

高效液相色谱法定量检测银杏叶中的黄酮及内酯含量

范秀林(浙江康恩贝制药股份有限公司,浙江 兰溪 321100)

银杏 *Ginkgo biloba* L. 又名白果、公孙树,为高大落叶乔木,是最古老的中生代孑遗物种之一,主产我国。据《本草纲目》记载,银杏叶具有敛肺平喘、止遗尿、白带的的作用。银杏叶中的主要有效成分为黄酮类和内酯类化合物,其中黄酮类成分具有扩张冠状动脉血管、增加血流量,改善脑营养及抗菌作用,并在临床、保健方面得到广泛应用;近年来银杏内酯的药理作用研究也十分活跃,因其具有血小板活化因子(PAF)的拮抗作用而引起医疗行业的极大兴趣。对此,国内外已有许多报道。由于目前全球对银杏叶的需求量日益增多,因此定量控制银杏叶的质量意义重大也势在必行。银杏叶的品质受各种因素的影响,有效成分含量不同,其质量就会有大的变化。定量检测银杏叶中黄酮类成分和内酯类成分,为银杏叶内在质量的品质评价提供了客观依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

美国 waters 高效液相色谱仪;uv-486 紫外检测器;410 视差检测器;515 泵;7725 进样器。

1.2 材料

槲皮素、山柰素、异鼠李素、银杏内酯 A、B、C 和白果内酯对照品由中国药品生物制品检定所提供。

1.3 银杏叶样品

取自收购进厂的山东省郯县的银杏城叶。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 测定黄酮流动相:甲醇:0.4%磷酸溶液=500:380;流速=1.4mL/min;紫外检测器,检测波长为 360nm;进样量 10 μ L;外标法计算含量。

2.1.2 测定内酯流动相:甲醇:0.2%柠檬酸=1000:260;流速=1.2mL/min;视差检测;柱温 40 $^{\circ}$ C;进样量 10 μ L;外标法计算含量。

2.2 样品制备

2.2.1 银杏叶总黄酮样品制备:

取精密称定的银杏叶 5g 于 150mL 索氏提取器中,加 70%乙醇 100mL,沸水浴回流 5h,放冷。用旋转蒸发仪除去溶剂,残余物用 20mL 甲醇溶解,倒入 100mL 圆底烧瓶中。加 5mL 25%盐酸,沸水浴中加热回流 30min,迅速冷却至室温。内容物转移到 50 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。用 0.45 μ m 滤膜滤过,备用。

2.2.2 银杏总内酯样品制备:

取精密称定的银杏叶 5g 于 150mL 索氏提取器中,90 $^{\circ}$ C

水浴中回流 5h,放冷。用旋转蒸发仪除去溶剂。残余物加 2mL5%光学纯乙醇使之溶解,再在其中加入 2mL5%NaCl 的水溶液。用乙酸丁酯萃取,共萃取 5 次。第一次用乙酸丁酯 5.5mL,余四次都用 5mL。每次都用涡旋混合器混合 20s,再用台式试管离心机以 2000r/min 离心 20s。离心后用 5mL 针筒吸 5mL 转移到 100mL 圆底烧瓶中。合并 5 次的乙酸丁酯萃取液,用旋转蒸发仪蒸干乙酸丁酯;残留物用 2mL 光学纯乙醇溶解后再蒸干,这样重复三次,直到在瓶中闻不到乙酸丁酯气味。最后的残留物用光学纯乙醇溶解到 2mL 容量瓶中并稀释至刻度,摇匀,备用。

2.3 对照品溶液的制备

2.3.1 黄酮对照品溶液的制备:

精密称取经 P_2O_5 减压干燥过夜的槲皮素对照品约 15mg,山柰酚约 12mg,异鼠李素约 3mg,置 100mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 内酯对照品溶液的制备:

精密称取经 P_2O_5 减压干燥过夜的白果内酯(B. B)、银杏内酯 A(G. A)、银杏内酯 B(G. B)各 20mg,银杏内酯 C(G. C)15mg 于 10mL 容量瓶中,用乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 标准曲线制备:进样测定并算得各对照品的回归方程为:

槲皮素: $Y=179800.13x-2661.2$, $r=0.9998$,线性范围 $0.15\sim0.45\mu\text{g}$;山柰素: $Y=209678.62x+9436.12$, $r=0.9994$,线性范围 $0.15\sim0.45\mu\text{g}$;异鼠李素: $Y=120678.32x-1456.61$, $r=0.9996$,线性范围 $0.10\sim0.40\mu\text{g}$;白果内酯: $Y=731731.69x-8031.65$, $r=0.9993$,线性范围 $10\sim40\mu\text{g}$;银杏内酯 A: $Y=216752.81x-269.12$, $r=0.9996$,线性范围 $5\sim25\mu\text{g}$;银杏内酯 B: $Y=275160.35x+4679.67$, $r=0.9992$,线性范围 $5\sim25\mu\text{g}$;银杏内酯 C: $Y=219941.03x+218.65$, $r=0.9993$,线性范围 $5\sim25\mu\text{g}$ 。

2.5 精密度试验

试验结果 RSD 为:槲皮素 2.54%;山柰素 2.85%;异鼠李素 2.63%;白果内酯 1.93%;银杏内酯 A2.02%;银杏内酯 B2.22%;银杏内酯 C2.90%($n=6$)。

2.6 回收试验

加样测定结果为:槲皮素 98.03%;山柰素 97.28%;异鼠李素 96.82%;白果内酯 99.23%;银杏内酯 A 96.43%;银杏内酯 B 96.82%;银杏内酯 C 97.35%($n=6$)。

2.7 样品含量测定

分别精密吸取银杏黄酮对照品和供试品溶液,银杏内酯对照品和供试品溶液各 $10\mu\text{L}$,按色谱条件测定,外标法计算含量。黄酮分别计算 3 种黄酮苷元的含量,按下式换算成黄酮苷含量:总黄酮苷含量=槲皮素含量 $\times 2.51$ +山柰素含量 $\times 2.51$ +异鼠李素含量 $\times 2.51$

总内酯含量=白果内酯+银杏内酯 A+银杏内酯 B+银杏内酯 C。

3 小结与讨论

提高银杏叶提取物与制剂质量的关键是银杏叶的质量,而且定量检测银杏叶中黄酮与内酯的含量是控制银杏叶质量的重要部分。只有选择准确、稳定、可靠的检测方法,才能切实控制好银杏叶提取物与制剂的质量,在解决了银杏叶质量控制这个关键问题后,再进行浸膏与制剂的生产工艺的研究,方能取得较满意的结果。

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组,全国中草药汇编上册,北京人民出版社,1982:295.
- [2] 杨义芳,等.中成药,1995,17(11):40.
- [3] 陈仲良.中国药学杂志,1996,31(6):326.
- [4] 钟郁青,等.药学报,1995,30(9):694.
- [5] 虞杏英,等.药物分析杂志,1993,13(2):85.
- [6] 池静端,等.药学报,1997,32(8):625.
- [7] 庄向平,等.中草药,1992,23(8):122.
- [8] 陶巧凤,等.中成药,1993,15(12):14.
- [9] 苑可武,等.中草药,1997,28(4):211.
- [10] Teris A, et al. Planta Med,1992,58:413.
- [11] Lobstein A, et al. Planta Med,1991,57:430.