甲醇溶解转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

### 2.4 阴性样品溶液制备

按降脂宁组方 4 味药的剂量比例,称取何首乌、决明子适量,按“2.1”和“2.3”项下方法,制备阴性样品溶液。

### 2.5 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:SunFire  $\text{C}_{18}$  色谱柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈-0.1%磷酸水溶液(30:70);流速:1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ;检测波长:370 nm;柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ 。

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,依上述色谱条件测定。在对照品溶液和供试品溶液色谱图相应位置上,有相同保留时间的色谱峰,而阴性样品溶液色谱图相应位置无色谱峰。色谱图见图 1。

### 2.6 线性关系考察

精密吸取对照品溶液(浓度为 0.026 1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ )2, 4, 6, 8, 10, 12  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪,测定槲皮素色谱峰峰面积。以对照品进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标,色谱峰峰面积为纵坐标绘制标准曲线,

计算回归方程为  $Y=3\ 231\ 057.74X-4\ 753.64$  ( $r=0.999\ 5$ )。槲皮素进样量在 0.052 2~0.313 2  $\mu\text{g}$  内线性关系良好。

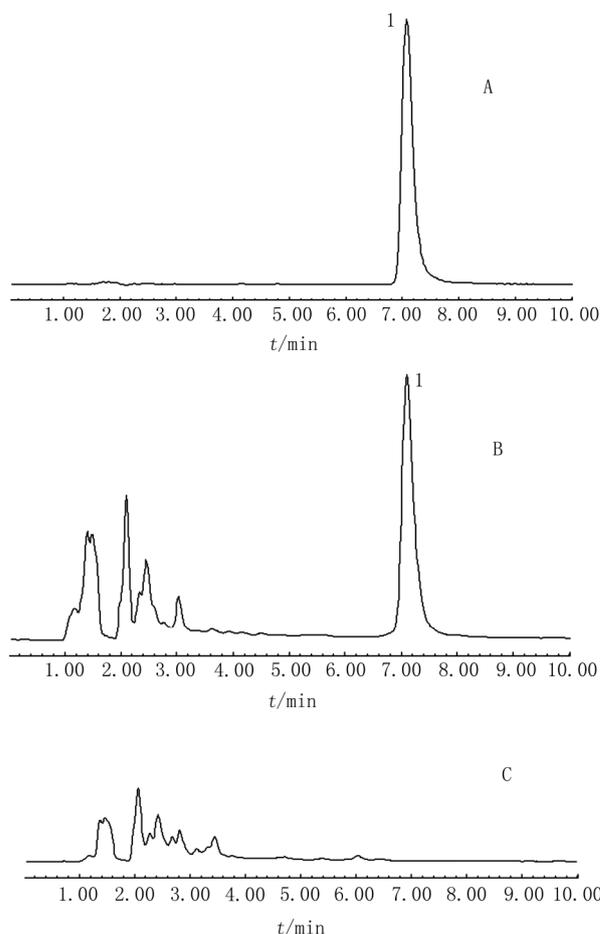


图 1 色谱图

A-对照品; B-样品; C-阴性样品; 1-槲皮素

Fig 1 HPLC chromatograms

A-reference substances; B-sample; C-negative sample; 1-quercetin

### 2.7 仪器适应性试验

精密吸取供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,测定槲皮素色谱峰峰面积,计算 RSD 为 1.23%( $n=6$ )。

### 2.8 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样,测定槲皮素色谱峰峰面积,计算 RSD 为 0.96%。表明供试品溶液在室温放置 12 h 内基本稳定。

### 2.9 精密度试验

取同一批降脂宁有效部位 6 份,每份约 10 mg,按“2.11”项下方法测定含量。计算槲皮素

平均含量为 2.03%(RSD=2.17%)。表明该方法精密度良好。

### 2.10 回收率试验

取已知含量的降脂宁有效部位(槲皮素含量为 2.03%)6 份,每份约 5 mg,精密称定,分别置 50 mL 锥形瓶中,精密加入槲皮素对照品溶液(浓度为 0.101 6 mg·mL<sup>-1</sup>)1 mL,按“2.3”项下方法制得供试品溶液,分别精密吸取 10 μL,注入液相色谱仪,测定色谱峰峰面积,计算槲皮素含量和回收率。结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery

样品称 样量/mg	含对照品 量/mg	加入对照 品量/mg	测得对照 品量/mg	回收率/%	平均 回收率/%	RSD/ %
5.05	0.102 7		0.202 1	97.91		
4.95	0.100 6		0.201 4	99.14		
4.99	0.101 4		0.201 2	98.18		
5.02	0.102 0	0.101 6	0.206 0	102.27	99.36	1.73
5.02	0.102 0		0.204 1	100.49		
4.98	0.101 2		0.201 0	98.16		

### 2.11 样品含量测定

取 3 批降脂宁有效部位各 3 份,每份约 10 mg,精密称定,置 5 mL 量瓶中,按“2.3”项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定槲皮素色谱峰峰面积,外标一点法计算含量。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(%, n=3)

Tab 2 Determination results of samples(%, n = 3)

批次	含量	RSD
1	2.04	1.69
2	2.06	2.18
3	2.07	1.04

## 3 讨论

### 3.1 检测波长选择

采用 PDA 检测器检测对照品和供试品,发现槲皮素在 370 nm 检测波长下有最大吸收,并且干扰峰少,因此选择 370 nm 作为检测波长。

### 3.2 流动相选择

通过比较甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液洗脱系统,发现乙腈-0.1%磷酸水溶液能良好改善色谱峰拖尾现象,对各成分分离良好,为了缩短分析时间,最终确定流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(30 : 70)。

### 3.3 供试品溶液制备水解条件考察

**3.3.1 水解溶剂考察** 取降脂宁有效部位 3 份,每份约 10 mg,精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,分别精密加入甲醇-25%盐酸(2 : 1, 4 : 1, 8 : 1)混合溶剂 15 mL,按“2.3”项下方法制得供试品溶液,分别精密吸取 10 μL,注入液相色谱仪,测定色谱峰峰面积,计算含量。结果表明水解溶剂为甲醇-25%盐酸(4 : 1)时,以槲皮素为苷元的黄酮苷类被最大程度的水解,槲皮素含量最高。

**3.3.2 水解时间考察** 取降脂宁有效部位 3 份,每份约 10 mg,精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇-25%盐酸(4 : 1)混合溶剂 15 mL,分别置水浴中加热回流 0.5, 1, 2 h,按“2.3”项下方法制得供试品溶液,分别精密吸取 10 μL,注入液相色谱仪,测定色谱峰峰面积,计算含量。结果表明水浴回流 1 h 后,以槲皮素为苷元的黄酮苷类水解完全,槲皮素含量不再继续增高。

## 4 结论

3 批降脂宁有效部位中槲皮素含量测定结果表明,采用 HPLC 方法,在本文建立的色谱条件下,样品中槲皮素与其他成分分离良好,方法简便快速,结果准确可靠,可作为其质量控制方法之一。

## REFERENCES

- [1] Chinese Patent Medicine Standard of the Ministry of Public Health, P R China. Vol 13 (中华人民共和国卫生部药品标准. 中药成方制剂. 第十三册)[S]. 1997:116.
- [2] GUAN J H, XUE Z, REN J B. Experimental research on the fat-regulating and anti-atherosclerosis effect of Jiangzhining[J]. Tradit Chin Med Pharmacol Clin (中药药理与临床), 2001, 17(4):29-30.
- [3] YANG Y, LIU B, BI L F, et al. Protective effect of effective fraction and active components of Jiangzhining extract on lesion of umbilical vein endothelial cells[J]. J Beijing Univ Chin Med (北京中医药大学学报), 2009, 32(3):160-163.
- [4] YANG Y, LIU B, BI L F, et al. Effects of Jiangzhining on blood lipid regulation and anti-oxidation in hyperlipidemic rats[J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2009, 2(5):647-649.
- [5] WU H H, SUN D L, QIAN W C, et al. Acid hydrolysis followed by HPLC for simultaneous determination of quercetin and kaempferol in Folium Mori[J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2010, 27 (3):248-251.
- [6] CHEN L, ZHENG H Y, SUERMAN K, et al. Determination of Rutin and Quercetin in Ocimi Herba from Different Places by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2011, 28 (4): 344-346.
- [7] XU W, XU X Q, HONG Z F, et al. RP-HPLC Determination of Four Flavonols in Bauhinia championii Benth [J]. Chin J Mod

- Appl Pharm (中国现代应用药学), 2009, 26 (9): 763-766.
- [8] SHEN D F, JIAO Y. Studies on Quality Standard of Herba Lysimachiae [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2009, 26 (8): 673-675.
- [9] QIAN Y X, KANG J C, HE J. Determination of the Ginkgo

Flavonoid Aglycon Solid Dispersions Capsules by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2010, 27 (8): 723-726.

收稿日期: 2011-02-24

## 近红外光谱法快速检测金银花中水分的含量

白雁<sup>1</sup>, 李珊<sup>1</sup>, 张威<sup>2</sup>, 陈志红<sup>1\*</sup> (1.河南中医学院, 郑州 450008; 2.郑州市卫生学校, 郑州 450005)

**摘要:** 目的 应用近红外光谱法和数据分析软件, 对金银花中水分含量进行快速测定。方法 利用甲苯法测定样品中水分的含量, 运用偏最小二乘(PLS)法建立其含量与 NIR 光谱之间的多元校正模型, 对未知样品进行含量预测。结果 建立的水分校正模型相关系数( $R^2$ )、估计误差均方根(RMSEE)、相对分析误差(RPD)分别为 0.933, 0.18%, 3.86。经外部验证, 校正模型的预测均方差(RMSEP)、平均回收率分别为 0.216, 98.9%。结论 此方法具有快速简便、准确无损的特点, 可应用于金银花中水分含量的快速检测。

**关键词:** 近红外光谱技术; 偏最小二乘法; 金银花; 水分; 快速测定

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2011)11-1024-04

### Rapid Determination of Moisture in Honeysuckle by Near-infrared Spectroscopy

BAI Yan<sup>1</sup>, LI Shan<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>, CHEN Zhihong<sup>1\*</sup> (1.Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2.Zhengzhou Health School, Zhengzhou 450005, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To determine moisture in honeysuckle rapidly by near-infrared spectroscopy and data analysis software. **METHODS** Toluene method was used as a reference method to determine the content of moisture in honeysuckle. Multivariate calibration model based on PLS algorithm was developed to correlate the spectra and the corresponding values determined by the reference method. **RESULTS** The correlation coefficients ( $R^2$ ), the root-mean-square error of estimated(RMSEE) and the RPD of the calibration model for moisture were 0.933, 0.18% and 3.86, respectively; the root-mean-square error of prediction(RMSEP) and the average rate of recovery were 0.216 and 98.9%. **CONCLUSION** The method is fast and convenient. The correction model could be used to predict moisture in honeysuckle rapidly.

**KEY WORDS:** near infrared spectrum; partial least square; honeysuckle; moisture; rapid determination

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb 的干燥花蕾或带初开的花, 药用历史悠久, 具有显著的抗病毒作用<sup>[1]</sup>。水分是金银花药材质量控制的成分之一, 水分含量太高, 必然会引起药材的霉变, 不利于储存, 所以对中药成分中水分的控制就显得格外重要。目前就金银花的水分研究并未见报道, 传统的水分测定方法为甲苯法, 此法虽然准确, 但是耗时长, 对药物有破坏, 而且因需要大量的有机试剂甲苯而污染环境并对操作人员造成伤害。

近红外光谱波数范围在 4 000~12 000  $\text{cm}^{-1}$ ,

有机化合物在该区有吸收。其特点是吸收较弱, 样品不需稀释就可测量, 易于实现简便快速的非破坏分析, 近年来在中药及其制剂领域的应用日益增多<sup>[2-3]</sup>。但其谱带较宽, 组分间谱带重叠严重, 给直接分析带来困难<sup>[4]</sup>。化学计量学可有效地解决这个问题。偏最小二乘法(partial least square, PLS)是目前化学计量学中最有效的分析方法之一。本实验采用近红外光谱技术结合化学计量学方法建立了测定金银花中水分含量的定量分析模型, 具有较高的预测精度, 为金银花中水分控制提供了一种新方法。

基金项目: 河南省重大公益科研项目(081100912500); 河南省杰出人才项目(084200510017)

作者简介: 白雁, 女, 教授, 博导 Tel: (0371)65962967 E-mail:white\_yan@hotmail.com \*通信作者: 陈志红, 女, 高级实验师  
Tel: 13526601286 E-mail: ls8600@163.com