

高效液相色谱法测定银杏叶制品中总黄酮

第三军医大学西南医院药剂科(重庆 630038) 刘松青* 唐先哲 马文秀 孔艳丽**

摘要 采用HPLC法测定了银杏叶浸膏干粉及银杏叶胶囊中总黄酮含量。采用YWG-C₁₈柱, 甲醇-水-冰醋酸(40:57.5:2.5, V/V)为流动相, 检测波长254nm。样品中10种成分分离较好以芦丁为对照外标法定量, 线性范围0.5~2.5μg, $r=0.9996$, 加样回收率为104.2% (RSD=3.3%)。

关键词 银杏叶制剂 黄酮类 HPLC

银杏树为银杏科植物银杏*Ginkgo biloba* L., 又名公孙树, 为我国的特产植物^[1]。银杏主要药理作用的有效成分都是从银杏叶和银杏的外种皮中提取而得到的, 银杏叶中黄酮类化合物含量较高, 有黄酮、黄酮醇及其甙类、儿茶素类和双黄酮类, 此类化合物具防治心血管疾病的功能^[2]。目前国内已生产了银杏叶浸膏制剂, 其含量测定采用比色法^[3]。而国外则以HPLC法测定银杏叶制剂中黄酮含量来控制其内在质量^[4,5]。

本文采用HPLC法, 以芦丁为标准物, 测定了银杏叶浸膏和银杏叶胶囊中总黄酮含量, 其结果与化学比色法比较, 重现性好, 干扰因素少, 更能反映其内在质量, 对于该药材制品的质量评价及控制具有一定作用。

1 仪器与试剂

DU-70型紫外分光光度计(Beckmen), Waters液相色谱系统(包括510泵, 484可变波长紫外检测器, Baseline 810计算机控制及处理系统), 25μl进样器。

芦丁、槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所), 银杏叶浸膏干粉(桂林思特新技术公司天然植物制品厂、重庆中药研究所各1批), 银杏叶胶囊(海南医药工业研究所提供, 1批)。甲醇(色谱纯), 其它试剂均为分析纯。

2 色谱条件及色谱行为

YWG C₁₈柱(10μl, 4.6mm×300mm, 大连化物所); 流动相: 甲醇-水-冰乙酸(40:57.5:2.5, v/v); 流速1.0ml/min; 柱温32±1℃; 检测波长: 254nm; 灵敏度0.05A.U.F.S。

在该色谱条件下芦丁、槲皮素标准品及样品色谱图见图。从图中可见银杏叶制剂在该色谱条件下能出现10个分离较好的峰, 其中有2个峰与芦丁、槲皮素峰相对应。

3 供试品溶液的制备

取银杏叶浸膏干粉适量(相当总黄酮50mg), 于10ml容量瓶中, 加甲醇溶解, 摇匀, 稀释至刻度, 精密量取1ml于10ml容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 备用。

取银杏叶胶囊20粒, 取出内容物, 混匀, 精密称量约1g, 加甲醇50ml, 加热回流2h, 放冷, 倾出上清液, 残渣加甲醇20ml回流1h, 放冷, 倾出上清液, 残渣再加甲醇适量洗涤3次, 合并上清液和洗液, 置100ml容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 备用。

4 标准曲线制备

4.1 HPLC法: 准确称取芦丁对照品约5mg, 用甲醇溶解定容至10ml, 用微量进样器吸取

*Address: Liu Songqing, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing

**贵阳中医学院中药系九0级实习生

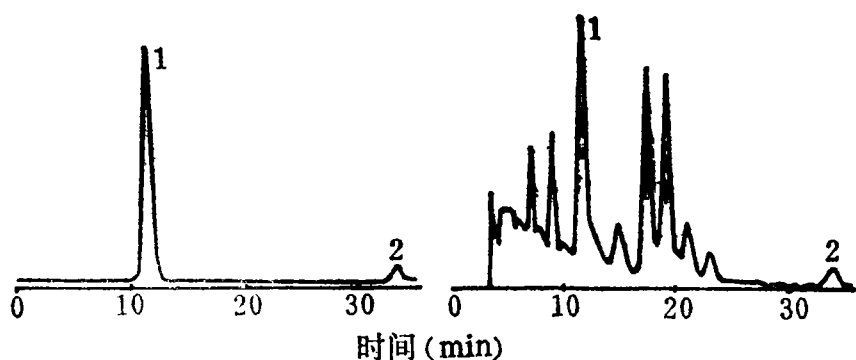


图 1 色谱图

左-标准品
1-芦丁

右-样品
2-银叶浸膏

对照品溶液10、15、20、25、30 μ l注入色谱仪,记录色谱图,测定峰面积。用芦丁峰面积(R)对进样量(C , μ g)进行线性回归,得回归方程: $C = 0.62273 \times 10^{-6}R - 0.0353$ ($r = 0.9996$)。峰面积与进样量的线性范围为0.5~2.5 μ g。

4.2 比色法^[3]:精密称取芦丁5mg,置50ml容量瓶中,用60%乙醇适量置水浴上加热溶解,放冷,用60%乙醇稀释至刻度,摇匀,准确吸取0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml分别置于10ml容量瓶中,各加30%乙醇使成5ml,先加5%亚硝酸钠溶液0.3ml,摇匀,放置6min,再加10%硝酸铝溶液0.3ml,摇匀,再放6min,加4%NaOH 4ml,用水稀释到10ml,放置10~20min,在波长510nm处测定吸收度,以吸收度对浓度(C , μ g)进行回归,其回归方程为: $C = 0.92507A - 0.0925$ ($r = 0.9996$)。

5 空白试验和回收率试验

按处方配比,取淀粉、硬脂酸镁等辅料,经样品处理得空白液,经色谱分析未见有干扰峰。

精密称取3份批号为940108的银杏叶胶囊中内容物0.8g,然后分别加入精密称量的芦丁对照品约10mg,按样品处理项下操作,制得待测液,依法进行测定,计算回收率,结果为104.2% ($RSD = 3.3\%$)。

6 样品测定

6.1 HPLC法:取银杏叶浸膏干粉供试液和银杏叶胶囊(平均粒重为0.2g)供试液分别进样20 μ l,记录色谱峰,测定所有峰面积之和,代入相应回归方程,计算含量结果见表。

6.2 比色法:精密量取银杏叶浸膏干粉供试液各0.5ml及银杏叶胶囊供试液5ml,分别置于10ml容量瓶中,按标准曲线法操作,在波长510nm处测吸收度,按标准曲线计算含量,结果见表。

7 讨论

7.1 HPLC法与比色法比较,后者结果较前者高,其原因可能是采用HPLC法时,流动相极性较大,有一些极性小的双黄酮及甙元未被洗脱所致。但采用HPLC法相对干扰少,重现

(下转第489页)

表 1 样品测定结果 ($n = 3$)

样品名称	HPLC法		比色法	
	平均含量 (%)	RSD (%)	平均含量 (%)	RSD (%)
银杏叶胶囊 (940108)	5.572	3.30	7.358	6.49
银杏叶浸膏干粉 (桂林产品)	23.22	1.52	25.28	5.64
银杏叶浸膏干粉 (重庆产品)	1.692	3.40	8.46	6.42

性好,更能反映其内在质量,并与国外方法相一致。

7.2 从2批银杏叶浸膏干粉分析结果可见其含量相差甚远,其原因可能是两者采用不同工艺所致,桂林产品采用喷雾干燥法,其含量较高,而重庆产品采用烘烤法,则含量较低,提示在高温烘烤过程中一些甙被破坏。

7.3 文献^[6]报道采用HPLC法测定水解后银杏制剂中黄酮甙元的含量来作制剂定量依据,而本法不需水解,且能反映制剂中多个峰的大小及相对比例,故更能反映制剂的内在质量。

7.4 银杏叶制剂除含主药银杏叶提取物外,还含有占较大比例的辅料(如:淀粉,硬脂酸镁等)。采用两次甲醇加热回流法,可使黄酮类成分提取完全。

7.5 采用芦丁作对照品定量所有峰不太科学,如能找到更多对照品,并分别计算,该法会更完善。

参 考 文 献

- 1 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志.北京:科学出版社,1978.18
 - 2 游松,等.沈阳药学院学报,1988,5(2):142
 - 3 江苏省卫生局编.江苏省药品标准(1977).南京:江苏科学技术出版社,1987.374
 - 4 CPI(B),1991,(9114):39
 - 5 Hasler A, et al. J Chromatogr, 1992, 605: 41
 - 6 陶巧凤,等.中成药,1994,15(12):14
- (1994-07-11收稿)

欢迎订阅 1996年《中国中药杂志》

中国中药杂志由中国药学会主办,中国中医研究院中药研究所承办,为综合性中药学术刊物,普及与提高相结合,国内外公开发行。主要报道中药的本草、资源、栽培、鉴定、炮制、药剂、化学、药理、中药理论、临床、合理用药等方面的研究成果与经验。读者对象是从事中药生产、企业管理、药房、科研教学及医疗等单位的中医药工作人员。

本刊为月刊,每期定价5.00元全国各邮局均可订阅。本刊邮发代号2—45,国外代号M399,国内统一刊号CN11—2272/R。

《中国药学杂志》(原名《药学通报》)1996年征订启事

中国药学杂志系1953年创刊,为中国药学会主办的12种期刊之一。

本刊为综合性学术刊物,内容包括药学各科,如药剂学、临床药学、药理学、药物分析、药品生物化学、中药及天然药物,等等。辟有专题笔谈、药品生产、中药及天然药药理、药剂、药品质量及检验、药物与临床、药物相互作用、药物不良反应、新药评介、新药研究、药学史、学术讨论、科研简报等20多个栏目。适合药学教学、科研、生产、营销等各级药学工作者以及其他医药卫生人员需要。欢迎订阅,每本定价5元,全年60元,各地邮局均可订阅。万一漏订,可直接向本刊编辑部邮汇订阅。地址:北京东四西大街42号,邮编:100710。本刊国内统一刊号CN11—2162/R,邮发代号:2—232。

《中国医院药学杂志》1996年征订启事

《中国医院药学杂志》系中国药学会主办的国内外公开发行的专业性学术期刊,旨在交流和推广医院药学成果和实验经验,提高医院药学工作者的学术水平,促进我国医院药学事业的发展,本刊栏目有实验研究、临床药学、科技交流、经验介绍、中西药制剂、医院制剂质量控制,药剂科的科学管理与改革经验、临床医师、医药院校师生、医药研究单位专业人员、药厂研究人员等。本刊为月刊,每月18日出版。1996年本刊为彩色封面彩色广告,每期定价4.5元,欢迎订阅。

本刊邮发代号38—50 国内统一刊号CN42—1204/R, ISSN1001—5213。

ABSTRACTS OF ORIGINAL ARTICLES

Studies on the Chemical Constituents of Sagittate Epimedium

(*Epimedium sagittatum*)

Wu Qinli, Zhao Yanqing, Li Zhulian

From *Epimedium sagittatum* Maxim, three compounds were isolated. They are β -sitosterol, β -sitosterolglucoside and a new flavone compound I. By spectroscopic and chemical methods, I was elucidated as 5-hydroxy-6, 7-dimethoxy-3', 4'-methylene-dioxyflavone.

(Original article on page 451)

Studies on the Chemical Constituents of Korean Epimedium(*Epimedium koreanum*)

Li Wenkui, Zhang Ruyi, Xiao Peigen

Eight compounds were isolated from the aerial parts of *Epimedium koreanum* Nakai. Their structures were identified as daucosterol(I), icariin(II), epimedoside-C(III), hyperoside(IV), quercetin(V), icariside I(VI), baohuoside-I(VII) and icaritin(VIII) by physico-chemical properties and UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR and MS. Among them I, IV, V, VI, and VII were isolated from the plant for the first time.

(Original article on page 453)

Analysis and Preparation of γ -Linolenic Acid from Seed Oil of Common

Borage (*Borago officinalis*)

Sun Qiliang

GC-MS analysis showed that seed oil of *Borago officinalis* contains up to 20.01% γ -linolenic acid. Urea fractionation-vacuum distillation separation allowed us to obtain fractions of methyl- γ -linolenate of 92.8% purity at a yield of 50%.

(Original article on page 456)

Determination of Flavonoids in Leaf Extract Preparations of Ginkgo

(*Ginkgo biloba*) by HPLC

Liu Songqing, Tang Xianzhe, Ma Wenxiu, et al

Quantitative HPLC method was developed for the determination of flavonoids in extract preparations of leaves of *Ginkgo biloba* L. YWG-C₁₈ column was used with a mobile phase of methanol-water-glacial acetic acid (40:57.5:2.5, V/V) and detected at 254nm. The flow rate was 1.0ml/min. Ten Peaks were observed. Rutin was used as external standard and the calibration curve was linear over the range of 0.5~2.5 μg ($r=0.9996$). The extraction recovery was 104.2% (RSD=3.3%). Compared with the results of chemical colorimetric analysis, the method has a better reproducibility and more information about the flavonoids in *G. biloba* can be obtained.

(Original article on page 461)

Comparative Study on the Extraction Process for the Preparation of Maxingshigan Pill

He Qun, Luo Jiying, Deng Qingping

Influence of extraction process on the quality of Maxingshigan pills was studied. Guided by the amount of ephedrine in the extraction as determined by dual wavelength TL-