

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.20.005

高效液相色谱法测定复方银杏通脉口服液中总黄酮醇苷含量*

张耕,刘译[△],唐勇,杨跃龙

(湖南省怀化市食品药品检验所,湖南 怀化 418000)

摘要:目的 建立测定复方银杏通脉口服液中总黄酮醇苷含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Shimadzu C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(55:45),流速为 1.0 mL/min,柱温为 25℃,进样量为 10 μL,检测波长为 360 nm,外标法定量。结果 成功建立回归方程,槲皮素为 $Y=40994X-15542$, $r=0.9998$ ($n=7$),线性范围为 0.0148~0.1486 μg;山柰素为 $Y=42969X-11186$, $r=0.9998$ ($n=7$),线性范围为 0.0149~0.1496 μg;异鼠李素为 $Y=37968X-9333.6$, $r=0.9997$ ($n=7$),线性范围为 0.0079~0.0795 μg。平均加样回收率,槲皮素为 97.30%, $RSD=1.61%$ ($n=6$);山柰素为 97.50%, $RSD=1.44%$ ($n=6$);异鼠李素为 97.83%, $RSD=1.63%$ ($n=6$)。结论 该方法操作简单,结果准确,重复性好,可用于复方银杏通脉口服液的质量控制。

关键词:复方银杏通脉口服液;总黄酮醇苷;高效液相色谱法;质量控制

中图分类号:R932;R284.1

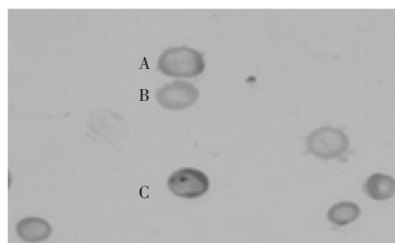
文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)20-0012-04

*基金项目:湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目[湘食药科 R201725]。

第一作者:张耕,男,硕士研究生,工程师,研究方向为药物的检验检测,(电子信箱)5159024@163.com。

[△]通信作者:刘译,男,大学本科,副主任药师,主要从事中药研发及检验检测工作,(电话)0745-2753392(电子信箱)zhanggenghn@163.com。



A. 嗜多染红细胞 B. 正染红细胞
C. 嗜多染红细胞微核细胞

图2 小鼠骨髓细胞微核形成(Giemsa 应用液染色,1 000 倍)

BALB/c 小鼠的基础值。本试验条件下,BALB/c 小鼠的精子畸形率低至 2.28%,表明维生素 CE 咀嚼片对小鼠精子畸形无影响。

微核的形成是细胞受遗传毒性物质作用后的遗传学终点^[11],因此广泛用于检测新药、食品和化妆品等是否具有诱导染色体或有丝分裂器损伤的作用^[12]。由骨髓细胞微核试验结果可知,受试物同一剂量组内雌、雄小鼠之间微核无明显的性别差异,且受试物各剂量组雌、雄小鼠微核率与阴性对照组比较,均无显著性差异,而与阳性对照组比较差异极显著,表明在本试验条件下,维生素 CE 咀嚼片对小鼠骨髓细胞微核无明显影响。

由于人们生活水平的提高及保健意识的增强,通过服用保健食品来预防疾病逐渐兴起。作为广泛应用的可增强免疫力的保健食品,维生素 CE 咀嚼片在本试验剂量下对小鼠精子畸形率和骨髓细胞微核率无明显影响,对小鼠生殖细胞和体细胞均无致遗传毒性作用。

参考文献:

- [1] 梁瑞强,王聪,曹进,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定保健食品中 10 种水溶性维生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2016,7(3):966-974.
- [2] 蒋俊树,赵彬. 高效液相色谱法测定能量饮料中多种水溶性维生素[J]. 食品科学,2008,29(12):635-637.
- [3] 杨大进,方从容,王竹天,等. 进口保健食品中维生素检测方法现状及展望[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(1):62-65.
- [4] 罗曼,张晓方. 当归天然维生素 E 复方制剂的安全毒理性评价[J]. 长江大学学报(自科版),2016,13(24):64-66.
- [5] 肖承鸿,周涛,江维克,等. 参力汁保健饮料安全性研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(9):2060-2064.
- [6] 王东亮,聂巧,李龙飞,等. 沙咪珠利对小鼠精子畸形和骨髓细胞微核的影响[J]. 中国兽药杂志,2016,50(4):45-47.
- [7] 李佳常,杜玉峰,史玉静. 脱氢乙酸小鼠骨髓细胞微核试验[J]. 药学研究,2014,33(6):319-320.
- [8] 杨平,李润国,孟宪军. 刺五加苷食用安全性毒理学评价[J]. 食品科学,2013,34(11):258-262.
- [9] 昭日格图,娜日苏,韩景芬,等. 黄芪多糖的安全性研究[J]. 食品科学,2009,30(19):309-313.
- [10] 林健,林蔚,吴育文. 不同品系小鼠精子畸形基础值探讨[J]. 医学动物防制,2010,26(5):421-422.
- [11] 刘忠平,李质馨,潘晓燕,等. 淫羊藿苷对酒精致小鼠骨髓细胞微核率的影响[J]. 中国民康医学,2014,26(19):1-2.
- [12] 曾海. 桑黄多糖对小鼠骨髓细胞微核和染色体的影响[J]. 海峡药学,2014,26(8):16-18.

(收稿日期:2018-05-24)

Content Determination of Total Flavonol Glycoside in Compound Yinxing Tongmai Oral Liquid by HPLC

Zhang Geng, Liu Yi, Tang Yong, Yang Yuelong

(Huaihua Institute for Food and Drug Control, Huaihua, Hunan, China 418000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of total flavonol glycoside in Compound Yinxing Tongmai Oral Liquid. **Methods** The chromatographic column was Shimadzu C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid solution(55:45), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25 °C, the sample size was 10 μL, and the detection wavelength was 360 nm. Quantification was performed by the external standard method. **Results** The regression equation was successfully established: the quercetin was $Y=40\,994X-15\,542$, $r=0.999\,8$ ($n=7$), it had a good linear relation in the range of 0.014 8-0.148 6 μg. The kaempferol was $Y=42\,969X-11\,186$, $r=0.999\,8$ ($n=7$), it had a good linear relation in the range of 0.014 9-0.149 6 μg. The isorhamnetin was $Y=37\,968X-9\,333.6$, $r=0.999\,7$ ($n=7$), it had a good linear relation in the range of 0.007 9-0.079 5 μg. The average recoveries of quercetin, kaempferol and isorhamnetin were 97.30% ($RSD=1.61\%$, $n=6$), 97.50% ($RSD=1.44\%$, $n=6$), 97.83% ($RSD=1.63\%$, $n=6$). **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Compound Yinxing Tongmai Oral Liquid.

Key words: Compound Yinxing Tongmai Oral Liquid; total flavonol glycoside; HPLC; quality control

复方银杏通脉口服液主要由银杏叶、(制)何首乌、女贞子、丹参、杜仲、川牛膝、钩藤7种中药组方,具有滋阴补肾、舒肝通脉功效,临床主要用于治疗中老年人轻度动脉硬化所致头晕头痛、耳鸣耳聋、视物模糊、记忆力减退、腰膝酸软、肢体麻木等。复方银杏通脉口服液现行国家药品标准中,只对制何首乌有液相含量定量测定,而银杏叶检验只有银杏叶对照药材薄层色谱定性鉴别,没有银杏叶相关液相含量定量测定。现有研究表明,银杏叶主要有效活性成分为总黄酮醇苷(槲皮素、山柰素与异鼠李素)和萜类内酯,总黄酮醇苷具有活血化瘀、通络止痛、敛肺平喘、化浊调脂等功效。有关银杏总黄酮醇苷的研究报道^[1-16]较多,为了更有效地控制产品质量,本研究中参照2015年版《中国药典(一部)》^[17]银杏叶总黄酮醇苷含量测定项相关方法,对复方银杏通脉口服液中总黄酮醇苷采用高效液相色谱(HPLC)法进行定量分析,以完善该制剂现行质量标准。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪(包括LC-20AT四元泵,SPD-M20A紫外检测器,SIL-20A自动进样器,LCsolution色谱工作站,日本岛津公司);HH-6型数显恒温水浴锅(温度控制范围0.0~100.0 °C,常州智博瑞仪器制造有限公司);XSE105DU型十万分之一电子分析天平(梅特勒-托利多公司);Direct-Q3型纯水机(美国密理博公司)。

1.2 试剂

槲皮素对照品(纯度为98.1%,批号为100081-201509),山柰素对照品(纯度为93.2%,批号为110861-201310),异鼠李素对照品(纯度为100.0%,批号为110860-200608),均由中国食品药品检定研究

院提供,供含量测定用;复方银杏通脉口服液(规格为每瓶1 mL,批号分别为20160305,20160306,20160401,湖南补天药业有限公司);阴性样品(规格为每瓶10 mL,批号为20160127,湖南补天药业有限公司);甲醇(色谱纯,批号为I0887507 717,Merck KgaA公司);磷酸(色谱纯,批号为20170801001,天津赛孚瑞科技有限公司);盐酸(优级纯,批号为20161128,国药集团化学试剂有限公司);水为Millipore Direct-Q3型纯水机制备的超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Shimadzu C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.4%磷酸溶液(55:45);流速:1.0 mL/min;柱温:25 °C;检测波长:360 nm;进样量:10 μL。理论板数按槲皮素峰计应不低于2 500,分离度按山柰素与异鼠李素峰计算应大于1.5。

2.2 溶液制备

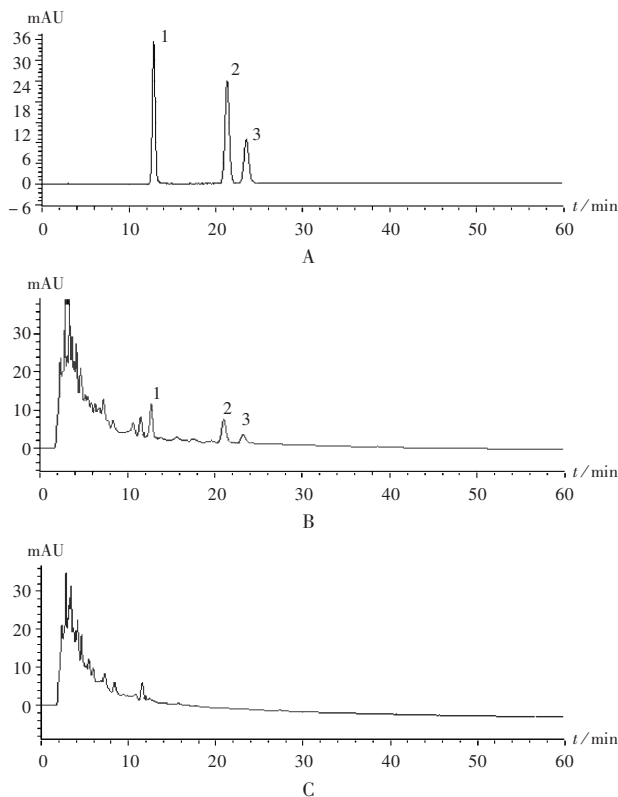
对照品溶液:分别称取槲皮素、山柰素与异鼠李素对照品20.20,21.41,10.60 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,再精密量取15 mL,置200 mL容量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得每1 mL含槲皮素、山柰素与异鼠李素对照品分别为14.86,14.96,7.95 μg的混合对照品溶液。

供试品溶液:取装量差异项下的本品,混合均匀,精密量取10 mL,加甲醇16 mL,18%盐酸8.0 mL,置沸水浴中加热回流90 min后,自然冷却至室温,移至50 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,混匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取滤液,作为供试品溶液。

阴性对照品溶液:取阴性样品,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取2.2项下3种溶液各10 μL ,按拟订色谱条件注入色谱仪,测定。结果阴性对照品溶液色谱中,在与供试品溶液相同保留时间处无色谱峰出现,表明阴性对照无干扰。详见图1。



1. 槲皮素 2. 山柰素 3. 异鼠李素
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

线性关系考察:精密吸取含槲皮素、山柰素与异鼠李素的混合对照品溶液各10 μL ,质量浓度分别为(1.48, 1.49, 0.79), (1.98, 1.99, 1.06), (3.96, 3.99, 2.12), (5.94, 5.98, 3.18), (7.92, 7.98, 4.24), (9.90, 9.97, 5.30), (14.86, 14.96, 7.95) $\mu\text{g/mL}$,进样10 μL ,以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程。结果见表1。

表1 线性关系考察结果($n=7$)

组分	线性回归方程	r	进样量线性范围(μg)
槲皮素	$Y=40\,994X-15\,542$	0.999 8	0.014 8~0.148 6
山柰素	$Y=42\,969X-11\,186$	0.999 8	0.014 9~0.149 6
异鼠李素	$Y=37\,968X-9\,333.6$	0.999 7	0.007 9~0.079 5

精密度试验:精密吸取同一含槲皮素、山柰素与异鼠李素对照品溶液各10 μL ,按拟订色谱条件连续进样6次。结果峰面积平均值槲皮素为207 448.2,山柰素为191 774.5,异鼠李素为71 797, RSD 分别为0.75%, 0.38%, 0.81% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为20160401)样品,

依法制备供试品溶液,分别于0, 1, 2, 4, 8, 12 h时进样10 μL ,记录峰面积。结果峰面积的平均值槲皮素为221 367.8,山柰素为205 558,异鼠李素为78 177, RSD 分别为0.43%, 0.47%, 0.98% ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为20160401)样品,依法平行制备供试品溶液6份,按拟订色谱条件分别进样10 μL 测定。结果峰面积的平均值槲皮素为201 601,山柰素为190 075.5,异鼠李素为71 065, RSD 分别为0.76%, 1.35%, 1.44% ($n=6$),表明方法重复性良好。

定量限检测:称取槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品,精密称定,配成每1 mL各含0.150, 0.150, 0.075 μg 的混合溶液,取20 μL 注入液相色谱仪。结果表明,信噪比(S/N) ≈ 10 时,槲皮素、山柰素、异鼠李素的定量限分别为0.003 0, 0.003 0, 0.001 5 μg 。

加样回收试验:分别精密量取6份已知含量的样品(批号为20160401,质量浓度为槲皮素25.70 $\mu\text{g/mL}$ 、山柰素22.75 $\mu\text{g/mL}$ 、异鼠李素9.78 $\mu\text{g/mL}$)溶液7 mL,分别精密加入混合对照品溶液(质量浓度为槲皮素49.54 $\mu\text{g/mL}$ 、山柰素49.88 $\mu\text{g/mL}$ 、异鼠李素26.50 $\mu\text{g/mL}$)3 mL,按供试品溶液制备方法制备溶液,进样测定,计算回收率。结果见表2至表4。

2.4 样品含量测定

按外标法以峰面积分别计算槲皮素、山柰素与异鼠李素的含量,以下列公式换算成总黄酮醇苷的含量:总黄酮醇苷含量=(槲皮素含量+山柰素含量+异鼠李素含量) $\times 2.51$ 。结果见表5。

表2 槲皮素加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
179.90	148.62	319.95	94.23	97.30	1.61
179.90	148.62	325.80	98.49		
179.90	148.62	324.53	97.32		
179.90	148.62	325.86	98.21		
179.90	148.62	325.60	98.04		
179.90	148.62	324.85	97.53		

表3 山柰素加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
159.25	149.65	300.99	94.71	97.50	1.44
159.25	149.65	306.46	98.37		
159.25	149.65	305.32	97.61		
159.25	149.65	306.39	98.32		
159.25	149.65	306.22	98.21		
159.25	149.65	305.63	97.81		

表4 异鼠李素加样回收试验结果($n=6$)

样品含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
68.46	79.50	143.71	94.65	97.83	1.63
68.46	79.50	147.15	98.98		
68.46	79.50	146.68	98.39		
68.46	79.50	146.92	98.69		
68.46	79.50	146.66	98.36		
68.46	79.50	146.28	97.89		

表5 样品中总黄酮醇苷的含量测定结果($\mu\text{g/mL}$, $n=3$)

样品批号	槲皮素	山柰素	异鼠李素	总黄酮醇苷
20160401	25.40	22.29	9.87	144.48
20160306	25.15	22.62	9.83	144.58
20160305	25.32	22.58	9.73	144.65

3 讨论

3.1 水浴温度及回流时间选择

试验表明,水浴温度及回流时间对酸水解结果影响较大。取同一批样品(批号为20160401)测定,当水浴温度为85℃、回流时间为45 min,测得总黄酮醇苷含量为108.43 $\mu\text{g/mL}$;85℃,60 min,含量为117.84 $\mu\text{g/mL}$;90℃,60 min,含量为135.85 $\mu\text{g/mL}$;90℃,90 min,含量为141.27 $\mu\text{g/mL}$;100℃,90 min,含量为144.65 $\mu\text{g/mL}$;100℃,105 min,含量为142.39 $\mu\text{g/mL}$ 。最终选择总黄酮测得含量最高的条件(即100℃水浴中加热回流90 min)对样品进行酸水解。

3.2 流动相选择

曾采用2015年版《中国药典(一部)》银杏叶中总黄酮醇苷含量测定方法中采用的流动相条件,即甲醇-0.4%磷酸溶液(50:50),对样品进行测定,但山柰素峰与异鼠李素峰分离效果不理想。采用2.1项下流动相条件,即甲醇-0.4%磷酸溶液(55:45),很好地解决了山柰素峰与异鼠李素峰分离度的问题(>1.5),符合色谱系统适用性条件要求,可用于本制剂中总黄酮醇苷含量测定。

3.3 方法适用性

本试验中建立了复方银杏通脉口服液中总黄酮醇苷的含量测定方法,以槲皮素、山柰素和异鼠李素为对

照品,采用HPLC法测定,方法简单、结果准确、数据重复性、精密度都良好,方法专属性较强,适用于复方银杏通脉口服液的质量控制。

参考文献:

- [1] 胡敏,姜发堂,张声华. 三种测定银杏叶提取物中总黄酮的方法比较[J]. 食品与发酵工业,1997,23(4):40-43.
- [2] 沈洁,任世禾. 复方银杏叶胶囊质量标准的研究[J]. 上海中医药杂志,2007,41(6):79-81.
- [3] 谭培汉. HPLC法测定银杏缓释片中总黄酮苷的含量[J]. 亚太传统医药,2008,4(2):45-47.
- [4] Hasler A, Sticher O, Meier B. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1992, 605(1): 41-48.
- [5] 韩立路,孙兴力,龙红萍,等. HPLC法快速测定银杏叶中银杏总黄酮醇苷含量[J]. 中国医药指南,2009,7(12):5-6.
- [6] 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]. 中国实用医药,2012,23(36):3446-3448.
- [7] 李彦博,孙静,弭玮. 银杏叶片中总黄酮醇苷的含量测定[J]. 中国实用医药,2008,3(6):16-17.
- [8] 陈红斗,孙黎清,董自波. 银杏叶总黄酮苷和萜内酯类化合物最佳提取工艺研究[J]. 中国药业,2007,16(14):47-48.
- [9] Lei T, Hu X, Gao L, et al. Preparation of extracts of *Ginkgo biloba* Leaves[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2002, 33(2): 70-72.
- [10] 杨雪鸥,郁建平,何照范,等. 酸法水解银杏黄酮的工艺条件[J]. 山地农业生物学报,2006,25(2):181-184.
- [11] 张雪梅,刘斐. 银杏达莫注射液的制备及含量测定[J]. 中国药业,2005,14(11):44-46.
- [12] 郭伟,易耀江,翟凤,等. 复方银杏叶颗粒中总黄酮醇苷的含量测定[J]. 江西中医药大学学报,2017,29(4):65-66.
- [13] 冯冬梅,辛懋. HPLC法测定银杏叶口服液中总黄酮的含量[J]. 华夏医学,2003,16(2):157-158.
- [14] 邓朝晖,胡文军. HPLC法测定复方银杏叶胶囊中总黄酮醇苷的含量[J]. 解放军药学报,2008,24(3):249-251.
- [15] 陈桂红,钟锐生. 高效液相色谱法测定银杏叶分散片中总黄酮醇苷含量[J]. 医药导报,2008,27(7):849-850.
- [16] 周金彩,王文渊,韩立露. 复方银杏叶胶囊质量控制方法研究[J]. 中国药业,2007,16(17):14-15.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:316.

(收稿日期:2018-03-05)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号:78-130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真:(023) 86592565

网上投稿: <http://www.zhongguoyaoye023.com> 或 中国药业在线投稿系统