

HPLC 测定银杏达莫注射液中游离芦丁和槲皮素的含量

王倬珣, 顾峥嵘, 丁建*

(江苏省常州药品检验所, 常州 213002)

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱法测定银杏达莫注射液水解前芦丁、槲皮素的含量。方法: 采用 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 甲醇-0.4% 磷酸溶液 (38:62) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 360 nm, 柱温 30 °C。结果: 芦丁、槲皮素分别在 0.046675 ~ 4.6675 μg、0.019927 ~ 1.9927 μg 之间线性关系良好, $r = 0.9999$; 平均回收率分别为 98.9%, 97.8%。结论: 本方法有效、简便、精确, 可用于银杏达莫注射液水解前芦丁、槲皮素的含量测定。

关键词: 中药; 注射液; 银杏达莫; 银杏叶; 提取物; 芦丁; 槲皮素; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)10-1902-03

RP-HPLC determination of rutin and quercetin in ginkgo damole injection before hydrolysis

WANG Zhuo-xuan, GU Zheng-rong, DING Jian*

(Changzhou Institute for Drug Control of Jiangsu Province, Changzhou 213002, China)

Abstract Objective: To establish an RP-HPLC method for determination of rutin and quercetin in ginkgo damole injection before hydrolysis. **Method:** Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column was adopted with the mobile phase of methanol-0.4% phosphoric acid (38:62) at flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. Detection wavelength was set at 360 nm and the column temperature was 30 °C. **Results:** The calibration curve was linear within the concentration range of 0.046675 ~ 4.6675 μg and 0.019927 ~ 1.9927 μg respectively. The recovery of rutin and quercetin total flavone was 98.9% and 97.8%. **Conclusion:** The method is effective, simple and accurate, and can be used to determine the content of ginkgo leaves extract before hydrolysis in ginkgo damole injection. **Key words:** traditional Chinese medicine; injection; ginkgo damole; ginkgo leaves; extract; rutin; quercetin; HPLC

银杏达莫注射液^[1,2]是一种疗效显著的心脑血管药物,主要成分银杏叶提取物具有扩张冠脉血管、脑血管,改善脑缺血产生的症状和记忆功能。现行标准通过对水解后总黄酮醇苷的含量测定来控制银杏叶提取物的质量,却对水解前芦丁、槲皮素的量没有控制。利用标准的不足,人为添加芦丁(芦丁水解后为槲皮素)、槲皮素,可使水解后总黄酮醇苷的量能达到现行标准规定,以次充好,降低成本。参照中国商务部外经贸行业标准 WM/T-2008(待批),银杏叶提取物水解前芦丁含量不得过 4.0%,槲皮素含量不得过 0.2%。据此计算,银杏达莫注射液中每 1 mL 含芦丁(C₂₇H₃₀O₁₆)不得过 0.18 mg,含槲皮素(C₁₅H₁₀O₇)不得过 0.009 mg,本文参考文

献^[3-5]建立反相高效液相色谱法测定银杏达莫注射液水解前芦丁、槲皮素的含量,进行质量控制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪 [包括: 可变波长紫外检测器 (VWD)、Agilent ChemStation 工作站 (美国安捷伦科技有限公司)、自动进样器]; Waters 2695 高效液相色谱仪 [包括: Waters 2996 二极管阵列检测器、Waters 工作站器 (上海) 有限公司]、BP211D 电子分析天平 (德国赛多利斯股份公司); KQ5200DE 超声清洗机 (上海舒美超声仪器有限公司); ED53 恒温干燥箱 (德国 BINDER 公司)。所用仪器和量具均经校正和检定。

1.2 试剂 对照品芦丁 (批号 100080-200707, 含

* 通讯作者 Tel: (0519) 86679061; E-mail: 13861272168@139.com

量为 90.5%, 不需干燥)、槲皮素(批号 100081 - 200406, 含量为 97.3%, 120 °C 干燥 4 h)、银杏叶提取物对照提取物(批号 110866 - 200202) 购于中国药品生物制品检定所; 银杏达莫注射液(A 企业, 批号 20081202; B 企业, 批号 081033 和 080921; C 企业, 批号 20081207, 20080903, 20090201); 银杏提取物(C 企业, 批号 20090201, 20090301; D 企业 批号 /; E 企业, 批号 TL0819 CP2005; F 企业, 批号 0807007 - 1); 银杏叶片(G 企业, 批号 080501); 银杏胶囊(D 企业, 批号 081125)。水为超纯水, 甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 0.4% 磷酸溶液 (38:62); 检测波长 360 nm; 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL · min⁻¹。在以上色谱条件下芦丁、槲皮素与其他组分分离度良好, 见图 1。

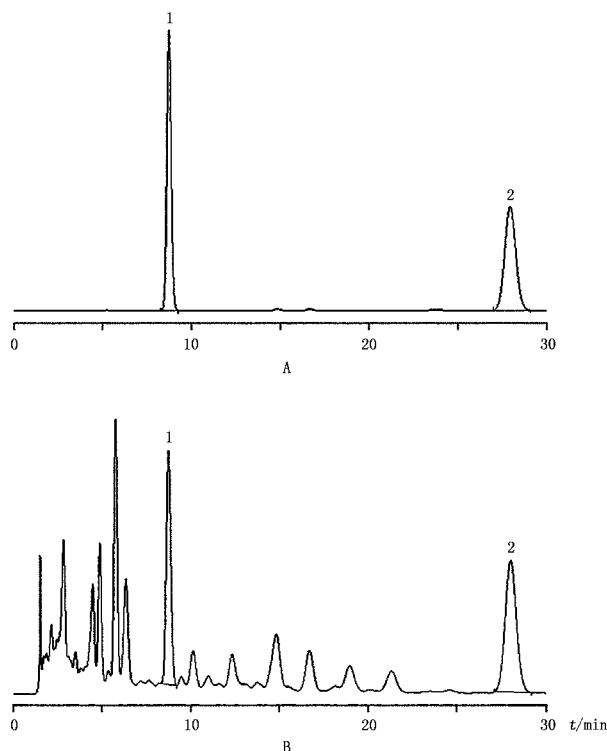


图 1 对照品(A)和样品(B)的HPLC图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and sample(B)
1. 芦丁(rutin) 2. 槲皮素(quercetion)

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别取对照品芦丁、槲皮素对照品 20 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别精密量取芦丁对照

品溶液 25 mL、槲皮素对照品溶液 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液(每 1 mL 含芦丁 50 μg、槲皮素 20 μg)。

2.2.2 供试品溶液 精密量取银杏达莫注射液 10 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 线性关系考察 精密量取混合对照 溶液 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 分别制成含芦丁为 0.005, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 mg · mL⁻¹, 含槲皮素为 0.002, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.2 mg · mL⁻¹ 的溶液。按上述色谱条件进样, 测定峰面积。以进样量 X(μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标进行回归, 得芦丁和槲皮素标准曲线方程分别为:

$$Y = 0.65504 + 1754.4X \quad r = 0.9999$$

$$Y = 0.064236 + 3898.6X \quad r = 0.9999$$

分别在 0.046675 ~ 4.6675 μg 和 0.019927 ~ 1.9927 μg 范围内呈良好线性关系。

2.4 检测限与定量限 芦丁按(S/N=3) 确定检测限为 0.5228 ng, 按 S/N=10 确定定量限为 1.643 ng; 槲皮素按 S/N=3 确定检测限为 0.5955 ng, 按 S/N=10 确定定量限为 2.382 ng。

2.5 精密度试验 取混合对照品溶液按上述色谱条件, 连续进样 5 次, 测定芦丁和槲皮素峰面积, 计算其 RSD 分别为 0.17% 和 0.13%, 说明该方法具有良好的精密度。

2.6 稳定性试验 取银杏达莫注射液(B 企业, 批号 081033) 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下, 分别于 0, 0.5, 2, 3.5, 5, 7.5, 12, 18.5, 22 h 进样测定, 求得芦丁、槲皮素峰面积的 RSD 分别为 0.26% 和 0.34%。结果表明, 供试品溶液在 22 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取银杏达莫注射液(B 企业, 批号 081033) 6 份, 按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液, 并按上述色谱条件进行测定。结果芦丁平均含量为 0.11 mg · mL⁻¹, RSD 为 0.11%, 槲皮素平均含量为 0.067 mg · mL⁻¹, RSD 为 0.31%。说明此方法重复性较好。

2.8 回收率试验 精密量取 9 份已知含量的银杏达莫注射液(B 企业, 批号 081033, 芦丁 0.10684 mg · mL⁻¹、槲皮素 0.067304 mg · mL⁻¹), 每份 5 mL, 分别置 50 mL 量瓶中, 精密加入混合对照品溶液

(芦丁 $0.050575 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、槲皮素 $0.02040 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 10 mL、15 mL 和 20 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。并按“2.1”项下色谱条件进行测定, 结果: 芦丁低、中、高浓度的回收率 ($n=3$) 分别为 98.3% (RSD = 0.6%), 98.4% (RSD = 0.5%), 100.0% (RSD = 0.9%), 平均值 ($n=9$) 为 98.9%;

槲皮素低、中、高浓度的回收率 ($n=3$) 分别为 95.9% (RSD = 1.0%), 98.8% (RSD = 0.16%), 98.7% (RSD = 0.6%), 平均值 ($n=9$) 为 97.81%。

2.9 样品测定 取各批次银杏达莫注射液, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下, 依法测定, 结果见表 1。

表 1 银杏达莫注射液测定结果

Tab 1 The determination results of ginkgo damole injection

生产单位 (manufacture)	规格 (specification)	批号 (batch number)	芦丁(rutin)		槲皮素含量(quercetion)	
			含量(content) /mg · mL ⁻¹	RSD /%	含量(content) /mg · mL ⁻¹	RSD /%
A	5 mL	20081202	0.12	0.0	0.004	1.1
B	10 mL	081033	0.11	0.04	0.067	0.14
	5 mL	080921	0.11	0.07	0.062	0.27
C	5 mL	20081207	0.20	0.06	0.011	0.37
	5 mL	20080903	0.15	0.18	0.011	0.22
	10 mL	20090201	0.09	0.06	0.014	0.45

3 讨论

3.1 采用二极管阵列检测器对芦丁、槲皮素进行紫外光谱的扫描, 均在 360 nm 附近有最大吸收, 故选择 360 nm 作为检测波长。

3.2 比较了不同组成和配比的流动相条件下的色谱参数、柱效和分离度等, 认为甲醇 - 0.4% 磷酸溶液(38: 62) 比较合适, 符合检测要求。

3.3 采用该方法共检验银杏达莫注射液 6 批, 其中 5 批超出限度, 同时我们检验了银杏叶提取物 5 批、银杏叶片、银杏胶囊各 1 批, 共 5 批超出限度, 因此有必要对水解前芦丁、槲皮素限度进行控制, 此方法可作为银杏类制剂检验的补充方法。

参考文献

- ZHANG Xue - mei(张雪梅), LIU Fei(刘菲). Preparation and content determination of ginkgo damole injection(银杏达莫注射液的制备及含量测定). *China Pharm*(中国药业), 2005, 14(11): 44

- BI Yu - meng(毕雨萌), SU Guo - xiang(孙国祥). Determination of the four components in Ginkgo - Leaf - Exact dipyrindamole injection by HPLC(RP - HPLC 同时测定银杏达莫注射液中 4 种成分的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2007, 29(11): 1620
- CHEN Hua - guo(陈华国), ZHOU Xin(周欣), ZHAO Chao(赵超), et al. RP - HPLC determination of quercetin in *Polygonum perforliatum* L. (HPLC 测定杠板归中槲皮素的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志). 2009, 29(10): 1749
- LAI Yu - hong(赖宇红), TONG Hui - zhen(童惠贞), XI Yan - fang(洗彦芳), et al. The revision advices on quantification of flavonoid aglycones in EGB recorded in ChP(中国药典水解测定银杏黄酮的改进建议). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志). 2009, 29(7): 1163
- WEI Xing - xing(卫星星), WANG Zhuan - hua(王转花). HPLC determination of rutin and quercetin in buckwheat husks(高效液相色谱法测定苦荞壳中芦丁和槲皮素的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(12): 1909

(本文于 2011 年 7 月 15 日修改回)

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告