

HPLC-ELSD同时测定灯银脑通胶囊中白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 的含量

宋金玉^{1,2}, 康博欣¹, 朱鸿敏¹, 赵怀清^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016 2 山西生物应用职业技术学院 中药系, 太原 030031)

摘要 目的: 建立同时测定灯银脑通胶囊中白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 含量的高效液相色谱-蒸发光散射检测法。方法: 采用 Diamonsil C_{18} (200 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相为甲醇-水-四氢呋喃 (25: 70: 12), 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 25℃, 漂移管温度为 110℃, 载气流速为 2.8 L · min⁻¹。结果: 样品中白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 分离良好, 线性范围分别为 0.02~0.2 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$), 0.126~1.26 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$), 0.108~1.08 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9995$), 0.306~3.06 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9997$); 方法平均回收率 ($n = 9$) 分别为 100.0%, 99.9%, 99.8%, 100.1%。结论: 本法准确, 专属性强, 重现性好, 可用于灯银脑通胶囊的质量控制。

关键词: HPLC-ELSD; 灯银脑通胶囊; 白果内酯; 银杏内酯 A; 三七皂苷 R_1 ; 人参皂苷 R_{g1}

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0532-04

HPLC-ELSD simultaneous determination of bilobalide, ginkgolide A, notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g1} in Dengyin Naotong capsules

SONG Jin-yu^{1,2}, KANG Bo-xin¹, ZHU Hong-min¹, ZHAO Hua-i-qing^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China

2. The Department of Traditional Chinese Medicine, Shanxi Biological Application Vocational Technical College, Taiyuan 030031, China)

Abstract Objective To develop an HPLC-ELSD method for the simultaneous determination of bilobalide, ginkgolide A, notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g1} in Dengyin Naotong capsules. **Methods** The chromatographic separation was achieved on a Diamonsil C_{18} (200 mm × 4.6 mm, 5 μ m) column with mobile phase of methanol-water-tetrahydrofuran (25: 70: 12). The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ with column temperature at 25℃. The drift-tube temperature of ELSD was 110℃, and the flow rate of air was 2.8 L · min⁻¹. **Results** The calibration curve was linear within the range of 0.02-0.2 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$) for bilobalide, 0.126-1.26 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$) for ginkgolide A, 0.108-1.08 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9995$) for notoginsenoside R_1 and 0.306-3.06 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9997$) for ginsenoside R_{g1} , respectively. The recoveries ($n = 9$) of bilobalide, ginkgolide A, notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g1} were 100.0%, 99.9%, 99.8% and 100.1%, respectively. **Conclusion** The method is accurate, sensitive and specific. It can be used for quality control of Dengyin Naotong capsules.

Key words HPLC-ELSD; Dengyin Naotong capsules; bilobalide; ginkgolide A; notoginsenoside R_1 ; ginsenoside R_{g1}

灯银脑通胶囊由灯盏细辛、银杏叶、三七、满山香 4 味药组成^[1], 是对云南彝药经典处方“脑瘫愈”方进行改良, 采用现代药物制剂技术研制而成的国家专利产品。具有行气活血、散瘀通络的功效, 适用于各种缺血性心脑血管疾病、脑力衰退、痴呆、失眠等症。目前未见关于灯银脑通胶囊的质量标准研究

文献报道, 作者采用 HPLC-ELSD 法, 对灯银脑通胶囊中主要成分白果内酯、银杏内酯 A、人参皂苷 R_{g1} 、三七皂苷 R_1 的含量进行测定, 该方法准确, 稳定, 重现性好, 为灯银脑通胶囊的质量控制提供了依据。

* 通讯作者 Tel: (024) 23986250 E-mail: zhaohq1955@sina.com

1 仪器与试剂

JASCO 公司 PU - 2080 Plus intelligent HPLC pump XW K - III 无油空气泵, A ltech ELSD 2000 检测器。对照品白果内酯 (批号 110865- 200404)、银杏内酯 A (批号 110862- 200305)、三七皂苷 R_1 (批号 110745- 200415) 和人参皂苷 R_{g1} (批号 110703 - 200323), 购自中国药品生物制品检定所。灯银脑通胶囊 (规格: $0.26 \text{ g} \cdot \text{粒}^{-1}$; 批号 20050731, 20050752, 20050814 云南某制药集团股份有限公司)。甲醇、四氢呋喃均为色谱纯, 所用水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C_{18} (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 水 - 四氢呋喃 (25: 70: 12); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$, 漂移管温度: 110 $^{\circ}\text{C}$, 载气流速: $2.8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量: 20 μL 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液 分别取对照品白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 适量, 精密称定, 置 5 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度分别为 1.0 6.3 5.4 15.3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液 取灯银脑通胶囊 10 粒, 取出细粉状内容物, 精密称定, 取上述内容物粉末约 2.0 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 90 W, 频率 59 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按照灯银脑通胶囊的制备工艺分别制备缺银杏叶和三七的阴性样品, 并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验 取供试品溶液, 在上述色谱条件下进样分析, 理论塔板数按白果内酯峰计算不低于 4000 按银杏内酯 A 峰计算不低于 5000 按三七皂苷 R_1 峰计算不低于 3000 按人参皂苷 R_{g1} 峰计算不低于 3000 白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 与相邻色谱峰的分度均大于 1.5 缺银杏叶阴性样品在白果内酯和银杏内酯 A 出峰区间未出现相应色谱峰, 缺三七阴性样品在三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 出峰区间未出现相应色谱峰, 表明该方法专属性较好, 测定无干扰。结果见图 1。

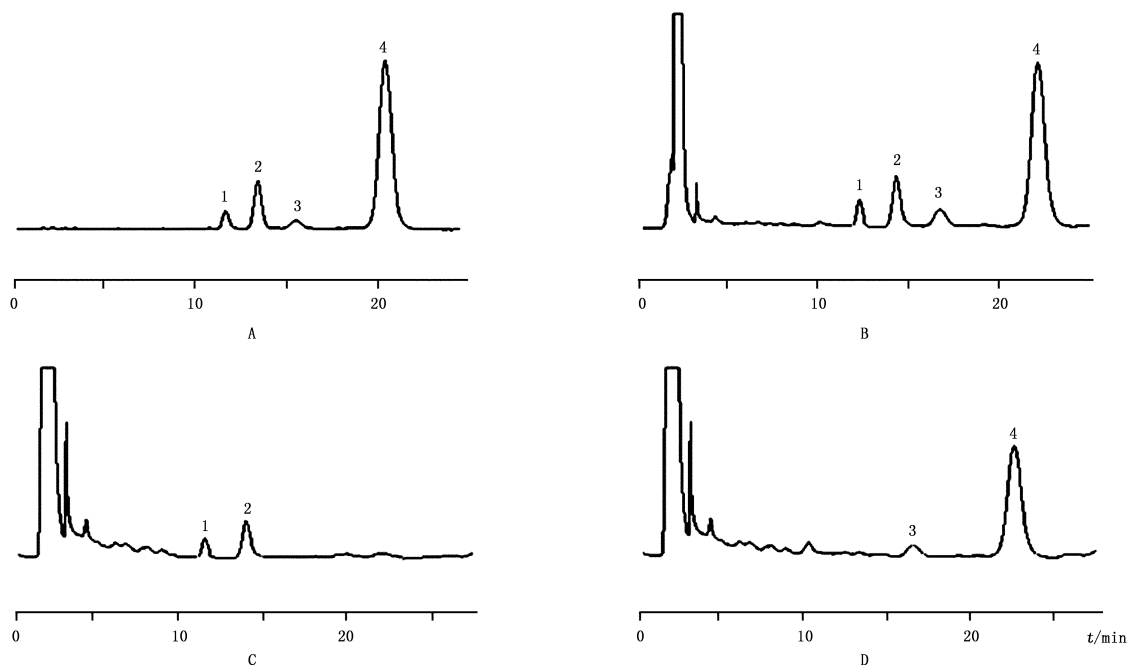


图 1 对照品 (A)、样品 (B)、缺银杏阴性样品 (C) 及缺三七阴性样品 (D) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), sample (B), negative sample without Folium Ginkgo (C) and Radix et Rhizoma Notoginseng (D)

1 白果内酯 (bilobalide) 2 银杏内酯 A (ginkgolide A) 3 三七皂苷 R_1 (notoginsenoside R_1) 4 人参皂苷 R_{g1} (ginsenoside R_{g1})

2.4 线性范围考察 依次精密吸取对照品储备液 0.10 0.25 0.5 0.75 1.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成系列质量浓度的混合对照品溶液。分别取上述溶液各 20 μ L, 在上述色谱条件下进样分析。以对照品质量浓度 (X , $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归计算, 白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 回归方程分别为:

$$Y = 1.262 \times 10^6 X + 2.534 \times 10^2 \quad r = 0.9999 (n = 5)$$
$$Y = 5.142 \times 10^5 X + 3.558 \times 10^3 \quad r = 0.9997 (n = 5)$$
$$Y = 2.692 \times 10^5 X + 2.494 \times 10^3 \quad r = 0.9999 (n = 5)$$
$$Y = 1.336 \times 10^4 X - 3.025 \times 10^3 \quad r = 0.9999 (n = 5)$$

结果表明, 4 种化合物的峰面积与对照品质量浓度均呈良好的线性关系, 线性范围分别为: 白果内酯 0.02~0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 银杏内酯 A 0.126~1.26 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 三七皂苷 R_1 0.108~1.08 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 人参皂苷 R_{g1} 0.306~3.06 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 仪器精密度试验 取同一混合对照品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 5 次, 白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 色谱峰面积的 RSD ($n = 5$) 分别为 1.4%, 0.5%, 0.7%, 0.6%。

2.6 重复性试验 取同一批号 (批号: 20050752) 样品粉末 5 份, 按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 5 份, 在上述色谱条件下进行测定, 按外标法计算白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 含量的平均值 ($n = 5$) 分别为 0.297 $\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$ (RSD = 0.9%), 2.118 $\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$ (RSD = 1.0%), 1.534 $\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$ (RSD = 0.7%), 5.022 $\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$ (RSD = 0.7%)。表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液 1 份, 室温放置, 放置 0 2 4 6 8 12 h 后, 按上述色谱条件进样分析。测得白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.8%, 0.2%, 0.6%, 0.5%, 结果表明供试品溶液在 12 h

内稳定性良好。

2.8 回收率试验 精密称取已知含量的样品 (批号: 20050752) 约 0.5 g 共 9 份, 平均分为 3 组, 以低、中、高三水平质量浓度分别精密加入白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 的浓度分别为 0.10 0.63 0.54 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 1.53 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品混合液 0.15 mL、0.3 mL、0.45 mL, 按每一质量浓度取 3 份, 以“2.2.2”项下方法平行制备成供试溶液, 按上述色谱条件测定并计算回收率。测得方法平均回收率的结果见表 1。

表 1 灯银脑通胶囊中白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 的回收率 ($n = 3$)

Tab 1 Recoveries of bibbalide, ginkgolide A, notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g1} in Dengyin Naotong capsules					
成分 (components)	加入量 (added) /mg	样品中含量 (original) /mg	测得量 (measured) /mg	回收率 (recovery) /%	RSD /%
白果内酯 (bibbalide)	0.015	0.028	0.043	99.2	0.82
	0.030	0.029	0.058	99.9	0.90
	0.045	0.027	0.073	100.8	0.63
银杏内酯 A (ginkgolide A)	0.095	0.193	0.288	99.8	0.26
	0.189	0.195	0.382	99.9	0.23
	0.284	0.195	0.477	100.0	0.19
三七皂苷 R_1 (notoginsenoside R_1)	0.076	0.148	0.225	100.1	0.48
	0.150	0.149	0.301	99.8	0.30
	0.227	0.149	0.376	99.6	0.35
人参皂苷 R_{g1} (ginsenoside R_{g1})	0.230	0.462	0.692	100.2	0.27
	0.459	0.461	0.921	100.0	0.20
	0.689	0.462	1.152	100.2	0.15

2.9 样品测定 取 3 批灯银脑通胶囊样品, 每批取 3 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样分析, 记录色谱峰面积, 按外标一点法计算含量。结果见表 2。

表 2 灯银脑通胶囊中白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 的含量 ($n = 3$)

批号 (Lot No.)	白果内酯 (bibbalide)		银杏内酯 A (ginkgolide A)		三七皂苷 R_1 (notoginsenoside R_1)		人参皂苷 R_{g1} (ginsenoside R_{g1})	
	含量 (content)	RSD	含量 (content)	RSD	含量 (content)	RSD	含量 (content)	RSD
	/mg per capsule	/%	/mg per capsule	/%	/mg per capsule	/%	/mg per capsule	/%
20050731	0.3035	0.37	2.095	0.52	1.618	0.19	4.998	0.22
20050752	0.3025	0.50	2.112	1.30	1.612	0.06	4.997	0.15
20050814	0.3022	0.33	2.106	0.01	1.618	0.34	4.990	0.05

3 讨论

银杏内酯和皂苷类物质无紫外吸收或仅为末端吸收, 如用紫外末端吸收检测, 则测定结果的干扰大^[2,3]。蒸发光散射检测器 (ELSD) 为通用质量型检测器, 其响应不依赖样品的光学性质, 只要样品的挥发性低于流动相即可被检测^[4], 故本实验选择 HPLC-ELSD 法对灯银脑通中白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g1} 这 4 种成分进行含量测定。

在使用 ELSD 进行检测时, 漂移管温度与载气流速是影响实验的 2 个关键性参数。在 ELSD 的气化室中, 载气流速对信号影响很大, 太低或太高均导致信号不够准确。而漂移管温度降低时, 溶剂挥发不够完全, 温度高时则样品颗粒挥发导致检测仪响应下降^[5]。本实验通过反复试验和综合评价后, 使用漂移管温度为 110℃、载气流速为 2.8 L·min⁻¹ 作为检测条件, 在该检测条件下对组分的干扰较小且操作可行性较好。

本实验分别考察了乙腈-水-酸和甲醇-水-酸 2 种流动相系统, 结果发现 2 种流动相系统都不能使待测组分色谱峰的分离度满足含量测定的要求, 同时噪音很大。参考有关文献^[6]在流动相中加入四氢呋喃, 并进一步调整比例, 结果表明当流动相为甲醇-水-四氢呋喃 (25:70:12) 时, 色谱峰之间达到完全分离且噪音也显著减小。

文献中对白果内酯、银杏内酯 A、三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g1} 4 种成分的提取方法多复杂烦琐, 但实验发现灯银脑通胶囊的内容粉末采用简单的超声提取的方法, 4 种成分的含量就能达到实验的要求。方法简便易行, 可操作性强。另外本实验考察了 50% 甲醇、70% 甲醇和纯甲醇 3 种提取溶剂, 结

果表明纯甲醇提取效果最好。超声提取 20 30 45 min 考察其提取效果。结果表明, 超声提取 30 min 的提取效果优于 20 min 的提取效果, 而与 45 min 的提取效果无明显差异, 故选用甲醇超声提取 30 min。

参考文献

- 1 National Standards Compilation of Proprietary Chinese Medicines Chinese Local Standards Increased National Standard Part of the Meridian Linb and Brain Volumes (国家中成药标准汇编, 中药地方标准上升国家标准部分, 经络肢体 脑系分册). 2002. 262
- 2 LÜ Fu-sheng (吕伏生), CHEN Wei (陈伟), FENG Fang (冯芳), et al. The contents of terpenelactones in the Ginkgo injection (ELSD 检测法测定银杏酮酯注射液中银杏内酯 A、B 的含量). *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(1): 34
- 3 HUANG Yong-zhuo (黄永焯), WANG Ning-sheng (王宁生). A assay of ginsenoside R_{g1} and R_{b1} and notoginsenoside R₁ in Radix Notoginseng by HPLC/ELSD with solid phase extraction (HPLC/ELSD 法结合固相萃取测定三七中人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 的含量). *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2003, 14(3): 180
- 4 ZHAO Yu-xin (赵宇新), LI Man-ling (李曼玲). Application of evaporative light-scattering detector in analysis of the active constituents in Chinese herbal medicine (蒸发光散射检测器在中药成分分析中的应用). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(10): 913
- 5 WANG Ming-juan (王明娟), HU Chang-qin (胡昌勤), JIN Shao-hong (金少鸿). Application of evaporative light-scattering detector in pharmaceutical analysis and other fields (蒸发光散射检测器在药物分析及其他方面的应用). *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2002, 16(7): 431
- 6 MA Yan-rong (马艳蓉), CHAIGuo-lin (柴国林), ZHANG Li-xia (张莅峡). Application of HPLC-ELSD in pharmaceutical analysis (HPLC-ELSD 在中药分析中的应用). *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2002, 16(7): 431

(本文于 2008 年 9 月 8 日收到)