

银杏叶滴丸中萜类内酯测定方法的改进研究

黄琴伟, 李樱红, 郑 成*

浙江省食品药品检验所, 浙江 杭州 310004

摘要: 目的 以银杏叶对照提取物为对照建立银杏叶滴丸中萜类内酯的定量测定方法。方法 采用 HPLC-ELSD 法, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (30:70), 体积流量 0.8 mL/min, ELSD 检测器, 漂移管温度 105 °C, 氮气体积流量 3.0 L/min。结果 银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯分别在 1 672.2~10 033.2、1 026.4~6 158.4、527.8~3 166.8、2 200.8~13 204.8 ng 呈良好的对数线性关系; 银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯及总萜类内酯的平均回收率分别为 100.3% (RSD 2.5%)、108.1% (RSD 3.5%)、116.0% (RSD 4.9%)、90.4% (RSD 0.6%) 及 99.3% (RSD 1.1%)。结论 本方法简单易行、可控性强、重复性好, 可用于银杏叶滴丸中萜类内酯的定量测定, 并为中成药中多指标成分同时测定提供了有效的思路和解决方案。

关键词: 银杏叶滴丸; 萜类内酯; 银杏叶提取物; 银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 银杏内酯 C; 白果内酯

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2456-03

Improvement of assay on terpene lactones in Yinxingye Dropping Pill

HUANG Qin-wei, LI Ying-hong, ZHENG Cheng

Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China

Key words: Yinxingye Dropping Pill; terpene lactones; ginkgo leaves extract; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgolide C; bilobalide

银杏叶滴丸为银杏叶提取物的新型制剂, 具有活血化痰、通络作用, 用于瘀血阻滞引起的胸痹心痛、中风、半身不遂、舌强语蹇, 冠心病稳定型心绞痛、脑梗死见上述症候者^[1]。目前银杏叶滴丸为浙江万邦药业有限公司独家生产品种, 标准收载于《中国药典》2010 年版^[2]。萜类内酯是银杏叶提取物的活性组分之一^[3]。银杏萜类内酯可高选择性拮抗由 PAF 诱导的血小板聚集, 其中以银杏内酯 B 作用最强, 从而降低血液黏度, 防止机体组织器官缺血、缺氧^[4]。银杏萜类内酯通常以银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯为对照建立 HPLC-ELSD 定量测定方法^[2, 5-7], 并以此 4 种对照品量的总和计。为简化操作并节省资源, 本实验以银杏叶对照提取物为对照进行方法学考察, 对原标准进行优化。

1 仪器与材料

Agilent 1200 型系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司): 包括 G1311A 四元泵、G1322A 脱气

机、G1329A 自动进样器、G1316A 柱温箱、Alltech 2000ES 蒸发光散射检测器。

白果内酯 (BB, 批号 110965-200404)、银杏内酯 A (GA, 批号 110862-200608)、银杏内酯 B (GB, 批号 110863-200508)、银杏内酯 C (GC, 批号 110864-200906) 对照品均由中国药品生物制品检定所提供; 银杏叶对照提取物 (批号 091004) 由浙江康恩贝药业有限公司提供 (已标化, 含 GA 26.78 mg/g、GB 16.44 mg/g、GC 8.45 mg/g、BB 35.25 mg/g)。醋酸乙酯、醋酸钠、盐酸均为分析纯; 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水。银杏叶滴丸 (批号 100310、100311、100312、100209、100401、100402) 由浙江万邦药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (30:70), 体积流量

收稿日期: 2011-07-12

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划 (2009ZX09308-004)

作者简介: 黄琴伟 (1983—), 女, 浙江温州人, 硕士, 主要从事药品质量分析。

Tel: 13957122401 Fax: (0571)86459425 E-mail: qingwei-h@163.com

*通讯作者 郑 成 Tel: (0571)86459414 E-mail: joeff30@163.com

0.8 mL/min, ELSD 检测器, 漂移管温度 105 °C, 氮气体积流量 3.0 L/min。理论板数按 BB 峰计算

不低于 2 500; GA 峰与 GB 峰的分离度大于 1.5。色谱图见图 1。

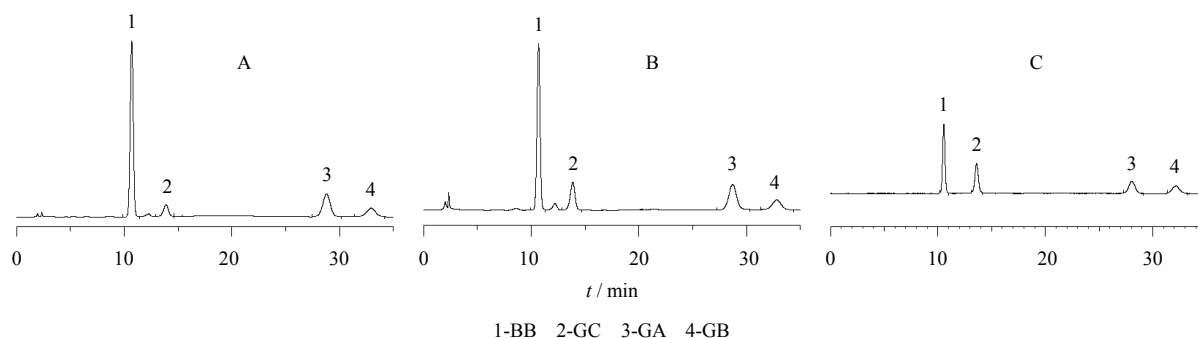


图 1 银杏叶对照提取物 (A)、银杏叶滴丸 (B) 和混合对照品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of ginkgo leaves extract control (A), Yinxingye Dropping Pill (B), and mixed reference substance (C)

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取 GA、GB、GC、BB 对照品 22.47、18.97、10.25、19.60 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取银杏叶滴丸 20 丸, 研细, 混匀, 取 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加水 20 mL、2% 盐酸溶液 4 滴、醋酸乙酯 20 mL, 加热回流 30 min; 冷却至室温, 转移至分液漏斗, 分取醋酸乙酯液, 水液再用醋酸乙酯萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并醋酸乙酯液, 用 5% 醋酸钠溶液 20 mL 萃取, 分取醋酸钠液, 用醋酸乙酯 20 mL 萃取, 合并醋酸乙酯液, 用水洗涤 2 次, 每次 10 mL, 分取水液, 用醋酸乙酯 20 mL 提取, 合并醋酸乙酯液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 对照提取物溶液的制备

取已标化的银杏叶对照提取物 0.15 g, 精密称定, 照供试品溶液的制备方法, 同法制成对照提取物溶液。

2.5 线性关系考察

精密吸取上述对照提取物溶液 2、4、6、8、10、12 μ L, 分别注入高效液相色谱仪, 以进样量的对数值为横坐标 (X), 峰面积的对数值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程: GA $Y=1.249 X-2.721 5$, $r=0.999 2$; GB $Y=1.421 6 X-4.629 1$, $r=0.999 4$; GC $Y=1.646 2 X-3.687 3$, $r=0.999 6$; BB $Y=1.257 4 X-1.986 1$, $r=0.999 4$; 表明 GA、GB、GC、BB 分别在 1 672.2~10 033.2、1 026.4~6 158.4、

527.8~3 166.8、2 200.8~13 204.8 ng 呈良好的对数线性关系。

2.6 精密度考察

精密吸取上述对照提取物溶液 10 μ L, 重复进样 5 次, 记录峰面积, GA、GB、GC、BB 峰面积的 RSD 分别为 0.2%、0.4%、0.5%、0.1%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取批号 100310 样品制备供试品溶液, 分别在 0、4、10、16、24、30 h 时注入色谱仪, 记录 GA、GB、GC、BB 峰面积, 结果 GA、GB、GC、BB 峰面积的 RSD 分别为 0.5%、1.2%、0.7%、0.2%, 表明供试品溶液在 30 h 内稳定。

2.8 重现性试验

取批号 100310 样品约 0.5 g, 共 6 份, 按供试品溶液制备方法操作, 注入液相色谱仪, 依法测定, 结果总萜类内酯量的 RSD 为 2.3%, GA、GB、GC、BB 的 RSD 分别为 2.4%、3.0%、2.8%、1.5%。

2.9 加样回收率试验

按供试品溶液制备方法, 取同一批样品 (批号 100310) 各约 0.25 g, 共 6 份, 加入已标化的银杏叶对照提取物各约 0.1 g, 注入液相色谱仪, 依法测定, 计算回收率和 RSD。结果表明, GA、GB、GC、BB 及萜类内酯的平均回收率分别为 100.3%、108.1%、116.0%、90.4%、99.3%, RSD 分别为 2.5%、3.5%、4.9%、0.6%、1.1%, 回收率符合要求。

2.10 样品测定

取 6 批样品各约 0.5 g, 按供试品溶液制备方法操作, 注入液相色谱仪, 依法测定, 参考《中国药

典》^[1]萜类内酯的量以 GA、GB、GC 和 BB 总量计, 结果见表 1。

表 1 银杏叶滴丸中总萜类内酯定量测定结果 ($n=2$)

Table 1 Determination of terpene lactones in Yinxingye Dropping Pill ($n=2$)

批号	总萜类内酯/(mg·丸 ⁻¹)	
	银杏叶对照提取物法	混合对照品法
100310	1.11	1.09
100311	1.17	1.19
100312	1.23	1.24
100209	1.20	1.17
100401	1.20	1.20
100402	1.25	1.28

3 讨论

参考《中国药典》2010 年版^[1]“加 10 mL 水, 温热溶解”, 结果发现有部分残渣不能完全溶解, 故本实验考察了供试品溶液的提取条件, 结果表明, “加水 20 mL, ……”, 加醋酸乙酯 20 mL, 加热回流 30 min”, 可解决残渣难溶的问题, 同时将每次醋酸乙酯的用量增至 20 mL, 可避免乳化。

本实验比较了正丙醇-四氢呋喃-水^[4-6]和甲醇-水^[8-9]两种流动相系统, 经试验, 发现两种系统下 4 种银杏内酯均能在 30 min 内达到基线分离, 考虑到正丙醇和四氢呋喃均为不常用的试剂, 特别是四氢呋喃, 毒性和刺激性均较大, 综上考虑, 故将流动相制定为甲醇-水 (30:70)。

本实验曾于 25、30、40 °C 的柱温条件下考察了色谱峰的分离效果, 结果各色谱峰均能有效分离; 另考察了 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 结果 3 种色谱柱均适用于该分析方法, 说明本方法有较好的耐用性。

本实验对蒸发光散射检测器参数进行优选, 考

察了漂移管温度、氮气体积流量, 结果表明漂移管温度为 105 °C、氮气体积流量为 3.0 L/min, 响应值最大。

本实验同时采用常规的混合对照品法测定了 6 批样品中总萜类内酯的量, 经对比, 两种测定方法所得结果的相对平均偏差依次为 0.9%、0.8%、0.4%、1.3%、0.0%、1.2%。

本实验为使标准更加科学简便, 对萜类内酯的前处理方法和液相色谱流动相系统进行了改进; 为节约对照品和化学试剂的用量, 采用银杏叶对照提取物进行定量, 为中成药中多指标同时的测定提供了有效的思路和解决方案, 为节省中药对照品, 降低实际检验成本都有很大的益处。

参考文献

- [1] 金虹, 黄毅, 王继生, 等. 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1339-1342.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 徐艳芬, 张丽娟, 宋新波. 银杏叶提取物的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 452-456.
- [4] Satyan K S, Jaiswal A K, Ghosal S, et al. Anxiolytic activity of ginkgolic acid conjugates from Indian *Ginkgo biloba* [J]. *Psychopharmacology*, 1998, 136(2): 148-152.
- [5] 颜玉贞, 谢培山. HPLC-ELSD 法测定银杏叶中的 4 种萜类内酯含量 [J]. 药物分析杂志, 2001, 21(3): 173-176.
- [6] 单鸣秋, 张丽, 曹雨诞. HPLC-ELSD 法测定银杏叶提取物中内酯的含量 [J]. 中草药, 2004, 35(12): 1366-1368.
- [7] 张富庚, 刘振国, 刘昌孝. 国产和进口银杏叶片中萜类内酯的比较 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 35-38.
- [8] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂 [S]. 第 19 册. 1998.
- [9] 盛志恒, 李旭红. HPLC-ELSD 法测定银杏叶提取物中四种萜类内酯的含量 [J]. 浙江中医学院学报, 2004, 28(4): 82-83.