

一测多评法测定银杏叶提取物中7种黄酮类成分含量

杨艳模^{1,2}, 缪建荣², 林海^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南省食品药品检验研究院, 长沙 410001)

[摘要] 目的: 建立一测多评法测定银杏叶提取物中7种黄酮类成分的含量, 验证方法在银杏叶提取物中应用的准确性和可行性。方法: 以槲皮素为内参物, 建立槲皮素与其他6种成分相对校正因子, 计算其他6种成分的含量, 实现一测多评。采用外标法测定银杏叶提取物中7个黄酮类成分的含量, Pearson相关系数法比较计算值和测定值的差异。结果: 一测多评法的计算值和外标法测定值间无显著差异, 实验所得的校正因子可信。结论: 在对照品缺乏的情况下, 以外标法测定槲皮素, 利用相对校正因子实现对其他6种黄酮类成分含量测定可行。

[关键词] 一测多评法; 银杏叶提取物; 相对校正因子; 检验经济学

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0082-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080082

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000039.html>

[网络出版时间] 2014-02-07 15:24

A Quantitative Method for Simultaneous Assay of Seven Flavonoids Ingredients with One Marker in *Ginkgo biloba* Extract by QAMS

YANG Yan-mo^{1,2}, MIU Jian-rong², LIN Hai^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Hunan Institute Food and Drug Control, Changsha 410001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative method of multi-components by single marker (QAMS) for determining of seven flavonoids for the improvement of the quality control of *Ginkgo biloba* extract, as well as ensure the accuracy and feasibility of the method apply to *G. biloba* extract. **Method:** With the typical composition quercetin as the indexes, the relative correction factors (RCF) between the quercetin and the other six flavonoids were established to detect the quantitation of quercetin and calculate the quantitation of the other six

[收稿日期] 20130731(007)

[基金项目] 2013年湖南省科技厅一般项目(2013KP0034)

[第一作者] 杨艳模, 硕士研究生, E-mail: 280063494@qq.com

[通讯作者] * 林海, 研究员, 从事天然药物化学研究, E-mail: 462762014@qq.com

[7] Tan X, Zhang T Y, Wei Y, et al. Separation of salidroside from *Rhodiola crenulata* by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatography A, 2002, 971(1/2): 237.

[8] 王强. 珍惜药用植物红景天[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 56.

[9] 崔秀梅, 商国懋, 吴建民. 不同产地大花红景天中红景天苷含量比较[J]. 中国现代中药, 2010, 12(9): 26.

[10] 陶贵荣, 赵银萍, 齐建红, 等. 不同地区红景天植物红景天苷含量比较研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(9): 1902.

[11] 董彦莉, 赵超. 纤维素酶解法提取红景天苷效果的研究[J]. 广东农业科学, 2011, 9(8): 103.

[责任编辑 邹晓翠]

constituents. The external standard method was used for quantitating the seven constituents, and contrasted calculated value with estimated value by Pearson correlation coefficient. **Result:** Calculated value and estimated value did not make significant difference on QAMS and external standard method. And it showed that the RCF was authentic. **Conclusion:** In the case of lacking reference substance, the quantitation of quercetin could be detected. It is feasible for taking advantage of the RCF to quantitate seven flavonoids.

[**Key words**] QAMS; *Ginkgo biloba* extract; RCF; inspection economics

银杏叶是银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 干燥叶。具有活血化瘀、通经活络、敛肺平喘、化浊降脂等作用^[1], 广泛用于治疗心脑血管疾病、哮喘、精神分裂症、癫痫、老年性痴呆和白斑病等^[2-4]。银杏叶提取物为银杏的干燥叶经加工制成的提取物^[5-6]。

中药具有成分的多样性和复杂性^[7], 应将质量控制评价指标多元化^[8], 由此提出“多指标综合质量控制模式”^[9]。中药质量控制中所需的中药化学对照品需要经过分离、鉴定结构、含量测定等过程, 又因单体不稳定等因素使得对照品相应价格提高, 在实际操作过程中存在很大困难^[10]。王智民^[11]提出了一测多评的质量评价方法。

目前, 国内标准以总黄酮醇苷含量来衡量银杏叶的含量^[1,12], 难以全面反映其内在质量。银杏叶提取物中黄酮类成分以芦丁和槲皮素含量较高, 且对照品价廉; 但芦丁对照品纯度不高, 且不稳定。故本次实验以槲皮素为参照物, 通过建立与芦丁、槲皮苷、木犀草素、山奈酚、芹菜素、异鼠李素间的相对校正因子, 计算出其他成分的含量, 实现7种成分的同时测定。本实验引用检验研究与检验经济学相结合的理念, 通过最大限度降低检验成本, 提高检验质量和效率从而达到7种黄酮类成分的同时测定。

1 材料

1.1 仪器 Shimadzu LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), Waters Alliance 型高效液相色谱仪(美国沃特斯公司), Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司), XP205 型电子分析天平。

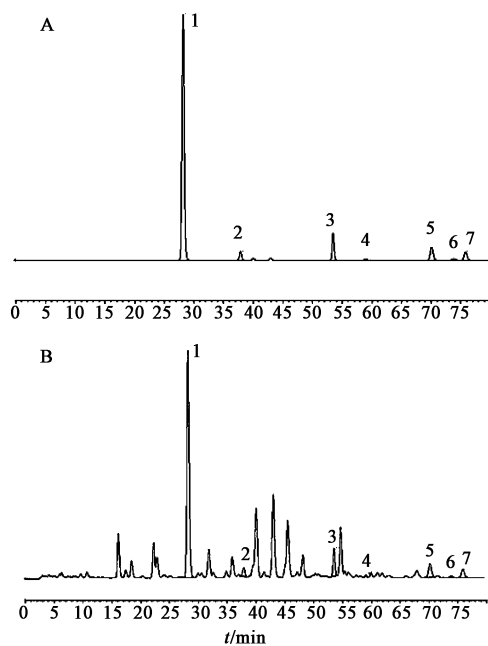
1.2 试剂 甲醇为色谱纯, 水为纯化水, 磷酸为分析纯。芦丁(批号 100080-200707, 纯度 90.5%), 槲皮苷(批号 111538-200504, 纯度 100%), 槲皮素(批号 100081-200907, 纯度 96.5%), 木犀草素(批号 111520-200504, 纯度 100%), 山奈素(批号 110861-201209, 纯度 93.2%), 芹菜素(批号 111901-201102, 纯度 99.6%), 异鼠李素(批号 110860-200608, 置五氧化二磷减压干燥 12 h 后使用)均购

自中国药品生物制品检定所, 供含量测定用; 8 批银杏叶提取物样品来自浙江某制药公司, 批号为 090931, 091231, 100231, 100431, 110731, 111131, 120831, 121041。

2 方法和结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 Thermo Synchronis C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 月旭 Xtimate-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 后两者仅 2.3 项下使用。流动相 甲醇(A)-0.1% 磷酸(B), 线性梯度(0 ~ 3 min, 70% B; 3 ~ 40 min, 70% ~ 60% B; 40 ~ 45 min, 60% ~ 55% B; 45 ~ 81 min, 55% ~ 51% B; 81 ~ 85 min, 51% ~ 70% B; 85 ~ 100 min, 70% B)。进样量 10 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35.0 °C, 检测波长 360 nm。在上述色谱条件下, 各成分分离度良好(图 1)。



1. 芦丁; 2. 槲皮苷; 3. 槲皮素; 4. 木犀草素;
5. 山奈素; 6. 芹菜素; 7. 异鼠李素

图 1 银杏叶提取物对照品(A)和样品(B)HPLC

2.1.2 溶液的制备

2.1.2.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁、槲皮苷、槲皮素、木犀草素、山奈素、芹菜素、异鼠李素对照品各适量,加甲醇溶解定容,得各对照品溶液储备液。稀释混合成混合对照品溶液母液,备用。

2.1.2.2 供试品溶液制备 精密称取银杏叶提取物 200 mg 置 10 mL 量瓶,50% 甲醇溶解,超声处理 30 min,50% 甲醇定容,摇匀,取滤液用 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.1.3 线性关系试验 精密取混合对照溶液母液 0.1,0.5,1,2,3,4,5 mL 至 10 mL 量瓶,加甲醇定容。各进样 10 μL 测定。按进样量对峰面积积分进行回归处理,得 $Y_{\text{芦丁}} = 19\ 321X - 29\ 766 (R^2 = 0.999\ 8)$, $Y_{\text{槲皮苷}} = 20\ 404x + 1\ 453.9 (R^2 = 0.999\ 9)$, $Y_{\text{槲皮素}} = 43\ 263X - 2\ 176.3 (R^2 = 0.999\ 9)$, $Y_{\text{木犀草素}} = 42\ 115X - 1\ 018 (R^2 = 0.999\ 8)$, $Y_{\text{山奈素}} = 44\ 376X - 4\ 117.9 (R^2 = 0.999\ 7)$, $Y_{\text{芹菜素}} = 34\ 854X + 34.919 (R^2 = 0.999\ 9)$, $Y_{\text{异鼠李素}} = 38\ 387X - 1\ 878.1 (R^2 = 0.999\ 8)$,表明 7 种黄酮分别在 23.418 ~ 1 170.889, 0.786 ~ 39.320, 0.992 ~ 49.601, 0.076 8 ~ 3.84, 0.706 ~ 35.304, 0.118 ~ 5.880, 0.536 ~ 26.8 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.1.4 校正因子的计算 同 2.1.3 项操作。按公式 $f_{k/m} = f_k/f_m = (W_k \times A_m)/(W_m \times A_k)^{[10]}$,以槲皮素为内参物,分别计算其对芦丁、槲皮苷、木犀草素、山奈素、芹菜素、异鼠李素的相对校正因子 f 。结果槲皮素对 6 种黄酮成分的相对校正因子 f 分别为 0.448 3, 0.479 3, 1.015 4, 1.015 1, 0.809 5, 0.875 2。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,连续进样 6 次测定。结果芦丁、槲皮素、槲皮

苷、木犀草素、山奈素、芹菜素、异鼠李素峰面积的 RSD 分别是 1.09%, 0.79%, 1.10%, 1.44%, 1.47%, 2.33%, 1.41%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 12 及 24 h 进样测定。结果上述 7 种黄酮成分的 RSD 分别是 1.12%, 0.83%, 1.26%, 1.21%, 1.56%, 2.16%, 1.43%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称取同一批样品约 200 mg,共 6 份,按 2.1.2.2 项下制备供试品溶液,进样测定。结果上述 7 种黄酮成分的平均质量分数 (mg·g⁻¹) 分别为 30.41, 1.35, 1.37, 0.10, 1.02, 0.20, 0.74, RSD 分别为 0.59%, 0.77%, 0.85%, 0.00%, 1.02%, 0.00%, 1.10%, 表明方法重复性良好。

2.1.8 加样回收试验 精密称取已知含量的银杏叶提取物样品约 0.1 g,共 6 份,各加入对照品适量,按 2.1.2.2 项下制备供试品溶液,进样测定。结果 7 种黄酮成分的加样回收率分别为 99.72%, 97.42%, 100.45%, 94.99%, 99.59%, 99.60%, 101.89, RSD 分别为 0.54%, 1.02%, 0.57%, 0.75%, 0.39%, 1.66%, 0.60%。表明方法回收率良好。

2.2 样品测定 精密吸取供试品、混合对照品、槲皮素对照品溶液各 10 μL 进样测定。分别采用一测多评法和外标法计算银杏提取物中的 7 种黄酮成分的含量。结果见表 1。

2.3 校正因子重现性考察 按 2.1.1 项下条件,考察不同色谱柱及高效液相色谱仪对校正因子和待测成分色谱峰的定位(专属性)的影响,按 2.1.4 项下公式计算,结果见表 2。

表 1 银杏叶中 7 种黄酮类成分含量测定

mg·g⁻¹

样品编号	槲皮素		芦丁		槲皮苷		木犀草素		山奈素		芹菜素		异鼠李素	
	外标	外标	QAMS	外标	QAMS	外标	QAMS	外标	QAMS	外标	QAMS	外标	QAMS	
090931	1.37	32.29	31.37	1.27	1.23	0.12	0.12	1.07	1.08	0.21	0.20	0.67	0.68	
091231	1.36	31.89	30.98	1.25	1.22	0.12	0.12	1.06	1.06	0.21	0.20	0.66	0.66	
100231	0.75	31.93	31.01	1.72	1.67	0.06	0.06	0.59	0.59	0.13	0.13	0.40	0.41	
100431	0.95	31.94	31.03	1.65	1.60	0.08	0.08	0.71	0.71	0.17	0.16	0.47	0.48	
110731	0.88	35.63	34.62	1.80	1.74	0.06	0.07	0.71	0.71	0.16	0.16	0.47	0.48	
111131	1.41	30.90	30.60	1.38	1.37	0.11	0.11	1.14	1.14	0.20	0.20	0.66	0.67	
120831	0.53	40.54	39.38	2.20	2.14	0.05	0.05	0.44	0.44	0.11	0.11	0.34	0.35	
121041	0.47	33.74	32.77	1.59	1.54	0.06	0.06	0.46	0.46	0.17	0.16	0.33	0.33	

2.4 外标法与一测多评方法对比研究 将外标法测定含量与一测多评法计算含量采用 Pearson 相关系数进行比较,验证一测多评方法用于银杏叶提取物

中黄酮类成分测定的准确性。应用 SPSS 16.0 统计学软件,样本数为 8,以横轴表示外标法,纵轴表示一测多评法,在直角坐标系上画出散点图,有直线趋势。

表2 不同仪器和不同色谱柱测得相对校正因子(RCF)和相对保留时间(RRT)

不同仪器	不同色谱柱	芦丁		槲皮苷		木犀草素		山奈素		芹菜素		异鼠李素	
		RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT	RCF	RRT
Shimadzu	Thermo	0.448 3	0.526 8	0.479 3	0.708 2	1.015 4	1.102 8	1.015 1	1.310 9	0.809 5	1.380 1	0.875 2	1.417 6
LC-20AT	Xtimate	0.446 2	0.533 4	0.455 6	0.720 0	1.022 8	1.099 8	1.035 4	1.304 4	0.787 3	1.367 4	0.882 1	1.403 5
	Agilent	0.439 8	0.491 2	0.438 9	0.675 4	1.036 8	1.101 5	1.038 5	1.291 0	0.802 4	1.357 5	0.892 3	1.403 2
Waters 2695	Thermo	0.442 8	0.511 2	0.459 9	0.694 1	1.040 5	1.103 3	1.034 6	1.312 1	0.791 1	1.382 0	0.880 5	1.420 8
	Xtimate	0.439 1	0.550 9	0.472 0	0.741 5	1.028 0	1.110 9	1.032 8	1.333 1	0.812 3	1.401 9	0.903 2	1.443 2
	Agilent	0.432 4	0.490 1	0.433 4	0.678 0	1.092 8	1.103 5	1.024 8	1.304 8	0.781 3	1.376 6	0.882 4	1.428 1
Ultimate 3000	Thermo	0.451 0	0.510 6	0.478 4	0.693 8	0.985 0	1.104 4	1.043 4	1.316 0	0.850 7	1.386 4	0.887 0	1.424 5
	Xtimate	0.449 1	0.536 9	0.467 6	0.723 8	0.999 6	1.103 3	1.048 9	1.316 3	0.826 4	1.380 9	0.888 7	1.418 2
	Agilent	0.458 5	0.474 3	0.471 9	0.659 6	0.970 5	1.109 6	1.055 6	1.300 9	0.898 0	1.367 8	0.883 7	1.413 7
平均值		0.445 2	0.513 9	0.461 9	0.699 4	1.021 3	1.104 3	1.036 6	1.309 9	0.817 6	1.377 8	0.886 1	1.419 2
RSD/%		1.73	4.64	3.59	3.55	3.49	0.31	1.17	0.85	4.51	0.88	0.91	0.82

采用积差相关系数进行直线相关分析:假设 $H_0 =$ 总体相关系数, $\rho = 0$; 外标法与一测多评法间无直接相关关系。 $H_1: \rho \neq 0$ 。 $\alpha = 0.05$ 。 以外标法和一测多评法为变量名, 建立数据文件。 结果6种黄酮成分 Pearson 相关系数分别为 0.998, 0.999, 0.993, 1.000, 0.992 和 0.999, 外标法和一测多评的 P 值均为 0.000, 按 $\alpha = 0.05$ 水准拒绝 H_0 , 接受 H_1 可以认为含量测定外标法和一测多评法呈正向直线相关。

3 讨论

3.1 耐用性考察 表2中可看出,6种黄酮成分和内参物槲皮素间的相对校正因子重复性良好,验证了一测多评方法在银杏叶提取物中黄酮类成分测定的可行性和准确性。

3.2 专属性考察 表2中可看出,6种黄酮成分和内参物槲皮素间的相对保留时间波动较小。可选用相对保留时间作为银杏叶提取物中上述待测成分峰的定位指标。

3.3 统计学方法验证 从统计学验证结果可以看出,一测多评测定的含量与外标法测定的含量无显著性差异。表明实验所得的校正因子可信。在对照品缺乏的情况下,以外标法测定槲皮素,利用相对校正因子实现对芦丁、槲皮苷、木犀草素、山奈酚、芹菜素、异鼠李素含量测定可行,可将一测多评法用于黄酮类化合物甚至更多中药的质量评价研究。

[参考文献]

[1] 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: 296.
 [2] 邱芳, 李霞, 郭爱华. 银杏叶制剂的临床新用途[J]. 山东医药杂志, 2004, 44(17): 69.

[3] Van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(11): 2002.
 [4] 徐静, 孙长凯, 马辉, 等. 银杏叶提取物及银杏内酯 B 对体外培养大鼠神经元损伤的保护作用比较[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 114.
 [5] 赵志燕. 银杏叶提取物的作用机制及临床应用[J]. 中国中医药现代远程教育, 2012, 10(1): 76.
 [6] 段峰, 胡婧, 李欣. 银杏叶提取物防治血管疾病药理作用研究进展[J]. 山东医药, 2009, 49(52): 114.
 [7] Zhao Mingzhu, Zhou Qiang, Ma Wanghao, et al. Exploring the ligand-protein networks in traditional Chinese medicine: Current databases, methods, and applications[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013: 806072.
 [8] 孙琴, 肖小河, 金城, 等. 中药质量控制和评价模式应多元化[J]. 中药材, 2008, 31(1): 1.
 [9] Ni S M, Qian D W, Duan J A, et al. Qualitative and quantitative analysis of the major bioactive phenolic compounds of *Glechoma longituba* by LC-coupled with PAD and ESI-MS detection [J]. Nat Prod Communications, 2011, 6(1): 17.
 [10] 张卫东. 中药现代化研究新思路——天然药物化学于生物学研究相结合[J]. 中国天然药物, 2008, 6(1): 2.
 [11] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925.
 [12] 聂黎行, 戴忠, 鲁静, 等. 银杏叶、银杏叶提取物及其制剂质量控制研究进展[J]. 中国药事, 2011, 25(2): 171.

[责任编辑 顾雪竹]