

# HPLC 测定印楝叶中的槲皮素和异鼠李素

范刚, 普元柱, 杜娟, 尹鸿翔, 张艺\*  
(成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137)

摘要: 目的 建立测定印楝叶中槲皮素、异鼠李素含量的方法。方法 采用 HPLC 法, 检测波长为 360 nm, 流动相为 0.2% 醋酸-乙腈(65:35)。结果 槲皮素、异鼠李素的线性范围分别为 0.42~2.10  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9999$ )、0.08~0.32  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9999$ ), 平均回收率分别为 100.30%、98.68%, RSD 分别为 1.73%、1.67%。结论 所建方法操作简便、准确、重复性好, 可控制印楝叶药材的质量。

关键词: 高效液相色谱法; 印楝叶; 槲皮素; 异鼠李素; 含量测定

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2010)03-0367-02

## Determination of quercetin and isorhamnetin in *Azadirachta indica* leaf by HPLC

FAN Gang, PU Yuan-zhu, DU Juan, YIN Hong-xiang, ZHANG Yi\*

(College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan, 611137 P. R. China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To establish an HPLC method for determining the contents of quercetin and isorhamnetin in *Azadirachta indica* leaf. **METHODS** Welchrom C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ ) was used as analytical column and the mobile phase was 0.2% acetic acid-acetonitrile (65:35). The flow rate was at 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and detection wavelength at 360 nm. **RESULTS** The linear ranges of quercetin and isorhamnetin were 0.42-2.10  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9999$ ) 0.08-0.32  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9999$ ) and the average recoveries were 100.30% 98.68% respectively. **CONCLUSION** This method is simple, accurate and repeatable. It provides a scientific basis for the quality evaluation of the *Azadirachta indica* leaf.

**Key words:** HPLC; *Azadirachta indica* leaf; Quercetin; Isorhamnetin; Content determination

**CLC number:** R917

**Document code:** A

**Article ID:** 1006-0103(2010)03-0367-02

印楝 *Azadirachta indica* A. Juss 为楝科楝属植物, 具有抗菌、抗病毒、抗生育、抗氧化、保肝、降血糖和免疫调节等多种生物活性, 被认为是一种极具开发价值的药用植物资源<sup>[1-2]</sup>。从印楝叶中分离和鉴定出来的黄酮类化合物主要为槲皮素、异鼠李素及与不同糖结合而成的苷<sup>[1-3]</sup>, 具有抗癌、抗炎、抗氧化、降血糖、免疫调节的作用<sup>[4-6]</sup>。现采用 HPLC 法测定了印楝叶中槲皮素和异鼠李素的含量。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

LC-10A 高效液相色谱仪系统(日本岛津)。槲皮素(批号:100081-200406)、异鼠李素(批号:110860-200608)对照品(中国药品生物制品检定所);印楝叶采自四川省攀枝花市拉鲊村印楝种源试验林基地(种质资源圃),共收集 13 个种源(表 3),经攀枝花市干热河谷应用生态研究中心解培惠教授鉴定为印楝 *Azadirachta indica* A. Juss 的叶子,

阴干备用;乙腈为色谱纯;其余试剂为分析纯。

### 1.2 方法与结果

**1.2.1 色谱条件** 采用 Welchrom C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ ) 流动相为 0.2% 醋酸-乙腈(65:35) 检测波长为 360 nm, 柱温为室温, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。理论板数以槲皮素峰计算大于  $5 \times 10^3$ , 供试品色谱图中, 槲皮素、异鼠李素峰与杂质峰分离良好(图 1)。

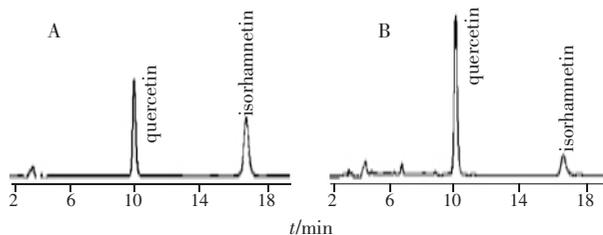


图 1 对照品(A)和供试品(B)溶液的 HPLC 图

Fig 1 Chromatograms of control solution(A) and sample solution(B)

**1.2.2 溶液的制备** 取 2.0 g 印楝叶药材粉末, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加 40 mL 石油醚, 于水浴中

基金项目: 四川省教育厅重大培育项目(07ZZ006); 攀枝花特色生物资源科技专项重点项目(2008CY-S-1); 成都中医药大学科技发展基金项目(ZRZD200707)

作者简介: 范刚(1983—), 男, 正攻读药物化学专业的硕士学位。Email: fangang1111@ yahoo. com. cn

\* 通信作者 (Correspondent author) Email: 9006zmy@ sina. com

回流提取 30 min 过滤, 弃去石油醚液, 药渣中加 50 mL 80% 乙醇, 称定重量, 水浴中回流提取 60 min, 放冷, 用 80% 乙醇补足减失的重量, 过滤, 精密量取 25 mL 续滤液, 置具塞锥形瓶中, 加 4 mL 盐酸, 在 85 °C 的水浴中加热水解 60 min, 取出, 迅速冷却, 转移至 50 mL 量瓶中, 用 80% 乙醇定容, 即得供试品溶液。精密称取适量槲皮素、异鼠李素对照品, 分别加甲醇配成 42、63、84、147、210  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  槲皮素对照品溶液和 8、12、16、24、32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  异鼠李素对照品溶液。

**1.2.3 线性关系考察** 按“1.2.1”项的色谱条件, 分别测定“1.2.2”项的两种对照品溶液。以对照品进样量为横坐标、相应的峰面积为纵坐标计算, 分别得回归方程为:  $Y_{\text{槲皮素}} = 3.764 \times 10^6 X - 4.778 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ ) 线性范围为 0.42 ~ 2.10  $\mu\text{g}$ ;  $Y_{\text{异鼠李素}} = 3.50 \times 10^6 X + 6.76 \times 10^3$  ( $r = 0.9999$ ) 线性范围为 0.08 ~ 0.32  $\mu\text{g}$ 。

**1.2.4 精密度、稳定性和重复性试验** 分别精密吸取 10  $\mu\text{L}$  槲皮素、异鼠李素对照品溶液, 连续进样 5 次, 记录色谱峰面积。计算其 RSD 分别为 0.86%、0.80%, 表明仪器精密度良好。取同一供试品溶液, 于制备后 0、1、2、4、8、12 h 时各测定 1 次。计算得槲皮素和异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 1.68%、2.12%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。分别取 5 份同一批药材, 精密称定, 按“1.2.8”项的方法测定含量。计算得槲皮素百分含量的 RSD = 2.03%; 异鼠李素的 RSD = 1.99%, 说明方法具有较好的重复性。

**1.2.5 加样回收率试验** 分别称取约 0.5 g 已知含量的样品 6 份, 精密称定, 再分别加入适量槲皮素、异鼠李素对照品, 混匀后按“1.2.8”项的方法测定, 计算回收率(表 1)。

表 1 加样回收率试验结果(mg)

Table 1 Results of recovery test of(mg)

Components	Original	Added	Detected	Recovery/%	$\bar{X}/\%$	RSD/%
Quercetion	1.9774	1.9950	3.9708	99.92	100.30	1.73
	1.9797	1.9950	4.0124	101.89		
	1.9782	1.9950	3.9904	100.86		
	1.9778	1.9950	3.9253	97.62		
	1.9809	1.9950	3.9614	99.27		
	1.9793	1.9950	4.0192	102.25		
Isorhamnetin	0.4212	0.4200	0.8434	100.52	98.68	1.67
	0.4205	0.4200	0.8267	96.71		
	0.4204	0.4200	0.8384	99.52		
	0.4213	0.4200	0.8279	96.81		
	0.4209	0.4200	0.8341	98.38		
	0.4212	0.4200	0.8417	100.12		

**1.2.6 样品的测定** 取印楝叶药材粉末样品, 按“1.2.2”项的方法制备供试品溶液。在“1.2.1”项的色谱条件下, 取 10  $\mu\text{L}$  供试品溶液进样测定。以峰面积按标准曲线法分别计算槲皮素和异鼠李素的

含量, 13 个种源印楝叶药材的测定结果见表 2。

表 2 不同种源印楝叶中槲皮素和异鼠李素的含量( $n = 3$ )

Table 2 Determination of quercetin and isorhamnetin in *Azadirachta indica* leaf of different provenances( $n = 3$ )

Provenances code	Place of origin	Quercetin/%	Isorhamnetin/%	Total flavanoid/%
P11	Burma	0.571	0.105	0.676
P10	Burma	0.592	0.095	0.687
P12	Burma	0.401	0.084	0.486
P1	Burma	0.393	0.073	0.467
P2	Burma	0.312	0.064	0.376
P3	Burma	0.384	0.067	0.451
D6	Burma	0.620	0.119	0.739
1014	Burma	0.581	0.104	0.684
1015	Burma	0.524	0.098	0.622
GM	Burma	0.283	0.063	0.346
ML	Burma	0.537	0.086	0.623
ADLY	Australia	0.215	0.055	0.270
YD	India	0.223	0.054	0.277

## 2 讨论

槲皮素和异鼠李素在 360 nm 处均有最大吸收, 故选其为测定波长。曾考察了提取法(回流和超声)提取溶剂(甲醇、无水乙醇、80% 乙醇), 药材水解所用酸的种类、用量和水解的时间以及流动相系统, 最后确定了流动相为 0.2% 醋酸 - 乙腈(65 : 35)。槲皮素和异鼠李素的测定可用文献<sup>[7-8]</sup>方法, 文中所建方法简便、准确、重复性好, 适用于印楝叶中槲皮素和异鼠李素的含量测定。

## 参考文献:

- [1] Subapriya R, Nagini S. Medicinal properties of Neem leaves: A review [J]. *Curr Med Chem Anti - Cancer Agents*, 2005, 5(2): 149 - 151.
- [2] Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK *et al.* Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*) [J]. *Current Science*, 2002, 82(11): 1337 - 1345.
- [3] 尹锋, 雷心, 楼凤昌. 印楝化学成分研究 [J]. *中草药*, 2003, 34(8): 687 - 688.
- [4] Baral R, Chattopadhyay U. Neem (*Azadirachta indica*) leaf mediated immune activation causes prophylactic growth inhibition of murine Ehrlich carcinoma and B16 melanoma [J]. *Immunopharmacol*, 2004, 4: 355 - 366.
- [5] 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.
- [6] 朱玲, 王正荣, 周黎明. 异鼠李素对肺癌的作用及其抗肿瘤机制的初步探讨 [J]. *航天医学与医学工程*, 2005, 18(5): 381 - 383.
- [7] 杨龙辉, 伍丕娥, 王天志. HPLC 测定沙棘膏中槲皮素和异鼠李素的含量 [J]. *华西药学期刊*, 2002, 17(2): 130 - 131.
- [8] 兰轲, 蒋学华, 任静. 醋柳黄酮缓释胶囊中总黄酮及槲皮素、异鼠李素的含量测定 [J]. *华西药学期刊*, 2004, 19(1): 41 - 44.

收稿日期: 2009 - 07 - 13