

复方银杏叶片质量标准研究

危华玲*, 潘洪平, 杨嘉珍

(广西壮族自治区人民医院, 广西南宁 530021)

[摘要] 目的: 建立复方银杏叶片的质量标准。方法: 采用薄层色谱鉴别法鉴别处方中的主要成分葛根素和槲皮素; 采用高效液相色谱法测定葛根素和槲皮素的含量。结果: 葛根素和槲皮素的薄层色谱具有鉴别特征; 葛根素在进样量 0.102~1.02 μg 范围内与峰面积线性关系良好, 相关系数为 0.999 8, 平均回收率为 99.21%, RSD=0.34%; 槲皮素在进样量 0.081~0.81 μg 范围内与峰面积线性关系良好, 相关系数为 0.999 8, 平均回收率为 99.12%, RSD 为 0.61% ($n=6$)。结论: 复方银杏叶片质量可控制。

[关键词] 复方银杏叶片; 质量标准; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)05-0006-04

复方银杏叶片主要由银杏叶提取物和野葛根提取物等制成的复方中药制剂。葛根素及槲皮素是其主要活性成分, 具有活血化瘀、降低血脂、清除自由基和抗衰老等功效^[1~2], 主要用于治疗心脑血管疾病。本文采用薄层色谱法对方中主要成分葛根素和槲皮素进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法对方中主要的有效成分葛根素和槲皮素进行含量测定。方法简便、准确、专属性强, 可用于复方银杏叶片的质量控制。

1 仪器与试剂

Waters-600E 型高效液相色谱仪, Waters-996 型 PDA 二极管阵列检测器, Waters-M32 色谱工作站(美国)。METTLER AE-240 型电子天平(瑞士); 葛根素对照品(110752-200410); 槲皮素对照品(00819304)由中国药品生物制品检定所提供; 甲醇为色谱纯; 水为重蒸水; 其余为分析纯。复方银杏叶片: 由本院制剂室提供。硅胶 G 薄层层析板: 自制。

2 样品 TLC 鉴别

2.1 复方银杏叶片中葛根素的 TLC 鉴别 方法: 取复方银杏叶片 2 片, 除去包衣, 研细, 加乙酸乙酯 20 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取不含葛根提取物

样品, 同法制成阴性样品溶液。再另取葛根素对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法^[3] 试验, 吸取上述两种溶液各 2 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水(7: 2.5: 0.25) 为展开剂, 展开, 展距 10 cm, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm) 下检视。结果: 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的蓝色荧光斑点, 阴性对照试验结果无干扰。

2.2 复方银杏叶片中槲皮素的 TLC 鉴别 方法: 取复方银杏叶片 5 片, 研细, 加正丁醇 15 mL, 置水浴中温浸(50 $^{\circ}\text{C}$) 15 min 并时时振摇, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取不含银杏叶提取物样品, 同法制成阴性样品溶液。再另取槲皮素对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法^[3] 试验, 吸取上述 3 种溶液各 3 μL , 分别点于同一以含 4% 醋酸钠的羧甲基纤维素钠溶液为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-丁酮-甲醇-水(5: 3: 1: 1) 为展开剂, 展开, 展距 7 cm, 取出, 晾干, 分别置日光及紫外光灯(365 nm) 下检视。结果: 供试品色谱中, 在与对照品提取物色谱相应的位置上, 紫外光下显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照试验结果无干扰。

3 样品含量测定

3.1 葛根素的含量测定

3.1.1 色谱条件 色谱柱: Novar-PakC₁₈ 柱(4.0 mm \times 150 mm, 4 μm); 流动相: 甲醇: 水(25: 75); 检测波长: 250 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 流速为 0.8 mL \cdot min⁻¹。在此条

[收稿日期] 2008-07-10

[基金项目] 广西壮族自治区科学基金项目(0342003-1)

[通讯作者] * 危华玲, Tel: (0771) 2186165; E-mail: weihualing@163.com

件下葛根素峰与杂质峰能得到较好分离(见图 1、图 2、图 3)。

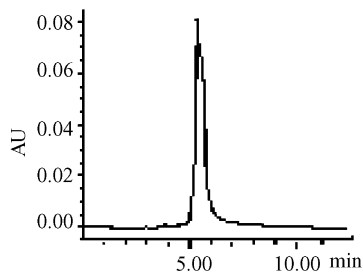


图 1 葛根素对照品 HPLC 图谱

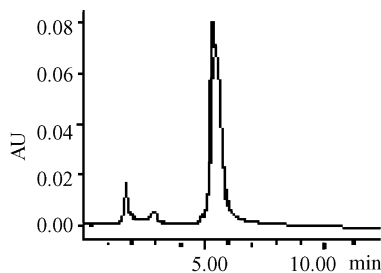


图 2 葛根素供试品溶液 HPLC 图谱

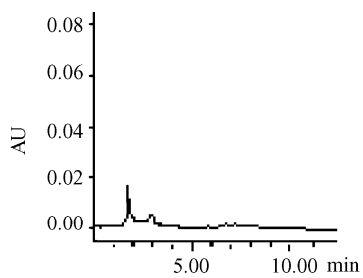


图 3 葛根素阴性溶液 HPLC 图谱

检测波长的选择 三维图谱上查看葛根素对照品的紫外吸收,并综合考虑检测波长的稳定性,选择其测定波长为 250 nm。

3.1.2 对照品溶液制备 精密称取葛根素对照品 1.02 mg,置 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液(0.102 mg·mL⁻¹)。

3.1.3 供试品溶液制备 取样品 20 片,精密称定,研细,精密称取平均片重约 0.25 g,加入水 25 mL,称定重量,超声处理(功率 150 W,频率 50 kHz) 30 min,取出,放冷再称重。用水补足减失的重量,摇匀。离心(1 200 r·min⁻¹) 10 min,取上清液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度作为供试品溶液。

3.1.4 线性关系考察 精密吸取葛根素对照品储备液(0.102 mg·mL⁻¹) 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL 分别置 10 mL 量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度。精密吸取上述溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定峰面积(Y)。以进样量(μg)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进

行线性回归,得回归方程 $Y = 3.95 \times 10^6 X + 6.25 \times 10^5$, $r = 0.9998$ 。结果表明葛根素在进样量 0.102~1.02 μg 范围内与峰面积有良好的线性关系。

3.1.5 精密密度试验 取供试品溶液,按以上色谱条件重复进样 6 次,每次进样 10 μL,测定峰面积,结果 RSD 为 0.35% ($n = 6$)。

3.1.6 稳定性试验 取供试品溶液,按以上色谱条件测定峰面积,每隔 2 h 进样测定 1 次,每次进样 10 μL,共测定 5 次,结果 RSD 为 1.5%,显示供试品溶液至少在 8 h 内稳定。

3.1.7 重复性试验 精密称取同一批号(20070108)样品 6 份,按供试品溶液制备项下方法操作,测定峰面积并计算葛根素含量,结果葛根素的平均含量为 13.72 mg/片, RSD= 3.2% ($n = 6$)。

3.1.8 空白试验 取不含主药的各种辅料,按制备工艺制得不含主药的空白试样。取相当于平均片重的空白试样,按供试品溶液制备项所述方法操作,对空白样品进行测定,结果表明,在对照品相应位置无干扰。

3.1.9 回收率试验 精密称取已知含量样品(20070108) 6 份,精密加入葛根素对照品适量,按供试品溶液制备项下方法操作,每次进样 10 μL,测得峰面积并计算含量。结果(见表 1)显示,平均回收率为 99.21%, RSD= 0.52% ($n = 6$)。

表 1 回收率试验结果

试验号	称样量(g)	样品含量(mg)	对照品加入量(mg)	实测总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.126	6.89	6.8	13.65	99.34	99.21	0.34
2	0.123	6.73	6.8	13.51	99.70		
3	0.125	6.84	6.8	13.61	99.56		
4	0.124	6.79	6.8	13.51	98.89		
5	0.127	6.95	6.8	13.68	98.98		
6	0.123	6.73	6.8	13.45	98.82		

3.1.10 样品测定 取本品 3 批,按供试品溶液制备项下方法操作,并按上述色谱条件,吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定含量,结果见表 2。

表 2 3 批样品葛根素含量测定结果

批号	葛根素含量 mg/片
20051015	13.68
20051108	13.73
20051206	13.86

3.2 槲皮素的含量测定

3.2.1 色谱条件 色谱柱: Novar PakC₁₈ 柱(4.0 mm ×

250 mm, 4 μm); 流动相: 甲醇: 0.4% 磷酸 (45: 55); 检测波长: 360 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 流速为 0.9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在此条件下槲皮素峰与杂质峰能得到较好分离(见图 4、图 5、图 6)。

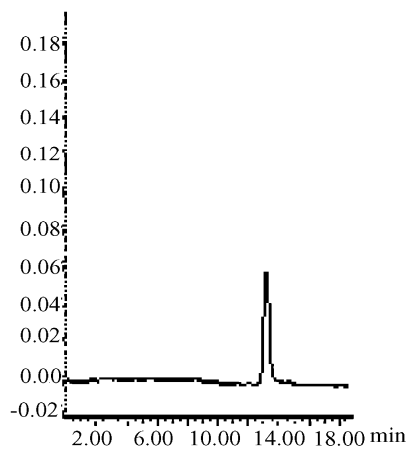


图 4 槲皮素对照品 HPLC 图谱

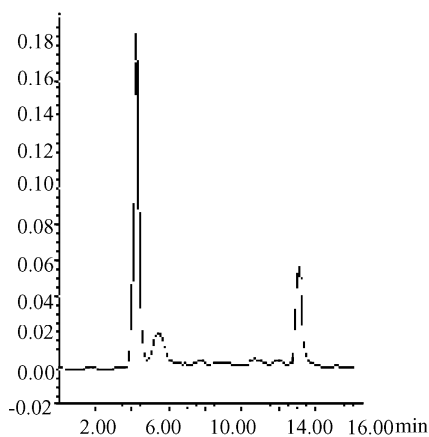


图 5 槲皮素供试品溶液 HPLC 图谱

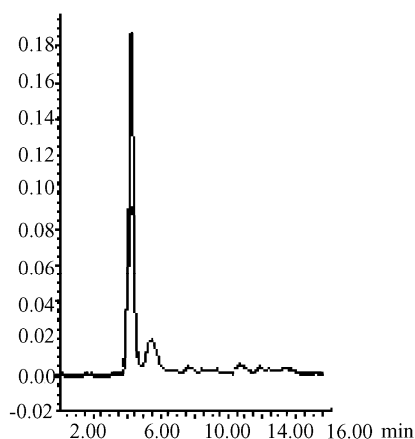


图 6 槲皮素阴性溶液 HPLC 图谱

3.2.2 对照品溶液制备 精密称取槲皮素对照品 1.62 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品溶液 ($162 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

3.2.3 供试品溶液制备 取样品 20 片, 精密称定,

研细, 精密称取平均片重约 0.25 g, 加甲醇-25% 盐酸 (4: 1) 的混合溶液 25 mL, 超声溶解约 5 min, 置水浴中加热回流 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, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取滤液, 即得。

3.2.4 线性关系考察 精密吸取槲皮素对照品溶液 ($162 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 作为对照品储备液 ($81 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。再精密吸取槲皮素对照品储备液 ($81 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度。精密吸取上述溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积 Y 。以进样量 (μg) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 4.70 \times 10^6 X + 3.56 \times 10^4$, $r = 0.9998$ 。结果表明槲皮素在进样量 0.081~0.81 μg 范围内与峰面积有良好的线性关系。

3.2.5 精密度试验 取供试品溶液, 按以上色谱条件重复进样 6 次, 每次进样 10 μL , 测定峰面积, 结果 RSD 为 0.48% ($n = 6$)。

3.2.6 稳定性试验 取供试品溶液, 按以上色谱条件测定峰面积, 每隔 2 h 进样测定 1 次, 每次进样 10 μL , 共测定 5 次, 结果 RSD 为 1.2%, 显示供试品溶液至少在 8 h 内稳定。

3.2.7 重复性试验 精密称取同一批号 (20070108) 样品 6 份, 按供试品溶液制备项下方法提取, 按以上色谱条件进行含量测定, 每次进样 10 μL , 测定峰面积并计算槲皮素含量, 结果槲皮素的平均含量为 2.05 mg/片, RSD= 2.3% ($n = 6$)。

3.2.8 回收率试验 精密称取已知含量样品 (20070108) 6 份, 精密加入槲皮素对照品适量, 按供试品溶液制备项下方法操作, 每次进样 10 μL , 测得峰面积并计算含量。结果(见表 3)显示, 平均回收率为 98.12%, RSD= 1.61% ($n = 6$)。

表 3 回收率试验结果

试验号	称样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	实测总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.124	1.02	1.1	2.12	99.84	99.12	0.61
2	0.126	1.04	1.1	2.13	99.25		
3	0.127	1.05	1.1	2.14	99.41		
4	0.125	1.03	1.1	2.12	99.09		
5	0.123	1.01	1.1	2.09	97.86		
6	0.126	1.04	1.1	2.13	99.25		

3.2.9 样品含量测定 依照供试品溶液制备所述方法, 测定 3 批样品, 含量测定结果见表 4。

表 4 3 批样品槲皮素含量测定结果

批号	槲皮素含量 mg/片
20051015	2.05
20051108	2.02
20051206	2.06

4 讨论

4.1 复方银杏叶片主要由银杏提取物和野葛根提取物等制成的复方中药制剂。本文根据其处方组成及所含化学成分理化性质建立了葛根素和槲皮素的 TLC 鉴别方法,经多次试验证明,斑点分离清晰,重复性好。可作为复方银杏叶片制剂的有效鉴别方法。

4.2 葛根素和槲皮素为复方银杏叶片的主要有效成分,葛根素和槲皮素的含量测定采用 HPLC 法^[4~5],专属性强,因此,文中建立了 HPLC 法测定复

方银杏叶片中葛根素和槲皮素含量的方法,以进一步完善该制剂的质量标准。

[参考文献]

- [1] 潘洪平. 银杏叶制剂药理作用和临床应用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 93.
- [2] 潘洪平, 危华玲, 陈英, 等. 复方银杏叶片对大鼠的长期毒性研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1572-1574.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 一部, 2005: 附录 31-32.
- [4] 危华玲, 杨青, 韦红音. 高效液相色谱法测定山楂叶提取物中槲皮素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(8): 10-11.
- [5] 葛尔宁. RP-HPLC 法测定葛根汤中葛根素的含量及变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(4): 12-13.