

HPLC - ELSD 法测定银杏露中银杏内酯 B 和银杏内酯 C 含量

张勇¹, 周亚球¹, 陈法贵²

(1. 安徽中医学院现代中药安徽省重点实验室, 合肥 230031; 2. 浙江大德药业集团有限公司, 义乌 322000)

摘要 目的:为控制银杏露药品的质量, 建立高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法测定萜类内酯的含量。**方法:**色谱柱为 UltimateTM XB - C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以水 - 甲醇 - 四氢呋喃 (65:24:11) 为流动相, 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 柱温: 30 °C, 检测器漂移管温度: 105 °C, 载气 (空气) 流速: 2.8 L · min⁻¹, 进样量: 20 μL。**结果:**实验测得 3 批银杏露中银杏内酯 B 的含量约在 29.8 μg · mL⁻¹ 左右, 银杏内酯 C 的含量约在 26.6 μg · mL⁻¹ 左右, 方法学考察结果良好。**结论:**本法方便准确, 简单通用, 重复性好, 适用于银杏露制剂的质量控制。

关键词:银杏露; 萜类内酯; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793 (2008) 10 - 1732 - 03

HPLC - ELSD determination of the ginkgolide B and ginkgolide C in Ginkgo Distillate

ZHANG Yong¹, ZHOU Ya - qiu¹, CHEN Fa - gui²

(1. Anhui Key Laboratory of Modernized Chinese Material, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China;

2. Zhejiang Dade Pharmaceutical Group Co., Ltd., Yiwu 322000, China)

Abstract Objective: To establish an assay method on terpenelactones in Ginkgo Distillate. **Methods:** HPLC with ELSD using UltimateTM XB - C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) as stationary phase, water - methanol - tetrahydrofuran (65:24:11) as mobile phase, flow at 1.0 mL · min⁻¹, evaporator tube temperature: 105 °C, gas flow: 2.8 L · min⁻¹. **Results:** The contents of ginkgolide B and ginkgolide C were 29.8 μg · mL⁻¹ and 26.6 μg · mL⁻¹ respectively in Ginkgo Distillate. **Conclusion:** The method is accurate for quality control of the Ginkgo Distillate.

Key words: Ginkgo Distillate; terpenelactone; HPLC

银杏露是由白果仁和蕈菜两味中药制成的口服溶液, 具有镇咳、化痰、平喘等作用, 临床上常用于慢性支气管炎等症^[1]。由于原卫生部药品标准“银杏露”中无含量测定项, 这就给药品生产和流通中的质量控制带来影响, 因此急需制定一个含量测定方法来加以控制。相对银杏叶提取物及其相关制剂, 白果仁的质量研究较少^[2], 2005 年版中国药典一部中记载白果药材含有萜类内酯, 但记录的是鉴别项, 没有其含量测定标准^[3], 而另一味药材蕈菜的研究更少。我们参考银杏叶类制剂的相关报道^[4-6], 选择萜类内酯成分, 包括银杏内酯 B 和银杏内酯 C 作为含量测定的指标, 采用高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法对其含量进行了测定和分析。

1 仪器与试药

岛津 LC - 10A 高效液相色谱仪, 美国 Alltech

2000 蒸发激光散射检测器 (ELSD), 美国 Welch Ultimate XB - C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 浙大 N2000 色谱数据工作站, METTLER AG135 型电子天平, 超声波提取器 JL180 (220 V, 50 Hz)。

银杏露 (规格: 10 mL · 支⁻¹, 批号: 061101, 061102, 061201), 浙江大德制药有限公司; 银杏内酯 B 对照品 (110863 - 200507)、银杏内酯 C 对照品 (110864 - 200505), 购自中国药品生物制品检定所; 甲醇和四氢呋喃都为色谱纯, 水为重蒸馏水。

2 溶液的制备

2.1 对照品储备液 精密称取银杏内酯 B 对照品 7.80 mg 和银杏内酯 C 对照品 8.10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液。

2.2 供试品溶液^[7] 取本品 6 支, 精密移取 50

第一作者 Tel: 13956075534; E-mail: yongzh@163.com

mL,加2%盐酸溶液4滴,用醋酸乙酯振摇提取4次(40,30,30,30 mL),合并提取液,用5%醋酸钠溶液40 mL洗涤,分取醋酸钠液,再用醋酸乙酯20 mL洗涤。合并醋酸乙酯提取液,用水洗涤2次,每次20 mL,合并水洗液,用醋酸乙酯20 mL洗涤,合并醋酸乙酯液,回收醋酸乙酯至干,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。

3 色谱条件及系统适用性

色谱柱:美国 Welch Ultimate™ XB - C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:水 - 甲醇 - 四氢呋喃 (65:24:11);流速:1.0 mL · min⁻¹;柱温:30 °C;漂移管温度:105 °C;载气(空气)流速:2.8 L · min⁻¹;进样量:20 μL。理论塔板数银杏内酯 B 和银杏内酯 C 都应不低于 3000,分离度应不低于 1.5。色谱图见图 1。

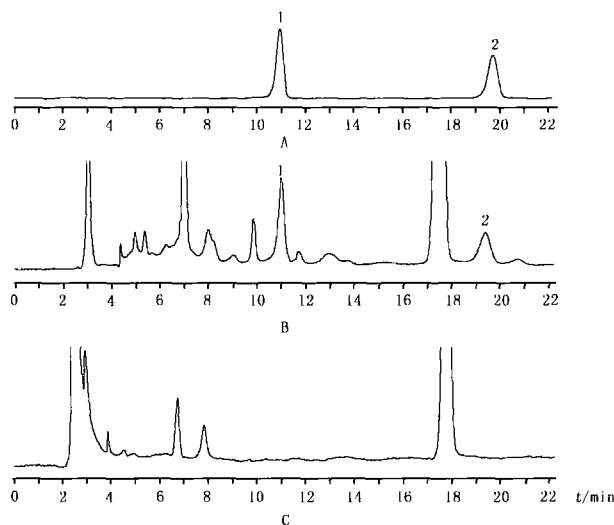


图 1 银杏内酯混合对照品(A)、供试品(B)及阴性样品(C)色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), sample from Ginkgo distillate (B), negative sample (C)

1. 银杏内酯 C(ginkgolide C) 2. 银杏内酯 B(ginkgolide B)

4 方法学结果

4.1 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下对照品储备液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0 mL, 分别置 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别吸取 20 μL 注入液相色谱仪, 测定, 以峰面积的自然对数为纵坐标 Y, 浓度的自然对数为横坐标 X, 进行线性回归, 得银杏内酯 B、银杏内酯 C 的回归方程分别为:

$$Y = 1.549X + 4.728 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 1.358X + 5.228 \quad r = 0.9995$$

结果表明:银杏内酯 B 浓度在 78 ~ 780 μg · mL⁻¹ 范围内, 银杏内酯 C 浓度在 81 ~ 810 μg · mL⁻¹ 范围内, 峰面积的自然对数与浓度的自然对数线性关系

良好。

4.2 精密度试验 取对照品储备液连续进样 6 次, 测得银杏内酯 B 和银杏内酯 C 峰面积的 RSD 分别为 1.2% 和 1.5%。

4.3 重复性试验 精密量取同一批号银杏露 50 mL, 按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液进行测定, 银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的 RSD 分别为 2.6% 和 2.0%。

4.4 稳定性试验 取供试品溶液, 分别在 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 进行测定, 银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的 RSD 分别为 1.5% 和 1.7%, 表明供试品溶液在 12 h 之内基本稳定。

4.4 回收率试验 精密量取银杏露 6 份各 25 mL, 各精密加入对照品储备液 1 mL, 按“2.2”项下方法制备溶液后测定, 计算银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的平均回收率 (n = 6) 为 100.0% 和 102.3%, RSD 分别为 4.0% 和 2.8%。

4.5 阴性对照试验 按处方比例制取缺白果仁的阴性样品(研究用少量, 按照标准项一个处方的量制取), 精密量取 50 mL, 照“2.2”项下方法, 制备阴性样品溶液后进行测定, 结果对银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的含量测定无干扰。

4.6 样品测定 按“2.2”项下方法制备, 用外标两点法对数方程分别计算以下 3 批样品银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的含量, 结果见表 1。

表 1 银杏露中银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的含量 (μg · mL⁻¹)

Tab 1 Content of ginkgolide B and ginkgolide C in Ginkgo Distillate

批号 (Lot No.)	银杏内酯 C (ginkgolide C)	银杏内酯 B (ginkgolide C)
061101	27.5	31.4
061102	26.3	29.8
061201	25.9	28.3

5 讨论

5.1 曾参考文献选择水 - 正丙醇 - 四氢呋喃 (84 : 1 : 15) 系统和水 - 甲醇 - 四氢呋喃 (65 : 25 : 10) 系统^[6-9], 发现第 1 个系统的保留时间太长, 1 个样品分析完需要 60 min 的时间, 并且峰宽较大; 而后 1 个系统保留时间适中, 但是银杏内酯 C 和周围的杂质峰的分度只有 1.1。改变四氢呋喃和甲醇的比例至水 - 甲醇 - 四氢呋喃 (65 : 24 : 11) 后, 银杏内酯 B 和银杏内酯 C 与周围的峰的分度良好, 并且阴性无干扰, 经方法学考察, 方法的重复性、稳定性、精

密度、回收率试验均符合有关规定,可作为银杏露中萜类内酯的含量测定方法。

5.2 在前期的方法摸索实验中,我们选择银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 和白果内酯作为其中的内控指标,但在白果药材和银杏露制剂中均未检测到银杏内酯 A 和白果内酯,因此最终选择了银杏内酯 B 和银杏内酯 C 作为最终质控成分。

5.3 关于白果仁及其制剂中萜类内酯的检测,一直罕有报道。这是由于其含量低,对制剂的质量控制易引起数据的误差,且其是否是镇咳、化痰、平喘的有效成分还有待进一步研究。

参考文献

1 JIN Jie(金捷),JIN Zu-han(金祖汉). Pharmacodynamic studies on cough - settling, phlegm dispelling and panting - calming actions of Ginkgo Distillate(银杏露镇咳、祛痰及平喘的药效学研究). *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2001,23(5):361

2 WANG Qin(王琴),WEN Qi-biao(温其标). Studies on the chemical composition and pharmacological effects of Ginkgo seeds(银杏种仁中活性成分及其药理作用的研究进展). *Mod Food Sci Technol*

(现代食品科技),2006,22(1):164

3 ChP(中国药典). 2005 Vol I(一部):597

4 LU Xiao-feng(陆晓峰),PENG Guo-ping(彭国平). HPLC fingerprint of the ginkgolide component of *Ginkgo biloba* L.(银杏叶内酯成分的特征图谱研究). *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2005,17(4):460

5 WU Yan(吴燕),MI Ya-xian(米亚娴). Determination of tieleinizhi of yinxingtongzhi sublingual by HPLC - ELSD(高效液相色谱法 - 蒸发激光散射检测器测定银杏酮酯舌下片中萜类内酯的含量). *Tianjin Pharm*(天津药学),2003,15(6):9

6 ChP(中国药典). 2005 Vol I(一部):221

7 ChP(中国药典). 2005 Vol I(一部):282

8 SHA Dong-xu(沙东旭),ZHANG Man-lai(张满来). Determination of terpene lactones in Ginkgo soft capsule by HPLC - ELSD(高效液相色谱蒸发光散射测定银杏叶软胶囊中4种萜类内酯的含量). *Drug Stand China*(中国药品标准),2004,5(3):62

9 ZHANG Ya-zhong(张亚中),ZHOU Ya-qiu(周亚球). Determination of terpenelactones in yinxingye soft capsule by HPLC - ELSD(HPLC - ELSD法测定银杏叶软胶囊中萜类内酯的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2005,27(1):22

(本文于2007年12月27日收到)

欢迎订阅《中国药师》杂志

《中国药师》杂志由国家食品药品监督管理局主管,月刊,大16开,132页码,国内外公开发行,2009年每期定价15元,邮发代号38-325,国内统一刊号CN42-1626/R,国际标准刊号ISSN1008-049X。

《中国药师》杂志是我国第一本面向工作在不同岗位上的全体药师的专业期刊,也是广大临床医师的询药指南。杂志辟有研究论文、继续教育、药学进展、药学与临床、研究报告、药品监管、综述与专论、社会药学、科技交流、医药信息等栏目。

编辑部开发运行了界面友好更为实用的远程稿处系统,作者与编审者沟通便捷,稿件审理及刊发大为提速。杂志已连续6年承办国家级刊授继续教育项目,成为广大药师、医师学术交流和继续教育之必备。

杂志用户中心: <http://www.tg.zgys.org>
 电子信箱: acjpe077@public.wh.hb.cn, tg@zgys.org
 编辑部地址:武汉市兰陵路2号,邮编:430014
 电话:027-82778580,82835077。