

HPLC同时测定脉平片中白果内酯、银杏内酯A和银杏内酯B、银杏内酯C的含量

倪琳¹, 张秀娟², 高进贤³, 杨锡¹

(1. 甘肃省药品检验研究院, 兰州 730070; 2. 兰州大学药学院, 兰州 730000;
3. 甘肃省人民医院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:建立脉平片中白果内酯、银杏内酯A、银杏内酯B和银杏内酯C的含量测定方法。方法:采用HPLC对制剂中银杏叶提取物的主要成分白果内酯、银杏内酯A、银杏内酯B和银杏内酯C进行定量分析。CAPCELL PAK C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm);流动相四氢呋喃-乙腈-水(12:10:78),蒸发光散射检测器,柱温30℃,流速1.0 mL·min⁻¹。结果:银杏内酯C在1.11~6.66 μg,白果内酯在2.232~13.392 μg,银杏内酯A在1.912~11.472 μg,银杏内酯B在1.502~9.004 μg均呈良好的线性关系,平均回收率分别为96.36%,97.18%,97.71%,96.57%;RSD分别为1.0%,1.4%,2.1%,1.4%。结论:方法准确可靠,专属性强,结果稳定,重复性好,可有效控制制剂质量。

[关键词] 白果内酯;银杏内酯A;银杏内酯B;银杏内酯C;高效液相色谱;脉平片

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0066-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060066

Determination of Bilobalide, Ginkgolide A, Ginkgolide B and Ginkgolide C in Maiping Tablet by HPLC

NI Lin¹, ZHANG Xiu-juan², GAO Jin-xian³, YANG Xi¹ (1. *Pharmaceutical Inspection Institute of Gansu Province, Lanzhou 730070, China*; 2. *Lanzhou University College of Pharmacy, Lanzhou 730000, China*; 3. *Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China*)

[Abstract] **Objective:** To establish an method for determination bilobalide, ginkgolide A, ginkgolide B and ginkgolide C in Maiping tablet. **Method:** The bilobalide, ginkgolide A, ginkgolide B and ginkgolide C in Maiping tablet was determined by HPLC. CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm) column was used. The mobile phase was tetrahydrofuran- acetonitrile-water (12:10:78) with the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was 30 °C and evaporative light-scattering mass detector. **Result:** The ginkgolide C, bilobalide, ginkgolide A and ginkgolide B were linear at the range of 1.11-6.66, 2.232-13.392, 1.912-11.472, 1.502-9.004 μg, respectively. The average recovery was 96.36%, 97.18%, 97.71%, 96.57% and RSD was 1.0%, 1.4%, 2.1%, 1.4% (n = 6). **Conclusion:** The established method is accurate, reliable and specific. The results are stable with good reproducibility. The quality of Maiping tablet can be controlled by the method.

[Key words] bilobalide; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgolide C; HPLC; Maiping tablet

脉平片的标准为国家食品药品监督管理局国家药品标准(WS-10298(ZD-02987)-2002-2012Z),由银杏叶提取物、维生素C、芦丁、何首乌、当归等组成,具有活血化瘀的功效。用于瘀血闭阻的胸痹、心痛病,症见胸闷,胸痛,心悸,舌暗或有瘀斑等,以及冠心病、心绞痛见上述症状者。原标准中有萜类内酯的含量测定方法,但按照原标准中供试品溶液的

制备方法处理样品,结果银杏内酯C峰分离度不好,达不到基线分离,故对供试品溶液的制备方法进行修订,使银杏内酯C峰达到基线分离,萜类内酯的总量较原标准方法测定总量高。

1 材料

1.1 仪器 LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津,ELSD-II蒸发光散射检测器)。

[收稿日期] 20140416(013)

[第一作者] 倪琳,主管药师,从事中成药质量分析及检验工作, Tel:0931-7633032, E-mail: nilinmanager937@sohu.com

1.2 试药 白果内酯(批号 110865-200404), 银杏内酯 A(批号 110862-200407), 银杏内酯 B(批号 110863-200508), 银杏内酯 C(批号 110864-200505) 对照品由中国食品药品检定研究院提供, 供含量测定用。甘肃独一味生物制药股份有限公司(批号 1301071901, 1301072901, 1301073901, 1301074901, 1304071901, 1304072901, 1304073901); 乙腈为色谱纯, 四氢呋喃为进口优级纯, 水为屈臣氏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

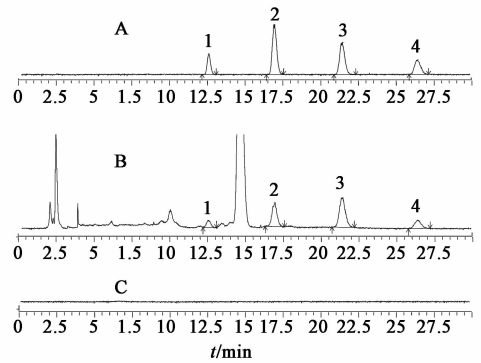
2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取白果内酯对照品 11.16 mg, 银杏内酯 A 对照品 9.56 mg, 银杏内酯 B 对照品 7.50 mg, 银杏内酯 C 对照品 5.55 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取本品 50 片, 除去包衣, 研细, 取约 6.0 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加 0.02% 盐酸溶液 50 mL^[1], 密塞, 称定质量, 加热回流 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 0.02% 盐酸溶液补足减失的质量, 摇匀, 离心, 精密量取上清液 15 mL, 用乙酸乙酯振摇提取 4 次(20, 15, 15, 15 mL), 合并提取液, 用 5% 乙酸钠溶液 30 mL 洗涤, 分取乙酸钠液, 再用乙酸乙酯 15 mL 洗涤。合并乙酸乙酯提取液及洗涤液, 用水洗涤 2 次, 每次 30 mL, 分取水液, 用乙酸乙酯 15 mL 洗涤, 合并乙酸乙酯液, 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, 滤过, 取续滤液, 即得^[2]。

2.3 阴性对照溶液的制备 按处方比例及制备工艺, 配制不含银杏叶提取物的阴性样品, 并按标准拟定的供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

2.4 色谱条件及系统适应性试验 选用 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 四氢呋喃-乙腈-水(12: 10: 78), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 对照品溶液(或对照提取物溶液) 进样 5, 10 μL, 供试品溶液 20 μL。对照品, 供试品以及阴性对照色谱图见图 1。阴性对照无干扰。

2.5 工作曲线与线性关系 精密吸取混合对照品溶液 5, 10, 15, 20, 30 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积积分值, 以峰面积积分值对数为横坐标(X), 对照品溶液的进样量对数(μg)为纵坐标(Y), 进行线性回归。分别得到回归方程: 银杏内酯 C: $\log Y = 0.7450 \log X - 2.7061$ ($r = 0.9995$); 白果内酯: $\log Y = 0.7278 \log X - 2.6882$ ($r = 0.9997$); 银杏内酯 A: $\log Y = 0.6892 \log X - 2.4770$ ($r = 0.9996$); 银杏内



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 银杏内酯 C; 2. 白果内酯; 3. 银杏内酯 A; 4. 银杏内酯 B

图1 脉平片 HPLC 液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Maiping tablet

酯 B: $\log Y = 0.7104 \log X - 2.5018$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 银杏内酯 C、白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 在 1.11 ~ 6.66, 2.232 ~ 13.392, 1.912 ~ 11.472, 1.502 ~ 9.004 μg 均呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果银杏内酯 C、白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B RSD 分别为 0.9%, 2.3%, 1.3%, 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 每隔 2 h 时间进样 1 次, 结果在 10 h 内供试品溶液中银杏内酯 C、白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 峰面积稳定, RSD 分别为 1.0%, 2.2%, 1.5%, 1.2%。

2.8 重复性试验 取脉平片样品 6 份, 按供试品溶液制备方法制备, 在确定的色谱条件下进行分析, 银杏内酯 C、白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B RSD 分别为 2.9%, 1.5%, 1.9%, 1.6%。

2.9 加样回收率试验 取已知银杏内酯 C、白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 含量的供试品(批号 1304071901) 6 份, 每份约 3 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 分别精密加入一定量的混合对照品溶液(银杏内酯 C 0.222 g·L⁻¹、白果内酯 0.4464 g·L⁻¹、银杏内酯 A 0.3824 g·L⁻¹、银杏内酯 B 0.2031 g·L⁻¹), 按供试品溶液制备方法制备, 依法测定, 即得。结果见表 1。

2.10 样品的测定 取 7 批脉平片按供试品溶液的制备方法制成供试液, 分别进样, 测得峰面积值, 计算脉平片中银杏内酯、白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 的含量。见表 2。

表 1 银杏内酯、白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 加样回收率试验
Table 1 Recovery test results of bilobalide, ginkgolide A, ginkgolide B and ginkgolide C

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
银杏内酯 C	3.102 1	1.363	0.888	2.218	96.31	96.36	1.0
	3.024 5	1.329	0.888	2.193	97.27		
	3.074 4	1.351	1.332	2.619	92.22		
	3.112 5	1.367	1.332	2.634	95.13		
	3.017 2	1.326	1.554	2.829	96.77		
白果内酯	3.204 3	1.408	1.554	2.922	97.45	97.18	1.4
	3.102 1	2.869	1.786	4.621	98.11		
	3.024 5	2.798	1.786	4.527	96.83		
	3.074 4	2.844	2.678	5.396	95.27		
	3.112 5	2.879	2.678	5.536	99.18		
银杏内酯 A	3.017 2	2.791	3.125	5.830	97.24	97.71	2.1
	3.204 3	2.964	3.125	5.977	96.43		
	3.102 1	2.094	1.530	3.550	95.17		
	3.024 5	2.042	1.523	3.513	96.23		
	3.074 4	2.075	2.294	4.351	99.18		
银杏内酯 B	3.112 5	2.101	2.294	4.397	100.06	96.57	1.4
	3.017 2	2.037	2.677	4.696	99.34		
	3.204 3	2.163	2.677	4.740	96.26		
	3.102 1	1.228	0.812	2.010 6	96.28		
	3.024 5	1.198	0.812	1.970 5	95.13		
	3.074 4	1.218	1.219	2.410 0	97.86		
	3.112 5	1.233	1.219	2.411 6	96.75		
	3.017 2	1.195	1.422	2.591 3	98.23		
	3.204 3	1.269	1.422	2.622 2	95.19		

表 2 脉平片样品中 4 种成分含量测定 mg/片

批号	银杏 内酯 C	白果 内酯	银杏 内酯 A	银杏 内酯 B	总量
1301071901	0.123	0.259	0.189	0.111	0.682
1301072901	0.086	0.271	0.184	0.107	0.648
1301073901	0.085	0.235	0.185	0.114	0.619
1301074901	0.087	0.248	0.187	0.112	0.634
1304071901	0.063	0.161	0.229	0.120	0.573
1304072901	0.061	0.153	0.218	0.120	0.552
1304073901	0.060	0.147	0.214	0.117	0.538

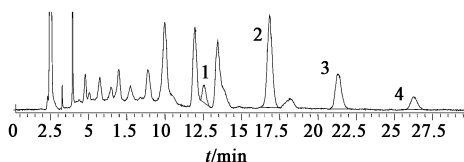
3 讨论

按原标准方法处理供试品,结果银杏内酯 C 峰分不开,见图 2。故修订后的供试品溶液的制备方法银杏内酯 C 峰能够达到基线分离。

比较原标准供试品溶液的制备方法与修订后的方法,结果正文拟定的供试品溶液的制备方法测得萜类内酯的总量较高且 4 个成分均达到基线分离。

考察供试品溶液的制备方法及加热回流时间,结果新拟定方法测得的萜类内酯的含量高。

参考《中国药典》2010 年版一部银杏叶片中萜



1. 银杏内酯 C; 2. 白果内酯; 3. 银杏内酯 A; 4. 银杏内酯 B

图 2 原标准方法提取供脉平片 HPLC

Fig. 2 HPLC Chromatograms of Maiping tablet by old standard

类内酯测定的流动相,结果发现保留时间比较长,并且水相比例较大,要求的漂移管温度和气体流速均较高,导致基线噪音比较大,色谱行为不好。为减少分析时间,提高工作效率,参考相关文献[6-9],依据峰的色谱行为、保留时间、信噪比等综合比较评价,最终确定了流动相四氢呋喃-乙腈-水(12:10:78)。

脉平片中萜类内酯的含量相关文献未见报道,本文对供试品溶液的制备方法进行修订,使银杏内酯 C 峰达到基线分离,且萜类内酯的总量较原标准方法萜类内酯的总量高。方法简便,结果准确可靠,可有效控制产品质量。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:392.
- [2] 孙丽丽,周沫. HPLC 测定银杏叶片中总黄酮醇苷和萜类内酯的含量[J]. 华西药学杂志,2007,22(2): 201-203.
- [3] 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): 26-28.
- [4] 陈香爱,袁志芳,张兰桐. HPLC 法测定银杏叶粉针中总黄酮醇苷和萜类内酯[J]. 中草药,2007,38(9): 1333-1335.
- [5] 余启荣,晏利芝,谭湘湘. HPLC 法测定银杏叶提取物中总黄酮醇苷的含量[J]. 首都师范大学学报:自然科学版,2009,30(2):32-34.
- [6] 陈红斗,孙黎清,董自波. 银杏叶总黄酮醇苷和萜类内酯类化合物最佳提取工艺研究[J]. 中国药业,2007,16(14):47-48.
- [7] 韩林涛,黄芳. HPLC 法测定银杏叶片中萜类内酯的量[J]. 湖北中医杂志,2009,31(9):74-76.
- [8] 王举涛,彭代银,金传山,等. 高效液相色谱法-蒸发激光散射检测器测定银杏酮酯胶囊中萜类内酯的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(8):4-5.
- [9] 窦国义,高宝益,李红梅. HPLC-RID 法测定银杏叶片中 4 种萜类内酯的含量[J]. 山西中医学院学报,2013,14(3):21-22.

[责任编辑 顾雪竹]