

HPLC 法测定银杏叶粉针中总黄酮醇苷和萜类内酯

陈香爱,袁志芳,张兰桐

(河北医科大学药学院 药物分析教研室,河北 石家庄 050017)

摘要:目的 采用高效液相色谱法测定银杏叶粉针中总黄酮醇苷和总萜类内酯。方法 黄酮醇苷水解后,采用 HPLC-UV 法测定;萜类内酯用醋酸乙酯萃取后采用 HPLC-ELSD 法测定。结果 槲皮素、山柰素、异鼠李素分别在 5.104~51.04、5.000~50.00、1.38~13.8 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系,平均回收率分别为 99.34%、99.25%、101.2%($n=5$);银杏内酯 A、B、C 及白果内酯分别在 0.415~2.075、0.402~2.010、0.426~2.130、0.803~4.015 mg/mL 呈良好线性关系,平均回收率分别为 99.28%、100.1%、101.0%、99.31%($n=5$)。结论 本实验采用的方法简便快速,结果准确,重现性好,可用于银杏叶粉针中黄酮和萜类成分的质量控制。

关键词:银杏叶粉针;黄酮醇苷;银杏萜内酯 A、B、C;白果内酯

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)09-1333-03

HPLC Determination of flavone glycosides and terpenlactones in *Ginkgo biloba* Leaves Powdery Injection

CHEN Xiang-ai, YUAN Zhi-fang, ZHANG Lan-tong

(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Key words: *Ginkgo biloba* Leaves Powdery Injection; flavone glycosides; ginkgolide A, B, and C; bilobalide

银杏叶性甘,味苦、涩、平,归心、肺经,有敛肺、平喘、活血化瘀、止痛之功,用于治疗肺虚咳嗽、冠心病、心绞痛、高脂血症等^[1]。银杏叶所含黄酮类成分和萜类内酯为其重要有效成分,对这些有效成分的控制可直接反映银杏叶制剂的质量。为了更好地控制自行研发的新药银杏叶粉针的质量,本实验采用 HPLC-UV 法测定了黄酮醇苷成分,并采用 HPLC-ELSD 法测定了萜类内酯,取得了满意的结果。

1 仪器与试剂

Waters 1525 液相色谱仪, Waters 2487 紫外检测器, Waters 2420 蒸发散射光检测器, Empower Project 色谱工作站, SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

槲皮素,山柰素,异鼠李素,白果内酯,银杏内酯 A、B、C 对照品(批号分别为 100081-200406、110861-200405、110860-200406、110865-200404、110862-200305、110863-200507、110864-200304,定量测定用)均购自中国药品生物制品检定所;银杏叶粉针剂为本院研制,每支平均装量为 0.212 g;甲醇、乙腈为色谱纯,水为二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 总黄酮醇苷的测定

2.1 色谱条件:色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.4%磷酸(50:50);体积流量为 1.0 mL/min;检测波长:360 nm;灵敏度:0.5 AUFS。理论板数按槲皮素计算不低于 2 500,山柰素峰与异鼠李素峰的分度度大于 1.5。

2.2 对照品溶液的制备:取槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量,精密称定,加甲醇制成分别含 0.0316、0.0315、0.0077 mg/mL 的混合溶液,即得。

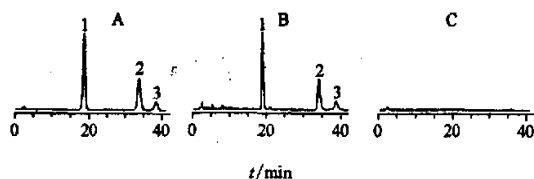
2.3 供试品溶液的制备:取内容物约 0.42 g,精密称定,加甲醇-25%盐酸(4:1)溶液 25 mL,置水浴中加热回流 30 min,迅速冷却至室温,转移至 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 空白干扰试验:取制备银杏叶粉针的辅料,按成药生产工艺和供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液和阴性对照溶液各 20 μL ,进样测定。结果表明,样品中槲皮素、山柰素、异鼠李素与其他相邻峰分离良好,且阴性对照在相应的位置无干扰,见图 1。

收稿日期:2006-12-25

作者简介:陈香爱(1980-),女,河北河间人,河北医科大学药学院 2004 级硕士研究生,主要从事中药质量标准及指纹图谱研究。

* 通讯作者 张兰桐 Tel: (0311)86266419 Fax: (0311)86052053 E-mail: zhanglantong@263.net



1-槲皮素 2-山奈素 3-异鼠李素
1-quercetin 2-kaempferol 3-isorhamnetin

图1 对照品(A)、样品(B)、空白样品(C)色谱图

Fig.1 Chromatograms of reference substance (A),

sample (B), and blank sample (C)

2.5 标准曲线的制备:取槲皮素、山奈素和异鼠李素对照品适量,精密称定,加甲醇制成分别含0.255 2、0.250 0、0.069 2 mg/mL的混合溶液。分别精密吸取0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL置25 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。分别取20 μ L,注入液相色谱仪,测定峰面积,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,槲皮素、山奈素和异鼠李素线性范围分别为5.104~51.04、5.000~50.00、1.38~13.8 μ g/mL,回归方程分别为 $Y=90\,499\,X-18\,271$ ($r=0.999\,3$)、 $Y=81\,433\,X-7\,202.5$ ($r=0.999\,8$)、 $Y=105\,249\,X-4\,654.2$ ($r=0.999\,3$)。

2.6 精密度试验:取同一供试品溶液重复进样6次,记录峰面积。结果槲皮素、山奈素和异鼠李素峰面积的RSD分别为0.69%、0.96%、1.45%。

2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液于0、2、4、6、8、24 h进样,记录其峰面积。结果供试品溶液在24 h内稳定性良好,槲皮素、山奈素和异鼠李素峰面积的RSD分别为2.79%、1.66%、2.91%。

2.8 重复性试验:取批号051101样品,按供试品溶液的制备方法平行制备6份,进样测定,计算得3种黄酮苷元的质量分数分别为4.162、4.175、1.013 mg/g, RSD分别为0.45%、0.56%、2.04%。

2.9 加样回收率试验:取批号051101样品约0.21 g,精密称定,精密加入槲皮素、山奈素和异鼠李素质量浓度分别为0.322、0.321、0.074 mg/mL的混合对照品溶液2.5 mL,制备供试品溶液,进样测定。结果槲皮素、山奈素和异鼠李素的平均回收率分别为99.34%、99.25%、101.2%, RSD分别为1.23%、0.98%、1.02% ($n=5$)。

2.10 样品测定:取3批样品,每批平行做3份,制备供试品溶液,进样测定,采用外标一点法计算,并采用总黄酮醇苷的质量分数=(槲皮素质量分数+山奈素质量分数+异鼠李素质量分数) $\times 2.51$ 计算,结果见表1。

表1 3批样品中总黄酮醇苷的测定结果

Table 1 Determination of flavone glycosides
in three batches of samples

批号	槲皮素/ (mg $\cdot$ g $^{-1}$)	山奈素/ (mg $\cdot$ g $^{-1}$)	异鼠李素/ (mg $\cdot$ g $^{-1}$)	总黄酮醇苷/ (mg $\cdot$ g $^{-1}$)
051101	4.159	4.171	1.009	23.44
051102	4.135	4.156	1.016	23.36
051103	4.169	4.158	0.998	23.41

3 萜类内酯的测定

3.1 色谱条件:色谱柱为Diamondsil C₁₈色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);甲醇-水为流动相梯度洗脱, 0~20 min;甲醇31%~45%, 20~25 min;甲醇45%~31%;体积流量:1.0 mL/min;ELSD检测器,漂移管温度为60 $^{\circ}$ C,氮气流量为25 psi,喷口温度35 $^{\circ}$ C,进样量20 μ L。

3.2 对照品溶液的制备:分别精密称取银杏内酯A、B、C和白果内酯对照品适量,加甲醇制成各含1.03、1.16、0.85、2.36 mg/mL的混合溶液,即得。

3.3 供试品溶液的制备:取内容物约1.2 g,精密称定,加水10 mL,振摇使溶解,用2%盐酸溶液调节至pH 2,用醋酸乙酯振摇提取4次(15、10、10、10 mL),合并提取液,用5%醋酸钠溶液20 mL洗涤,分取醋酸钠液,再用醋酸乙酯10 mL洗涤,合并醋酸乙酯提取液和洗液,用水洗涤2次,每次20 mL,分出水洗液,用醋酸乙酯10 mL洗涤,合并醋酸乙酯液,回收醋酸乙酯至干,残渣用丙酮溶解并转移至5 mL量瓶中,加丙酮至刻度,摇匀,即得。

3.4 空白干扰试验:取制备银杏叶粉针的辅料,按成药的生产工艺和供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液和阴性对照溶液各20 μ L,进样测定。结果表明,样品中银杏内酯A、B、C,白果内酯与其他组分分离较好,且阴性对照在相应的位置无干扰,见图2。

3.5 标准曲线的制备:分别精密称取银杏内酯A、B、C和白果内酯对照品适量,加甲醇制成各含2.075、2.010、2.130、4.015 mg/mL的混合溶液。分别进样4、8、10、16、20 μ L,测定峰面积。以质量浓度的对数值为横坐标,峰面积的对数值为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,银杏内酯A、B、C和白果内酯线性范围分别为0.803~4.015、0.415~2.075、0.402~2.010、0.426~2.130 mg/mL,回归方程分别为 $\ln Y=1.338 \ln X+5.385\,3$ ($r=0.998\,8$)、 $\ln Y=1.5153 \ln X+5.198\,1$ ($r=0.997\,3$)、 $\ln Y=1.4182 \ln X+4.773\,6$ ($r=0.995\,9$)、 $\ln Y=1.241 \ln X+5.551\,7$ ($r=0.994\,6$)。

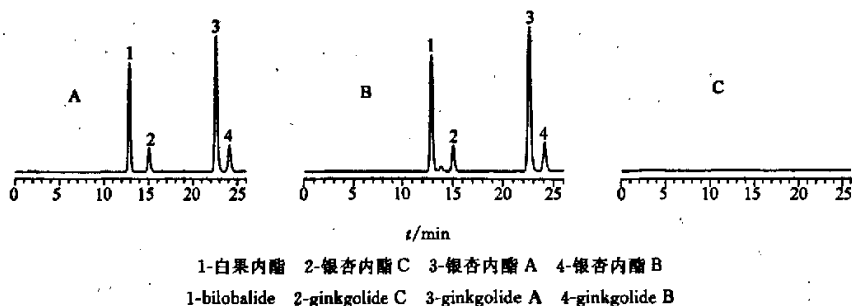


图2 对照品(A)、样品(B)和空白样品(C)的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of reference substance (A), sample (B), and blank sample (C)

3.6 精密度试验:取同一供试品溶液重复进样6次,记录峰面积。结果表明,银杏内酯A、B、C和白果内酯峰面积的RSD分别为1.59%、1.36%、2.14%、1.48%。

3.7 稳定性试验:取同一供试品溶液于0、2、4、6、8、24 h进样测定,记录其峰面积。结果供试品溶液24 h内稳定性良好,银杏内酯A、B、C和白果内酯峰面积的RSD分别为2.36%、1.98%、2.56%、2.37%。

3.8 重复性试验:取批号051101样品,按供试品溶液的制备方法平行制备6份,进样测定,计算,得4种内酯的质量分数分别为3.795、1.605、2.165、1.514 mg/g, RSD分别为2.12%、1.90%、0.80%、1.76%。

3.9 加样回收率试验:取批号051101样品约0.6 g,精密称定,精密加入质量浓度分别为2.630、0.301、1.196、0.803 mg/mL内酯混合对照品溶液1 mL,依法操作,测定。结果银杏内酯A、B、C和白果内酯的平均回收率分别为99.28%、100.1%、101.0%、99.31%, RSD分别为1.69%、2.11%、2.51%、1.38% (n=5)。

3.10 样品测定:取3批样品,每批平行3份,制备供试品溶液,进样测定峰面积值,采用外标法两点法计算银杏叶粉针中银杏内酯A、B、C和白果内酯的质量分数,结果见表2。

4 讨论

采用HPLC法测定银杏萜类内酯所用流动相有甲醇-水^[2]、四氢呋喃-异丙醇-水^[3]系统,经比较发现甲醇-水系统已可满足定量要求,但等梯度洗脱分离度不满意,采用二元梯度洗脱的方法,银杏内酯A、B、C和白果内酯4种内酯的分离可满足定量要求。此外,还将量较低而且生理活性不明显的银杏内酯J与相邻的银杏内酯C达到基线分离,色谱图显示基线

表2 3批样品中内酯的测定结果

Table 2 Determination of lactones in three batches of samples

批号	银杏内酯A/ (mg·g ⁻¹)	银杏内酯B/ (mg·g ⁻¹)	银杏内酯C/ (mg·g ⁻¹)	白果内酯/ (mg·g ⁻¹)	总量/ (mg·g ⁻¹)
051101	3.798	1.601	2.171	1.516	9.086
051102	3.698	1.612	2.147	1.522	8.979
051103	3.681	1.623	2.089	1.504	8.897

平稳,杂质峰很少,效果满意。同一样品采用四氢呋喃-异丙醇-水系统为流动相时的响应值远远小于以甲醇-水系统为流动相时的响应值,灵敏度较低。且由于四氢呋喃容易被氧化,该系统稳定性较差。

不同的流动相系统对4种内酯出峰顺序有很大影响,甲醇-水系统中各成分的出峰顺序为白果内酯、银杏内酯C、银杏内酯A和银杏内酯B;四氢呋喃-异丙醇-水系统中各成分的出峰顺序为银杏内酯C、白果内酯、银杏内酯A、银杏内酯B;在甲醇-水系统中加入四氢呋喃时,四氢呋喃-甲醇比例的改变,可导致4种成分出峰顺序的改变。这可能与流动相的极性、4种成分的分子结构以及与有机相的亲力和力有关。

ELSD检测的漂移管温度和载气流量是影响试验的两个关键性参数。在ELSD的气化室中,载气流量对信号影响很大,太低或太高均导致信号不够准确。而漂移管温度降低时,溶剂挥发不够完全;温度高时则样品颗粒挥发导致检测仪响应下降。本实验采用的检测条件可行性较好,是通过反复试验、综合评价得出的。

References:

- [1] Ch P (中国药典)[S]. Vol 1. 2005.
- [2] Yan Y Z, Xie P S. Assay of terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves by RP-HPLD-ELSD [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21(3), 173-176.
- [3] Zhang Y Z, Zhou Y Q, Wang J, et al. Determination of terpenelactones in Yinxingye Soft Capsule by HPLC-ELSD [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2005, 27(1), 22-24.