

高效液相色谱法测定广西余甘子叶中槲皮素和山奈酚的含量

梁臣艳, 甄汉深*, 马雯芳, 刘圆圆, 陈美安
(广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立广西余甘子叶中槲皮素及山奈酚的含量测定方法。方法: 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Thermo Hypersil BDS C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸(27:73); 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 柱温为 30 °C; 检测波长为 360 nm。结果: 槲皮素在 0.06 ~ 1.2 μg 之间; 山奈酚在 0.021 ~ 0.43 μg, 峰面积与进样量呈良好的线性关系; 槲皮素和山奈酚的加样回收率分别为 98.83%, 101.58%, RSD 分别为 2.73%, 2.21% (n=6)。结论: 该方法简便可行, 重复性好, 结果准确, 可作为广西余甘子叶中槲皮素和山奈酚的含量测定方法。

[关键词] 余甘子叶; 槲皮素; 山奈酚; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0041-03

RP-HPLC Determination of Quercetin and Kaempferol in the Leaves of *Phyllanthus emblica* L

LIANG Chen-yan, ZHEN Han-shen*, MA Wen-Fang, LIU Yuan-yuan, CHEN Mei-an
(Guangxi Chinese Traditional Medical University, Nanning, 530001)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantification method for quercetin and kaempferol in the leaves of *Phyllanthus emblica* by HPLC. **Method:** HPLC is applied on the determination of quercetin and kaempferol in the leaves of *P. emblica* with C₁₈ column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and a mixture of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (27:73) as a mobile phase with the flow rate at 1.0 mL · min⁻¹. Quercetin and kaempferol were detected at 360 nm, column temperature was set at 30 °C. **Result:** Quercetin and kaempferol were linear in the range of 0.06 ~ 1.2 μg and 0.021 ~ 0.43 μg. The average recovery of quercetin and kaempferol was 98.83% with RSD 2.73% and 101.58% with RSD 2.21% (n=6) respectively. **Conclusion:** The method can be applied to the quality control of the leaves of *P. emblica* L.

[Key words] the leaves of *Phyllanthus emblica* L.; quercetin; kaempferol; RP-HPLC

余甘子叶为大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的叶子, 具有较高的食用和药用价值, 被联合国卫生组织指定为在全世界推广种植的 3 种保健植物之一, 适用于血病、肝病、心脏病、高血压等病症。文献报道余甘子具有抗菌^[1]、抗肿瘤^[2]、抗氧

化^[3]、抗动脉粥样硬化^[4-5]、抗乙肝病毒^[6]、保肝^[7]等作用。槲皮素、山奈酚为余甘子叶的活性成分, 测定槲皮素、山奈酚的含量对控制该药材质量具有重要意义。本文建立了 RP-HPLC 法测定余甘子叶中槲皮素及山奈酚含量的方法, 实验结果表明, 该法操作简便可行, 结果准确、重复性好, 可作为余甘子叶中槲皮素及山奈酚的含量测定方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 Agilent1100 高效液相色谱仪, 在线真空脱气机 (G-1322A), 高压四元泵 (G-1311A), 标准自动进样器 (G-1313A), 智能化柱温箱 (G-1316A), 可变波长检测器 (G-1313A), 二极管阵

[收稿日期] 2009-11-17

[基金项目] 广西科技厅项目 (桂科基 0639051; 桂科攻 0718002-2-1); 广西高校人才小高地建设创新团队资助计划 (桂教人 [2005] 80 号)

[通讯作者] 甄汉深, Tel: (0771) 2219867; E-mail: 8zhen@163.com

列检测器, Agilent1100 series 色谱工作站; SB3200T 超声波清洗仪(上海必能信超声有限公司); Millipore Simplicity-185 超纯水仪(美国密里博公司); BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯)。

1.2 试剂与试药 槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100081-200406,供含量测定用);山奈酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号 11081-200405,供含量测定用);余甘子叶药材分别采自广西桂林、广西恭城、广西贵港、广西柳州、广西南宁、广西浦北,经广西中医学院刘寿养副教授鉴定为大戟科叶下珠属植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的叶,标本存于广西中医学院药学中心实验室;乙腈为色谱纯(天津市四友精细化学品有限公司)、其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈 - 0.1% 磷酸(27:73);流速 1.0 mL · min⁻¹;柱温 30 °C;检测波长 360 nm;进样量 20 μL,理论塔板数以槲皮素、山奈酚均计不少于 3 000。对照品和供试品色谱图见图 1。

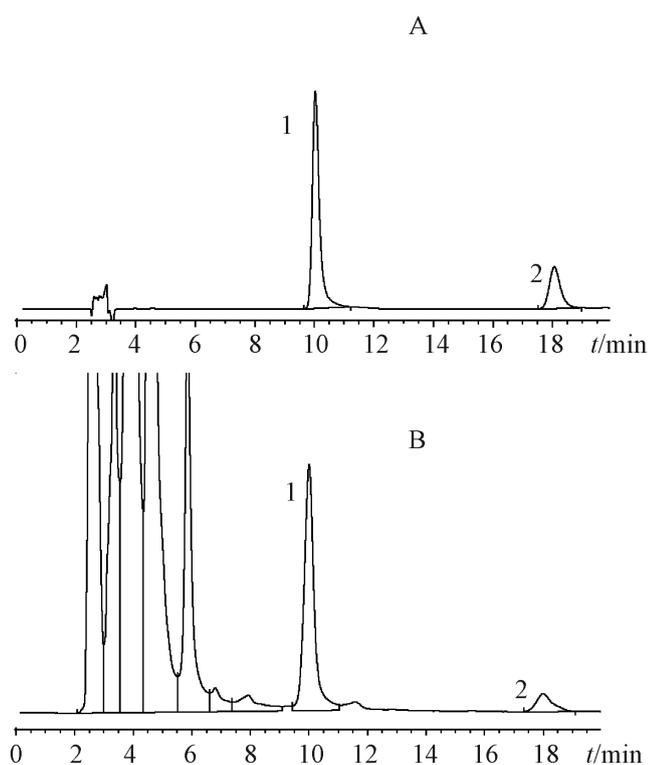


图 1 槲皮素(1)、山奈酚(2)、对照品(A)及余甘子叶供试品(B) HPLC 色谱图

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取槲皮素对照品(3.00 mg)、山奈酚对照品(1.015 mg)分别置于 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 0.06 mg · mL⁻¹的槲皮素对照品溶液、浓度为 0.0213 mg · mL⁻¹的山奈酚对照品溶液,

即得。

2.3 供试品溶液的制备 取干燥的余甘子叶药材粗粉约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,超声 45 min,放冷,用甲醇补足损失重量。用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,续滤液为供试品溶液。

2.4 线性关系的考察 分别精密吸取上述槲皮素对照品溶液 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mL,山奈酚对照品溶液 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mL,置 10 mL 量瓶中,加入甲醇定容至刻度,摇匀。分别取上述 6 个不同浓度的标准溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件进行分析测定其峰面积。以对照品标准溶液进样量(μg)为横坐标,其色谱峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线,并求出槲皮素回归方程式为 $Y = 3.29 \times 10^3 X - 2.12 \times 10$, $r = 0.999 5$;山奈酚回归方程式为 $Y = 2.84 \times 10^3 X - 10.48$, $r = 0.999 8$,结果表明槲皮素在进样量为 0.06 ~ 1.2 μg;山奈酚在进样量为 0.021 ~ 0.43 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 在选定的色谱条件下,精密吸取同一对照品溶液,进样 20 μL,连续进样 6 次,分析测定槲皮素和山奈酚峰面积值,计算其峰面积 RSD 分别为 0.47% 和 0.54%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,于制备后的 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h 注入高效液相色谱仪,进样 20 μL,测定槲皮素、山奈酚峰面积值,考察其稳定性,结果槲皮素和山奈酚的峰面积 RSD 分别为 1.99% 和 1.37%,表明供试品溶液中槲皮素、山奈酚在 24 h 内保持稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批余甘子叶样品 6 份各 1 g,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算槲皮素、山奈酚含量,RSD 值分别为 1.86%, 2.17% ($n = 6$),表明该法重复性较好。

2.8 加样回收试验 精密称取已知槲皮素、山奈酚含量的药材干燥粗粉 0.5g,共 6 份。分别精密加入与药材相当量的槲皮素对照品溶液(0.30 mg · mL⁻¹) 1 mL,山奈酚对照品溶液(0.048 mg · mL⁻¹) 1 mL,按 2.3 项下供试品制备方法制备,按 2.1 项下色谱条件测定,分别计算槲皮素和山奈酚的加样回收率,结果槲皮素平均回收率为 98.83%,RSD 为 2.73% ($n = 6$),山奈酚平均回收率为 101.58%,RSD 为 2.21% ($n = 6$),结果见表 1、2,表明本方法准确度较好。

表 1 槲皮素加样回收率测定 (n=6)

No.	药材称样量 /g	药材中含 量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率 /%	RSD /%
1	0.500 1	0.301 6		0.59	98.34		
2	0.501 0	0.302 1		0.60	101.15		
3	0.500 5	0.301 8	0.30	0.59	96.08	98.83	2.73
4	0.501 5	0.302 4		0.60	101.13		
5	0.500 2	0.301 6		0.60	101.04		
6	0.500 0	0.301 5		0.58	95.22		

表 2 山奈酚加样回收率测定 (n=6)

No.	药材称样量 /g	药材中含 量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率 /%	RSD /%
1	0.500 1	0.301 6		0.59	98.34		
2	0.501 0	0.302 1		0.60	101.15		
3	0.500 5	0.457 4	0.048	0.096	104.53	101.58	2.21
4	0.501 5	0.045 83		0.094	99.59		
5	0.500 2	0.0457 1		0.094	100.12		
6	0.500 0	0.457 0		0.096	104.20		

2.9 样品测定 分别取不同产地的余甘子叶干燥粉末约 1 g 每批 3 份,精密称定,按 2.3 项下供试品制备方法制备,按 2.1 项下色谱条件进样,分别测定中槲皮素、山奈酚的含量,测定结果见表 3。

表 3 余甘子叶中槲皮素和山奈酚 /%

产地	槲皮素	山奈酚
广西桂林	0.60	0.093
恭城	0.68	0.12
贵港	0.16	0.044
柳州	0.25	0.037
南宁	0.39	0.069
浦北	0.12	0.033

3 讨论

本文考察了乙醇、甲醇、50%乙醇、50%甲醇作为溶剂对余甘子叶进行提取,经 HPLC 测定,比较其色谱图,结果表明以甲醇作为提取溶剂提取率较高,且干扰少,故选用甲醇作为提取溶剂。在 200~400 nm 波长测定槲皮素和山奈酚的吸收曲线,在 360 nm 波长处为最大吸收,灵敏度最高,因此采用 360nm 作为检测波长。曾考察过甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸等流动相,但峰形均不佳,以乙腈-0.1%磷酸(27:73)为流动相,分离度较好(大于 1.5),保留时间适中,峰形亦较好而选用。

本文建立的槲皮素和山奈酚含量测定方法,可以较好地反映余甘子叶中槲皮素和山奈酚的含量,结果准确,重复性良好,对余甘子叶药材的质量控制有一定意义。

[参考文献]

- [1] 钟振国,曾春兰.余甘子叶提取物体外抗菌实验研究[J].中药材,2008,31(3):428.
- [2] 曾春兰,钟振国.余甘子叶提取物体外抗肿瘤作用研究[J].时珍国医国药,2008,19(3):580.
- [3] 潘国庆,赵旭升,蒋焱治.余甘子抗氧化作用的研究[J].青海科技.2007,12(6):33.
- [4] 刘丽梅,高政,李宝文.余甘子对实验性颈动脉粥样硬化家兔的影响[J].中国临床康复,2003,7(5):766.
- [5] 王绿娅,王大全,秦彦文,等.余甘子抗脂质过氧化和保护血管内皮的实验研究[J].中国药学杂志,2003,38(10):505.
- [6] 黄正昌,邓学龙,朱宇同,等.台湾细叶油柑体内外抗乙型肝炎病毒作用研究[J].广州中医药大学学报,2000,17(3):260.
- [7] 李萍,谢金鲜,林启云.民族药余甘子对 D2 半乳糖胺所致小鼠急性肝损伤的影响[J].中国民族民间医药杂志,2003,12(3):161.

[责任编辑 顾雪竹]