

高效液相色谱法测定山楂叶提取物中槲皮素的含量

危华玲*, 杨 青, 韦红音

(广西壮族自治区人民医院, 广西 南宁 530021)

[摘要] 目的: 用高效液相色谱法(HPLC 法)测定山楂叶中槲皮素的含量。方法: 采用 C₁₈ 柱, 以甲醇:0.4% 磷酸(45:55) 为流动相, 流速为 0.9mL/min, 检测波长为 360nm。结果: 槲皮素在 0.1624~1.624μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 相关系数为 0.9998, 平均回收率为 97.9%, RSD 为 0.59% (n=6)。结论: HPLC 法操作简便、准确, 可作为山楂叶提取物的定量分析方法。

[关键词] 槲皮素; 山楂; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)08-0010-02

Determination of Quercetin in Hawthorn Leaves by HPLC

WEI Hua-ling, YANG Qing, WEI Hong-yin

(Pharmacy Department, The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for determining the content of quercetin in hawthorn leaves. **Methods:** The Suntek ODS column with methanol-0.4% phosphoric acid(45:55) as the mobile phase was used. The flow rate was 0.9mL/min and the detective wavelength was 360nm. **Results:** The linear range of calibration curve was 0.1624~1.624μg/mL, for the quercetin (r = 0.9998). The average recovery was 97.9% and the RSD was 0.59% (n = 6). **Conclusion:** The method is simple, and accurate with a good repeatability and can be used as quantitative analysis for this preparation.

[Key words] quercetin; Hawthorn Leaves; HPLC; determination

山楂叶为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. major N. E. Br. 或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge 的干燥叶, 秋季果实成熟后采收。目前, 山楂叶提取物的含量测定多采用络合-比色法^[1,2]测定其黄酮含量, 络合-比色法以芦丁折算, 在 510nm 处比色测定, 此法所用仪器较普及, 操作简便, 但因样品未经过分离纯化, 供试品与对照品的可见一紫外光谱差别较大, 受杂质干扰, 定量误差较大, 重现性较差, 而高效液相测定法定量较准确, 重现性好。据文献报道, 槲皮素及槲皮素的衍生物为山楂叶中的主要活性成分^[3], 槲皮素具有保护心肌、

抗氧化、消除自由基、抗血小板聚集等作用^[4]。山楂叶提取物中的黄酮类成分多达 20 多种, 测定每一种黄酮含量较繁琐, 但经酸水解后这些成分的甙元主要为槲皮素^[5], 故以测定槲皮素含量作为山楂叶提取物的定量手段。本文摸索并确立了对山楂提取物的含量进行高效液相测定的方法, 本法操作简单, 重现性好。

1 仪器与试剂

Waters 液相色谱仪, Waters510 泵, 7725i 进样阀, 486 紫外检测器, 746 数据处理机; HP-8453 型紫外-可见分光光度计; 槲皮素对照品由中国药品生物制品检定所提供; 甲醇为色谱纯; 水为重蒸水; 其余为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Nova-PakC₁₈ 柱 (4.0mm × 250mm, 4μm); 流动相: 甲醇:0.4% 磷酸(45:55); 检测

[收稿日期] 2005-12-12

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅课题(Z2003081)

[通讯作者] 危华玲, Tel: (0771) 3014821; E-mail: weihualing@163.com

波长: 360nm; 柱温: 30℃; 流速为 0.9mL/min。在此条件下槲皮素峰与杂质峰能得到较好分离(见图 1)。

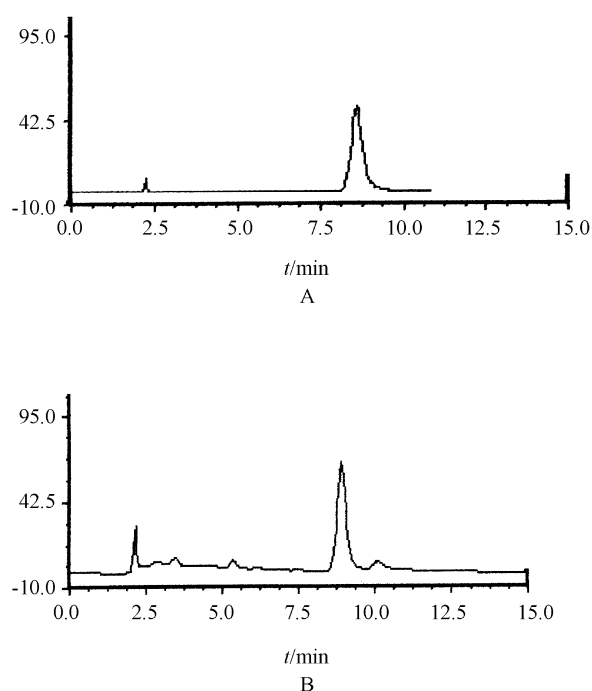


图 1 对照品、供试品高效液相色谱图
A. 对照品; B. 供试品

2.2 山楂叶的提取 取山楂叶适量,用 60% 乙醇液 10 倍量加热回流提取 2 次,每次提取 60min,过滤,残渣用 60% 乙醇洗 3 次,合并滤液,进行浓缩,干燥得到山楂提取物粉末。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取槲皮素对照品适量,置 50mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液制备 取本品细粉约 0.2g,精密称定,加甲醇-25% 盐酸(4:1)的混合溶液 25mL,超声溶解约 5min,置水浴中加热回流 30min,迅速冷却至室温,转移至 50mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45μm)滤过,取滤液,即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取槲皮素对照品储备液(1.624mg/mL) 1, 2, 4, 6, 8, 10mL 分别置 100mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度。精密吸取上述溶液各 10μL,注入液相色谱仪,测定峰面积 Y。以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,并以最小二乘法计算,得回归方程 $Y = 4889913X -$

144259, $r = 0.9998$ 。结果表明槲皮素在 0.1624~1.624μg 范围内与峰面积有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取供试品溶液,按以上色谱条件重复进样 6 次,测定峰面积,结果 RSD 为 0.5% ($n = 6$)。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液,按以上色谱条件每隔一定时间进样 1 次,测定峰面积,结果 RSD 为 0.9%,显示供试品溶液至少在 48h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批号(2004040323)样品 6 份,按 2.3.2 项下方法提取,测定峰面积并计算槲皮素含量(mg/g),结果槲皮素的平均含量为 10.65mg/g, RSD= 1.7% ($n = 6$)

2.8 回收率试验 精密称取已知含量样品(2004040323) 6 份,精密加入槲皮素对照品适量,按 2.3.2 项下方法提取,测得峰面积并计算含量。结果显示,平均回收率为 97.93%, RSD= 0.59% ($n = 6$)。

3 讨论

供试品溶液的制备主要参照《中国药典》银杏叶提取物的槲皮素含量测定中供试品溶液的制备方法。从实验得知,山楂叶提取物酸水解后能得到较好的色谱图,如图 1B 所示,槲皮素峰与杂质峰能得到较好分离。

本实验曾采用甲醇:0.4% 磷酸(50:50)为流动相,但所得色谱图中槲皮素与杂质峰不能很好地分离。后来采用甲醇:0.4% 磷酸(45:55)为流动相后,磷酸的比例增加,由于磷酸可以抑制黄酮甙元的酚羟基的电离,改善了分离效果,防止拖尾现象,所得色谱图槲皮素峰与杂质峰能得到较好分离。

[参考文献]

- [1] 张妍,李厚伟,张永春,等. 山楂中总黄酮几种提取分离方法的考察及含量测定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35(3): 183-184.
- [2] 何文胜. 紫外分光光度法测定脑灵胶囊中银杏黄酮的含量[J]. 海峡药学, 2002, 14(2): 37-38.
- [3] 孙敬勇,杨书斌,谢鸿霞,等. 山楂化学成分研究[J]. 中草药, 2002, 33(6): 483-486.
- [4] 俞一心,戈升荣,王桂珍. 槲皮素及其衍生物的药理作用研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(12): 902-904.
- [5] 王艳芳,王新华,朱宇同. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 171-173.