

高效液相色谱法测定银杏叶提取物中黄酮甙含量

李典鹏 方 宏

(广西植物研究所, 桂林 541006)

摘 要 用高效液相色谱法测定银杏叶提取物经酸水解后黄酮甙元含量。采用 C_{18} 柱, 甲醇: 水: 磷酸 (55: 44.5: 0.5) 为流动相, 检测波长 370 nm, 方法回收率 95.1%~103.2%, 变异系数 (CV) 3.17%, 10 批样品含测平均为 25.4%。

关键词 高效液相色谱; 银杏叶黄酮甙; 槲皮素; 银杏叶提取物

DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN EXTRACT OF GINKGO BILOBA LEAVES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Li Dianpeng Fang Hong

(Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006)

Abstract A HPLC method has been developed for the determination of Flavonoids in extract of *Ginkgo biloba*, leaves. (EGb). Procedure includes hydrolysis of flavonoids and subsequent quantitative chromatographic assay of the obtained aglycones on a C_{18} column using methanol, water and phosphoric acid (55: 44.5: 0.5) as mobile phase, and UV detection at 370 nm. The results have shown that the recoveries were between 95.1%~103.2% and CV was 3.17%. The average content of ginkgo flavanol glycosides in EGb was 25.4%.

Key words HPLC; flavanol glycosides; quercetin; extract of *Ginkgo biloba*

1 前 言

在欧洲, 主要在德、法等国家, 由银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 叶提取制成的药物销路长盛不衰, 而且市场正在看好。我国在 70 年代虽也有银杏叶提取物 (EGb) 制剂面市, 但因其提取工艺不佳, 质量标准不够完善, 未能推广使用。EGb 中含有黄酮甙、银杏内酯和一些酚性物等。国内过去多采用比色法^(1,2)测定其总黄酮, 但因专属性差, 只能测算总黄酮, 而不能有选择地定量测定有效黄酮甙元。至于对银杏叶, 可能由于大量原花色素的干扰, 使此法重现性差。国外有采用 HPLC 测定 EGb 中双黄酮的含量⁽³⁾; 有采用 HPLC 测定 EGb 中内酯的含量⁽⁴⁾; 有采用样品直接进样, 梯度洗脱高效液相分析, 测定银杏叶中所含黄酮甙类成分⁽⁵⁾; 也有样品经

酸处理, 梯度洗脱高效液相色谱分析测定其甙元含量⁽⁶⁾。因为 EGb 中黄酮类成分相当复杂, 单一测定每一个成分比较困难, 且缺乏各自对照品。另外, 梯度洗脱常引起基线漂移, 给定量带来误差。我们研究了 EGb 经酸水解测定其甙元, 恒比例溶剂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、山萘酚和异鼠李素分离良好。方法简便, 重现性好, 准确, 精密度高。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

2.1.1 仪器

美国 Waters 公司高效液相色谱仪采用 510 泵, 810 色谱工作台, U6K 手动进样器, Waters 486 可编程序紫外检测器, 梅特勒 AT 200 电子天平。

2.1.2 试剂与样品

重蒸水 (自制, Millipore HA 0.45 μ m 滤膜过滤), 甲醇 (色谱纯, millipore FA 0.5 μ m 滤膜过滤), 磷酸 (分析纯), 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 0.056 mg/mL, 用前新鲜配制, EGb (广西植物研究所制药厂提供)。

2.2 色谱条件

流动相: 甲醇: 水: 磷酸 (55: 44.5: 0.5); 流速: 1.0 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 进样体积: 10 μ L; 检测波长: 370 nm。色谱柱: Spherisorb Rb-18(10 μ m) (250 $\times$ 4 mm)。

2.3 样品处理

准确称取 75.0 mg EGb, 加 20 mL 甲醇使其溶解, 然后加入 5 mL 25% 盐酸液, 混匀, 置水浴上回流加热 60 min, 冷却, 过滤至 50 mL 容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 待进样。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件选择及数据处理

本实验选用甲醇—水—磷酸溶液作流动相。在条件实验中发现: (1) 适当增大流动相中甲醇量, 可使槲皮素等成分出峰快, 敏锐, 减少拖尾。(2) 流动相中加入磷酸, 可以缩短分离时间, 增强组分峰的对称性, 但为了保持柱的稳定性, 延长柱的寿命, 尽可能减少磷酸加入量。

样品色谱出现的主要峰 1 为槲皮素 Q(C₁₅H₁₀O₇), 2 为山萘酚 K(C₁₅H₁₀O₅), 3 为异鼠李素 I (C₁₆H₁₂O₇) (图 1)。以槲皮素对照品为对照, 外标法定量所有峰, 按峰面积计算主要峰的含量, 相应的黄酮与黄酮甙元转化因子为 2.51, 2.64, 2.39⁽⁶⁾, 平均 2.51。

3.2 标准曲线与空白试验

准确称取槲皮素对照品 28 mg, 用甲醇溶解定容至 100 mL 容量瓶中作为母液, 用移液管精确移取 2, 3, 4, 5, 6, 8 mL 于 25 mL 容量瓶, 甲醇稀释至刻度, 各进样 10 μ L 于高效液相色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积。峰面积对浓度进行回归计算, 得回归方程: $A = 4.02 \times 10^7 C + 2.8 \times 10^4$, 相关系数 $r = 0.9992$, 峰面积与浓度的线性范围: 0.02~0.08 mg/mL。

表 1 槲皮素的回收率

编号	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	变异系数 (%)
1	1.00	0.962	96.2	98.2	3.17
2	1.00	0.951	95.1		
3	1.00	0.981	98.1		
4	1.00	1.032	103.2		
5	1.00	0.983	98.3		

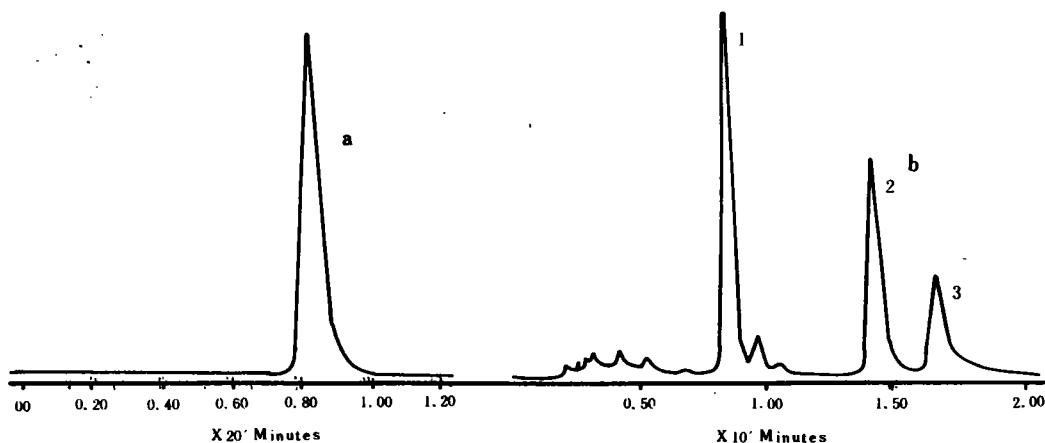


图1 银杏叶提取物黄酮类化合物色谱图
a 槲皮素标准 b 样品

未加样品的空白液按样品处理方法, 进样 10 μL 经色谱分析未见任何峰。

3.3 加标回收率与重现性试验

在数份 75 mg 银杏叶提取物样品中, 分别准确加入槲皮素对照品 1.00 mg, 然后按样品前处理方法进行处理, 以 10 μL 进样量进样测定槲皮素的标样回收率, 结果见表 1。

3.4 精密度试验

按样品处理方法, 制备一样品溶液, 依含量测定方法重复进样 7 次, 测定其精密度, 结果如表 2。

表2 方法精密度测定结果 $n=7$

含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)								标准偏差	变异系数(CV)%
0.294	0.296	0.297	0.298	0.292	0.293	0.294		0.00217	0.74

3.5 样品测定

按样品处理方法, 对广西植物研究所制药厂生产的 10 批 EGb 进行含量测定 (表 3)。

表3 不同批次银杏叶提取物黄酮含量

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
含量 (W/W)%	26.5	25.2	24.1	25.7	27.9	24.6	26.6	24.4	24.7	24.4

本文采用槲皮素作对照定量所有峰, 不尽准确, 如能有山萘酚, 异鼠李素分别作对照, 该法会更完善。

致谢 本实验承蒙成桂仁教授指导; 工作中得到陈秀珍老师的大力协助与支持, 在此一并表示感谢!

参 考 文 献

- 1 庄向平, 虞杏英, 杨更生等. 银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法. 中草药, 1992, 23: 122
- 2 江苏新医学院编. 中药大辞典(附篇). 上海: 上海人民卫生出版社, 1977: 559
- 3 F Briancon—Scheid *et al.* HPLC separation and quantitative determination of biflavones in leaves from *Ginkgo biloba*. *Planta Med*, 1983, 49: 204~207
- 4 T A Van Beek *et al.* Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals. *Journal of chromatography*, 1991, 543: 375~387
- 5 A Lobstein *et al.* Seasonal variations of the flavonoid content from *Ginkgo biloba* leaves. *Planta Med*, 1991, 57: 430~433
- 6 O Sticher. Quality of Ginkgo preparations. *Planta Med*, 1993, 59(1): 2~11