

## HPLC 法测定银杏叶中 6 种黄酮成分的含量

池静端 何秀峰 刘爱茹 徐礼燊

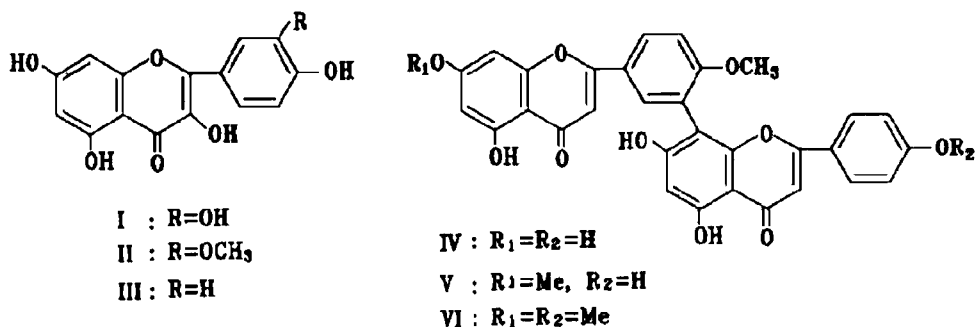
(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 用反相高效液相色谱法测定了银杏叶中 6 种黄酮成分即槲皮素(querctin)、异鼠李素(isorhamnetin)、山奈酚(kaempferol)、白果黄素(bilobetin)、银杏黄素(ginkgetin)、西阿多黄素(sciadopitysin)。单酚酸 B(salvianolic acid B)为内标。并对 18 个样品进行了测定。色谱柱为 Zorbax ODS 柱, 流动相: A. MeOH, B. THF-H<sub>2</sub>O-HCOOH(34:65:1), 梯度洗脱。流速: 1.0 ml·min<sup>-1</sup>, 检测波长: 350 nm。线性范围 0.10~2.57 μg, 相关系数  $\gamma = 0.9994 \sim 0.9998$ , 回收率 98.0%~102.0%。本法准确、快速、重现性好, 为生产及工艺研究提供质量控制依据。

**关键词** 银杏; 黄酮; 反相高效液相色谱法

银杏(*Ginkgo biloba* L.)又名公孙树, 是最古老的植物之一, 有裸子植物活化石之称。据《本草纲目》记载, 银杏果具有敛肺平喘、止遗尿、白带的作[1]。近 20 年来, 药理研究表明, 银杏叶中的黄酮成分具有扩张冠状动脉血管, 增加脑血流量, 改善脑营养及抗菌作用[2], 有较高的药用开发价值。国内外学者对银杏叶中黄酮成分的定量分析方法较多, 有比色法[3]、胶束毛细管电泳法[4]和 HPLC 法[5~7]。在已

报道的 HPLC 法中, 未见 6 种黄酮成分同时测定的方法。本文首次采用反相高效液相色谱法, 测定了银杏叶中 6 种黄酮成分槲皮素(querctin, I), 异鼠李素(isorhamnetin, II), 山奈酚(kaempferol, III), 白果黄素(bilobetin, IV), 银杏黄素(ginkgetin, V), 西阿多黄素(sciadopitysin, VI)。考察了 6 种黄酮成分的提取、分离及测定等条件。本法可用于银杏叶及银杏叶提取物的分析。6 种黄酮结构如下:



## 材 料 与 方 法

**仪器、药品** 仪器 HP 高效液相色谱系统: HP1090 型高效液相色谱仪, 79994A 分析工作站, 1040 型二极管阵列检测器。

**标准品** 内标物单酚酸 B(salvianolic acid B)由本所提供。6 种黄酮成分由作者从银杏叶中提取、分离获得。经 HPLC 检查, 纯度均在 99% 以上。

**样品** 银杏提取物由徐州药厂提供。银杏叶自采。试剂规格均为 AR 级。

色谱条件 色谱柱: Zorbax ODS C<sub>18</sub> 柱 (150 mm × 4 mm ID, 5 μm), 流动相: A. MeOH, B. 四氢呋喃 (THF)—H<sub>2</sub>O—HCOOH (34:65:1), 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1; 流速: 1 ml·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 350 nm; 色谱柱温 25℃。

**Tab 1 Gradients of mobile phase**  
(flow rate: 1.0 ml·min<sup>-1</sup>)

Time (min)	Composition	
	MeOH (%)	THF—H <sub>2</sub> O—HCOOH (%)
0.0	0.0	100.0
20.0	0.0	100.0
26.0	10.0	90.0
27.0	10.0	90.0
35.0	10.0	90.0

## 结 果

### 1 流动相、内标物和检测波长的选择

比较了不同系统和比例的流动相, 如甲醇—水, 甲醇—0.5 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠, 乙腈—水, 四氢呋喃—水—甲酸—甲醇等系统。结果表明以 A. 甲醇, B. 四氢呋喃—水—甲酸(34:65:1) 为流动相, 梯度洗脱, 分离效果好。图 1 为 6 种黄酮粗提物的 HPLC 色谱图。

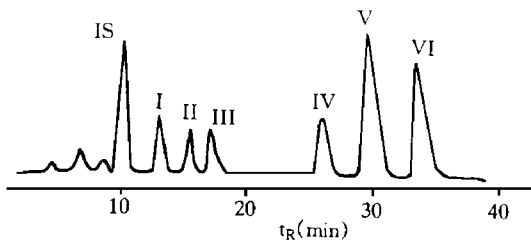


Fig 1 HPLC chromatogram of sample extracts and internal standard. I. Quercetin; II. Isorhamnetin; III. Kaempferol; IV. Bilobetin; V. Ginkgetin; VI. Sciadopitisin; IS. Salvianolic acid B.

试验了维生素 B<sub>12</sub>、单酚酸 A、单酚酸 B、迷迭香酸、大豆甙元、葛根素等为内标。结果表明单酚酸 B 作为内标较合适, 内标物与银杏叶中

的黄酮成分及其杂质峰不重叠。

将从银杏叶中得到的 6 种黄酮及内标物单酚酸 B 在 UV-3000 型(岛津)分光光度计上分别进行光谱扫描, 单酚酸 B 在 350 nm 波长处吸收最强, 而 6 种黄酮成分在 350 nm 处均有较强吸收, 故选择 350 nm 为检测波长。

### 2 线性关系

精密称取 6 种黄酮标准品各约 10~20 mg, 加 THF—MeOH(1:2) 溶解并定容至 10 ml。精密称取单酚酸 B 10 mg, 以甲醇溶解并定容于 2 ml 量瓶中。分别吸取各标准溶液 10~60 μl, 置 5 只 1 ml 量瓶中, 各加入内标液(5 mg·ml<sup>-1</sup>) 60 μl, 加甲醇至刻度, 摇匀。按上述色谱条件, 进样 10 μl 测定, 得到 6 条直线。其线性范围及相关系数为 I: 0.107~1.284 μg, γ=0.9998; II: 0.104~1.041 μg, γ=0.9996; III: 0.100~1.920 μg, γ=0.9996; IV: 0.101~1.010 μg, γ=0.9997; V: 0.192~1.920 μg, γ=0.9994; VI: 0.115~2.574 μg, γ=0.9995。

### 3 校正因子

精密吸取各标准溶液 50 μl, 置 1 ml 量瓶中, 加内标液 60 μl, 加甲醇至刻度、摇匀。在上述色谱条件下进样 10 μl, 测得校正因子: I = 4.941, II = 3.102, III = 4.403, IV = 4.401, V = 14.97, VI = 10.43。

### 4 回收率及精密度试验

取等量的样品 5 份, 其中 3 份加入一定量混合标准液, 依法提取、分离及测定。计算回收率。结果为 I: 98.0%, II: 102.0%, III: 100.1%, IV: 98.7%, V: 104.2%, VI: 96.0%。

取“校正因子项”标准混合溶液 10 μl, 连续进样 10 次, 进行测定。计算相对标准偏差(RSD)为 I: 1.2%, II: 1.8%, III: 1.1%, IV: 1.3%, V: 3.0%, VI: 4.1%。

### 5 提取条件的选择

提取方法: 首先选用不同溶剂(甲醇、丙酮、乙醚)直接对银杏叶粉进行热回流提取。在 HPLC 上可看出银杏叶中双黄酮含量很高, 而山奈酚、异鼠李素、槲皮素等单黄酮甙元的含量很低, 它们多以各种甙的形式存在于银杏叶中,

无法在 HPLC 上直接检测到,故改用酸解后热回流的方法。

提取溶剂:选择甲醇、乙醇、丙酮作为溶剂,按“测定方法”项操作,测定黄酮含量。结果表明丙酮提取效率最好。

提取时间:曾试验了丙酮回流提取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h 及 2.0 h(提取 2 次)测定总黄酮含量,结果表明回流提取 1.5 h 已使黄酮成分提取完全。

## 6 测定方法

准确称取银杏叶细粉(60 目)4 g,加丙酮

80 ml, 25% 盐酸 20 ml, 回流 1.5 h, 滤过, 滤渣用 100 ml 丙酮冲洗, 浓缩后加甲醇—THF (2:1)于 50 ml 量瓶中, 取适量于离心管中, 离心 10 min, 吸取上清液 0.5 ml, 加入内标液 60  $\mu$ l, 加甲醇—THF(2:1)溶液定容于 1 ml 量瓶中, 摇匀, 进样 10  $\mu$ l。按上述色谱条件进行分离测定, 以内标法计算含量。

## 7 样品分析

用本法对不同产地银杏叶及银杏提取物进行测定, 结果见表 2。

Tab 2 Results of determination of crude drugs

Habitat	Date	Contents of flavonoids (%)						Total (%)
		I	II	III	IV	V	VI	
Guangdong, Nanxiong	1994.10	0.015	—	0.13	0.10	0.42	0.65	1.32
Hebei, Chengde	1994.10	0.41	—	—	0.02	0.22	0.31	0.96
Zhejiang, Cangnan	1994.10	0.03	0.011	0.051	0.016	0.092	0.13	0.33
Shanxi, Xi'an	1994.10	0.062	0.052	0.064	0.017	0.13	0.21	0.54
Jiangsu, Xuzhou	1994	0.01	—	0.042	0.016	0.12	0.18	0.37
Beijing, Qianmen (1)	1995.9	0.047	—	0.048	0.04	0.18	0.31	0.63
Beijing, Qianmen (2)	1995.9	0.054	0.02	0.14	0.11	0.33	0.37	1.02
Beijing, Qianmen (1)	1995.10	0.04	0.019	0.06	0.021	0.092	0.013	0.36
Beijing, Qianmen (2)	1995.10	0.037	—	0.16	0.05	0.21	0.25	0.74
Beijing, Jian dingsuo (1)	1995.9	0.049	—	0.088	—	0.22	0.31	0.66
Beijing, Jian dingsuo (2)	1995.9	0.01	0.056	0.10	0.035	0.16	0.32	0.68
Beijing, Jian dingsuo (1)	1995.10	0.08	0.035	0.12	—	0.08	0.01	0.33
Beijing, Jian dingsuo (2)	1995.10	0.06	0.05	0.067	0.019	0.13	0.25	0.53
Beijing, Xuanwumen (1)	1995.9	—	—	0.05	—	0.14	0.18	0.37
Beijing, Xuanwumen (2)	1995.9	—	—	0.22	0.031	0.27	0.33	0.85
Beijing, Xuanwumen (1)	1995.10	0.009	—	0.011	0.026	0.11	0.16	0.32
Beijing, Xuanwumen (2)	1995.10	0.024	—	0.037	0.038	0.04	0.21	0.45
Jiangsu, Xuzhou (3)		5.79	0.81	7.89	—	0.91	1.50	16.9

(1) Male tree; (2) Female tree; (3) Extracts provided by factory.

对银杏叶样品的测定结果表明,雌树中的 6 种黄酮成分总量高于雄树。与文献报道<sup>[3]</sup>一致。

在所测定的不同产地的样品中,广东南雄产银杏叶中 6 种黄酮总含量最高,可能与广东亚热带地理环境有关。

从北京不同地区、不同采集时间的银杏叶中 6 种黄酮成分含量分析可以看出,9 月下旬采集的银杏叶中 6 种黄酮含量比 10 月下旬银

杏叶中黄酮含量高。与文献<sup>[8]</sup>报道结果一致。

## 讨 论

流动相中加入一定量的酸对黄酮成分的色谱行为影响很大。加入适量的酸可改善黄酮色谱峰的拖尾现象,使峰形对称。

甲醇和四氢呋喃对山奈酚与槲皮素分离作用不同,前者使山奈酚先于异鼠李素流出色谱

柱,而后者则相反。但甲醇—水系统不能使上述两种成分完全分离,而甲醇—THF—水系统因甲醇和 THF 对两种成分的分离作用相反也不能很好分离。THF—水系统对上述两种成分能够获得满意的分离效果。

双黄酮成分在多数溶剂中的溶解度较小,而在 THF 中却能很好溶解,因此在配制双黄酮标准溶液时可以选择 THF 作为溶剂。

### 参 考 文 献

- 1 中国医学科学院药物研究所编. 中药志. 第三册. 第二版. 北京:人民卫生出版社, 1982:295
- 2 《全国中草药汇编》编写组编. 全国中草药汇编. 上册. 北京:人民卫生出版社, 1982:295
- 3 陈秀珍. 银杏叶不同生长期总黄酮的含量测定. 广西植物, 1988, **8**:363
- 4 Pietta P, Mauri P, Rava A, *et al.* Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the determination of flavonoid drugs. *J Chromatogr*, 1991, **549**:367
- 5 Hasler A, Sticher O, Meier B. High-performance liquid chromatographic determination of five widespread aglycones. *J Chromatogr*, 1990, **508**:236
- 6 Pietta P, Mauri P, Bruno A, *et al.* Identification of flavonoids from *Ginkgo biloba* L. by HPLC with diode-array UV detection. *J Chromatogr*, 1991, **553**:223
- 7 Hasler A, Sticher O, Meier B. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by HPLC. *J Chromatogr*, 1992, **605**:41
- 8 Lobstein A, Rietsch-jako L, Hang-Berrurier M, *et al.* Seasonal variations of the flavonoids content from *Ginkgo biloba* leaves. *Planta Med*, 1991, **57**:430

## HPLC DETERMINATION OF SIX FLAVONOID CONSTITUENTS IN *GINKGO BILOBA* LEAVES

JD Chi, XF He, AR Liu and LX Xu

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences  
and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

**ABSTRACT** Six flavonoid constituents (quercetin, isorhamnetin, kaempferol, bilobetin, ginkgetin and sciadopitysin) were isolated from *Ginkgo biloba* leaves and determined by reversed phase HPLC using salvianolic acid B as internal standard. The column employed was Zorbax ODS (150 mm × 4 mm ID, 5 μm). The mobile phase consisted of solvent A (methanol) and solvent B [tetrahydrofuran — water — formic acid (34:65:1)] for gradient elution. The flow rate was 1 ml·min<sup>-1</sup> and detection was effected at 350 nm. This method is accurate, rapid and reproducible. Analytical data for various samples were given.

**KEY WORDS** *Ginkgo biloba* L.; Flavonoids; RP-HPLC