

一测多评法测定银杏叶提取物中总黄酮醇苷的含量

王丹^{1,2}, 张晶^{1*}, 赵晓宏^{2*}

(1. 吉林农业大学, 吉林 130118; 2. 北京协和医学院 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 建立银杏叶提取物中总黄酮醇苷含量测定的一测多评法。方法: 采用药典含量测定操作方法, 以槲皮素为内标, 通过测定山柰素、异鼠李素与槲皮素在固定配比和正交设计的不同配比下的响应因子, 计算相对校正因子, 进而考察相关影响因素并确立相对校正因子; 样品测定中以槲皮素含量按相对校正因子直接计算出山柰素和异鼠李素的含量, 三者相加计算总黄酮醇苷的含量, 从而建立起仅以槲皮素为对照品的一测多评法, 并通过与外标法实测值比较验证。结果: 相对校正因子分别为 $f_{\text{山柰素/槲皮素}} = 1.020$, $f_{\text{异鼠李素/槲皮素}} = 1.033$, RSD 分别为 1.23%, 1.03%, 重复性良好; 8 份样品的一测多评法计算值与外标法实测值之间没有显著性差异。结论: 实验测得的相对校正因子及建立的银杏叶提取物中总黄酮醇苷含量测定的“一测多评法”准确可靠, 为实际工作中银杏叶提取物中总黄酮醇苷的常规化、多批次含量测定带来了方便, 具有较好的实用价值。

[关键词] 一测多评法; 相对校正因子; 高效液相色谱; 银杏叶提取物; 黄酮醇苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0058-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070058

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000008.html>

[网络出版时间] 2014-01-20 16:04

Content Determination of Total Falconoid Glycosides in Ginkgo Biloba Extract by QAMS

WANG Dan^{1,2}, ZHANG Jing^{1*}, ZHAO Xiao-hong^{2*}

[收稿日期] 20131014(011)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZXJ09106-03C)

[第一作者] 王丹, 硕士研究生, 从事中药新药质量研究, Tel:15043098132, E-mail:925317599@qq.com

[通讯作者] * 张晶, 教授, 从事中药学, Tel:0431-84532803, E-mail:zhjing0701@sina.com;

* 赵晓宏, 副研究员, 从事天然药物研究开发, Tel:010-57833282, E-mail:xhzhao86@126.com

- [8] Huang X S, Huang R C. Studies on enriched yield of wedeliatrilolactone A and B in *Wedelia trilobata* by macroporous resin [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2003, 34(8):701.
- [9] 武美兰. 三裂叶蟛蜞菊的化学成分研究[D]. 广州: 广东药学院, 2010.
- [10] Li Y T, Hao X J, Li S F, et al. Eudesmanolides from *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. as potential inducers of plant systemic acquired resistance [J]. J Agri Food Chem, 2013, 61(16):3884.
- [11] 刘雪梅, 杨秀芬, 刘耀泉, 等. 超临界 CO₂ 提取桂郁金挥发油的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19):114.
- [12] 王燕, 陈文豪, 陈光英, 等. 鹰爪花挥发油 GC-MS 分析及抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17):313.
- [13] Ebrahimabadi A H, Ebrahimabadi E H, Djafari-Bidgoli Z, et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran [J]. Food Chem, 2009, 119(2):452.
- [14] 丛浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002:783.
- [15] 杨东娟, 郭守军, 陈远平, 等. 南美蟛蜞菊叶挥发油化学成分分析[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(1):131.
- [16] 江贵波, 陈实, 曾任森. 入侵物种三裂叶蟛蜞菊挥发物质的鉴定及其抗菌活性[J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(4):905.
- [17] 林碧芬, 黄志坚. 南美蟛蜞菊挥发油的抑菌活性及成分分析[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(11):69.

[责任编辑 蔡仲德]

(1. Jilin Agricultural University, Jilin 130118, China; 2. Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China)

[Abstract] Objective: To establish a quantitative method of quantitative analysis of multi-component with a single-marker (QAMS) for the content determination of flavonoid glycosides in Ginkgo biloba extract. **Method:** According to the operating method in the Pharmacopoeia, quercetin was used as the internal standard, the response factors of kaempferol, isorhamnetin and quercetin were respectively measured under a fixed ratio and different ratios of orthogonal design to calculate the relative correction factor, the relative correction factors were established after investigating the related influencing factors. In the content determination of the samples, the relative correction factor were used to calculate the content of kaempferol and isorhamnetin. The content of flavonoid glycosides was determined by kaempferol, isorhamnetin and quercetin. The results of the QAMS method were verified by comparing with the external standard method. **Result:** The relative correction factors of kaempferol and isorhamnetin were 1.020 and 1.033 respectively; RSD was 1.23%, 1.03% respectively, demonstrating good reproducibility. Two methods did not show significant difference in results. **Conclusion:** The relative correction factors and the QAMS methods for the content determination of flavonoid glycosides in Ginkgo biloba extract were accurate and reliable. This method is suitable for routine, multi-batch content determination of flavonoid glycosides in Ginkgo biloba extract, bringing the convenience to the actual content determination, and has good practical value.

[Key words] quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS); relative correction factor (RCF); HPLC; Ginkgo biloba extract; flavonoid glycosides

一测多评法为多组分的同时测定带来极大方便,特别适用于对照品难得或不稳定的情况^[1],在中药及制剂的多组分质量评价中具有重要的应用价值。在实际测定中,用外标法测定内标物的含量,再通过相对校正因子计算其他各组分的含量,同时用常规外标法(ESM)进行测定,以验证计算值的正确性和可行性。该法已被2010年版《中国药典》收录。药典中银杏叶提取物总黄酮醇苷的含量测定方法^[5]是分别测定槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量进而换算出总黄酮醇苷的含量。本文以槲皮素为内标物,建立山柰素、异鼠李素与槲皮素的相对校正因子,通过影响因素的考察和与常规外标法的比较验证其准确性,最终建立银杏叶提取物中黄酮醇苷类成分的一测多评的测定方法。

1 仪器与试剂

Waters 系列高效液相色谱仪,包括 Waters 600 controller, Waters 2707 Auto-sampler, Waters 2489 UV/visible detector, Waters 2487 dual absorbance detector, Waters Empower 工作站(美国 Waters 公司);MS105DU 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司),KQ-250B 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),XMTD-6000

型水浴锅(北京市长风仪器仪表公司)。

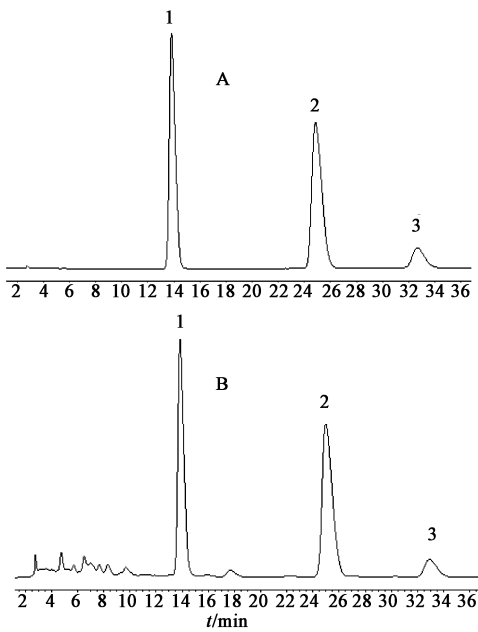
槲皮素对照品(批号 100081-200907)、山柰素对照品(批号 110861-200808)、异鼠李素对照品(批号 110860-200608)均购自于中国食品药品检定研究院;银杏叶提取物(徐州恒凯银杏叶制品有限公司,N110512,N130511,N130515,N130519;邳州富通生物制品有限公司,20130404;郟城县曙光植化制品有限公司,20130512;上海友信生物科技有限公司,GBEXP130220,GBEXP121218);甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 基本测定方法

2.1.1 色谱条件^[5] Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.4% 磷酸溶液(50:50),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,检测波长 360 nm,柱温 25 ℃。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 取槲皮素对照品、山柰素对照品和异鼠李素对照品各约 5 mg,精密称定为 5.12, 5.11, 5.11 mg,分别置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成各对照品的贮备液。精密量取槲皮素对照品贮备溶液 15 mL、山柰素对照品贮备溶液 15 mL、异鼠李素对



1. 槲皮素; 2. 山柰素; 3. 异鼠李素
图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) HPLC

照品贮备溶液 2.5 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液 (槲皮素、山柰素、异鼠李素质量浓度分别为 30.72, 30.66, 5.11 mg·L⁻¹)。

2.1.3 供试品溶液的制备^[5] 取银杏叶提取物约 35 mg, 精密称定, 加甲醇-25% 盐酸溶液 (4:1) 的混合溶液 25 mL, 置水浴锅中加热回流 30 min, 迅速冷却至室温, 转移至 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.1.4 线性范围 精密吸取 2.1.2 项下混合对照品溶液 2, 6, 10, 14, 18 μL, 依次进样 3 次, 以进样量和测得的平均峰面积进行回归处理, 得到各组分的回归方程以及线性范围。结果表明, 银杏叶提取物黄酮醇苷类对照品混合溶液在一定范围内线性关系良好, 见表 1。

表 1 银杏叶提取物中 3 种有效成分的标准曲线 (n=3)

有效成分	标准曲线	线性范围 / μg	r
槲皮素	$Y = 4.00 \times 10^6 X - 1.01 \times 10^5$	0.061 4 ~ 0.553	0.999 8
山柰素	$Y = 4.00 \times 10^6 X - 1.12 \times 10^5$	0.061 3 ~ 0.552	0.999 9
异鼠李素	$Y = 4.00 \times 10^6 X - 1.89 \times 10^4$	0.010 2 ~ 0.092 0	0.999 8

2.2 相对校正因子的测定

2.2.1 基本原理 一测多评法 (QAMS) 基本原理^[1-4]是: 在一定范围 (线性范围) 内成分的量 (质量或浓度) 与检测器响应成正比, 即 $A = fW$, 可得响应因子 $f = A/W$ 。组分间的相对校正因子 $f_{i/s}$ 定义如下:

$$f_{i/s} = f_i/f_s = A_i W_s / (A_s W_i) \quad (1)$$

由此可导出定量计算公式:

$$W_i = A_i W_s / (A_s f_{i/s}) \quad (2)$$

式中 A_s 为内标物峰面积, W_s 为内标物的质量。 A_i 为其他组分 i 的峰面积; W_i 为其他组分 i 的质量。

2.2.2 相对校正因子的计算 取 2.1.2 项下混合对照品溶液, 按确定的色谱条件分别进样 2, 6, 10, 14, 18 μL, 测定各成分的峰面积, 以槲皮素为内标, 按校正因子计算公式 (1) 计算山柰素、异鼠李素与槲皮素之间的相对校正因子, 见表 2。

2.2.3 正交设计法相对校正因子重复性试验 鉴于银杏提取物实际样品中 3 个组分含量比例的不确定性, 本实验对文献^[6-7]记载“采用固定浓度配比的混合对照品溶液测定相对校正因子”的重复性试验进行了改进, 以槲皮素、山柰素、异鼠李素为 3 个因素, 取其高、中、低浓度 (线性范围内) 3 个水平, 按 $L_9(3^4)$ 正交设计试验, 在其配比大范围变化中考察相对校正因子的重复性。结果见表 3。

2.3 相对校正因子影响因素的考察 考察了不同仪器 (waters1: 检测器为 Waters 2489 UV/visible

表 2 黄酮醇苷类成分的相对校正因子 (n=3)

进样体积/μL	槲皮素		山柰素			异鼠李素		
	峰面积	进样量/μg	峰面积	进样量/μg	$f_{\text{山柰素/槲皮素}}$	峰面积	进样量/μg	$f_{\text{异鼠李素/槲皮素}}$
2	120 821	0.061 4	121 950	0.061 3	1.011	20 588	0.010 2	1.023
6	579 791	0.184 3	587 288	0.184 0	1.015	98 779	0.030 7	1.024
10	1 051 072	0.307 2	1 067 598	0.306 6	1.018	182 214	0.051 1	1.042
14	1 504 603	0.430 1	1 536 062	0.429 2	1.023	260 635	0.071 5	1.042
18	1 938 169	0.553 0	1 993 553	0.551 9	1.030	337 160	0.092 0	1.046
平均值					1.019			1.035
RSD/%					0.72			1.06

表3 $L_9(3^4)$ 正交设计的不同浓度配比测得的相对校正因子

No.	槲皮素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$f_{\text{山柰素/槲皮素}}$	山柰素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$f_{\text{异鼠李素/槲皮素}}$	异鼠李素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1	20.48(1)	0.998	20.44(1)	1.064	2.555(1)
2	20.48(1)	1.003	30.66(2)	0.997	5.110(2)
3	20.48(1)	1.010	40.88(3)	0.997	7.665(3)
4	30.72(2)	0.998	20.44(1)	1.002	5.110(2)
5	30.72(2)	1.002	30.66(2)	0.981	7.665(3)
6	30.72(2)	0.990	40.88(3)	1.024	2.555(1)
7	40.96(3)	0.985	20.44(1)	0.971	7.665(3)
8	40.96(3)	0.992	30.66(2)	1.056	2.555(1)
9	40.96(3)	0.989	40.88(3)	1.008	5.110(2)
平均值		0.996		1.009	
RSD/%		0.80		3.31	

detector, 和 waters2: 检测器为 Waters 2487 dual absorbance detector)、不同色谱柱(Agilent ZORBAX SB-Aq 柱、HibarRP-18e 柱、Kromasil 100-5C₁₈ 柱),及在同一实验室条件下,采用 Waters1 高效液相色谱系统和 Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱在不同柱温(25, 30, 35 °C)、不同流速(0.9, 1.0, 1.1 mL·min⁻¹)、不同流动相比例(甲醇-0.4% 磷酸溶液:49:51, 50:50, 51:49)、不同检测波长(359, 360, 361 nm),对相对校正因子的影响,结果见表4。

2.4 相对校正因子的最终确定 综合以上影响相对校正因子的因素,将所有试验测得的相对校正因子取平均值,得出山柰素、异鼠李素与内标物槲皮素之间的相对校正因子分别为 1.020, 1.033, RSD 分别为 1.23%, 1.03%。

2.5 待测组分色谱峰的定位 考察了待测组分与内标物在不同色谱柱和色谱仪上相对保留时间差及相对保留值的变化情况,最终采用相对保留值作为色谱峰定位依据,见表5。

表4 各影响因素下测得的相对校正因子($n=3$)

影响因素	$f_{\text{山柰素/槲皮素}}$	RSD/%	$f_{\text{异鼠李素/槲皮素}}$	RSD/%
不同仪器和色谱柱	1.020	1.49	1.031	1.67
不同柱温	1.044	2.11	1.053	1.59
不同流速	1.020	0.20	1.032	0.68
不同流动相比例	1.015	0.40	1.030	0.44
不同检测波长	1.014	0.46	1.027	1.01

表5 不同仪器和不同色谱柱下目标成分的相对保留值和相对保留时间差($n=3$)

仪器	色谱柱	$r_{\text{山柰素/槲皮素}}$	$r_{\text{异鼠李素/槲皮素}}$	$\Delta tR_{\text{山柰素/槲皮素}}$	$\Delta tR_{\text{异鼠李素/槲皮素}}$
Waters1	AgilentZORBAXSB-Aq	1.844	2.460	12.359	21.388
	HibarRP-18e	1.837	2.068	13.829	17.648
	Kromasil 100-5C ₁₈	1.835	2.056	12.179	15.409
Waters2	AgilentZORBAXSB-Aq	1.813	2.407	11.095	19.191
	HibarRP-18e	1.870	2.123	16.287	20.999
	Kromasil 100-5C ₁₈	1.814	2.038	11.173	14.238

注: $r_{\text{山柰素/槲皮素}}$ 为山柰素与槲皮素的相对保留值, $r_{\text{异鼠李素/槲皮素}}$ 为异鼠李素与槲皮素的相对保留值, $\Delta tR_{\text{山柰素/槲皮素}}$ 为山柰素与槲皮素的相对保留时间差, $\Delta tR_{\text{异鼠李素/槲皮素}}$ 为异鼠李素与槲皮素的相对保留时间差。

2.6 一测多评法与外标法含量测定比较 ①一测多评法:仅以槲皮素为对照品,采用药典含量测定操作方法进行测定,按照相对校正因子计算山柰素、异鼠李素及总黄酮醇苷的含量。②外标法:以槲皮素、山柰素、异鼠李素为对照品,按药典含量测定方法进行测定。

8 份银杏叶提取物样品的测定结果显示,一测多评法与外标法实测值无显著性差异,相对误差均 < 5%,表明所建立的一测多评法准确稳定,见表 6。

表 6 外标法和一测多评法测定银杏叶提取物中黄酮醇苷类成分的含量(n=3)

产地来源	批号	槲皮素 /mg·g ⁻¹		山柰素/mg·g ⁻¹		异鼠李素/mg·g ⁻¹			总黄酮醇苷/mg·g ⁻¹		
		B	A	B	相对误差/%	A	B	相对误差/%	A	B	相对误差/%
1	N110512	45.77	50.94	50.40	1.07	7.25	7.11	1.97	260.94	259.23	0.66
	N110511	45.23	48.56	48.04	1.08	6.76	6.63	1.96	252.38	250.75	0.65
	N130515	46.76	51.78	51.23	1.07	7.35	7.21	1.94	265.78	264.05	0.66
	N130519	48.33	51.70	51.85	-0.29	7.02	7.00	0.29	268.70	269.02	-0.12
2	XP130220	45.15	49.75	49.89	-0.28	6.91	6.89	0.29	255.54	255.84	-0.11
	XP121218	47.09	51.87	51.79	0.15	5.56	5.48	1.46	262.35	261.94	0.16
3	20130404	43.82	47.94	47.87	0.15	5.05	4.98	1.41	242.99	242.64	0.14
4	20130512	43.97	48.18	48.14	0.08	5.09	5.02	1.39	244.07	243.80	0.11

注:1. 徐州恒凯;2. 上海友信;3. 邳州富通;4. 郟城曙光。相对误差 = (A_i - B_i)/B_i × 100%,式中:A 为 QAMS 法计算值,B 为外标法实测值。

3 讨论

本文建立了以槲皮素为内标的一测多评法,测得的黄酮醇苷类成分含量与传统外标法所得含量之间没有显著性差异,表明所建立的一测多评法准确稳定,为银杏叶提取物的质量检测提供了简便易行的方法。在相对校正因子的重复性试验中采用了正交设计法制备不同配比的对照品混合溶液,目的是使 3 个组分在混合对照品溶液中相对量大范围地变化的情况下,考察相对校正因子的重复性,以便更好地适应实际样品的测定,结果表明本实验测定的相对校正因子具有良好的重复性,准确可靠。

色谱峰的定位在一测多评法中至关重要,常用的定位方法有相对保留时间差、相对保留值、少量对照品随行等。本实验考察了各组分在不同仪器和不同色谱柱中的相对保留时间差及相对保留值,结果山柰素、异鼠李素的相对保留时间差的 RSD 均 > 15%,故采用相对保留值作为色谱峰定位依据。对不同型号的色谱柱,山柰素相对保留值在 1.813 ~ 1.844, RSD < 5%,可以直接进行定位;异鼠李素相对保留值在 2.038 ~ 2.460, RSD > 5%,但在同一色谱柱时较稳定,因此采用了在固定色谱柱上的相对

保留值或随行少量对照品进行定位的方法。

[参考文献]

- [1] 王智民,钱中直,张启伟,等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志,2011, 36(6):657.
- [2] 林永强,徐丽华,王淑华,等. 一测多评法同步测定银黄片中 6 种咖啡酰奎宁酸[J]. 中草药,2012, 43(4):706.
- [3] 宋永贵,张武岗,刘岩庭,等. 一测多评法同时测定预知子中 4 种三萜皂苷[J]. 中草药,2012,43(7):1418.
- [4] 冯伟红,王智民,张启伟,等. 一测多评法测定秦皮药材与饮片中香豆素类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13):1782.
- [5] 国家药典委员会. 中国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:392.
- [6] 杨菲,冯伟红,王智民,等. 一测多评法测定银黄制剂中 4 种黄酮类成分含量[J]. 中国药学杂志,2012, 47(12):984.
- [7] 李爱红,陈伟健,胡文军. 一测多评法测定银杏叶胶囊中总黄酮醇苷的含量[J]. 中国药房,2012, 23(36):3446.

[责任编辑 蔡仲德]