复合银杏叶片中总黄酮的含量分析

池玉梅　潘苏华
(南京中医药大学,江苏 南京　210029)

复合银杏叶片系根据养阴活血中医理论组方而成。其主要原料为银杏叶提取物,并添加多种天然植物和营养素。药理实验证实,该复合片具有调节血脂、选择性升高高密度脂蛋白水平及抗氧化等多种功效。黄酮为其主要有效成分。有关银杏叶黄酮成分的定量分析方法,报道较多,有分光光度法[1]、胶束毛细管电脉法[2]和 HPLC。[3~6]为有效地控制产品质量,本文研究了该复合片经酸水解后,以甲醇、四氢呋喃、2 %甲酸水溶液组成的三元溶剂系统为流动相,进行高效液相色谱分析的分析方法,黄酮成分(槲皮素、异鼠李素、山奈素)之间成基线分离,其它多种添加成分无干扰。本法简便,重现性好,准确度高。

1　材料与方法

1.1　**仪器和试剂**　Shimadzu-10A 高效液相色谱仪系统;SPD-10A 紫外检测器;Class-10A 色谱工作站。

试剂为色谱纯和分析纯,水为重蒸水,槲皮素含量 > 99.5 %(中国药品生物制品检定所)。

1.2　**方法**

色谱条件　色谱柱　Shim-Pack CLC ODS 柱(150 mm ×6.0 mm,5 μ);流动相　甲醇 - 四氢呋喃 - 2 %甲酸(18∶25∶57);流速　1.0 mL/min;检测波长　370 nm;Atten:6;柱温　25 ℃。

试样预处理条件　以甲醇 - 25 % HCl(7∶1)[3]和甲醇 - 25 % HCl(4∶1)[1]的条件水解,测定结果差异较大。本法比较了用不同浓度稀盐酸(3,4,5 mol/L)进行水解以及甲醇 - 25 %(体积分数)HCl 的不同比例对水解的影响,结果以甲醇 - 25 %(体积分数)HCl(4∶2)水解最完全。同时考察了水解时间(30,60,90,120 min)和回流温度的影响,结果表明 80 ℃~90 ℃时无显著差异,水解时间以 90 min 为宜。

2　结果与分析

线性关系考察　精密称取置干燥器内 48 h 以上的槲皮素 2.5 mg,以甲醇溶解定容至 50 mL,得对照品溶液 0.05 mg/mL,依次进样 2、4、6、8、10 μL 各三次,以浓度对峰面积进行线性回归,得回归方程:$A = 3.658 \times 10^6 C + 9\,132$,$r = 0.999\,5$,其线性范围为 0.02~0.8 μg。

精密度和稳定性试验　对照品溶液 0.0518 mg/mL,进样 10 μL 连续 6 次,结果依次为 0.504,0.527,0.513,0.517,0.527,0.514 μg,平均 0.517 μg,精密度 *RSD* 为 1.72 %。用同一浓度的试样,每隔 1 h 进样测定,连续 6 h,其 *RSD* 为 1.56 %。(见表 1)

表 1　试样稳定性　mg/g

t/h	槲皮素	异鼠李素	山奈素	总黄酮	*RSD* %
1	13.64	2.09	10.20	65.1	1.56
2	13.77	2.13	10.28	65.7	
3	13.92	2.15	10.36	66.3	
4	13.50	2.07	10.00	64.2	
5	13.60	2.16	10.41	65.7	
6	13.87	2.19	10.70	67.2	

试样测定和重复性试验　取本品 20 片,精密称定,研细,称取 0.25 g(相当于一片的量),置 50 mL 容量瓶中,加甲醇 - 25 %(体积分数)盐酸(4∶2)混合液,使溶解,并稀释到刻度,摇匀,精密吸取 10 mL,置 50 mL 回流瓶中,于(85 ±5) ℃水浴中回流 90 min,取出冷却后,全部转移到 25 mL 容量瓶中,以甲醇稀释到刻度,过 0.45 μm 膜,10 μL 进样分析,采用外标法以槲皮素校正曲线分别计算出试样水解后槲皮素、异鼠李素、山奈素的含量,按下式计算,即得总黄酮甙的含量。总黄酮含量 = (槲皮素 + 异鼠李素 + 山奈素) ×2.51。结果见表 2。

表 2　试样中总黄酮的测定结果($n = 3$)　mg/g

	981219	981220	981221
槲皮素含量	12.10	12.13	12.16
异鼠李素含量	2.02	2.01	2.02
山奈素含量	8.97	9.11	9.15
总黄酮含量　mg/片	15.33	15.28	15.30
RSD %	1.29	0.44	0.97

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

按上法对批号为 981219 的试样重复处理 6 次,测定总黄酮含量,其 *RSD* 为 2.12 %。试样、空白及对照品的色谱图见图 1,结果显示复合片中其它成分在本实验条件中不产生干扰。

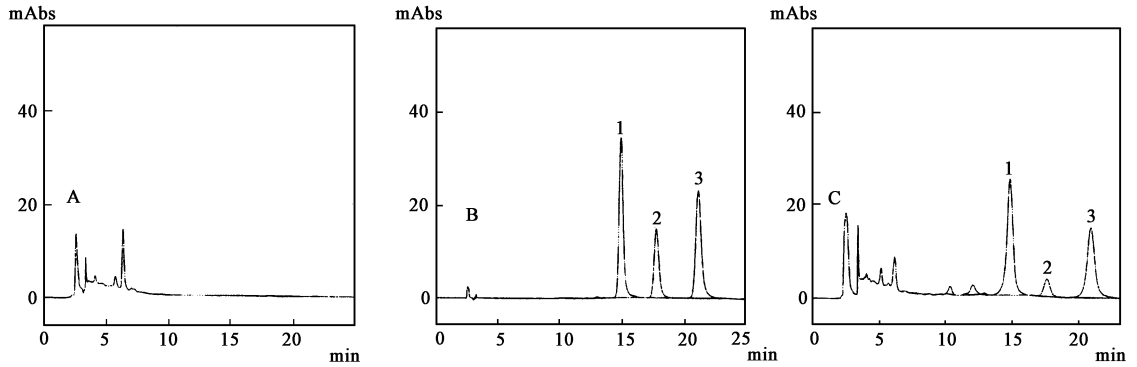

图 1　色谱图

(A 空白,B 混合对照品,C 试样;1. 槲皮素　2. 异鼠李素　3. 山奈素)

加标回收试验　称取试样约 0.13 g 及对照品约 2 mg,余下处理同试样测定,结果见表 3。

表 3　槲皮素加标回收试验　%

加标量 mg	本底值 mg	测定值 mg	回收率	平均回收率	*RSD*
2.11	1.824	3.962	101.4		
2.11	1.824	3.988	102.6		
2.03	1.935	3.823	93.00	100.3	3.84
2.03	1.935	3.959	99.70		
1.69	1.770	3.475	100.9		
1.69	1.770	3.528	104.0		

3　讨论

色谱条件的选择　经岛津 UV2401 扫描显示,3 种物质最大吸收波长均在 370 nm 处,故本法用 370 nm 作为检测波长。本法比较了酸性甲醇洗脱系统,[5,6]酸性四氢呋喃洗脱系统,[4]结果显示异鼠李素与山奈素出峰次序互倒,但均不能很好分离,本法选择三元溶剂体系即甲醇 - 四氢呋喃 - 酸性水调节适当比例,能达到基线分离。

含量计算　有关测定银杏叶及提取物中总黄酮甙含量的计算方法以及应用槲皮素作为对照品均有报道。[3,5,7]银杏叶含多种黄酮甙化合物,但由于活性较强的带有香酰基的黄酮醇甙含量较低,且对照品(标准品)难得,使直接测定黄酮甙不能实现。鉴于银杏叶中的黄酮类化合物分别是槲皮素、山奈素、异鼠李素的单糖、双糖、三糖及糖分子上接有桂皮酰基的甙,其甙元基本是槲皮素、山奈素及少量的异鼠李素,目前国内外均采用将黄酮甙水解,得到的甙元以 HPLC 法检测,测的甙元量的总和乘上平均转化因子(黄酮醇香豆酰基糖甙的平均分子量 760 折算而成),计算总黄酮甙的含量。考虑到目前山奈素和异鼠李素标准品较难购到,根据山奈素和异鼠李素与槲皮素性质相近,结构相似的特点,本文按文献[4,8]报道的方法,以槲皮素作对照品研究了复合银杏叶片中总黄酮的含量分析方法。

参考文献:

[1] 庄向平,等. 银杏叶黄酮含量的测定和提取方法[J]. 中草药,1992,23(3):122.

[2] Pietto P, Mauri P, Rava A, et al. Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the determination of flavonoid drugs[J]. J Chromatogr, 1991, 549: 367.

[3] Hasler A, Sticher O, Meier B. Identification and determination of the flavonoids from Ginkgo bibloa by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1992, 605: 41.

[4] 池静瑞,等. HPLC 法测定银杏叶中 6 种黄酮成分的含量[J]. 药学学报,1997,32(8):625.

[5] 钱之玉,等. 银杏黄酮的 HPLC 法测定及其探讨[J]. 中国药科大学学报,1996,27(4):253.

[6] 陈云龙,等. 高效液相色谱法分析测定银杏叶中黄酮糖苷化合物的研究[M]. 97 银杏国际研讨会论文集,120.

[7] 谢培山. 银杏叶制剂质量标准的商榷[J]. 中国新药与临床药理,1996,7(2):1—3.

[8] 范怡梅,等. 银杏叶黄酮甙含量与生长季节和植株性别的相关性研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(5):267.

中图分类号:Q56,Q949.64　　**文献标识码**:B　　**文章编号**:1004 - 8456(2001)01 - 0021 - 02

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net