

Nghiên cứu quy trình phân lập kaempferol và xác định hàm lượng kaempferol trong các chế phẩm từ lá Bạch quả

Nguyễn Tường Vân

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
ntvan@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu xây dựng quy trình phân lập kaempferol từ dịch chiết lá Bạch quả và sử dụng kaempferol phân lập được để thẩm định quy trình định lượng. Từ dịch chiết cồn lá Bạch quả, thủy phân bằng acid hydroclorid, chuyển flavonoid toàn phần dạng glycosid thành dạng aglycon. Chiết flavonoid dạng aglycon bằng etyl acetat, cô loại dung môi được cặn flavonoid toàn phần dạng tự do. Tiến hành sắc kí cột lần một với petrol ete và etyl acetat và kết tinh lại trong aceton được phân đoạn gồm 3 chất kaempferol, quercetin và isorhamnetin. Sắc kí cột lần hai với cloroform và methanol để tinh chế kaempferol. Xác định độ tinh khiết (sắc kí lớp mỏng và sắc kí lỏng) và cấu trúc chất thu được bằng các phương pháp phổ (IR, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR). Sau đó, dùng kaempferol phân lập được để xây dựng và thẩm định quy trình định lượng trên chế phẩm Tanakan®. Quy trình định lượng đạt các chỉ tiêu về tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, tính tuyến tính, độ đúng.

Nhận 26.04.2019
Được duyệt 13.08.2019
Công bố 20.09.2019

Từ khóa
lá Bạch quả, kaempferol,
phân lập, sắc kí cột, sắc
kí lỏng hiệu năng cao

© 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Kaempferol là một flavonoid phân bố rộng rãi trong nhiều loài thực vật như Bạch quả, Bạch thược, Địa liền... Nhiều loài đã được dùng để chiết xuất cao dược liệu, làm hoạt chất cho các chế phẩm hiện đại. Kaempferol từng được phân lập bởi Thái Nguyễn Hùng Thu và cộng sự năm 2012 từ cây Đơn lá đỏ[1], hoặc từ cao khô lá Bạch quả[2]. Kaempferol cũng đã được phân lập từ nhiều dược liệu khác nhau bởi các tác giả nước ngoài, chẳng hạn như Sharma Priyanka và cộng sự năm 2012 từ cây *Pedaliium murex*[3]. Bên cạnh đó, quy trình định lượng kaempferol trong dược liệu đã được xây dựng, chủ yếu sử dụng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao, điều kiện sắc kí thay đổi đa dạng[4-7]. Bạch quả là dược liệu được sử dụng rộng rãi trên thế giới, có trong các chuyên luận của Dược điển Anh và Mỹ. Các công trình nghiên cứu gần đây tập trung vào nghiên cứu tác dụng dược lí của Bạch quả. Các chất chiết ra từ lá Bạch quả chứa các flavonoid và các terpenoid (ginkgolid, bilobalid) và được sử dụng trong dược phẩm. những chất này có tác dụng tăng độ minh mẫn và được sử dụng chủ yếu như là các chất làm tăng trí nhớ và khả năng tập trung[4]. Điều này dẫn đến sự ra đời của ngày càng nhiều loại thuốc và thực phẩm chức năng chứa cao Bạch quả được lưu hành trên thị trường như Ginkgo Biloba, Tanakan, Cebrex, Ginkgo Fort, Ginkgo 6000...

Để nâng cao giá trị sử dụng và phát triển các nghiên cứu sâu hơn về cây Bạch quả, đề tài “Nghiên cứu quy trình phân lập kaempferol từ lá Bạch quả và ứng dụng để đánh giá hàm lượng kaempferol trong các chế phẩm chứa Bạch quả” đã được thực hiện với mục tiêu cụ thể như sau: phân lập kaempferol từ dịch chiết cồn lá Bạch quả, dùng kaempferol phân lập được để định lượng kaempferol trong các chế phẩm chứa Bạch quả.

2 Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu và trang thiết bị

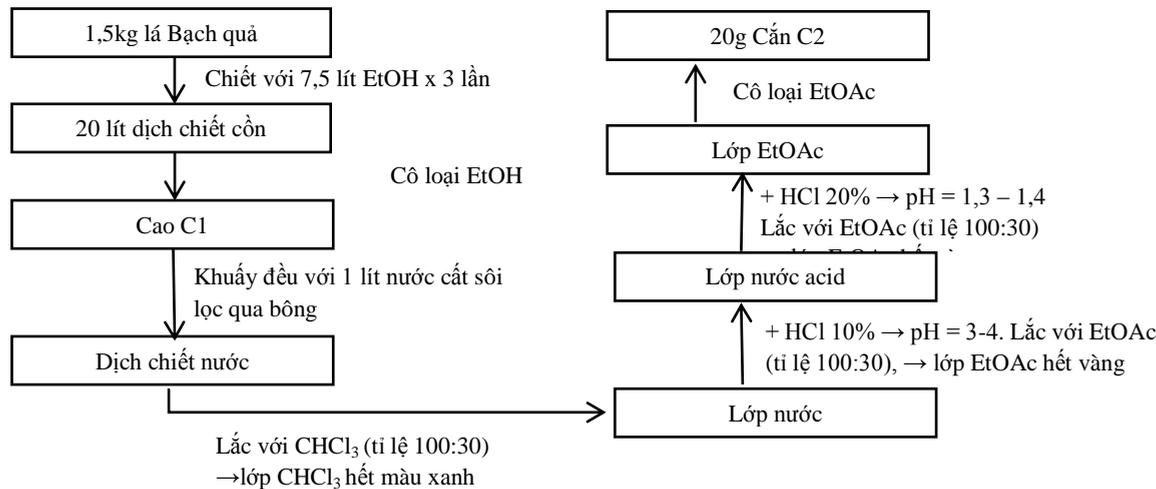
- Dược liệu: lá Bạch quả mua từ cửa hàng Luân Đức, chợ Hải Thượng Lãn Ông, sau đó xay thành bột mịn.
- Đối tượng nghiên cứu: là Tanakan® (IPSEN, Pháp), thành phần chính lá Bạch quả được tiêu chuẩn hóa EGb 761.
- Hóa chất, dung môi: Acetonitril HPLC, Methanol HPLC, nước cất 2 lần, các dung môi khác tinh khiết ở mức độ phân tích.
- Trang thiết bị: máy quang phổ hồng ngoại Thermo scientific iS50, Máy DSC, Máy NMR AVANCE 500, Máy đo khối phổ 910 TQ- FTMS, HPLC- đầu dò PDA.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chiết xuất flavonoid toàn phần từ lá Bạch quả

Chiết flavonoid toàn phần trong lá Bạch quả bằng EtOH 96°. Loại các tạp chất kém phân cực, thủy phân. Chiết lấy flavonoid aglycon bằng etyl acetat. Tiến hành theo sơ đồ sau để thu được cao (C2).





Hình 1 Quy trình chiết xuất và loại tạp flavonoid trong lá Bạch quả

2.2.2 Phân lập kaempferol

- Phân tách trên cột cô điển: sắc kí cao C2 với tốc độ rửa giải 2,5ml/phút (khoảng 40 giọt/phút) và pha động PE và EtOAc theo tỉ lệ như Bảng 1.

Bảng 1 Kết quả hứng khi sắc kí phân đoạn (C2)

PE-EtOAc	Thể tích (ml)	Phân đoạn (15ml)	Cô thu hồi
100:0	400	Hứng thu hồi	PĐ1
95:5	300	1- 20	
90:10	300	21- 40	
85:5	3000	41 - 200	

- Kết tinh lại trong aceton: hòa tan PĐ1 trong lượng tối thiểu aceton trong chén sứ rồi kết tinh lại trong aceton nhiều lần được PĐ2. Sắc kí lớp mỏng PĐ2 với điều kiện sắc kí bản mỏng silicagel 60 F254. Kết quả thấy sắc kí đồ có 3 vết.

- Tinh chế bằng sắc kí cột cô điển: tiến hành sắc kí PĐ2, rửa giải bằng CHCl₃, tốc độ rửa giải 2,5ml/phút, đến khi kaempferol tinh khiết bắt đầu xuất hiện. Sau đó, thay pha động bằng MeOH, rửa giải đến khi không còn vết của kaempferol, thu lấy phân đoạn chứa kaempferol tinh khiết. Để dung môi bay hơi tự nhiên trong tủ hood đến cạn. Cạo cặn cho vào lọ kín.

2.2.3 Xác định các đặc tính của PĐ3

Độ tinh khiết sắc kí lớp mỏng: sắc kí với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau (1) CHCl₃ : MeOH : Acid formic (8:2:1); (2) PE : EtOAc : Acid formic (5:5:1); (3) CHCl₃ : EtOAc : Acid formic (5:4:1)

Điều kiện chạy HPLC[7]:

Đầu dò: PDA2998, λ = 370nm

Cột: Luna® 5µm C18, (250 x 4,6mm, 5µm)

Pha động: MeOH - ACN - H₃PO₄ 0,05% (15 : 25 : 60)

Thể tích tiêm: 20µl; Tốc độ dòng: 1ml/phút

Nhiệt độ cột: 25°C

Xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ: phổ hồng ngoại, phổ khối, phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR

2.2.4 Xây dựng và thẩm định qui trình định lượng kaempferol trong chế phẩm Tanakan®

Mẫu thử Tanakan®

Hộp 2 vỉ x 15 viên bao phim, thành phần như sau:

Cao Bạch quả (*Ginkgo biloba* extract) 40 mg

Tá dược vừa đủ 1 viên

Điều kiện sắc kí giống 2.2.3.

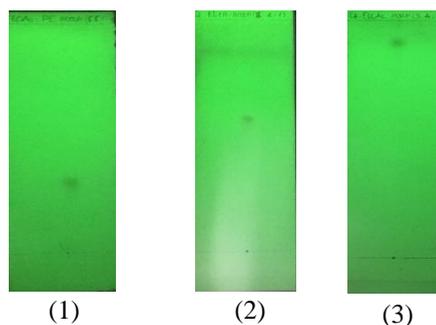
Chuẩn bị các dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch thử thêm chuẩn. Sau đó tiến hành thẩm định các chỉ tiêu: tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng.

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Xác định các đặc tính của PĐ3

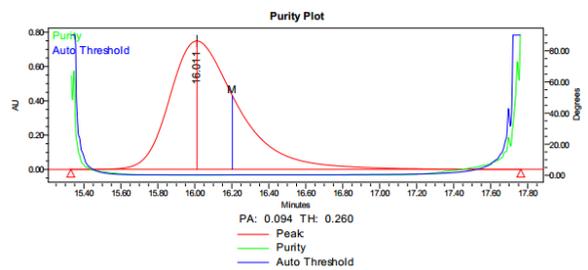
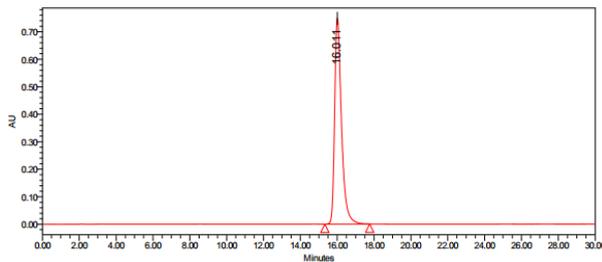
3.1.1 Độ tinh khiết

- Tinh khiết sắc kí lớp mỏng : (1) CHCl₃ : MeOH : Acid formic (8:2:1) (2) PE : EtOAc : Acid formic (5:5:1), (3) CHCl₃ : EtOAc : Acid formic (5:4:1). Phát hiện bằng đèn UV 254nm. PĐ3 cho một vết trên bản mỏng (Hình 2). Vậy chất phân lập được đạt độ tinh khiết sắc kí lớp mỏng.



Hình 2 Sắc kí lớp mỏng PĐ3

- Xác định độ tinh khiết bằng kĩ thuật sắc kí lỏng



Hình 3 Sắc kí đồ của PD3

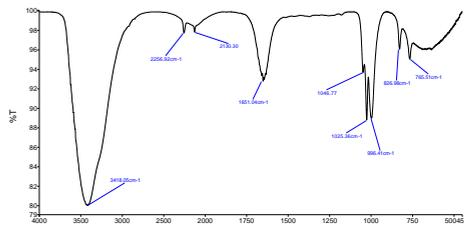
Bảng 2 Kết quả độ tinh khiết sắc kí lỏng của PD3

Chất	1	2	3	4	5	6	TB (%)
PD3	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	99,84 %

PD3 đạt độ tinh khiết sắc kí lỏng trên 98% tính theo 100% diện tích pic (Bảng 2). Mặt khác, pic của kaempferol tinh khiết không lẫn pic của tạp chất khác (Hình 3).

3.2.3 Xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ

Phổ hồng ngoại: Phổ IR của PD3 có các dao động đặc trưng tương tự nhau vì có các nhóm chức giống nhau của nhóm O-H (3148cm^{-1}), pyron (1651cm^{-1}), C-O (1046cm^{-1}), aren (1612 và 1659cm^{-1}) (Hình 4). Phù hợp với phổ hồng ngoại của kaempferol trong tài liệu tham khảo[8].



Hình 4 Phổ IR của CX3

Phổ khối: Dựa phổ khối xác định khối lượng phân tử khối của PD3.

Bảng 3 So sánh phổ khối ESI (MS-) của PD3 với tài liệu tham khảo [9,10]

	Kaempferol ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$)	PD3
$[\text{M}-\text{H}]^+$	287	
$[\text{M}]^+$		286
$[\text{M}-\text{H}]^-$	285,041	284,8

Phổ khối cho thấy khối lượng phân tử của PD3 có khối lượng khoảng 286 đ.v.C, tương ứng với công thức $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$, phù hợp với công thức phân tử của kaempferol.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân:

Phổ $^1\text{H-NMR}$

Bảng 4 Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của 110VAN_Kaempferol (500 MHz, DMSO)

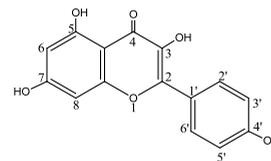
Proton	110VAN_KaempFerol (ppm)
H-3', H-5'	6,943 (2H; d; 8,5)
H-2', H-6'	8,021 (2H; d; 9)
H-6	6,229 (1H; d; 1,5)
H-8	6,490 (1H; d; 1,5)
-OH	10,251 (1H; s)
-OH	12,438 (1H; s)

Độ chuyển dịch hoá học, độ bội và hằng số ghép spin của 6 proton này theo khuôn mẫu của các proton trong Flavonol C-3 (Bảng 5). Tra cứu TLTK về Flavonoid cho thấy Độ chuyển dịch hoá học δ_c của hợp chất 110VAN_KaempFerol hoàn toàn phù hợp với δ_c của kaempferol (Bảng 5).

Bảng 5 Dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của 110VAN_Kaempferol (125 MHz, DMSO)

C	110VAN_KaempFerol (ppm)	Kaempferol [10, 11] (ppm)
C-2	146,88	146,1 (s)
C-3	135,72	135,5 (s)
C-4	175,97	175,7 (s)
C-5	156,19	156,0 (s)
C-6	98,34	98,2 (d)
C-7	164,14	163,8 (s)
C-8	93,58	93,4 (d)
C-9	160,66	160,5 (s)
C-10	103,01	102,9 (s)
C-1'	121,66	121,6 (s)
C-2'	129,46	129,3 (s)
C-3'	115,53	115,3 (d)
C-4'	159,33	159,0 (s)
C-5'	115,53	115,3 (d)
C-6'	129,46	129,3 (d)

Dữ liệu phổ UV, IR và NMR chứng tỏ PD3 tương ứng với kaempferol có công thức phân tử $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$. Công thức cấu tạo của kaempferol như Hình 5.



Hình 5 Cấu trúc của PD3

3.2 Thẩm định qui trình định lượng kaempferol

3.2.1 Tính tương thích hệ thống

Tiêm 6 lần mỗi dung dịch chuẩn kaempferol vào hệ thống sắc kí lỏng. Ghi nhận các thông số thời gian lưu (t_R), diện tích đỉnh (S), hệ số bắt đầu (As), hệ số dung lượng (k'), số

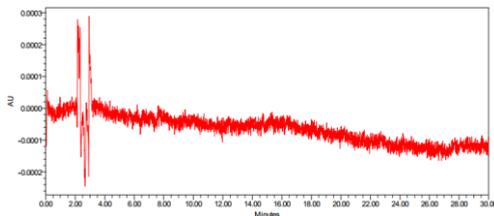
đĩa lí thuyết (N) của 6 lần tiêm để tính kết quả phân tích tính tương thích hệ thống.

Bảng 6 Kết quả thẩm định tính tương thích hệ thống của dung dịch thử

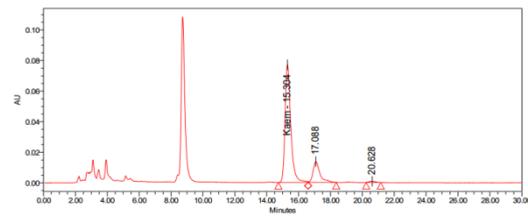
t _R (phút)	S (μV * s)	k'	As	N
15.461	1878556	4.85	1.35	9573
15.391	1907164	4.82	1.37	9402
15.346	1920794	4.80	1.39	9253
15.342	1927768	4.80	1.41	9228
15.304	1923970	4.79	1.41	9309
15.306	1915147	4.79	1.40	9451
TB = 15.358	TB = 1912233			
RSD = 0.39%	RSD = 0.94%			

Qui trình đạt yêu cầu về tính tương thích hệ thống, RSD % các giá trị t_R và S đều ≤ 2% (Bảng 6).

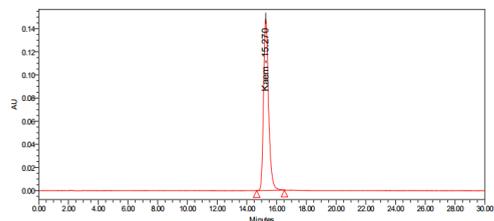
3.2.2 Tính đặc hiệu



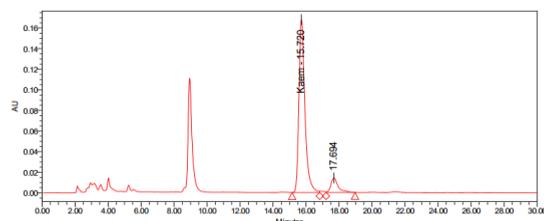
Hình 6 Sắc kí đồ mẫu trắng



Hình 8 Sắc kí đồ dung dịch thử



Hình 7 Sắc kí đồ dung dịch chuẩn



Hình 9 Sắc kí đồ mẫu thử thêm chuẩn

Bảng 7 Các thông số sắc kí khi phân tích mẫu thử

STT	Pic	t _R	Rs	USP Tailing
1	Kaempferol	15,304		1,39
2		17,088	2,74	1,60
3		20,628	4,9	1,14

Sắc kí đồ các mẫu thử (Hình 8) cho pic có thời gian lưu tương ứng với pic của kaempferol trong sắc kí đồ mẫu chuẩn (Bảng 7). Trên sắc kí đồ mẫu thử có xuất hiện thêm các pic khác không phải pic của kaempferol, nhưng tách hoàn toàn với pic của kaempferol (Rs > 1,5) (Hình 7).

Bảng 8 Các thông số sắc kí khi phân tích mẫu thử thêm chuẩn

stt	Rt	S _{pic-trước}	S _{pic-sau}
1	15,304	1918810	4234816
2	17,088	405357	431431
3	20,628	21955	#

Khi thêm kaempferol chuẩn vào vào mẫu thử, diện tích pic của pic kaempferol tăng lên (Bảng 8), trong khi diện tích pic của các pic còn lại thay đổi không đáng kể (Hình 9).

3.2.3 Độ chính xác

Bảng 9 Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp định lượng

STT	KL cân (g)	S thử	S chuẩn (30 μg/ml)	HL mg/viên
1	0.9978	1918810	1748803	1.651
2	0.9986	1908974	1748803	1.642
3	1.0008	1944339	1748803	1.668
4	0.9961	1875448	1748803	1.617
5	0.9978	1914453	1748803	1.648
6	1.0009	1971140	1748803	1.691
TB				1.653
RSD %				1.522%

Giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích pic của 6 lần tiêm mẫu thử là 1,522 % ≤ 2,0% (Bảng 9).

Phân tích 6 dung dịch mẫu thử khác nhau nhưng có nồng độ giống nhau. Hàm lượng viên trong 6 lần định lượng có kết quả lặp lại, vậy qui trình có tính chính xác.

3.2.4 Độ chính xác trung gian



Bảng 10 Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng

STT	KL cân (g)	S thử	S chuẩn (30µg/ml)	HL mg/viên
1	0.9964	1834555	1748803	1.581
2	0.9988	1832240	1748803	1.575
3	0.9956	1816382	1748803	1.567
4	0.9971	1843824	1748803	1.588
5	0.9967	1851033	1748803	1.595

6	0.9989	1860038	1748803	1.599
TB				1.584
RSD %				0.769

Độ chính xác trung gian: giá trị định lượng trung bình của ngày 1 và của cả hai ngày phải nằm trong khoảng 98,0 - 102,0% (Bảng 10).

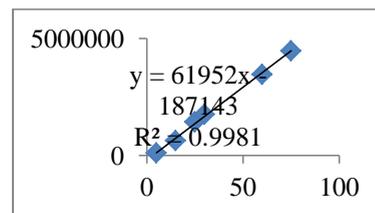
Giá trị RSD (%) kết quả định lượng của mỗi ngày và của hai ngày $\leq 2,0\%$.

3.2.5 Tính tuyến tính

Bảng 11 Kết quả xây dựng đường tuyến tính của kaempferol

Nồng độ (µg/mL)	S pic kaempferol
5	114483
15	641668
25	1443403
30	1748803
60	3465065
75	4473573

Dựa vào kết quả khảo sát cho thấy, hệ số B_0 không có ý nghĩa thống kê, hệ số B có ý nghĩa thống kê. Vậy phương trình hồi qui là $y = 61952x$ (trong khoảng nồng độ khảo sát: 5 – 75µg/ml) (Hình 10).

**Hình 10** Đồ thị tương quan giữa nồng độ các dung dịch đối chiếu và diện tích pic của kaempferol

3.2.6. Độ đúng

Kết quả phân tích độ phục hồi của kaempferol trên mẫu thử thêm chuẩn như sau (Bảng 11):

Bảng 11 Độ phục hồi của kaempferol

Chuẩn thêm vào	Lượng mẫu thử (µg)	Lượng thêm vào (µg)	S*	Lượng phát hiện (µg)	Độ phục hồi (%)
80%	680	550	3821447	553	100,5
		550	3838727	559	101,6
		550	3825328	554	100,8
100%	680	680	4234816	687	101,0
		680	4217828	681	100,2
		680	4258860	693	102,0
120%	680	816	4619277	811	99,4
		816	4657367	823	100,8
		816	4630057	814	99,8
RSD = 0,82%					

Độ phục hồi của qui trình khi định lượng các mẫu thử thêm chuẩn nằm trong khoảng 98,0 - 102,0% và giá trị $RSD \leq 2,0\%$ (Bảng 11). Vậy qui trình đạt yêu cầu về độ đúng.

4 Kết luận

- Phân lập kaempferol: chất đối chiếu kaempferol được bán trên thị trường với giá rất cao vì hàm lượng kaempferol trong dược liệu thấp. Các kaempferol và các flavonoid cùng nhóm flavon khác trong dịch chiết cùi lá Bạch quả khá giống nhau nên rất khó phân lập. Qui trình được xây dựng để phân lập kaempferol đơn giản, thời gian chạy cột ngắn, sử dụng hệ pha động đơn giản gồm $CHCl_3$, MeOH, EtOAc.

Khó khăn trong qui trình chiết xuất này là cần lựa chọn môi trường thủy phân phù hợp, để có hiệu suất chiết flavonoid dạng aglycon cao, vì nhóm này vốn có hàm lượng rất thấp trong lá Bạch quả.

- Xác định cấu trúc: xác định cấu trúc kaempferol phân lập được bằng các phương pháp phổ, kết quả đo phổ phù hợp với dữ liệu từ tài liệu tham khảo.

- Trong qui trình định lượng: qui trình định lượng xây dựng được có nhiều ưu điểm như thành phần dung môi đơn giản, an toàn cho thiết bị và dễ chuẩn bị; Sử dụng cột sắc kí phổ biến, dài 15-25cm, 5µm, thời gian lưu ngắn, độ phân giải giữa kaempferol và các flavonoid khác như quercetin và

isorhamnetin >2. Khi thẩm định, qui trình đạt tính phù hợp hệ thống, đặc hiệu, độ chính xác, tính tuyến tính và độ đúng.

- Đối tượng nghiên cứu là chế phẩm Tanakan® (IPSEN, Pháp), làm từ nguyên liệu cao lá Bạch quả chuẩn EGb 761.

Đây là loại cao đã được chuẩn hóa và chấp thuận rộng rãi ở các nước Châu Âu, đảm bảo các flavonoid có hàm lượng cao. Thực tế sử dụng cho thấy, chế phẩm Tanakan® cải thiện đáng kể tình trạng thiếu máu não, suy giảm trí nhớ ở người lớn tuổi.

Tài liệu tham khảo

1. Thái Nguyễn Hùng Thu (2010), *Nghiên cứu chiết xuất tinh chế kaempferol từ đơn lá đồ để làm chất đối chiếu trong kiểm nghiệm*, Tạp chí Dược học 408 (50), tr.45-47.
2. The Directorate for The Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (2013), EP 8.0, *Ginkgo dry extract, refined and quantified*, pp. 1257, pp. 1258.
3. Sharma Priyanka (2012), *Isolation and characterization of quercetin and kaempferol in vivo and in vitro from Pedalium murex*, International research Journal of Pharmacy, 3(6), pp. 184-187.
4. Ngô Văn Thu (2011), *Dược liệu học tập 1*, Nhà xuất bản Y học, tr. 374, 413 – 416.
5. Tokuçoğlu Ö.(2003), “*HPLC-UV and GC-MS Characterization of the Flavonol Aglycolcs Quercetin, Kaempferol, and Myricetin in Tomato Pastes and Other Tomato-based Products*”, ACTA Chromatographica, 13, pp. 196-206.
6. Shimadzu Corporation, *Analysis of Flavonoida in Ginkgo Biloba Extracts Application news - High Performance Liquid chromatography*, No.L405, pp.1,2.
7. Zu Y., (2006), “*Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaves by RP-HPLC with DAD*”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41, pp. 714- 719.
8. Diniatik, Suwijiyono Pramono, Sugeng Riyanto (2017), *Kaempferol from stelechocarpus burahol, (bl.) Hook f. & th. Leaves and Xanthine oxidase inhibition activity*, Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 10 (4), pp. 322-328.
9. Filip Cuyckens and Magda Claeys (2003), *Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids*, Journal Of Mass Spectrometry, 2004 (39), pp. 1–15.
10. Yeqing Chen (2015), *Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration*, Molecules ISSN 1420-3049, 2015 (20), pp. 18352-18366.
11. Handbook of Analytical chemistry, No.7: Analysis of NMR spectra, Chemical Industry Press, Pekin (ISBN 7-5025-2474-6)

Isolation of kaempferol from the leaves of Ginkgo biloba and establishing a quantitative evaluation procedure of Kaempferol in preparations containing *Ginkgo biloba* extracts

Nguyen Tuong Van

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

ntvan@ntt.edu.vn

Abstract The aim of this research is to develop a procedure to isolate kaempferol from Ginkgo leaves extract, and then use the isolated kaempferol to validate the quantification method. Flavonoids in ginkgo leaves were extracted using 96 % ethanol. These flavonol glycosides, which are hydrolysed in the presence of hydrochloric acid, convert to aglycones. Flavonol aglycones were then extracted from the hydrolysing solution with ethyl acetate. The solvent was evaporated under reduced pressure to produce crude flavonol aglycones named C2. Kaempferol was then purified from C2 by traditional column chromatography twice. The first mobile phase required mixing petrol ether and ethyl acetate, acquiring PDD1. PDD1 was then repeatedly crystallized in acetone, to achieve PDD2, supposedly composed of kaempferol, quercetin and isorhamnetin. Kaempferol in this fraction was then purified by traditional column chromatography with a mobile phase composed of chloroform and methanol. After that, The isolated kaempferol was characterized in terms of purity (Thin layer chromatography and High Performance Liquid Chromatography-HPLC) and structures (IR, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR). Kaempferol was eventually used as a standard to establish and validate the qualification method applied for Tanakan® by replacing phase HPLC with PDA detector. After being validated, the procedure meets the requirements of specificity, repeatability, intra-day and inter-day precision, linearity, and exactitude.

Keywords Ginkgo leaves extract, kaempferol, isolate, column chromatography, High Performance Liquid Chromatography

