

# 银杏叶片中5种银杏双黄酮类成分同时测定方法的建立

刘丽娜<sup>1\*</sup>,李海亮<sup>1</sup>,李耀磊<sup>1,2</sup>,金红宇<sup>1#a</sup>,咎珂<sup>1#b</sup>(1.中国食品药品检定研究院,北京 100050;2.北京中医药大学中药学院,北京 100029)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)10-1220-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.10.11



**摘要** 目的 建立同时测定银杏叶片中穗花杉双黄酮、白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮含量的方法。方法 银杏叶片经甲醇超声提取后,采用超高效液相色谱法测定。以 Waters Acquity UPLC HSS T3 为色谱柱,以乙腈-0.4%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,流速为 0.4 mL/min,柱温为 35 ℃,检测波长为 340 nm,进样量为 1 μL(对照品)、10 μL(供试品)。采用一测多评法,以穗花杉双黄酮为参照物,计算白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的相对校正因子,以相对保留时间法定位色谱峰,再计算上述成分的含量并与外标法测定结果(穗花杉双黄酮除外)进行比较。结果 穗花杉双黄酮、白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮检测进样量的线性范围分别为 0.10~8.21、0.24~19.34、0.16~12.98、0.22~17.66、0.06~4.86 ng( $r$ 均大于 0.999),定量限分别为 0.10、0.24、0.16、0.22、0.06 ng;精密性、重复性、稳定性(36 h)试验的 RSD 均小于 3.00%,平均加样回收率为 99.77%~102.85%,RSD 为 1.90%~4.40%( $n=6$ )。白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的平均相对校正因子分别为 0.91、0.93、0.96、0.95,平均相对保留时间分别为 1.08、1.18、1.19、1.30;一测多评法计算结果与外标法测得结果的相对偏差在 ±3.00% 以内。结论 所建方法准确、稳定,可用于银杏叶片中银杏双黄酮类成分的测定及质量控制。

**关键词** 超高效液相色谱法;一测多评法;银杏叶片;银杏双黄酮;含量测定

## Establishment of determination method for five *Ginkgo* biflavones in *Ginkgo biloba* leaves tablets

LIU Lina<sup>1</sup>, LI Hailiang<sup>1</sup>, LI Yaolei<sup>1,2</sup>, JIN Hongyu<sup>1</sup>, ZAN Ke<sup>1</sup>(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. College of TCM, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To establish a method for the determination of amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin and sciadopitysin in *Ginkgo biloba* leaves tablets. **METHODS** After extracted with methanol, ultra-performance liquid chromatography (UPLC) was adopted to determine *G. biloba* leaves tablets. The determination was performed on Waters Acquity UPLC HSS T3 column with acetonitrile-0.4% phosphoric acid as mobile phase (gradient elution) at the flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature was set at 35 ℃, and the detection wavelength was 340 nm. The sample size were 1 μL(substance control) and 10 μL(test sample). The relative correction factors (RCFs) of bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin and sciadopitysin were calculated by quantitative analysis of multicomponents by single marker (QAMS) using amentoflavone as control. The chromatographic peak was located with the relative retention time method. Then the contents of the above components were calculated, and the results were compared with those of external standard method (ESM) (except for amentoflavone). **RESULTS** The linear ranges of amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin and sciadopitysin were 0.10-8.21, 0.24-19.34, 0.16-12.98, 0.22-17.66, 0.06-4.86 ng, respectively (all  $r > 0.999$ ). The quantitation limits were 0.10, 0.24, 0.16, 0.22, 0.06 ng, respectively. RSDs of precision, repeatability and stability tests (36 h) were all lower than 3.00%. The average recoveries were 99.77%-102.85%, and RSDs were 1.90%-4.40% ( $n=6$ ). The average RCFs of bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin and sciadopitysin were 0.91, 0.93, 0.96 and 0.95, respectively. The average relative retention times were 1.08, 1.18, 1.19 and 1.30, respectively. The relative deviation between the calculation result of QAMS and ESM was within ±3.00%. **CONCLUSIONS** The established method is accurate and stable, and can be applied to the determination of *Ginkgo* biflavones in *G. biloba* leaves tablets and control the quality.

**KEYWORDS** ultra-performance liquid chromatography; quantitative analysis of multicomponents by single marker; *Ginkgo biloba* leaves tablets; *Ginkgo* biflavones; content determination

银杏叶片是以银杏叶提取物为原料,加适宜辅料制备而成的中药制剂,是临床重要的治疗心脑血管疾病

\*副研究员,硕士研究生。研究方向:中药、天然药物质量控制及有害残留物分析。电话:010-53852466。E-mail:klln@163.com

#a通信作者:主任药师。研究方向:中药、民族药质量控制与评价。电话:010-53852076。E-mail:jhyu@nifdc.org.cn

#b通信作者:副研究员,博士。研究方向:中药、民族药质量控制与评价。电话:010-53852092。E-mail:6206310@qq.com

的药品。银杏叶提取物中不仅含有黄酮、萜类内酯、有机酸、烷基酚、酚酸、甾体、聚戊烯等30余种成分,还含有双黄酮类成分<sup>[1-2]</sup>。银杏双黄酮是由两分子黄酮母核通过C—C键聚合而成的一类化合物,现已从银杏叶中分离鉴定出8种双黄酮类成分,其中苷元6种,分别为穗花杉双黄酮、金松双黄酮、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、白果黄素、5'-甲氧基白果黄素;双黄酮苷2种,分别为银杏

黄素-7"-O-β-D-吡喃葡萄糖苷和异银杏黄素-7"-O-β-D-吡喃葡萄糖苷<sup>[2-3]</sup>。有研究表明,双黄酮类成分有抗氧化、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等生物活性<sup>[4-10]</sup>。然而,近年来有部分学者关注到银杏双黄酮类成分的毒性,比如穗花杉双黄酮是酶强抑制剂<sup>[11]</sup>,银杏叶中双黄酮具有潜在的肝毒性和肾毒性<sup>[12]</sup>,金松双黄酮和白果黄素均可导致严重的肾功能障碍和溶血等并发症<sup>[13-14]</sup>。

德国植物药企业 Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG 于 1965 年研发出银杏叶提取物,定名为 EGb761,成分包括黄酮类(24%)和萜类内酯(6%)。该提取物组成被认为是黄金配比,其质量标准也被沿用至今<sup>[15]</sup>。EGb761 的生产工艺包含以丙酮-水为起始溶剂的粗提取,脱脂,除去银杏酚酸、原花青素、银杏双黄酮,富集萜类内酯,富集黄酮醇类等 15 道工序<sup>[15-16]</sup>。其中,有一道工序为去除银杏双黄酮,且其质量标准中还对双黄酮类成分进行了限量。2020 年版《中国药典》(一部)中提及,银杏叶提取物以银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶为原料,用乙醇回流提取,合并提取液并浓缩至适量后,上样至大孔吸附树脂柱上,依次用水及不同浓度的乙醇洗脱,收集相应洗脱液,回收乙醇,干燥,即得有效成分富集的浅黄棕色至棕褐色的银杏叶提取物粉末,但其检查项并不涉及双黄酮类成分<sup>[17]</sup>。本研究拟采用超高效液相色谱法联合一测多评法,建立测定银杏叶片中 5 种双黄酮类成分(穗花杉双黄酮、金松双黄酮、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、白果黄素)含量的方法,旨在摸清国产制剂银杏叶片中双黄酮类成分的含量,为银杏叶制剂的质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Acquity UPLC H-CLASS 型超高效液相色谱仪及配备的二极管阵列检测器(美国 Waters 公司),UlitiMate 3000 型高效液相色谱仪及配备的紫外检测器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),Nexera UHPLC LC-30A 型超高效液相色谱仪及配备的二极管阵列检测器(日本 Shimadzu 公司),AE240 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),Milli-Q 型超纯水处理系统[默克密理博实验室设备(上海)有限公司]等。

### 1.2 主要药品与试剂

7 批银杏叶片来源于 2019 年国家药品评价抽验样品,生产厂家包括云南某药业股份有限公司(厂家 1,样品批号分别为 20190302、20190303)、湖南某药厂股份有限公司(厂家 2,样品批号分别为 181201、190301)、江苏某药业有限公司(厂家 3,样品批号分别为 180508、180509)、石家庄某药业股份有限公司(厂家 4,样品批号为 A1902004),规格均为每片含总黄酮醇苷 9.6 mg、萜类

内酯 2.4 mg。穗花杉双黄酮对照品(批号 111902-201603,纯度 97.7%)购自中国食品药品检定研究院;金松双黄酮对照品(批号 P20N10F103774,纯度 99.4%)、银杏双黄酮对照品(批号 P09N8F47765,纯度 98.4%)、异银杏双黄酮对照品(批号 Y10N8Y47776,纯度 99.7%)、白果黄素对照品(批号 Y15J9L63710,纯度 95.6%)均购自上海源叶生物科技有限公司;甲醇、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 单一对照品储备液 取白果黄素对照品 12 mg、银杏双黄酮对照品 8 mg、异银杏双黄酮对照品 11 mg,精密称定,分别置于 50 mL 量瓶中;另取穗花杉双黄酮对照品 10 mg、金松双黄酮对照品 6 mg,精密称定,分别置于 100 mL 量瓶中;均用二甲基亚砷溶解并稀释至刻度,即得单一对照品储备液。

2.1.2 混合对照品溶液 分别精密吸取“2.1.1”项下各单一对照品储备液 1 mL,置于 100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,即得混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液 取银杏叶片 10 片,除去包衣,研细,称取相当于总黄酮醇苷 9.6 mg 的样品粉末,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,密塞,称定质量,超声(功率 250 W,频率 33 kHz)处理 20 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

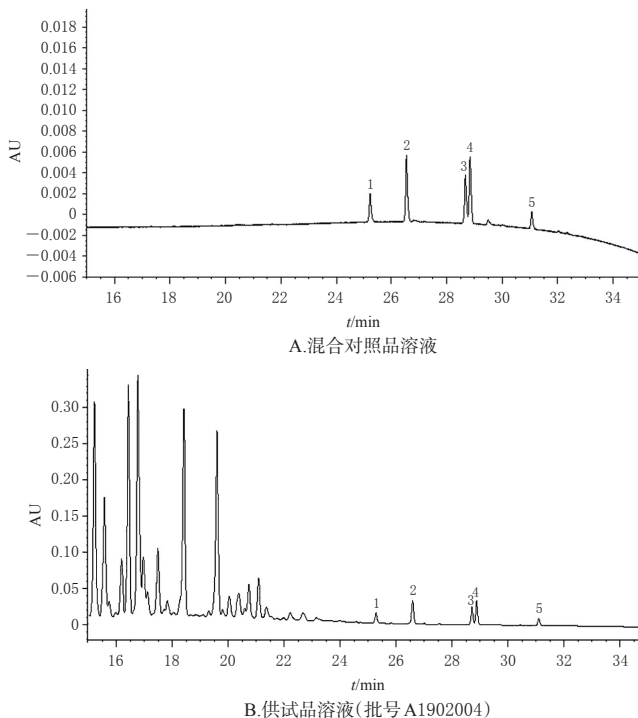
### 2.2 色谱条件

以 Waters Acquity UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)为色谱柱,以乙腈(A)-0.4%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~1.5 min, 1% A; 1.5~21.5 min, 1% A→40% A; 21.5~35.5 min, 40% A→99% A; 35.5~40 min, 99% A→1% A);流速为 0.4 mL/min;柱温为 35 ℃;检测波长为 340 nm;混合对照品溶液进样量为 1 μL,供试品溶液进样量为 10 μL。在该色谱条件下,混合对照品溶液、供试品溶液(批号 A1902004)的色谱图见图 1,空白溶液(即甲醇)不干扰各待测成分的测定(图略)。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 0.1、0.5、1、2、5、8 μL,按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以进样量为横坐标(x/ng)、峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线并进行回归分析,得穗花杉双黄酮、白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的回归方程和线性范围,结果见表 1。

2.3.2 定量限考察 取混合对照品溶液适量,用甲醇逐步稀释,以信噪比 10:1 所对应的对照品溶液质量考察定量限。结果显示,穗花杉双黄酮、白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的定量限分别为 0.10、0.24、0.16、0.22、0.06 ng。



1: 穗花杉双黄酮; 2: 白果黄素; 3: 银杏双黄酮; 4: 异银杏双黄酮; 5: 金松双黄酮

图1 穗花杉双黄酮等5种银杏双黄酮类成分的超高效液相色谱图

表1 穗花杉双黄酮等5种银杏双黄酮类成分定量分析的回归方程和线性范围

待测成分	回归方程	r	线性范围/ng
穗花杉双黄酮	$y=16\ 150\ 286x-3\ 790$	0.999 9	0.10~8.21
白果黄素	$y=14\ 888\ 421x-1\ 230$	0.999 9	0.24~19.34
银杏双黄酮	$y=16\ 023\ 995x-956$	0.999 9	0.16~12.98
异银杏双黄酮	$y=16\ 548\ 518x-1\ 371$	0.999 9	0.22~17.66
金松双黄酮	$y=15\ 699\ 838x-1\ 532$	0.999 9	0.06~4.86

2.3.3 精密度试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(批号A1902004)10  $\mu$ L,按“2.2”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,穗花杉双黄酮、白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮峰面积的RSD分别为1.56%、1.21%、0.83%、1.87%、1.63%( $n=6$ ),表明该方法精密度良好。

2.3.4 重复性试验 分别取相当于总黄酮醇苷9.6 mg的样品粉末(批号A1902004)6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并采用外标法计算各成分含量。结果显示,穗花杉双黄酮、白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的含量分别为11.31、29.36、17.97、22.54、7.26  $\mu$ g/片,即58.41、151.64、92.80、116.44、37.51  $\mu$ g/g, RSD分别为2.66%、2.06%、1.75%、1.81%、1.63%( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 分别精密吸取“2.1.3”项下供试品溶液(批号A1902004),分别于室温下放置0、3、12、24、

36 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,穗花杉双黄酮、白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮峰面积的RSD分别为2.03%、1.98%、2.54%、2.38%、2.64%( $n=5$ ),表明供试品溶液在室温下放置36 h内稳定。

2.3.6 加样回收率试验 按“2.1.2”项下方法制备混合对照品溶液,精密量取50 mL,置于100 mL量瓶中,加甲醇至刻度,即得加标回收溶液。分别取相当于总黄酮醇苷4.8 mg的样品粉末(批号A1902004)6份,置于具塞锥形瓶中,精密加入加标回收溶液10 mL,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 穗花杉双黄酮等5种银杏双黄酮类成分的加样回收率试验结果( $n=6$ )

待测成分	样品含量/ $\mu$ g	加入量/ $\mu$ g	测得量/ $\mu$ g	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
穗花杉双黄酮	5.65	6.03	11.76	101.33	101.58	3.66
	5.66	6.03	11.38	94.86		
	5.65	6.03	11.93	104.15		
	5.65	6.03	12.01	105.47		
	5.66	6.03	11.86	102.82		
	5.66	6.03	11.74	100.83		
白果黄素	14.65	12.12	26.05	94.06	99.77	4.40
	14.67	12.12	26.09	94.22		
	14.65	12.12	27.15	103.14		
	14.65	12.12	27.14	103.05		
	14.66	12.12	27.09	102.56		
	14.67	12.12	26.98	101.57		
银杏双黄酮	8.98	8.11	17.09	100.00	102.30	1.90
	8.99	8.11	17.11	100.12		
	8.98	8.11	17.41	103.95		
	8.98	8.11	17.41	103.95		
	8.99	8.11	17.43	104.07		
	8.99	8.11	17.24	101.73		
异银杏双黄酮	11.27	11.04	22.05	97.64	102.45	2.98
	11.28	11.04	22.27	99.55		
	11.27	11.04	22.77	104.17		
	11.27	11.04	22.75	103.99		
	11.28	11.04	22.85	104.80		
	11.28	11.04	22.82	104.53		
金松双黄酮	3.63	3.04	6.68	100.33	102.85	2.67
	3.63	3.04	6.63	98.68		
	3.63	3.04	6.78	103.62		
	3.63	3.04	6.80	104.28		
	3.63	3.04	6.85	105.92		
	3.63	3.04	6.80	104.28		

## 2.4 相对校正因子的计算

取混合对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续进样测定3次,以穗花杉双黄酮为参照物,采用斜率法计算白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的相对校正因子( $f_{is}$ ): $f_{is}=A_i/A_s$ (式中, $A_s$ 为参照物的斜率, $A_i$ 为待测成分的斜率)<sup>[18-20]</sup>。结果显示,白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的平均相对校正因子分别为0.91、0.93、0.96、0.95, RSD分别为1.60%、3.53%、3.50%、2.04%( $n=3$ )。

## 2.5 相对保留时间的确定

取混合对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续进样测定3次,以穗花杉双黄酮为参照物,采用相对保留时间法定位色谱峰并计算白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的相对保留时间( $r_{i/s}$ ): $r_{i/s}=t_i/t_s$ (式中, $t_s$ 为参照物的保留时间, $t_i$ 为待测成分的保留时间)<sup>[21]</sup>。结果显示,白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的平均相对保留时间分别为1.08、1.18、1.19、1.30,RSD分别为1.26%、2.09%、2.23%、2.39%( $n=3$ )。

## 2.6 耐用性试验

分别考察3种色谱仪(Waters Acquity UPLC H-CLASS、Shimadzu Nexera UHPLC LC-30A、Thermo UlitiMate 3000)和2种色谱柱[Waters Acquity UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm,1.8 μm)、Waters Cortecs UPLC C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm,1.6 μm)]对白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮相对校正因子和相对保留时间的影响,结果见表3、表4。由表3、表4可知,白果黄素等4种成分相对校正因子和相对保留时间的RSD均小于4.00%( $n=6$ ),表明不同色谱仪和不同色谱柱对白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮相对校正因子和相对保留时间的影响较小。

表3 不同色谱仪和色谱柱对白果黄素等成分相对校正因子的影响

色谱仪	色谱柱	白果黄素	银杏双黄酮	异银杏双黄酮	金松双黄酮
Waters	HSS T3	0.92	0.99	1.02	0.97
	Cortecs C <sub>18</sub>	0.92	0.89	0.96	0.98
Shimadzu	HSS T3	0.89	0.94	0.92	0.95
	Cortecs C <sub>18</sub>	0.88	0.92	0.94	0.94
Thermo	HSS T3	0.93	0.94	0.95	0.93
	Cortecs C <sub>18</sub>	0.90	0.91	0.96	0.94
均值		0.91	0.93	0.96	0.95
RSD/%		2.17	3.68	3.52	2.04

## 2.7 含量测定

取7批银杏叶片样品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液各3份,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以穗花杉双黄酮为参照物,按一测多评法计算白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的含量,并与外标法测定结果(穗花杉双黄酮除外)进行比

表4 不同色谱仪和色谱柱对白果黄素等成分相对保留时间的影响

色谱仪	色谱柱	白果黄素	银杏双黄酮	异银杏双黄酮	金松双黄酮
Waters	HSS T3	1.07	1.17	1.18	1.29
	Cortecs C <sub>18</sub>	1.09	1.22	1.23	1.35
Shimadzu	HSS T3	1.06	1.16	1.17	1.27
	Cortecs C <sub>18</sub>	1.09	1.19	1.21	1.31
Thermo	HSS T3	1.07	1.16	1.17	1.27
	Cortecs C <sub>18</sub>	1.09	1.20	1.21	1.32
均值		1.08	1.18	1.20	1.30
RSD/%		1.23	2.05	2.10	2.40

较,计算相对偏差:相对偏差= $(X_1 - X_2) / [(X_1 + X_2) / 2] \times 100\%$ (式中, $X_1$ 、 $X_2$ 分别为外标法和一测多评法的测定结果)<sup>[21]</sup>。结果显示,7批样品两种方法测定结果的相对偏差在±3.00%以内,表明两者无明显差异<sup>[21]</sup>,见表5。

## 3 讨论

现有关于银杏叶双黄酮的定量研究主要集中于银杏叶,而对银杏叶片中双黄酮类成分的定量研究少见报道<sup>[22-24]</sup>。本研究关注了银杏叶片中双黄酮类成分的含量,建立了同时测定5种双黄酮类成分含量的超高效液相色谱-一测多评法,可为银杏叶片的质量评价提供参考。由于目前中国食品药品检定研究院仅提供穗花杉双黄酮对照品,暂无白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮对照品,同时考虑到检测的经济性,所以本研究选择以穗花杉双黄酮为参照物,计算白果黄素、银杏双黄酮、异银杏双黄酮、金松双黄酮的相对校正因子和相对保留时间。根据赵一懿等<sup>[18]</sup>研究方法,用对照品不同浓度点建立一条标准曲线,将待测成分峰面积带入曲线求得含量,此法较为准确,所以本研究选择采用斜率法计算相对校正因子。

与单黄酮和黄酮苷相比,双黄酮类化合物极性较小,为了保证该类成分的溶解性,本研究先用二甲基亚砜溶解各对照品以后,再用甲醇稀释,最终制得对照品溶液。

本课题组前期考察了不同提取溶剂(80%甲醇、甲醇、二甲基亚砜)对双黄酮类成分提取效率的影响,结果显示,甲醇的提取效率最高,故本研究选择甲醇为提取溶剂;本课题组考察了超声、回流、振荡3种提取方式对

表5 银杏叶片中穗花杉双黄酮等5种银杏双黄酮类成分含量的测定结果

批号	穗花杉双黄酮/ (μg/片)	白果黄素			银杏双黄酮			异银杏双黄酮			金松双黄酮			总和/(μg/片)		
		外标法/ (μg/片)	一测多评法/ (μg/片)	相对偏差/ %	外标法/ (μg/片)	一测多评法/ (μg/片)	相对偏差/ %	外标法/ (μg/片)	一测多评法/ (μg/片)	相对偏差/ %	外标法/ (μg/片)	一测多评法/ (μg/片)	相对偏差/ %	外标法/ (μg/片)	一测多评法/ (μg/片)	相对偏差/ %
20190302	1.943	0.028	0.028	0	0.724	0.743	-2.59	0.732	0.728	0.55	0.678	0.670	1.19	4.105	4.112	-0.17
20190303	1.872	0.029	0.029	0	0.594	0.609	-2.49	0.708	0.704	0.57	0.643	0.635	1.25	3.846	3.849	-0.08
181201	2.942	1.675	1.650	1.50	1.112	1.140	-2.49	2.345	2.332	0.56	1.819	1.798	1.16	9.893	9.862	0.31
190301	0.574	0.151	0.148	2.01	0.219	0.225	-2.70	0.213	0.212	0.47	0.153	0.151	1.32	1.310	1.310	0
180508	0.207	-	-	-	0.081	0.083	-2.44	0.020	0.020	0	0.016	0.016	0	0.324	0.326	-0.62
180509	0.149	0.063	0.062	1.60	0.050	0.051	-1.98	0.140	0.139	0.72	0.117	0.115	1.72	0.519	0.516	0.58
A1902004	11.307	29.358	28.903	1.56	17.966	17.642	1.82	22.542	23.046	-2.21	7.261	7.238	0.32	88.434	88.136	0.34

—:未检出

双黄酮类成分提取效率的影响,结果显示,超声与回流都可以达到较好的提取效果,故在考虑操作方便性的基础上,本研究选择了超声提取;本课题组还考察了超声时间对双黄酮类成分提取效率的影响,结果显示,超声20 min就可将该类成分提取完全,故本研究选择提取时间为20 min。但由于实验条件有限,本研究在耐用性试验中只考察了2种色谱柱对待测成分相对校正因子和相对保留时间的影响,而其他品牌及型号色谱柱的相关数据尚需进一步积累。

本研究结果显示,不同企业产银杏叶片中双黄酮类成分的含量差异较大,主要原因可能是各个生产厂家的提取工艺不同。

综上所述,本研究所建一测多评法准确、稳定,可用于银杏叶片中银杏双黄酮类成分的测定及质量控制。

### 参考文献

- [1] VAN BEEK T A, MONTORO P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(11): 2002-2032.
- [2] MA X, YANG S, YING T, et al. The research progress on the biflavonoids in *Ginkgo biloba* leaves[J]. Shandong Chemical Industry, 2018, 345(23): 72-74, 76.
- [3] HYUN S K, KANG S S, SON K H, et al. Biflavone glucosides from *Ginkgo biloba* yellow leaves[J]. Chem Pharm Bull, 2005, 53(9): 1200-1201.
- [4] SU Y, SUN C M, CHUANG H H, et al. Studies on the cytotoxic mechanisms of ginkgetin in a human ovarian adenocarcinoma cell line[J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2000, 362(1): 82-90.
- [5] PAN X L, TAN N H, ZENG G Z, et al. Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human cathepsin B[J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(20): 5819-5825.
- [6] AN J G, LI Z X, DONG Y Y, et al. Amentoflavone protects against psoriasis-like skin lesion through suppression of NF-kappa B-mediated inflammation and keratinocyte proliferation[J]. Mol Cell Biochem, 2016, 413(1/2): 87-95.
- [7] KANG S S, LEE J Y, CHOI Y K, et al. Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15(15): 3588-3591.
- [8] ISHOLA I O, CHATTERJEE M, TOTA S, et al. Antidepressant and anxiolytic effects of amentoflavone isolated from *Cnestis ferruginea* in mice[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2012, 103(2): 322-331.
- [9] LEE M K, LIM S W, YANG H, et al. Osteoblast differen-

tiation stimulating activity of biflavonoids from *Cephalotaxus koreana*[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(11): 2850-2854.

- [10] LEE C W, NA Y, PARK N H, et al. Amentoflavone inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1 expression through the modulation of AP-1 components in normal human fibroblasts[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166(5): 1137-1147.
- [11] 陈莉,王青青,张瑶丹,等.一种检测银杏叶制剂中多种双黄酮含量的方法,中国:CN108020611A[P]. 2018-05-11.
- [12] LI Y Y, LU X Y, SUN J L, et al. Potential hepatic and renal toxicity induced by the biflavonoids from *Ginkgo biloba*[J]. Chin J Nat Med, 2019, 17(9): 672-681.
- [13] LIN J L, HO Y S. Flavonoid-induced acute nephropathy[J]. Am J Kidney Dis, 1994, 23(3): 433-440.
- [14] WANG Q, WU Z L, YUAN X, et al. Bilobetin induces kidney injury by influencing cGMP-mediated AQP-2 trafficking and podocyte cell cycle arrest[J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153073.
- [15] 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[J].中国中药杂志, 1999, 24(1): 3-5.
- [16] SCHWABE K P. *Ginkgo biloba* leaf extracts with a reduced 4'-O-methylpyridoxine and biflavone content: US6328999 [P]. 2001-12-11.
- [17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社, 2020: 434.
- [18] 赵一懿,郭洪祝,陈有根,等.中药多组分含量测定中相对校正因子计算方法的比较与建议[J].中国药品标准, 2014, 15(4): 245-251.
- [19] 冯桂玲,刘莹娟,李文献,等.基于一测多评法同时定量测定人参女金丸中9个主要成分[J].中国药学杂志, 2018, 53(23): 2047-2053.
- [20] 刘宏,白玉琴,王焕芸.一测多评法同时测定蒙药三臣丸中7种成分的含量[J].中国药学杂志, 2018, 53(14): 1152-1159.
- [21] 梁悦,刘涛,李松洋,等.生脉注射液中4种成分测定及HPLC特征图谱建立[J].中成药, 2020, 42(9): 2285-2290.
- [22] 罗珂,张佳丽,雷家珩,等.银杏双黄酮高效液相色谱定量分析方法研究[J].化学试剂, 2020, 42(1): 58-61.
- [23] 郁丹红,姜玮,姚鑫,等.基于UPLC-TQ-MS考察不同树龄银杏叶双黄酮含量变化规律[J].中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 145-149.
- [24] 李冰,胡高升,胡玲玲,等.银杏叶中双黄酮成分的提取与测定[J].中草药, 2014, 45(17): 2552-2555.

(收稿日期:2021-12-17 修回日期:2022-04-18)

(编辑:邹丽娟)