

HPLC 法测定柿叶浸膏中槲皮素和山柰酚

贝伟剑^{1,2}, 罗杰², 吴爱奎², 彭文烈^{1*}

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515)

摘要:目的 建立柿叶浸膏中黄酮成分的 HPLC 测定。方法 采用 HPLC 法 Hypersil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸溶液 (50:50); 检测波长: 360 nm; 柱温: 室温; 体积流量: 1.0 mL/min。结果 槲皮素和山柰酚的线性范围均为 2.0~30.0 μg/mL, 线性关系良好 ($r=0.9997$)。槲皮素加样回收率为 97.5%, RSD 为 1.84% ($n=5$); 山柰酚加样回收率为 97.7%, RSD 为 1.11% ($n=5$)。结论 该法操作简便、结果可靠, 重现性好, 可用于柿叶浸膏的质量控制。

关键词: 柿叶浸膏; 槲皮素; 山柰酚; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)07-1014-02

Determination of quercetin and kaempferol in *Diospyros kaki* leaf extract by HPLC

BEI Wei-jian^{1,2}, LUO Jie², WU Ai-luan², PENG Wen-lie¹

(1. School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Co. Ltd, Guangzhou 510515, China)

Key words: *Diospyros kaki* leaf extract; quercetin; kaempferol; HPLC

脑心清片是广州白云山中药厂用单味柿叶提取物(以下简称柿叶浸膏)制成的中成药,经 10 家大型医院进行临床验证 404 例研究证实,对冠心病心绞痛、动脉硬化疗效显著,对短暂脑缺血发作、脑栓塞、脑血栓形成、脑血栓形成后遗症、心肌梗死后遗症等伴有或不伴有高血压的多种心脑血管疾病有良好的治疗效果,并具有一定的降血压、降血脂作用。长期服用本品,未发现有明显不良反应^[1]。脑心清片中的黄酮类成分是其重要活性部位^[2],其质量控制是确保脑心清片高效安全的手段,但目前对脑心清片的黄酮成分质量控制尚未有很好的方法。HPLC 技术在柿叶浸膏中的应用尚未见报道,本实验将 HPLC 法运用于柿叶浸膏的黄酮类成分测定中,并建立了一套成熟的方法,为脑心清片原料柿叶浸膏的质量控制提供了手段。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, DAD—G1315B 可见-紫外检测器。甲醇为色谱纯; 芦丁(批号 0080-9705)、槲皮素(批号 081-90003)、山柰酚(批号 0861-200002)对照品均为中国药品生物制品检定所提供; 柿叶浸膏由广州白云山中药厂提供。其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸溶液 (50:50); 检测波长: 360 nm; 柱温: 室温; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 10 μL。理论塔板数按槲皮素和山柰酚峰计均大于 5 000。

2.2 供试品溶液的制备: 称取柿叶浸膏约 0.1 g, 加甲醇 20 mL 使其完全溶解后, 加入 36% 浓盐酸使盐酸终浓度为 2 mol/L, 摇匀, 90 °C 回流 2 h, 冷却, 置 200 mL 量瓶中并加甲醇至刻度, 配成约 0.50 mg/mL 的水解液, 经 Millipore 滤器滤过, 备用。

2.3 标准曲线的制备: 精密称取槲皮素对照品 5.10 mg、山柰酚对照品 5.05 mg, 各加甲醇溶解定容至 25.0 mL, 作为贮存溶液。各取 10.00 mL 按 1:1 混合后, 精密吸取 0.20、0.60、1.00、1.60、2.00、3.00 mL, 用甲醇分别稀释成 10.0 mL, 进样测定, 以进样质量浓度 (C) 为横坐标, 平均峰面积 (A) 为纵坐标进行回归, 得标准曲线回归方程。槲皮素: $A=35.904 C+12.474$, $r=0.9997$, 线性范围: 2.0~30.6 μg/mL; 山柰酚: $A=38.209 C+21.359$, $r=0.9997$, 线性范围: 2.0~30.3 μg/mL。

2.4 精密度试验: 取含槲皮素 10.2 μg/mL 及山柰

收稿日期: 2004-10-16

基金项目: 广州市科技局 2002 年度重点科技攻关项目; 广州市名优中成药中药现代化研究专项资金资助 (2002Z2-E5081)

作者简介: 贝伟剑 (1963—), 广西昭平县人, 高级工程师, 副研究员, 中山大学生命科学学院博士研究生, 研究方向为中药现代化及中成药二次研发。Tel: (020) 87200301, 87200331 E-mail: bwj001@hotmail.com

* 通讯作者 彭文烈 Tel: (020) 84113656 E-mail: pengwenlie@21cn.com

酚 10.1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,重复进样 5 次,测定,计算得槲皮素峰面积的 RSD 为 1.26%,山奈酚峰面积的 RSD 为 1.03%。

2.5 重现性试验:精密称取同一批柿叶浸膏 5 份,制备供试品溶液,进样测定,计算得槲皮素峰面积的 RSD 为 1.81%,山奈酚峰面积的 RSD 为 1.42%。

2.6 稳定性试验:取柿叶浸膏供试品溶液,分别在 0、1、2、4、6、8、12、24 h 测定,结果槲皮素峰面积的 RSD 为 1.45%,山奈酚峰面积的 RSD 为 1.24%。表明溶液中槲皮素和山奈酚在 24 h 内稳定性良好。

2.7 回收率试验:精密称取已知含量的柿叶浸膏 5 份,每份约 50 mg (含槲皮素约 2.0 mg),分别精密加入 0.10 mg/mL 槲皮素对照品溶液 20.0 mL;另精密称取已知含量的柿叶浸膏 5 份,每份约 50 mg (含山奈酚约 3.0 mg),分别精密加入 0.153 mg/mL 山奈酚对照品溶液 20.0 mL,制备供试品溶液,进样测定,计算加样回收率,结果槲皮素平均回收率为 97.5%,RSD 为 1.84%,山奈酚平均回收率为 97.7%,RSD 为 1.11%。

2.8 样品测定:取样品,制备供试品溶液,进样测定,根据标准曲线计算柿叶浸膏中槲皮素和山奈酚的质量分数,并按下式计算黄酮的量,结果见表 1,色谱图见图 1。

$$\text{黄酮} = \text{槲皮素} \times 2.55 + \text{山奈酚} \times 2.59$$

表 1 柿叶浸膏中槲皮素、山奈酚和
黄酮的测定结果 ($n=5$)

Table 1 Quercetin, kaempfetol, and flavonoids
in *D. kaki* leaf extract ($n=5$)

批号	槲皮素/%	山奈酚/%	黄酮/%
04001	3.88	6.18	25.89
04002	3.58	6.42	25.77
04003	3.59	6.30	25.47

3 讨论

目前已发现的柿叶中黄酮类化合物有槲皮素、异槲皮苷、槲皮素 3-O-[2"-O-(3,3,5-三羟基苯甲酰)]-葡萄糖苷、芦丁、金丝桃苷、山奈酚、山奈酚 3-O- β -D-葡萄糖苷、山奈酚 3-O- α -L-鼠李糖苷、山奈酚 3-O- β -D 木糖苷(黄芪苷)、山奈酚 3-O- α -L-阿拉伯糖苷等^[3,4]。HPLC 测定结果表明:柿叶浸膏中主要含有槲皮素和山奈酚两种苷元及其苷类黄酮成

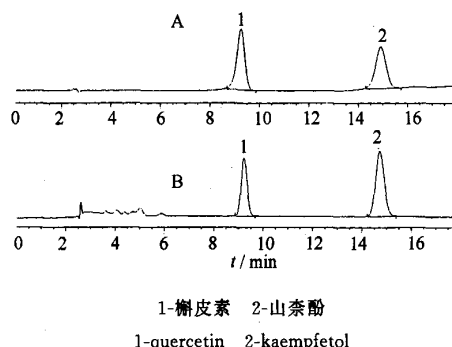


图 1 混合对照品溶液(A)和柿叶浸膏
水解产物(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference
substances (A) and *D. kaki* leaf extract
hydrolysate (B)

分。以槲皮素和山奈酚为指标,基本反映了柿叶浸膏中的黄酮成分的定量概貌,是一个可行的质量标准控制手段。

槲皮素和山奈酚对照品甲醇溶液在室温下放置,时间稍长(大于 24 h)峰面积会有所降低,但在 10 $^{\circ}\text{C}$ 下冷藏、则较稳定。因此对照品和样品溶液应冷藏保存,尽量在 24 h 内测定。

在检测样品的制备方法上,比较了加热回流 1.5、2.0、2.5 h,结果 2 h 以上,黄酮苷水解基本完全。比较了水解时盐酸浓度为 1.5、2.0、2.5 mol/L,结果 2.0 mol/L 以上浓度时黄酮苷水解基本完全,因此选择盐酸浓度为 2 mol/L、回流 2 h,以便操作。

致谢:广州军区药检所陈桂明药师为本研究提供技术帮助。

References:

- [1] Cai Y D, Yang S F. Effect of Naoxinging Tablet for cerebral atherosclerosis and angina pectoris of coronary heart disease; an observation of 60 cases [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2001, (12): 414-416.
- [2] Bei W J. Studies on active constituents of leaves of *Diospyros kaki* and Naoxinging Tablet & their neuroprotection against cerebral ischemia [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Sun Yatsen University* (中山大学博士学位论文) [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2003.
- [3] The Pharmaceutical Factory of PLA 58th Hospital. The experimental study and primary clinical effect observation of *Diospyros kaki* leaves [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1973, (3): 8-12.
- [4] Gorobets A V, Bandyukova V A. *Diospyros* flavonoids [J]. *Khim Prirod Soedin*, 1985 (5): 710.