

10 批次银杏叶片质量评价

马琳^{1,2} 张杰² 王四旺^{1*}

1. 空军军医大学中药学和天然药物学教研室 陕西 西安 710032; 2. 聊城市人民医院 山东 聊城 252000;

3. 聊城市食品药品检验检测中心 山东 聊城 252000

【摘要】目的 建立银杏叶片 HPLC 定量测定方法, 对 10 批次银杏叶片进行质量评价。方法 黄酮成分采用色谱柱: Waters-C18 (250mm × 4.6mm, XBridge, 5 μ m), 流动相: 甲醇-0.4%磷酸溶液 (50:50), 检测波长: 360nm, 流速: 1.0ml/min; 柱温: 30℃。内酯成分采用色谱柱 Waters-C₁₈ (250mm × 4.6mm, XBridge, 5 μ m), 流动相: 正丙醇-四氢呋喃-水 (1:15:84), 流速: 1.0ml/min, 柱温: 30℃, 雾化温度: 90℃, 蒸发光散射检测器, 蒸发温度: 110℃, 气流: 1.80L/min。结果 样品A (槲皮素 3.56mg/片、山柰素 3.44mg/片、异鼠李素 1.96mg/片、银杏内酯 A 1.55mg/片、银杏内酯 B 1.099mg/片、银杏内酯 C 1.03mg/片、白果内酯 2.38mg/片) 和样品B (槲皮素 1.92mg/片、山柰素 3.44mg/片、异鼠李素 1.33mg/片、银杏内酯 A 0.81mg/片、银杏内酯 B 0.62mg/片、银杏内酯 C 0.53mg/片、白果内酯 1.19mg/片) 的含量合格。结论 此方法稳定性、重复性、精密度等方面考察均符合要求, 为银杏叶片质量控制提供参考依据。

【关键词】银杏叶片; HPLC; 槲皮素; 山柰素; 异鼠李素; 银杏内酯 A/B/C; 白果内酯

银杏叶片主要化学成分是银杏黄酮和银杏内酯, 银杏黄酮主要存在于银杏叶及种仁中, 尤其在银杏叶中的含量很高, 其中的槲皮素、异鼠李素、t 奈素含量较高, 是银杏单黄酮的主要成分, 在药物生产过程中常常通过检测这 3 种黄酮苷元的含量来控制银杏制剂的质量。银杏内酯为银杏叶的特有成分, 在银杏种仁、银杏叶及银杏根、茎中均含有, 也是银杏制剂质量控制的重要指标, 其中银杏内酯 A、B、C 为二萜内酯类, 白果内酯为倍半萜内酯。银杏叶片中银杏黄酮和银杏内酯含量的测定方法很多, 本实验对银杏叶片中黄酮和内酯成分一起研究, 旨在对 10 批次银杏叶片进行质量评价, 为银杏叶片的质量控制提供客观的科学依据。

1 材料

1.1 标准品与对照品

1.1.1 标准品 槲皮素 (QUE) 批号 181123, 含量 ≥ 98.05%; 山柰酚 (KAE) 批号 10128, 含量 ≥ 98.54%; 异鼠李素 (ISO) 批号 181217, 含量 ≥ 98.07%; 银杏内酯 A (GA) 批号 180412, 含量 ≥ 99.32%; 银杏内酯 B (GB) 批号 180210, 含量 ≥ 98.97%; 银杏内酯 C (GC) 批号 180330, 含量 ≥ 98.8%; 白果内酯 (BB) 批号 180615, 含量 ≥ 99.69%; 均购自北京世纪奥科生物技术有限公司。

1.1.2 对照品 10 批次银杏叶片总黄酮醇苷和萜类内酯规格各为 19.2mg/4.8mg, 9.6mg/2.4mg, 分别记作 A(A1 批号 180327, A2 批号 171004, A3 批号 180602,

A4 批号 180804, A5 批号 02A180551, A6 批号 18051922), B (B1 批号 170901, B2 批号 180202, B3 批号 18030221, B4 批号 18030121)。

1.2 试剂 甲醇 (色谱纯) 美国 Thermo Fisher 公司, 批号 3GE0021; 乙酸乙酯 (分析纯) 天津市福晨化学试剂厂, 批号 20170920。

1.3 仪器与设备 电子天平 (BT125D) 德国 sartorius 公司; 超声仪 (KQ-500GVDV) 昆山市超声仪器有限公司; 去离子水机 (Elix10) 德国 Milipore 公司; 高效液相色谱仪系统 (Agilent1200) 安捷伦科技有限公司 (美国); 蒸发光散射检测器 (PL-ELS2100) 英国 Polymer Laboratories 公司。

2 方法

2.1 银杏叶片总黄酮醇苷含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 取本品 10 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取约相当于总黄酮醇苷 9.6mg 的粉末 (A1-A6 样品半片, B1-B4 样品 1 片), 精密称定, 加甲醇-25% 盐酸溶液 (4:1) 的

混合溶液 25ml, 摇匀, 置水浴中加热回流 30 分钟, 迅速冷却至室温, 转移至 50ml 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.2 标准品溶液制备 分别精密称取槲皮素 10.10mg、山柰素 10.57mg、异鼠李素 10.44mg 对照品于 50ml 量瓶中加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为槲皮素、山柰素、异鼠李素的对照品母液。分别精密量取上述各母液 0.1ml、0.2ml、0.5ml、1ml、2ml、4ml、8ml 于 25ml 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度摇匀, 制成梯度标准品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱: Waters-C₁₈ (250mm × 4.6mm, XBridge, 5 μ m), 流动相: 甲醇-0.4%磷酸溶液 (50:50); 进样量: 10 μ l, 检测波长: 360nm, 流速: 1.0ml/min; 柱温: 30℃。

2.2 银杏叶片萜类内酯含量测定

2.2.1 供试品溶液的制备 取本品 20 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取相当于萜类内酯 19.2 mg 的粉末, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50ml, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250W, 频率 33kHz) 20 分钟, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤 20ml, 回收甲醇, 残渣加水 10ml, 置水浴中温热使溶散, 加 2% 盐酸溶液 2 滴, 用乙酸乙酯振摇提取 4 次 (15ml, 10ml, 10ml, 10ml), 合并提取液, 用 5% 醋酸钠溶液 20ml 洗涤, 分取醋酸钠液, 用乙酸乙酯 10ml 洗涤, 合并乙酸乙酯提取液及洗液, 用水洗涤 2 次, 每次 20ml, 合并水液, 用乙酸乙酯 10ml 洗涤, 合并乙酸乙酯液, 回收至干, 残渣用甲醇溶解并转移至 5ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 标准品溶液制备 分别精密称取银杏内酯 A: 10.09mg、银杏内酯 B: 11.04mg、银杏内酯 C: 6.72mg、白果内酯: 9.91mg 对照品于 10ml 量瓶中加甲醇溶解并稀释至刻度作为对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱: Waters-C₁₈ (250mm × 4.6mm, XBridge, 5 μ m), 流动相: 正丙醇-四氢呋喃-水 (1:15:84); 流速: 1.0ml/min; 柱温: 30℃, 雾化温度 90℃, 蒸发光散射检测器, 蒸发温度 110℃, 气流 1.80L/min。

2.2.4 测定 分别精密量取对照溶液 5 μ l、20 μ l 及供试品溶液 20 μ l, 注入液相色谱仪, 测定用外标两点法对数方程计算各成分含量, 即得。

3 结果

3.1 银杏叶片总黄酮醇苷含量测定 《中国药典》2015 年版一部 [1] 规定, 规格 A 中总黄酮醇苷应不低于 19.2mg/片, 规格 B 中总黄酮醇苷含量应不低于 9.6mg/片。结果显示, 10 批次银杏叶片中总黄酮醇苷含量合格, 见表 1。

表1 银杏叶片总黄酮苷含量测定

编号	样品	规格 (mg)	质量分数 (mg /片)
1	A1	19.2	23.1
2	A2	19.2	22.2
3	A3	19.2	22.4
4	A4	19.2	22.3
5	A5	19.2	22.0
6	A6	19.2	22.9
7	B1	9.6	13.5
8	B2	9.6	12.6
9	B3	9.6	11.3
10	B4	9.6	12.1

3.2 方法学考察

3.2.1 标准曲线 取“标准溶液配制”项下系列标准品溶液,按“色谱条件”项测定 (n=3)。以槲皮素、山奈酚、异鼠李素的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得到线性回归方程分别为 $y = 42.513x - 24.573$, $y = 39.64x - 7.1031$, $y = 19.236x - 9.31$, 结果表明,各标准品在一定的范围内线性关系良好, $r^2 \geq 0.9995$ 。

3.2.2 精密度 按“标准品溶液”配制低、中、高浓度混合标准品质控样品,按“色谱条件”项测定。日内精密度指一日内平行进行6次检测;日间精密度指每日平行进行2次检测,连续测定3天,结果槲皮素、山奈酚、异鼠李素日内RSD分别为0.17%、0.13%、0.23%,日间RSD分别为0.55%、0.75%、1.33%,表明该方法日内、日间精密度良好。

3.2.3 重复性 取样品A3,按供试品溶液制备项,各平行制备6份供试品溶液,

按“色谱条件”项测定 (n=3),结果槲皮素、山奈酚、异鼠李素RSD分别为0.39%、0.37%、2.85%,表明该方法重复性良好。

3.2.4 稳定性 取样品A1,按供试品溶液制备项,各平行制备供试品溶液7份,按“色谱条件”项测定 (n=3),分别在0h、2h、4h、8h、16h、32h、48h进样检测,结果槲皮素、山奈酚、异鼠李素RSD分别为0.23%、0.495、1.31%,表明48h内供试品溶液稳定性良好。

3.2.5 加样回收率 精密称定已知含量的样品A1、A2、A3各3份,按照高、中、低浓度对照品加入量与所取供试品中待测定成分之比为1.5:1、1:1、0.5:1的比例,得到高中低浓度质控样品,按“色谱条件”项测定,得到本方法槲皮素、山奈酚、异鼠李素回收率RSD为93.53%~106.26%,表明该方法加样回收率符合要求。

3.2.6 10批次银杏叶片黄酮成分含量测定 取银杏叶片样品
表2 10批银杏叶片中银杏黄酮3成分的含量(mg /片)

编号	样品	槲皮素	山奈酚	异鼠李素
1	A1	3.68	3.45	2.09
2	A2	3.17	3.3	2.36
3	A3	3.58	3.5	1.85
4	A4	3.74	3.41	1.75
5	A5	3.54	3.19	2.05
6	A6	3.65	3.81	1.66
7	B1	1.69	2.10	1.58
8	B2	1.69	1.84	1.47
9	B3	1.77	1.88	0.84
10	B4	1.52	1.85	1.44

10批次(见表1),按“供试品溶液制备”项下配制供试品溶液,按“色谱条件”项测定 (n=3),含量合格,见表2。

3.3 银杏叶片萜类内酯含量测定 《中国药典》2015年版一部[1]规定,规格A中萜类内酯含量应不低于4.8mg/片,规格B中萜类内酯应不低于2.4mg/片。结果显示,10批次银杏叶片中银杏内酯含量合格,见表3。

表3 银杏叶片萜类内酯含量测定

编号	样品	规格 (mg)	质量分数 (mg /片)
1	A1	4.8	5.4
2	A2	4.8	5.1
3	A3	4.8	6.0
4	A4	4.8	5.0
5	A5	4.8	5.9
6	A6	4.8	9.0
7	B1	2.4	3.1
8	B2	2.4	3.1
9	B3	2.4	3.4
10	B4	2.4	3.1

3.4 方法学考察

3.4.1 标准曲线 取对照品溶液,依次进样2、5、8、10、15 μ l,按“色谱条件”项测定 (n=3)。以进样量的自然对数为横坐标,峰面积的自然对数为纵坐标,进行线性回归,得到GA, GB, GC, BB回归方程分别为 $y = 1.4996x + 1.7633$, $y = 1.4792x + 1.6494$, $y = 1.4392x + 1.8822$, $y = 1.6302x + 1.9231$, 结果表明,各标准品在一定的范围内线性关系良好, $r^2 \geq 0.9933$ 。

3.4.2 精密度 按“标准品溶液”配制低、中、高浓度混合标准品质控样品,按“色谱条件”项测定。日内精密度指一日内平行进行6次检测;日间精密度指每日平行进行2次检测,连续测定3天,结果GA、GB、GC、BB日内RSD分别为1.54%、1.27%、1.47%、2.38%,日间RSD分别为3.33%、4.12%、3.03%、3.51%,表明该方法日内、日间精密度良好。

3.4.3 重复性 取样品A3,按供试品溶液制备项,各平行制备6份供试品溶液,按“色谱条件”项测定 (n=3),结果GA、GB、GC、BB的RSD分别为1.7%、5.62%、2.29%、1.11%,表明该方法重复性良好。

3.4.4 稳定性 取样品A1,按供试品溶液制备项,各平行制备7份供试品溶液,按“色谱条件”项测定 (n=3),分别在0, 2, 4, 8, 16, 32, 48h进样检测,结果GA、GB、GC、BB的RSD分别4.02%、5.82%、5.82%、1.32%,表明48h内供试品溶液稳定性良好。

3.4.5 加样回收率 精密称定已知含量样品A1、A2、A3各6份,分别加入一定量对照品,按照“供试品溶液制备”方法进行处理,按“色谱条件”项测定 (n=3),得到本方法回收率为98.82%~101.08%,结果表明,该方法加样回收率符合要求。

3.4.6 10批次银杏叶片萜类内酯成分含量测定 取银杏叶片样品10批次(见表1),按“供试品溶液制备”项下配制供试品溶液。按“色谱条件”项测定 (n=3),含量合格,见表4。

银杏叶作为天然药物,化学成分十分复杂,各化学成分含量受到来源、生长、气候、采收等多种环节影响,其性质很难做到十分稳定。银杏叶片加工生产过程同样影响着其化学成分含量。本研究建立的银杏叶片定量测定方法重复性、稳定性、精密度等均较好,10批次银杏叶片含量合格,可作为银杏叶片质量控制的依据。

表4 10批银杏叶片中4个内酯成分的含量(mg/片)

编号	样品	银杏内酯A	银杏内酯B	银杏内酯C
1	A1	1.25	1.05	0.76
2	A2	1.21	0.72	0.81
3	A3	1.45	1.13	1.09
4	A4	1.41	0.9	0.86
5	A5	1.46	1.28	1.18
6	A6	2.52	1.45	1.5
7	B1	0.73	0.66	0.49
8	B2	0.72	0.67	0.48
9	B3	0.98	0.57	0.62
10	B4	0.82	0.59	0.51

3.5 银杏叶片中7成分的含量 10批银杏叶片中7成分含量合格, 结果见表5, 见色谱图1, 图2, 图3, 图4。

表5 10批银杏叶片中7个成分的含量(mg/片)

编号	样品	槲皮素	山奈酚	异鼠李素	银杏内酯A	银杏内酯B	银杏内酯C	白果内酯
1	A1	3.68	3.45	2.09	1.25	1.05	0.76	2.31
2	A2	3.17	3.3	2.36	1.21	0.72	0.81	2.35
3	A3	3.58	3.5	1.85	1.45	1.13	1.09	2.31
4	A4	3.74	3.41	1.75	1.41	0.9	0.86	1.8
5	A5	3.54	3.19	2.05	1.46	1.28	1.18	1.94
6	A6	3.65	3.81	1.66	2.52	1.45	1.5	3.56
7	B1	1.69	2.1	1.58	0.73	0.66	0.49	1.21
8	B2	1.69	1.84	1.47	0.72	0.67	0.48	1.19
9	B3	1.77	1.88	0.84	0.98	0.57	0.62	1.23
10	B4	1.52	1.85	1.44	0.82	0.59	0.51	1.13

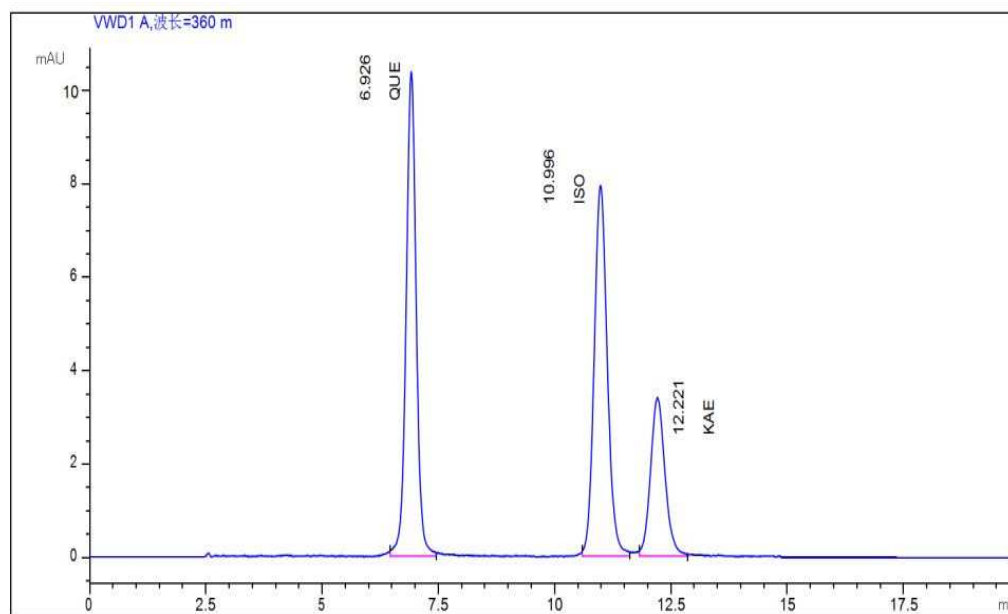


图1 银杏叶片黄酮3成分(QUE、ISO、KAE)对照品HPLC色谱图
出峰时间: QUE6.926min, ISO10.996min, KAE12.221min

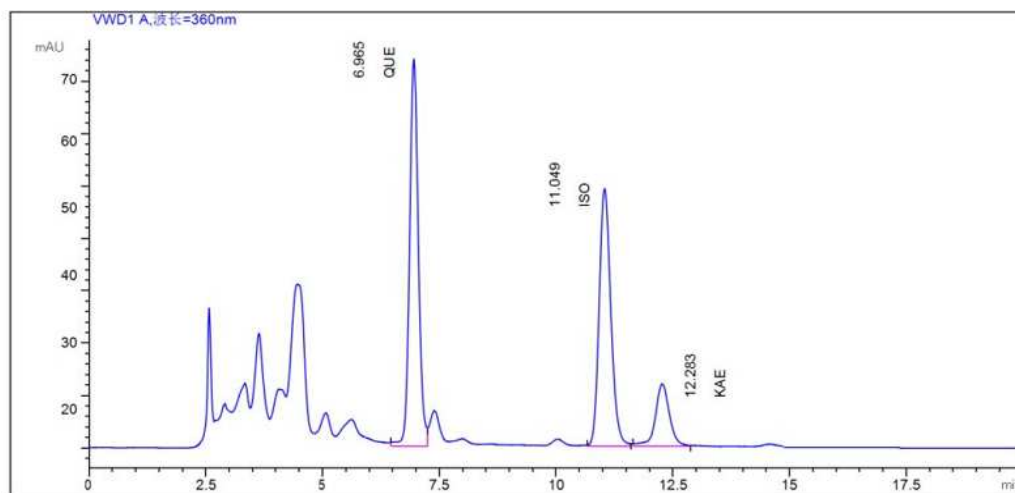


图2 银杏叶片黄酮3成分(QUE、ISO、KAE)样品HPLC色谱图
出峰时间: QUE6.965min, ISO11.049min, KAE12.283min

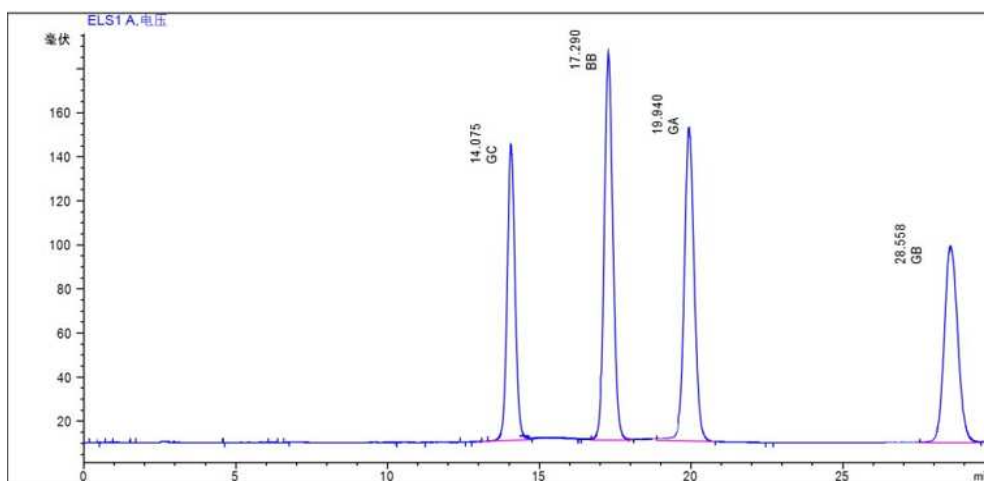


图3 银杏叶片内酯4成分(GC、BB、GA、GB)对照品HPLC-ELSD色谱图
出峰时间: GC14.075min, BB17.298min, GA19.940min, GB28.558min

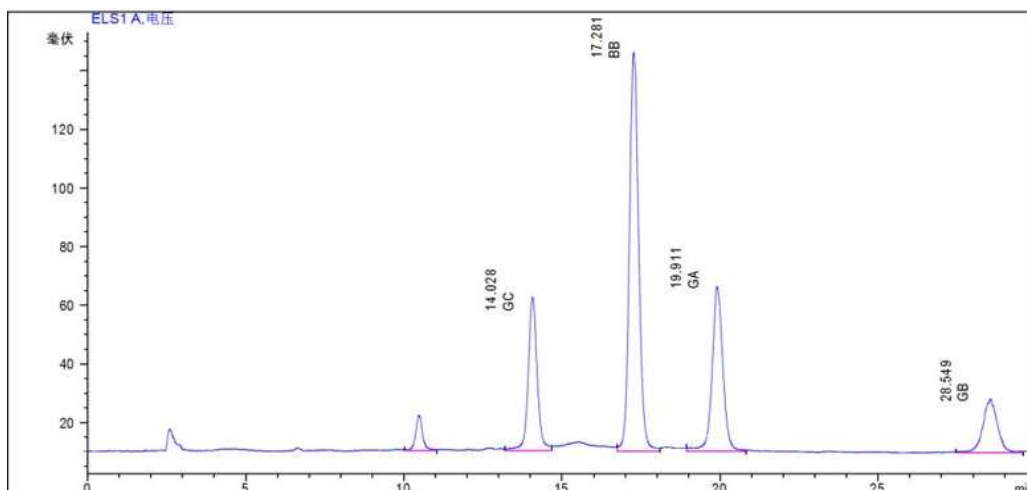


图4 银杏叶片内酯4成分(GC、BB、GA、GB)样品HPLC-ELSD色谱图
出峰时间: GC14.028min, BB17.281min, GA19.911min, GB28.549min

参考文献:

[1]国家药典委员会.中华人民共和国药典(第一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015:1491-1492.

作者简介:

马琳:女,空军军医大学中药学专业在读博士,研究方向:中药

物效机制。

通讯作者:

王四旺:男,教授,空军军医大学中药和天然药物学教研室,博士生导师;从事分子中药学和创新药物研究。