

HPLC-ELSD法测定舒血宁注射液中萜类内酯含量

王京辉¹, 杜小伟¹, 王萌萌¹, 张小茜¹, 荆芳², 房秀霞², 王海涛², 王连喜², 石任兵³

(1 北京市药品检验所, 北京 100035; 2 北京双鹤高科天然药物有限责任公司, 北京 102100; 3 北京中医药大学, 北京 100102)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)同时测定舒血宁注射液中银杏内酯 A、B、C 的含量。方法: 色谱柱为 C₁₈ 色谱柱(100 mm × 4.6 mm, 3 μm); 流动相为甲醇-四氢呋喃-水(20:10:75), 流速 0.5 mL·min⁻¹, 蒸发光检测器(以空气为载气, 流速 3 L·min⁻¹, 漂移管温度 105 ℃)检测。结果: 舒血宁注射液中银杏内酯 A 进样量在 4.4~21.9 μg 范围内线性关系良好, r = 0.9993; 银杏内酯 B 进样量在 2.0~10.0 μg 范围内线性关系良好, r = 0.9995; 银杏内酯 C 进样量在 2.0~10.2 μg 范围内线性关系良好, r = 0.9996。方法重复性良好。银杏内酯 A、B、C 平均回收率分别为 97.1%, 99.0%, 99.3%; RSD 分别为 0.72%, 1.1%, 1.8%。结论: 该法专属性强, 灵敏、准确, 可作为舒血宁注射液质量控制方法。

关键词: 舒血宁注射液; 银杏内酯 A、B、C; 高效液相色谱法; 蒸发光检测器

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0076-03

HPLC-ELSD assay of terpene lactones in Shuxuening injection

WANG Jing-hui¹, DU Xiao-wei¹, WANG Meng-meng¹, ZHANG Xiao-qian¹, JIN Fang²,
FANG Xiu-xia², WANG Hai-tao², WANG Lian-xi², SHI Ren-bin³

(1 Beijing Institute for Drug Control Beijing 100035, China; 2 Beijing Double-Crane High SCI & TECH. Natural Pharmaceutical CO. LTD, Beijing 102100 China; 3 Beijing University of Traditional Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective To develop an HPLC-ELSD for determination of ginkgolide A, B, and C in Shuxuening injection. **Method** The determination was carried out by C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 3 μm) column. The mobile phase consisted of methanol-tetrahydrofuran-water (20:10:75) and the flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. Evaporated light scattering detector was used. **Results** There was good linear relationship between the absorption area value and the concentration in the ranges of 4.4-21.9 μg for ginkgolide A (r = 0.9993), 2.0-10.0 μg for ginkgolide B (r = 0.9995) and 2.0-10.2 μg for ginkgolide C (r = 0.9996) respectively. The HPLC method showed good repeatability. The average recoveries of ginkgolide A, B, and C were 97.1% (RSD = 0.72%), 99.0% (RSD = 1.1%), 99.3% (RSD = 1.8%) respectively. **Conclusion** The method is specific, sensitive, accurate. It has been effectively method for control quality of Shuxuening injection.

Key words Shuxuening injection; ginkgolide A, B, and C; HPLC; evaporated light scattering detector

舒血宁注射液具有扩张血管、改善微循环的功能, 多用于缺血性心脑血管疾病、冠心病、心绞痛、脑栓塞、脑血管痉挛等, 临床疗效好, 应用广泛。原质量标准收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第十九册, 采用视差折光检测器测定银杏内酯 A 的含量, 由于仪器灵敏度低, 检测不准确, 因此对该方法进行了修订, 采用稀盐酸酸化、乙酸乙酯提取, 蒸发光检测器检测, 同时测定银杏内酯 A、B、C 3 个成分, 结果检测灵敏, 专属性强, 大大提高了检测的准

确度。

1 仪器、试剂与样品

岛津 LC-10Avp 高效液相色谱仪, 岛津 SIL-10Avp 自动进样器, Alltech ELSD 2000 蒸发光散射检测器, 岛津 Class-VP 6.12 工作站。

对照品银杏内酯 A (批号 110862-200004)、B (批号 0863-200103)、C (批号 110864-200203) 均购自中国药品生物制品检定所。甲醇、四氢呋喃为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。样品银杏叶提取物

注射液(国外 A 厂)、舒血宁注射液(国内 A、B、C、D、E、F 厂)。

2 色谱条件

色谱柱: SUPELCO SIL C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 3 μm); 以流动相甲醇 - 四氢呋喃 - 水 (20: 10: 75); 流速 0.5 mL · min⁻¹; 蒸发光散射检测器, 以空气为载气, 流速 3 L · min⁻¹, 漂移管温度 105 °C; 柱温 30 °C。理论板数按银杏内酯 A、B、C 计算, 均不低于 5000。

3 溶液的制备

3.1 对照品混合溶液 精密称取银杏内酯 A、B、C 对照品适量, 加丙酮制成每 1 mL 分别含 1 mg、0.5 mg、0.5 mg 的混合溶液, 即得。

3.2 供试品溶液 精密量取本品 15 mL, 加稀盐酸 2 滴, 调节 pH 至 2, 用乙酸乙酯提取 4 次 (20, 10, 10, 10 mL), 合并乙酸乙酯液, 用 5% 醋酸钠溶液 20 mL 洗涤, 分取乙酸乙酯液, 醋酸钠溶液再以乙酸乙酯 10 mL 洗涤, 合并乙酸乙酯液及洗涤液, 用水洗涤 2 次, 每次 20 mL, 分取乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加丙酮适量使溶解, 并转移至 2 mL 量瓶中, 加丙酮稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

4 测定法

分别精密吸取对照品溶液 10 μL 与 15 μL、供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 用外标两点对数关系方法计算银杏内酯 A、B、C 含量, 求和即得萜类内酯的总量。色谱图见图 1。

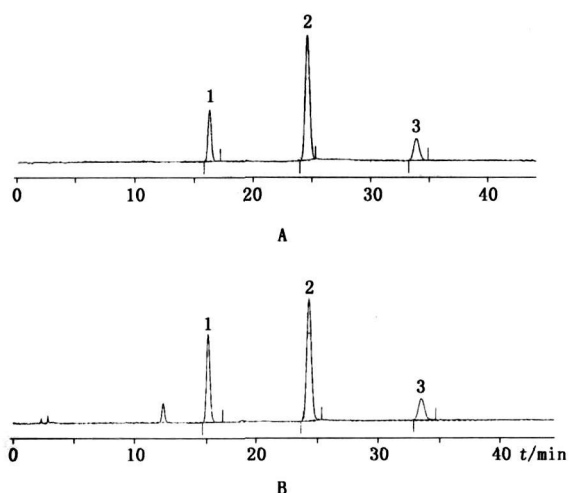


图 1 银杏萜类内酯对照品 (A) 与舒血宁注射液样品 (B, 国内 A 厂, 样品号 11) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of chemical reference substances (A) and Shuxuening injection sample (B, national manufacturer A, sample No. 11)
1. 银杏内酯 C (ginkgolide C, 16.3 min) 2. 银杏内酯 A (ginkgolide A, 24.6 min) 3. 银杏内酯 B (ginkgolide B, 33.9 min)

5 线性试验

精密吸取银杏内酯 A、B、C 浓度分别 1.094、0.499、0.511 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液 4、8、12、16、20 μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以进样量 (μg) 的自然对数 (X) 为横坐标, 峰面积的自然对数 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 1。

表 1 3 种萜类内酯线性方程、相关系数和线性范围

Tab 1 Linear equation, correlation coefficient and linear range of the three Ginkgo terpenes

成分 (component)	线性方程 (linear equation)	r	线性范围 (linear range) / μg
银杏内酯 A (ginkgolide A)	Y = 1.441X + 11.00	0.9993	4.4~21.9
银杏内酯 B (ginkgolide B)	Y = 1.265X + 11.02	0.9995	2.0~10.0
银杏内酯 C (ginkgolide C)	Y = 1.327X + 11.16	0.9996	2.0~10.2

6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 (国内 A 厂, 样品号: 11) 10 μL, 分别于配制后 0、2、4、24 h 依法测定。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内基本稳定, 银杏内酯 A、B、C 峰面积的 RSD (n = 4) 分别为 2.9%、3.4%、1.6%。

7 重复性试验

按样品测定方法, 对同一批样品 (国内 A 厂, 样品号: 11) 进行 5 次平行测定, 样品中银杏内酯 A、B、C 含量的 RSD (n = 5) 分别为 1.4%、1.3%、1.1%。

8 回收率试验

精密吸取已知含量的同一批号的样品 (国内 A 厂, 样品号: 11; 含量: 银杏内酯 A 0.1227 mg · mL⁻¹, 银杏内酯 B 0.0607 mg · mL⁻¹, 银杏内酯 C 0.0769 mg · mL⁻¹) 7.5 mL, 置分液漏斗中, 分别精密加入银杏内酯 A 对照品溶液 (0.925 mg · mL⁻¹)、银杏内酯 B 对照品溶液 (0.450 mg · mL⁻¹)、银杏内酯 C 对照品溶液 (0.570 mg · mL⁻¹) 各 1 mL, 加水 4.5 mL, 按上述供试品溶液的制备方法操作并按上述色谱条件测定。结果银杏内酯 A、B、C 平均回收率 (n = 5) 分别为 97.1%、99.0%、99.3%; RSD 分别为 0.72%、1.1%、1.8%。

9 样品测定结果

按“4”项下方法测定国内外 7 个厂家生产的样品, 结果见表 2。

10 讨论

10.1 曾试用甲醇 - 四氢呋喃 - 水 (20: 10: 75)、甲醇 - 水 (3: 7)、正丙醇 - 四氢呋喃 - 水 (1: 15: 84) 作为流动相, 经试验, 采用甲醇 - 四氢呋喃 - 水 (20: 10

表 2 样品萜类内酯测定结果 (mg mL^{-1})

Tab 2 Test data of Ginkgo terpenes of sample

厂家 (manufactory)	样品号 (sample No.)	银杏内酯 A (ginkgolide A)	银杏内酯 B (ginkgolide B)	银杏内酯 C (ginkgolide C)	三者之和 (sum of ginkgolide A, B, C)
国外 (overseas) A	1	0.0720	0.0282	0.0544	0.1546
	2	0.1392	0.0267	0.0482	0.2141
	3	0.1580	0.0284	0.0488	0.2352
	4	0.1566	0.0244	0.0492	0.2302
国内 (national) A	5	0.1027	0.0626	0.0748	0.2401
	6	0.0935	0.0574	0.0676	0.2185
	7	0.1112	0.0554	0.0869	0.2535
	8	0.0948	0.0556	0.0640	0.2144
	9	0.0993	0.0618	0.0720	0.2331
	10	0.1227	0.0607	0.0769	0.2603
国内 (national) B	11	0.6722	0.1844	0.0270	0.8836
	12	0.1247	0.0677	0.0482	0.2406
国内 (national) C	13	0.1006	0.0370	0.0649	0.2025
	14	0.2277	0.1294	0.2286	0.5857
国内 (national) D	15	0.4273	0.1043	0.0375	0.5691
	16	0.4282	0.1036	0.0384	0.5702
	17	0.4391	0.1053	0.0361	0.5805
国内 (national) E	18	0.4821	0.4321	0.0433	0.9575
	19	0.5242	0.4788	0.0500	1.0530
	20	0.4402	0.4115	0.0399	0.8916
国内 (national) F	21	0.0743	0.0160	0.0393	0.1296
	22	0.1055	0.0399	0.0285	0.1739

: 75) 流动相时, 各成分色谱峰形、分离度最佳, 基线平稳, 检测准确, 因此选用甲醇-四氢呋喃-水系统为流动相。

10.2 试验中, 分别比较了 3 根 C_{18} 色谱柱: 日本资生堂 CAPCELL PAK C_{18} ($4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\ \mu\text{m}$)、DISCOVERY C_{18} ($250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, $5\ \mu\text{m}$)、SUPELCOSIL C_{18} ($100\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, $3\ \mu\text{m}$)。试验结果表明, 3 根色谱柱均能将样品较好分离, 其中 SUPELCOSIL C_{18} ($100\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, $3\ \mu\text{m}$) 色谱柱由于柱身短, 既节省流动相, 色谱基线也更平稳。

10.3 试验中发现, 起较好药效作用且含量较高的白果内酯在制剂中丢失, 因此本研究做了模拟工艺试验, 结果发现单纯 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 加热或只调节酸碱, 不会破坏白果内酯成分, 但调节酸碱和加热相结合, 白果内酯必然损失, 且在工艺和样品制备过程中不可逆, 因此本文检测总内酯仅以银杏内酯 A、B、C 总和计。另文献报道的内酯含量测定均为测定固体制剂中的银杏内酯含量, 纯水的液体制剂还未见报道^[1~4]。本文针对液体制剂的特点, 采用稀盐酸酸化, 乙酸乙酯振荡提取, 操作简便、易行。

10.4 从内酯含量测定数据可以看出, 国外产品内

酯化合物各成分比例相对稳定, 总含量批间差异不大, 国内产品只有 A 厂家可以和其媲美, 其他厂家的产品含量忽高忽低, 各色谱峰比例差异较大, 产品的均一稳定性与国外产品有一定差距, 因此国内产品的质量有待于进一步提高。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 281
- 2 YAN Yu-zhen(颜玉贞), XIE Pei-shan(谢培山). A assay of terpenelactones in *Ginkgo biloba* leaves by RP-HPLC-ELSD (RP-HPLC-ELSD 法测定银杏叶中的 4 种萜类内酯含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2001, 21(3): 173
- 3 WANG Jie(王劫), YUAN Lin(袁林), LI Jin-zhong(厉进忠), et al. The contents of terpenelactones in preparation of *Ginkgo biloba* extract(银杏叶提取物制剂中萜类内酯含量考察). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1998, 33(11): 655
- 4 QIAN Da-wei(钱大玮), JU Jian-ming(鞠建明), ZHU Ling-ying(朱玲英), et al. Study on changing rules for total flavonoids and total terpenelactones in *Ginkgo biloba* leaves at different ages of tree and collecting seasons(不同树龄银杏叶在不同季节中总黄酮和总内酯的含量变化). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2002, 33(11): 1025

(本文于 2008 年 12 月 2 日修改回)