

HPLC-ELSD 法测定不同厂家银杏叶提取物中 4 种银杏内酯的含量研究

★ 刘晓谦 王跃生* 罗晓健 张国松 黄锋荣 饶晓勇 孙艳荣 丁丽 刘芳菊 (中药固体制剂制造技术国家工程研究中心 南昌 330006)

摘要:目的:制定一种简便、迅速、准确的银杏内酯含量测定方法,准确测定不同银杏叶提取物中 4 种银杏内酯的含量。方法:经处理过的银杏叶提取物采用 HPLC-ELSD 法测定其银杏内酯的含量。流动相为甲醇-水(25:75);流速:1.0 ml·min⁻¹;ELSD 检测器;漂移管温度:104℃;载气流速:2.9 L·min⁻¹;柱温:25℃。结果:建立的方法简便、准确、灵敏度高,能很好地控制银杏叶提取物的质量。所测不同厂家生产的银杏叶提取物中银杏内酯的含量均符合《中国药典》(2005 版一部)的要求。

关键词:HPLC—ELSD;含量测定;银杏叶提取物;银杏内酯 A;银杏内酯 B;白果内酯

中图分类号:R 282.5 **文献标识码:**A

银杏叶提取物(EGB761)对心血管、脑循环系统、心脏有很好的保护作用,临床主要用于治疗脑损伤后遗症及老年性大脑、心血管系统机能衰退等症^[1,2]。药理研究发现银杏内酯具有专属性的抗血小板活化因子(platelet activating factor,PAF)活性,是天然的 PAF 拮抗剂,其中尤以 GB 的活性最高^[3~5],因此控制提取物中内酯的含量是保证原料质量的关键。目前国际上标准的银杏提取物系按 Schwabe 专利工艺生产的 EGB761,萜类内酯的含量须达到 6% 以上。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪;ELSD 检测器;HHS 型电热恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试剂 银杏内酯 A(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,含测用,银杏内酯 A 含量≥98%,1016-060126);银杏内酯 B(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,含测用,银杏内酯 B 含量≥98%,1017-060110);银杏内酯 C(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,含测用,银杏内酯 C 含量≥98%,1018-051209);白果内酯(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,含测用,白果内酯含量≥98%,1019-051230);银杏叶提取物 1(徐州市绿

源生物技术有限公司,批号:20060412);银杏叶提取物 2(杭州杭宝生物科技有限公司,批号:20060510);银杏叶提取物 3(汉中天然谷生物科技有限公司,批号:20060215);银杏叶提取物 4(西安润泽生物技术有限公司,批号:20060421)银杏叶提取物 5(长沙市惠瑞生物科技有限公司,批号:20060619);甲醇(色谱纯),其余试剂均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(25:75);流速:1.0 ml·min⁻¹;ELSD 检测器;漂移管温度:104℃;载气流速:2.9 L·min⁻¹;柱温:25℃。

3 方法与结果

3.1 对照品溶液的制备 精密称取银杏内酯 A、B、C、白果内酯对照品适量,用甲醇溶解并定量稀释成每 1ml 含银杏内酯 A 1 mg,银杏内酯 B 1 mg,银杏内酯 C 1 mg,白果内酯 0.5 mg 的对照品溶液,置冰箱中保存备用。

3.2 供试品溶液的制备^[6] 称取银杏叶提取物粉末 0.15 g,精密称定,加水 100 ml,置水浴中温热使溶散,加 2% 盐酸溶液 2 滴,用乙酸乙酯振荡提取 4 次(15,10,10,10 ml),合并提取液,用 5% 醋酸钠溶液 20 ml 洗涤,分取醋酸钠液,再用乙酸乙酯 10 ml

* 通讯作者:王跃生(1960—),男,汉族,山东青岛人,研究员,博士生导师。

洗涤。合并乙酸乙酯提取液及洗液,用水洗涤2次,每次20 ml,分取水液,用乙酸乙酯10 ml洗涤,合并乙酸乙酯液,回收溶剂至干,残渣用甲醇溶解并转移至5 ml容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

3.3 线性关系考察 取对照品溶液,依次进样2、5、8、10、20 μl 。以进样量的自然对数为横坐标,峰面积的自然对数为纵坐标,进行线性回归,回归方程分别为:

银杏内酯 A: $y = 1.6997x + 3.6798, r = 0.9998$ (线性范围: 2.048 ~ 20.48 μg)

银杏内酯 B: $y = 1.6776x + 3.8977, r = 0.9999$ (线性范围: 2.036 ~ 20.36 μg)

银杏内酯 C: $y = 1.6854x + 3.1527, r = 0.9999$ (线性范围: 2.018 ~ 20.18 μg)

白果内酯: $y = 1.6314x + 4.3888, r = 0.9999$ (线性范围: 1.256 ~ 12.56 μg)

3.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液5 μl ,注入液相色谱仪,连续进样5次,分别测定峰面积,计算求得银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的 RSD 分别为: 0.2%、0.32%、0.18%、0.28% ($n = 5$)。结果表明,精密度良好。

3.5 重复性试验 取同一提取物5份,按3.2项下制备5份供试液,分别测定峰面积,求得银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的 RSD 分别为: 1.92%、0.98%、1.09%、1.22%。结果表明,重复性良好。

3.6 稳定性试验 取同一份供试溶液,分别于制备后0、2、4、8、12、24 h进样,测定峰面积, RSD 分别为: 0.6%、0.78%、0.77%、0.86% ($n = 6$),表明供试液在24 h内稳定性良好。

3.7 加样回收试验 分别取同一批已测定含量的提取物约0.15 g,共9份,分成3组,精密称定,分别精密加入各对照品溶液各0.8、1、1.2 ml,照供试品溶液制备方法制备样品,分别测定含量,计算回收率。结果 GA、GB、GC、BB 的平均加样回收率分别为95.43%、96.12%、94.32%、95.87%; RSD ($n = 5$) 分别为1.42%、0.96%、1.14%、0.89%。

4 讨论

由于银杏内酯具有很强的抗血小板聚集活性,因此控制银杏提取物中银杏内酯的含量是非常必要的。目前有用 HPLC-UV、HPLC-RI 等方法测定银杏内酯的含量,但由于银杏内酯分子结构中没有强的生色团,紫外吸收很弱,在低波段有很弱的吸收,

容易受到银杏叶提取物中其他成分的干扰。示差折光检测器广泛用于银杏内酯的含量测定^[7,8],但存在基线稳定性差的缺点。蒸发光散射检测器属于通用型检测器,灵敏度较高,且分辨率好,可用于定量分析,而且针对本实验所测样品,该方法还具有样品前处理简便,分析迅速的优点。故本实验建立了 HPLC-ELSD 法测定银杏叶提取物中银杏内酯含量的方法,为银杏叶及其制剂的质量控制提供了依据。

关于用 HPLC-ELSD 法测定银杏内酯含量,目前报道的方法多采用三相流动相^[9~11],操作较复杂;或采用两相流动相,但需梯度洗脱^[12],会造成基线的漂移。本试验建立的方法选用的流动相为甲醇-水,且无需梯度洗脱,重现性良好,经济、简单。

通过 HPLC-ELSD 法测定不同厂家银杏叶提取物中银杏内酯的含量,结果表明目前国内生产的银杏叶提取物中4种银杏内酯的含量没有显著性差异,提示国内厂家生产的银杏叶提取物质量稳定,工艺比较成熟。

参考文献

- [1] 雷红松,沈程文. 银杏提取物药理作用研究进展[J]. 茶叶通讯, 2004, (1): 21-24.
- [2] 陈仲良. 银杏提取物的化学成分和制剂的质量[J]. 中国药杂志, 1996, 31(6): 326-331.
- [3] Braquet P. The ginkgolides: potent platelet-activating factor antagonists isolated from Ginkgo biloba L: chemistry, pharmacology and clinical applications [J]. Drugs Future, 1987, 12(7): 643-699.
- [4] 韩金玉,李海静. 天然药物银杏内酯研究进展[J]. 化工进展, 2000, 19(2): 23.
- [5] Han jinyu, Wang hua. et al. Isolation and Preparative Purification for Ginkgolides A and B [J]. Chinese J. Chem. Eng, 2003, 11(2): 125-129.
- [6] 药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [7] T A Van Beek, G P Lelyveld. Concentration of ginkgolides and bilobalide in ginkgo biloba leaves in relation to the time of year[J]. Planta Med. 1992, 58(5): 413-416.
- [8] 张鉴,潘见. 反高效液相色谱法测定银杏叶提取物中5种银杏内酯的含量[J]. 分析化学, 2000, 28(1): 53-56.
- [9] 单鸣秋,张丽,曹雨. HPLC-ELSD 法测定银杏叶提取物中内酯的含量[J]. 中草药, 2004, 35(12): 1365-1368.
- [10] 张亚中,周亚球,王娟,等. HPLC-ELSD 法测定银杏叶软胶囊中萜类内酯的含量[J]. 中成药, 2005, 27(1): 22-24.
- [11] 刘利群,刘天扬. HPLC-ELSD 法测定银杏叶口腔崩解片中的银杏内酯含量[J]. 中国药师, 2006, 9(6): 529-531.
- [12] 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.

(收稿日期: 2007-10-10)