

## HPLC 测定银杏黄酮苷元固体分散体胶囊剂的含量

钱一鑫, 康冀川\*, 何珺(贵州大学西南药用生物资源教育部工程研究中心, 贵阳 550025)

**摘要:** 目的 建立高效液相色谱法(HPLC)测定银杏黄酮苷元固体分散体胶囊中有效成分的含量。方法 以 Hypersil ODS (4.6 mm×150 mm, 5 μm)为色谱柱; 甲醇-4%醋酸水溶液(48:52)为流动相; 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 360 nm, 柱温 45 °C。结果 槲皮素和山奈素 5~100 μg·mL<sup>-1</sup> 浓度内线性关系良好, 异鼠李素在 3.4~68.0 μg·mL<sup>-1</sup> 浓度内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.31%, 99.35%和 98.18%, RSD 分别为 2.12%, 2.28%和 1.65%(n=6), 精密度良好。结论 本方法灵敏、准确、专属性强, 可作为该制剂的含量测定方法。

**关键词:** 银杏黄酮苷元固体分散体胶囊; HPLC; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)08-0723-04

### Determination of the Ginkgo Flavonoid Aglycon Solid Dispersions Capsules by HPLC

QIAN Yixin, KANG Jichuan\*, HE Jun(*The Engineering and Research Center for Southwest Bio-Pharmaceutical resources of National Education Ministry of China, Guizhou University, Guiyang 550025, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** A HPLC method was established to determine the content of ginkgo flavonoid aglycon solid dispersions capsules. **METHODS** Chromatographic condition included the Hypersil ODS column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) and mobile phase consisting of methanol - 4% acetic acid solution(48:52). The flow rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was set at 360 nm, the column temperature was 45 °C. **RESULTS** The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 5.0–100.0 μg·mL<sup>-1</sup> and 3.40–68.0 μg·mL<sup>-1</sup>. The mean recovery was 99.31%, 99.35% and 98.18%, RSD was 2.12%, 2.28% and 1.65%(n=6) with good precision. **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate and high selectivity. A satisfactory result to determine the dissolution of this dosage form was obtained with this method.

**KEY WORDS:** Ginkgo flavonoid aglycon solid dispersions capsules; HPLC; content determination

黄酮类化合物是银杏叶中的主要药效成分, 银杏叶黄酮具有广泛的生物活性, 包括抗氧化活性、抗肿瘤活性、抗炎症和免疫调节细胞效应等<sup>[1]</sup>。银杏叶黄酮主要以黄酮糖苷的形式存在, 主要是由山奈酚、槲皮素以及异鼠李素等黄酮苷元与葡萄糖等单糖以O-糖苷键联结而成, 以该种形式存在的黄酮占到提取物黄酮总含量的95%以上。目前, 公认的药物或食物中的黄酮化合物主要通过2种途径吸收进入人体<sup>[2-9]</sup>。第一种途径, 苷元可以从小肠直接吸收, 机制尚不清楚, 推测是由于苷元的脂溶性和分子空间结构较小, 使得苷元可被小肠上的绒毛上皮细胞被动扩散直接吸收, 也有人认为黄酮在小肠的吸收是通过主动转运, 涉及的主要活性蛋白是糖基转运蛋白及乳糖脱氢酶; 第二种途径, 20年前就有人报道肠道内的微生物在异黄酮的代谢和生物利

用率上起着关键性作用, 一般认为苷类不通过小肠壁, 其在肠的蠕动下, 行进的过程中, 通过小肠和结肠中细菌、微生物的葡萄糖苷酶或半乳糖苷酶的杂环裂解等作用水解为苷元或进一步被降解后, 被肠壁吸收进入血液。由此可见, 首先黄酮苷元原料本身的生物利用度高于黄酮苷, 其次由于黄酮苷元一般难溶或不溶于水, 易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂中, 属于生物药剂学分类系统中的第二类药物(低水溶解性、高渗透性), 而水难溶性药物的溶出速度又是其口服吸收的限速步骤。鉴于这两点, 笔者以银杏黄酮苷元为原料药, 采用固体分散体制剂新技术制备了高溶出度的银杏黄酮苷元固体分散体胶囊剂, 以期更大程度地提高银杏黄酮类化合物的生物利用度, 增强疗效。目前, 笔者研究开发的银杏黄酮苷元原料药及其固体分散体制剂

基金项目: 贵州省科技厅重大专项[黔科合重大专项字(2008)6020]; 贵州大学 2008 年青年基金项目[贵大自青基合字(2007)077 号]

作者简介: 钱一鑫, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (0851)8298735  
士后, 博导 Tel: (0851)8298675 E-mail: becc.jckang@gzu.edu.cn

E-mail: qianyixin@gmail.com \*通信作者: 康冀川, 男, 教授, 博

的制备工艺方法正在申请专利。笔者采用HPLC同时测定银杏黄酮苷元固体分散体胶囊剂中山奈酚(kaempferide)、槲皮素(querctetin)和异鼠李素(isorhamnetin)的含量, 以期为这一新产品的质量控

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); AR1140 Adventurer 电子天平(奥豪斯公司); KQ-100 超声波清洗器(昆山市超声波仪器厂)。

银杏黄酮苷元固体分散体胶囊(自制, 批号: 20090301, 20090501, 20090502, 20090503); 对照品槲皮素、山奈素和异鼠李素(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 0081-9304, 110861-200808 和 110860-200608, 纯度分别为 98.0%, 95.9%和 98.0%)。甲醇为色谱纯; 醋酸为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为: Hypersil ODS (4.6 mm×150 mm, 5 μm)。以甲醇-4%醋酸溶液(48:52)为流动相。检测波长为 360 nm; 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 45 °C, 理论板数按槲皮素、山奈素和异鼠李素计算应不低于 2 500。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 分别精密称取槲皮素对照品 12.5 mg、山奈素对照品 12.5 mg 和异鼠李素对照品 8.5 mg, 置于同一 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液。再取对照品储备液适量, 加甲醇稀释成每 1 mL 含 30.0 μg 槲皮素、30.0 μg 山奈素和 20.0 μg 异鼠李素的混合溶液, 摇匀, 作为对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取本品 20 粒, 精密称取适量内容物(约相当于槲皮素和山奈素各 10 mg、异鼠李素 5 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

**2.2.3 测定方法** 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 按外标法计算, 即得, 本品中每粒胶囊含槲皮素、山奈素和异鼠李素, 应分别不低于 10.0, 10.0, 和 5.0 mg。

### 2.3 系统适应性试验和空白干扰试验

**2.3.1 专属性试验** 根据上述色谱条件, 分别测定

对照品和供试品中的槲皮素、山奈素和异鼠李素。结果表明, 对照品和供试品的峰形较好, 槲皮素、山奈素和异鼠李素的理论塔板数均在 2 500 以上, 拖尾因子均在 0.95~1.05 之间, 见图 1。

**2.3.2 空白辅料影响试验** 按样品的处方称取辅料制备不含主药的空白样品, 同供试品溶液制备方法制成空白对照溶液, 并按上述方法进行样分析, 记录色谱图, 结果表明在与对照品色谱相应的保留时间处, 空白对照品无色谱峰, 提示制剂所用辅料对含量测定的组分不产生任何影响, 见图 1。

**2.3.3 系统适应性试验** 精密量取上述混合对照品溶液(槲皮素 30.0 μg·mL<sup>-1</sup>、山奈素 30.0 μg·mL<sup>-1</sup>、山奈素 20.0 μg·mL<sup>-1</sup>)10 μL 注入液相色谱仪, 连续进样 5 次, 记录色谱图, 结果槲皮素峰面积 RSD=1.29%(n=5), 山奈素峰面积 RSD=1.47%(n=5), 异鼠李素峰面积 RSD=1.86%(n=5)。

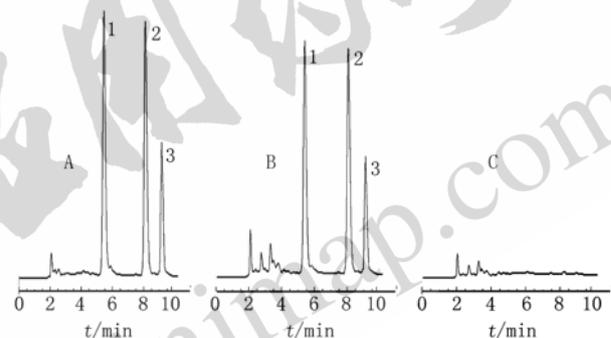


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品; C-空白辅料; 1-槲皮素; 2-山奈素; 3-异鼠李素

Fig 1 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-sample; C-blank; 1-querctetin; 2-kaempferide; 3-isorhamnetin

### 2.4 线性试验

分别精密量取“2.2.1”项下配置的对照品贮备液 0.1, 0.2, 0.6, 1.0, 2.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 以流动相稀释并定容, 摇匀, 精密量取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱峰, 以峰面积 Y 对其浓度 X(μg·mL<sup>-1</sup>)进行线性回归, 结果回归方程为: 槲皮素  $Y=41.765X-5.4816$ ,  $r=0.9998$ ; 山奈素  $Y=43.455X+44.439$ ,  $r=0.9999$ ; 异鼠李素  $Y=47.207X+50.259$ ,  $r=0.9995$ 。结果表明槲皮素和山奈素分别在 5~100 μg·mL<sup>-1</sup> 内浓度与峰面积呈良好的线性相关性, 异鼠李素在 3.4~68 μg·mL<sup>-1</sup> 内浓度与峰面积呈良好的线性相关性。

### 2.5 重复性试验

取同一批样品(批号: 20090301)6 份, 分别按

照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定含量，计算结果得平均含量分别为槲皮素 11.10 mg·粒<sup>-1</sup>，山奈素 11.30 mg·粒<sup>-1</sup>，异鼠李素 5.67 mg·粒<sup>-1</sup>，RSD 分别为槲皮素 1.98%，山奈素 1.82%，异鼠李素 1.84%，表明本方法的重复性良好。

## 2.6 日间精密度试验

取同一批样品 6 份，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在连续 6 d 时间里，分别进样测定含量，计算结果得平均含量分别为槲皮素 11.93 mg·粒<sup>-1</sup>，山奈素 11.55 mg·粒<sup>-1</sup>，异鼠李素 5.94 mg·粒<sup>-1</sup>，RSD 分别为槲皮素 2.45%，山奈素 2.17%，异鼠李素 2.11%，表明本方法的日间精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

将“2.2.1”项下对照品溶液(槲皮素 30.0 μg·mL<sup>-1</sup>、山奈素 30.0 μg·mL<sup>-1</sup>、山奈素 20.0 μg·mL<sup>-1</sup>)于室温、阳光不直射的情况下放置，每隔 1 h 分别精密量取 10 μL 注入液相色谱仪测定 1 次，共测定 6 次，记录色谱图，槲皮素、山奈素和异鼠李素的色谱峰面积变化均在 1.5% 范围内，表明溶液在 6 h 内稳定。结果见表 1。

表 1 稳定性试验结果

Tab 1 The result of stability test

时间/h	槲皮素		山奈素		异鼠李素	
	峰面积	变化率/%	峰面积	变化率/%	峰面积	变化率/%
0	1 197	0.00	1 375	0.00	1 024	0.00
1	1 207	0.84	1 384	0.65	1 034	0.98
2	1 215	1.50	1 392	1.24	1 009	-1.46
3	1 184	-1.09	1 395	1.45	1 017	-0.68
4	1 179	-1.50	1 364	-0.80	1 039	1.46
5	1 214	1.42	1 358	-1.24	1 012	-1.17
6	1 213	1.34	1 387	0.87	1 016	-0.78

## 2.8 加样回收率试验

分别精密称取 6 份已知含量的样品(批号: 20090301)内容物，每份约 11.0 mg，置于 10 mL 量瓶中，再分别向该 10 mL 量瓶中精密加入对照品混合溶液(槲皮素浓度 150 μg·mL<sup>-1</sup>、山奈素浓度 150 μg·mL<sup>-1</sup>、异鼠李素浓度 102 μg·mL<sup>-1</sup>)各 1 mL，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液 10 μL 注入色谱仪，记录色谱图，按含量测定方法，计算平均回收率。结果见表 2，表 3 和表 4。

## 2.10 样品含量测定

分别取自制银杏黄酮苷元胶囊剂 3 批(批号: 20090501, 20090502, 20090503)按“2.2.2”项下方

法制备供试品溶液，在上述色谱条件下，分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液及供试品溶液各 10 μL，进样，测定各自峰面积，按外标法计算银杏黄酮苷元胶囊剂中槲皮素、山奈素和异鼠李素的含量。结果见表 5。

表 2 槲皮素加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 The result of kaempferide recovery test(n=6)

已知量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
154.5	150	302.4	98.62	99.31	2.12
152.0	150	298.2	97.48		
153.7	150	305.5	101.19		
152.9	150	300.2	98.23		
153.6	150	307.7	102.64		
155.3	150	301.7	97.73		

表 3 山奈素加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 The result of quercetin recovery test(n=6)

已知量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
160.2	150	312.9	101.67	99.35	2.28
157.6	150	307.4	99.89		
159.4	150	301.6	95.13		
158.5	150	309.7	100.74		
159.3	150	308.7	99.65		
161.0	150	309.4	99.03		

表 4 异鼠李素加样回收率实验(n=6)

Tab 4 The result of isorhamneti recovery test(n=6)

已知量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
80.7	102	182.4	99.66	98.18	1.65
79.3	102	178.3	96.17		
80.2	102	181.6	99.19		
79.8	102	178.7	96.09		
80.2	102	181.1	98.63		
81.0	102	182.5	99.32		

表 5 样品含量测定(n=6)

Tab 5 Results of sample determination(n=6)

批号	槲皮素含量/ mg·粒 <sup>-1</sup>	山奈素含量/ mg·粒 <sup>-1</sup>	异鼠李素含量/ mg·粒 <sup>-1</sup>
20090501	11.17	11.08	6.11
20090502	11.60	11.01	5.83
20090503	11.29	11.15	6.15

## 3 讨论

银杏黄酮苷元固体分散体胶囊是贵州大学西南药用生物资源教育部工程研究中心开发研究的中药新制剂，采用去除糖基的黄酮苷元直接为原

料, 通过固体分散体技术提高其溶出速度, 增加药物的体内吸收, 提高生物利用度, 增强疗效, 是现有银杏黄酮类等药物的升级换代产品, 目前该产品尚未上市, 故产品质量标准的充分研究, 将对制剂品种的稳定性和产品上市后质量监控具有十分重要的意义。本试验建立了 HPLC 测定银杏黄酮苷元固体分散体胶囊中槲皮素、山奈素和异鼠李素的含量测定方法, 方法学研究表明重复性和准确性均较好, 可将此法用于银杏黄酮苷元固体分散体胶囊的质量控制, 也可用于银杏黄酮苷元其他制剂和原料药的含量测定。

## REFERENCES

- [1] GEN X F, PANG X Y, LI G Z. The progress of research on ginkgolignone flavone [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(6): 488-490.
- [2] WU CH, SU H L, ZHANG X M. Enzymatic preparation of flavonoid aglycone from ginkgo biloba extract [J]. *Food Mach*

(食品与机械), 2005, 21(6): 27-35.

- [3] ONOZAWA M, FUKUDA K, OHTAN M, et al. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 1998, 28(6): 360-363.
- [4] AKIYAMA, ISHIDA J, NAKAGAWA S. A specific inhibitor of tyrosine protein kinases [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(12): 5592-5595.
- [5] MIKSICEK R J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity [J]. *Mol Pharmacol*, 1993, 44(1): 37-43.
- [6] WEI, WEI L, FRENKEL K, et al. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein [J]. *Nutr Cancer*, 1993, 20(1): 1-12.
- [7] MARKOVITS, LINASSIER C, FOSSE P, et al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II [J]. *Cancer Res*, 1989, 49(18): 5111-5117.
- [8] POLKOWSKI K, MAZUREK A P. Biological properties of genistein [J]. *Acta Pharm*, 2000, 57(2): 135-155.
- [9] CLARK J W, SANTOS-MOORE A, STEVENSON L E. Effects of tyrosine kinase inhibitors on the proliferation of human breast cancer cell lines and proteins important in the rat signaling pathway [J]. *Int J Cancer*, 1996, 65(2): 186-191.

收稿日期: 2010-12-23