

中国药典水解测定银杏黄酮的改进建议

赖宇红, 童惠贞, 冼彦芳, 朱焕容

(广东省药品检验所, 广州 510180)

摘要 目的: 改进中国药典银杏黄酮的测定。方法: 采取对供试液稀释溶剂加热回流脱氧、充氮气保护供试液、避光等保护措施下, 考察盐酸浓度、甲醇浓度、加热时间、供试液浓度、供试液放置时间等条件的耐用性。结果: 在以上预防氧化降解措施的保护下, 药典银杏黄酮水解条件有较好的耐用性。结论: 建议将预防氧化降解措施纳入药典银杏黄酮测定的正文, 并建议修改盐酸浓度的表示方式。

关键词: 银杏叶提取物; 黄酮醇苷; HPLC; 槲皮素; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)07-1163-03

The revision advices on quantification of flavonoid aglycones in EGB recorded in ChP

LA I Yu-hong, TONG Hui-zhen, XIAN Yan-fang, ZHU Huan-rong

(Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

Abstract Objective To improve the robustness of quantification of flavonoid aglycones in *Ginkgo biloba* (EGB) extract etc recorded in Chinese Pharmacopoeia (ChP) 2005 flavonoid aglycones **Methods** To test the robustness of the conditions including the concentration of methanol, HCl and in the reaction, the time of hydrolysis and the stability of the test solution, adopting the protection measurements with introducing inert gas and protecting the reaction from light etc **Results** The robustness of the hydrolysis condition recorded in ChP 2005 is favourable after adopting the above measures **Conclusion** It is suggested that the quantification of flavonoid aglycones in *Ginkgo biloba* (EGB) extract etc recorded in ChP 2005 should conclude the measures of oxidation preventing and modified the expression of concentration of methanol

Key words Extract of *Ginkgo biloba*; Flavonoids; HPLC; Quercetin; quantification

黄酮醇苷的含量是银杏叶提取物及其制剂的重要含量指标之一,《中国药典》2005年版(以下简称药典)收载的是加热回流水解法^[1]。银杏黄酮水解条件研究的历年来反复报道^[2-8],但根据工作经验和应用交流了解的情况,该测定方法有时结果很不理想,在不同的实验室重现性不好,仍需要完善。已有研究报道认为氧化降解是影响测定结果准确性和重现性的重要因素,实验比较了在不同脱氧措施下的水解,结果黄酮测得量提高且供试液稳定^[9]。在此研究基础上,本文在脱氧、避光等措施下,以药典的银杏叶提取物总黄酮测定条件为基础,综合了文献报道的水解条件的范围,测定其耐用性。

1 试药与仪器

试药: 银杏叶对照提取物: [Extract *Ginkgo biloba* EGB 761 Standard, Batch DM 1430H] 德国威马舒博士药厂 (Dr Wilhelm Schwabe GmbH) 提供; 槲皮素 (Quercetin)、山奈素 (Kaempferide)、异鼠李素 (Isohamnetin): 中国药品生物制品检定所提供, 批号依次为: 10081-9905, 0861-9901, 0869-9903。仪器: Waters 2695/2996 高效液相色谱仪; JULABO-19 恒温水浴; Kromasil C18 色谱柱 (150 mm × 4.5 mm, 5 μm)。

2 实验条件

预防氧化降解的措施: 脱气甲醇系指将甲醇加热回流 30 min 放冷, 用于水解后供试液的稀释, 取

用时轻拿轻倒;充氮气指容量瓶在密塞振摇前,先用氮气吹扫 1~2 min,再立即密闭。其余条件除另有注明外,均按药典^[1]。

3 考察实验与结果

3.1 盐酸浓度的耐用性 不同的文献对盐酸浓度的表述方式不一致,本文所述的水解盐酸浓度指水解过程溶液中盐酸的浓度($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。药典所取 25% 盐酸浓度如依凡例规定(即按 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 计)水解时盐酸浓度约 $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,如依浓盐酸浓度 36% ~ 38% 计(即按 $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 计)水解时盐酸浓度约 $1.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验配制的水解溶液盐酸浓度依次为 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4 1.7, 2.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,其余水解条件均按药典。结果测得总黄酮醇苷的值依次为 11.98%, 14.23%, 19.33%, 20.96%, 20.76%, 20.96%, 20.84%,可见,盐酸浓度在 $1.2 \sim 2.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,水解结果耐用性非常好($\text{RSD} = 0.5\%$, $n = 4$);当盐酸浓度低于 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,测定结果偏低。

3.2 甲醇浓度的耐用性 本文所述的水解甲醇浓度指水解过程溶液中甲醇的浓度(%),药典的水解甲醇浓度为 80%。配制的水解溶液的甲醇浓度依次为 20%, 40%, 60%, 80%,其余水解条件均按药典。结果测得总黄酮醇苷的值依次为 19.97%, 20.21%, 20.94%, 20.96%。可见,甲醇浓度对测定结果影响较小。

3.3 回流时间的耐用性 制备相同的溶液,精密吸取同量,分别加热回流 10 20 30 40 50 min,其余条件均按药典。结果测得总黄酮醇苷的值依次为 18.09%, 20.02%, 20.27%, 20.58%, 20.70%。可见,加热回流 30 min 是合适的。

3.4 供试液浓度的耐用性 本文所述的供试液浓度指水解过程溶液中银杏叶提取物的浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),药典的供试液浓度为 $1.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。配制的水解溶液含银杏叶提取物浓度依次为 0.69 1.37 2.72 5.45 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,其余条件均按药典。结果测得总黄酮醇苷的值依次为 20.96%, 20.48%, 20.53%, 20.93%。可见,药典条件下供试液浓度远远未达到测定的饱和状态。

3.5 水解后供试液的稳定性 取同一份加热回流水解并以脱气甲醇在充氮气下稀释后的供试品溶液,分装于两个进样瓶中,分别将进样瓶裸露于光线充足的窗台或以黑纸包裹避光,在不同时间进样(图 1)。实验结果表明,在 28 h 内,避光与不避光的溶液均基本稳定。

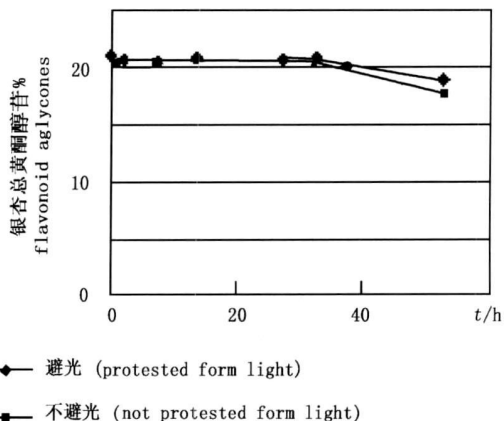


图 1 供试品溶液稳定性

Fig 1 The stability of test solution

4 讨论

4.1 水解液的稀释操作 必须注意尽量减少氧进入溶液。由于加热回流过程就是很好的脱气过程,因此回流液中氧化降解并不明显,回流后的水解液,如能保持与冷凝管的连接下冷却、放置,溶液的稳定性并无显著下降;如果采用低酸度回流水解液不经稀释直接进样测定,其稳定性非常好;但稀释后的供试液稳定性则显著下降。以上现象表明水解后稀释过程溶液引入氧气导致稳定性迅速下降。由于药典选择了高酸度、短时间的水解,出于保护色谱柱,水解液必须稀释以降低酸度,因此,建议稀释用的溶剂应预处理,例如加热回流 30 min 以达到脱气目的;在定容后的混合中,如不具氮气吹扫的条件,也应设法避免振摇混合操作将氧带入溶液,建议定容后超声混合、补足溶剂至刻度再超声处理。实验证实,本文提高溶液稳定性所采用的减少溶液中氧的措施是充足有效的,药典的水解条件的耐用性是非常好的。

4.2 根据本实验考察的结果,盐酸浓度对水解结果有关键影响,建议修订药典盐酸浓度的表述方式。药典规定水解时取 25% 盐酸,其浓度单位($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 或 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)不甚明确,两者相比约为 1.2 倍,虽然根据本实验的考察结果两种浓度均在平台值范围,对测定结果影响甚少,但如果取用 ($25 \text{ mL} \rightarrow 100 \text{ mL}$) 的盐酸溶液,其所配水解供试液的盐酸浓度仅为 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,测定结果往往明显偏低,据了解,应用中此类典型失误并不少见,本实验曾在该酸度下分段考察了回流水解,直至 3 h 其结果仍只相当足量盐酸时的 90%。为减少理解歧义并保证操作的一致性,建议《中国药典》修订时盐酸溶液的浓度按 ($25 \rightarrow 36$) 方式表述。

4.3 根据本文的考察结果,药典选择的酸度与水解时间是合适的。文献报道中水解时间存在较多的争

议^[4,5], 本文认为是盐酸浓度单位的理解不同造成的。由于盐酸浓度及回流时间与水解结果紧密相关, 即酸度足够时回流时间可较短, 酸度略低时需适当延长回流时间。本实验盐酸浓度在 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时回流水解 30 min, 水解结果略偏低, 与文献报道的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸下回流水解需 60 min^[4]的情况是吻合的。

4.4 建议适当避光。在加热回流状态至拆除冷凝管之前, 溶液中的溶解氧甚少, 氧化降解基本不发生; 在溶解样品至开始回流的这段操作时间也不长, 氧化降解不明显; 本实验在避氧操作下稀释, 考察了最终供试液避光与否, 一天内测定结果区别不太明显。但综合所掌握的槲皮素不稳定的表现^[9,10], 以适当避光更稳妥。

4.5 加热回流水解时甲醇的浓度对结果的影响小,可能加热回流状态下甲醇与溶质均处于激烈的对流之中, 故影响远远低于密封加热水解^[9]。

4.6 银杏总黄酮测定采用密封水解比回流水解的收得率更高^[9],但密封水解氧化降解的发生更容易, 故需要严格控制更多的条件, 而回流水解更容易掌握、耐用性好, 建议药典暂不急于修订为密封水解法。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005 Vol I (一部): 281
- 2 XIE Pei-shan(谢培山). 银杏叶标准提取物 EGb761 及银杏叶制剂的质量评价(待续). *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 1999, 24(1): 3
- 3 XIE Pei-shan(谢培山). 银杏叶标准提取物 EGb761 及银杏

- 叶制剂的质量评价(续完). *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 1999, 24(2): 116
- 4 QIAN Zhi-yu(钱之玉), FU Jian(傅建), HU Mei(胡梅). 银杏黄酮的 HPLC法测定及其探讨. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1996, 27(4): 253
- 5 DENG Dan-dan(邓丹丹), ZHAO Hao-nu(赵浩如), HUANG Luo-sheng(黄罗生). Influence of hydrolysis time on Ginkgo biloba flavonoids content(水解时间对银杏黄酮含量的影响). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2004, 26(8): 662
- 6 XIE Min(谢敏), HU Yan(胡燕), CHEN Wei-ping(陈维平), et al. Determination of content of flavonoids from Ginkgo biloba leaves and extract of Ginkgo biloba by HPLC(高效液相色谱法测定银杏叶及其提取物中黄酮类成分的含量). *China Pharmacist*(中国药师), 1999, 2(3): 146
- 7 WANG Jun-de(王俊德), XIONG Bo-hui(熊博晖), CONG Run-zi(丛润滋), et al. Several problems in analysis of flavonoids from Ginkgo biloba by high performance liquid chromatography(高效液相色谱法分析银杏黄酮时几个问题的探讨). *Chin J Anal Chem*(分析化学), 1999, 27(9): 1076
- 8 JI Xing-rong(鞠兴荣), WANG Hai-feng(汪海峰). Determination of flavonoids in extract of Ginkgo biloba L. by high performance liquid chromatography(银杏叶提取物中黄酮类化合物的高效液相色谱测定). *Food Science*(食品科学), 2001, 22(12): 66
- 9 LAI Yu-hong(赖宇红), TONG Hui-zhen(童惠贞), XIAN Yan-fang(洗彦芳), et al. Flavonoids hydrolysis conditions in EGb quantification(银杏黄酮测定时水解条件的研究). *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2007, 38(6): 569
- 10 NI Li-jun(倪力军), ZHU Guo-guang(祝国光). Oxidation of quercetin and its effect on producing process and quality of EGb(槲皮素的氧化及其对 EGb制备过程和质量的影响). (*Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2000, 22(12): 825

(本文于 2008年 8月 27日收到)