

银杏叶提取物中黄酮类成分的高效液相色谱分析

谢大年 郭兆贵

(湖南医科大学 临床药理国家培训中心 长沙 410078)

1 前言

银杏叶提取物(Extract Ginkgo biloba, EGb)作为治疗应用已有几个世纪,在德国和法国已成为医生最常开的处方药品之一。我国早在70年代虽有EGb制剂面市,但缺乏适当的质量控制方法,产品质量不稳定,影响了该产品在临床上的应用。EGb中含有黄酮甙、银杏内酯和一些酚性酸。国内多采用比色法^[1]测定EGb所含银杏总黄酮作为含量标准,该法重现性较差。国外采用样品直接进样,梯度洗脱高效液相色谱分析,测定其所含黄酮甙类成分^[2,3];或样品经酸水解后,梯度洗脱高效液相色谱分析,测定水解甙元含量^[4,5];也有用高效液相色谱法测定EGb中银杏内酯含量的报道^[6]。由于梯度洗脱常引起基线漂移,给定量分析带来困难。我们研究了EGb经酸水解,等度洗脱高效液相色谱分析,水解后的三种主要黄酮甙元槲皮素、山萘素和异鼠李素获得满意的分离。方法简便,重现性好,准确度高。

2 实验部分

2.1 试剂与样品

重蒸水(自制, Millipore HA0.45 μ m 滤膜过滤), 甲醇(AR, Millipore FA0.5 μ m), 磷酸(GR), 槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所提供, 081-9003)溶解于甲醇中, 配制成0.06mg/mL, 用前新鲜配制。EGb(湖南麓山天然植物制药有限公司提供)。

2.2 仪器

美国光谱物理公司高效液相色谱仪SP8800泵, S4400型积分仪, Chrom De脱气机, Spheri-5 RP-18(5 μ m)色谱柱(220mm \times 4.6mm), 进样器配10 μ L定量管。Waters M490可编程序紫外检测器。

2.3 色谱条件

流动相: 甲醇-0.4%磷酸溶液(55:45), 流速: 1.0mL/min, 柱温: 25 $^{\circ}$ C, 进样体积: 10 μ L, 检测波长: 360nm。

2.4 样品制备

取0.1g EGb, 加20mL 甲醇使其完全溶解, 然后加入1.5mol/L的盐酸溶液20mL, 混匀, 置水浴上回流加热120分钟, 冷却, 用甲醇定量转入50mL的容量瓶并稀释至刻度, 用FA0.5 μ m 滤膜过滤。

3 结果与讨论

3.1 流动性的选择及pH值对色谱分离的影响

EGb经酸水解后, 含有三种主要黄酮甙元, 以甲醇-水(55:45)为流动相, 三种成分可获得满意分离。由于黄酮甙元的酚羟基易于电离, 组分峰拖尾, 加入磷酸调整流动相pH为2.5, 组分峰的对称性良好, 色谱图见图1。乙腈或四氢呋喃有机改性剂不能改善山萘素和异鼠李素的分离效果。

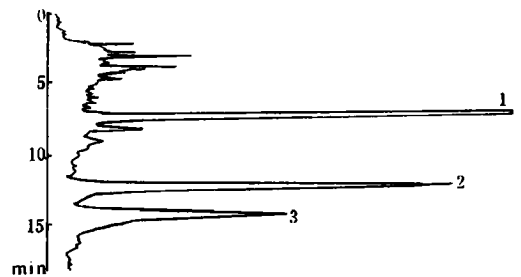


图1 EGb水解后高效液相色谱图

1. 槲皮素, 2. 山萘素, 3. 异鼠李素。

3.2 色谱峰归属及峰纯度检查

以槲皮素对照品确定槲皮素峰位, 柱后收集另两种洗脱组分, 氮气挥发溶剂, 分别以甲醇和氢氧化钠的甲醇溶液溶解, 测定紫外吸收光谱, 与文献^[7]图谱比较确定山萘素和异鼠李素的峰位。以吸收度比

值法(360nm/254nm)检测,证明槲皮素、山柰素和异鼠李素峰均为纯组分。

3.3 样品稳定性

槲皮素对照品和水解后的样品溶液放置过夜,含量降低较大,所以样品和对照品应新鲜制备。

3.4 线性关系

外标峰面积法测定,槲皮素在 0.001~0.2 μ g 范围内呈良好的线性关系, $Y=18.5 X-2.12, Y=0.9998$ 。X 单位为 g, Y 为积分峰面积。

3.5 加样回收率与重现性试验

取 0.1g EGb, 精确称定, 加入槲皮素对照品 2mg, 按样品制备中的方法, 测得槲皮素的添加回收率见表 1。对照品测定精密密度 $CV=2.2\%$ ($n=5$), 样品测定精密密度 $CV=3.0\%$ ($n=4$)。

表 1 槲皮素加样回收率试验

加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	变异系数 (%)
2.00	1.88	94.0		
2.00	1.98	99.0		
2.00	1.96	98.0	96.7	3.1
2.00	1.99	99.5		
2.00	1.86	93.1		

3.6 样品测定

采用测量峰面积外标一点法, 3 种水解甙元均以槲皮素为对照, 计算样品水解后各甙元含量。按文献[5]的换算关系计算银杏总黄酮含量, 测得 4 批样

品银杏总黄酮含量分别为 22.2%, 25.4%, 21.4% 和 25.4%。EGb 含有 20 多种黄酮类成分, 测定每一种黄酮成分的含量十分复杂。但这些成分的甙元部分为槲皮素、山柰素和异鼠李素, 经酸水解后高效液相色谱分析也可发现主要为上述 3 种黄酮甙元。我们采用等度洗脱法, 简化分析条件, 提高了测定的准确度, 是一种快速可行的方法。本法的建立对控制 EGb 质量, 提高临床疗效具有实际意义。

关键词 高效液相色谱, 黄酮类化合物, 槲皮素, 银杏叶提取物

参 考 文 献

- 1 庄向平, 虞杏英, 杨更生等. 中草药, 1992; 23(3): 122
- 2 Pietta P, Mauri P, Bruno A *et al.* J Chromatogr, 1991; 553: 223
- 3 Pietta P, Mauri P, Manera E *et al.* Chromatographia, 1989; 27(9/10): 509
- 4 Hasler A, Sticher O, Meier B *et al.* J Chromatogr, 1990; 508: 236
- 5 Hasler A, Sticher O, Meier B *et al.* J Chromatogr, 1992; 605: 41
- 6 Van Beek T A, Scheeren H A, Rantio T *et al.* J Chromatogr, 1991; 543: 375
- 7 戴伦凯著, 谢玉如等译. 黄酮类化合物. 北京: 科学出版社, 1983: 52

Analysis and Determination of the Flavonoids from Ginkgo Biloba Extract by High Performance Liquid Chromatography

Xie Danian and Guo Zhaogui

(The National Training Centre of Clinical Pharmacology,
Hunan Medical University, Changsha, 410078)

Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic method has been developed for the separation and determination of the flavonoids found in the extracts of the leaves of ginkgo biloba L. (EGb). Procedure includes hydrolysis of the flavonoids and subsequent quantitative chromatographic assay of the obtained aglycones on a C_{18} column with methanol-0.4% orthophosphoric acid (55:45) as eluent. The detection was effected at 360nm. A good linear relationship of standard (quercetin) was found in the range of 0.001 and 0.2 μ g. The coefficients of variation of standard and sample (EGb) were 2.2% and 3.1%, respectively. Four batches of EGb were tested by the mentioned method. The total content of ginkgo flavone glycosides was 23.4% (W/W).

Key words HPLC, flavonoids, quercetin, extract of ginkgo biloba