

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

王举涛, 彭代银*, 金传山, 刘劲松

(安徽中医学院药学院安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230001)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱法-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, 以控制该制剂的质量。方法: 采用高效液相色谱法-蒸发激光散射检测器测定 4 种萜类内酯的含量。色谱条件为: Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇: 水(30: 70); 柱温: 30 °C; 流速为 1.0 mL/min; 检测器条件: 漂移管温度为 110 °C, 载气流速为 2.8 L/min。结果: 4 种萜类内酯之间分离度均达 1.5 以上; 理论塔板数以白果内酯峰计算为 7 287, 平均加样回收率为 97.8% (RSD 为 0.55%); 白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 分别在 4.82~24.1, 3.81~19.0, 2.84~14.2, 1.90~9.50 μg 范围内, 进样量对数值与峰面积对数值呈良好的线性关系。结论: 该方法分离度高, 重现性好, 简便, 准确, 可用于银杏酮酯胶囊的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 蒸发激光散射检测器; 萜类内酯

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)08-0004-02

银杏酮酯胶囊是由银杏叶提取物为主药制成的胶囊剂, 主要含有银杏黄酮和萜类内酯等有效成分, 能够促进血液循环、增加脑血流量, 有改善脑营养及促进脑代谢等功能, 因而对脑缺血、脑功能障碍、脑栓塞具有显著疗效。临床用于血瘀型胸痹及血瘀型轻度动脉硬化引起的眩晕、冠心病、心绞痛等症^[1]。采用高效液相色谱法-蒸发激光散射检测器(HPLC-ELSD法), 对其中 4 种萜类内酯进行了含量测定, 并进行了方法学考察, 结果表明本法不受其他成分的干扰, 分离度高, 重现性好, 简便, 准确, 是一种良好的质量控制方法, 可推广应用。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, Alltech 2000 蒸发光散射检测器, 浙江大学 N2000 色谱工作站; 德国赛德利斯 AB135-S(十万分之一)。白果内酯对照品(批号: 110865-200303), 银杏内酯 C 对照品(批号: 110864-200305), 银杏内酯 A 对照品(批号: 0862-200004), 银杏内酯 B 对照品(批号: 110863-200204), 均由中国药品生物制品检定所提供; 银杏酮酯胶囊由厂方提供。甲醇为色谱纯, 醋酸乙酯等均为分析

纯, 水为重蒸去离子水。

2 方法与结果

2.1 系统适用性试验^[2] 色谱柱: Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 甲醇-水(30: 70), 流速: 1.0 mL/min; ELSD 参数: 漂移管温度为 110 °C, 载气流速为 2.8 L/min。理论塔板数按白果内酯峰计算为 7 287, 白果内酯峰与银杏内酯 C 峰的分离度均大于 1.5。缺银杏提取物的空白辅料不干扰白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 的测定。

2.2 供试品溶液的制备 取本品内容物, 研细, 取 2.4 g, 精密称定, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 20 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 20 mL, 回收甲醇, 残渣加水 10 mL, 置水浴中温热使溶解, 加 2% 盐酸溶液 2 滴, 用醋酸乙酯振摇提取 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, 再用醋酸乙酯 10 mL 洗涤。合并醋酸乙酯提取液及洗液, 用水洗涤 2 次, 每次 20 mL, 合并水洗液, 用醋酸乙酯 10 mL 洗, 合并醋酸乙酯液, 回收醋酸乙酯至干, 残渣用流动相溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 对照品溶液的制备 分别取在五氧化二磷减压干燥器中放置过夜的白果内酯、银杏内酯 A、银杏

[收稿日期] 2006-12-06

[通讯作者] * 彭代银, Tel: (0551) 5169189; E-mail: pengdy@ahcm.edu.cn

内酯 B、银杏内酯 C 对照品适量,精密称定,置同一量瓶中,加甲醇溶解制成每 1 mL 分别含 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.4 线性关系的考察 分别精密称取在五氧化二磷减压干燥器中放置过夜的白果内酯对照品 30.13 mg, 银杏内酯 C 对照品 23.80 mg, 银杏内酯 A 17.75 mg 和银杏内酯 B 对照品 11.88 mg 置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液,并稀释成系列溶液。精密量取混合对照品系列溶液各 20 μ L 进样,记录色谱峰面积,以对照品响应的峰面积的对数为纵坐标,进样量的对数为横坐标,绘制标准曲线,得到的白果内酯回归方程为 $\lg A = 0.9978 \lg m + 5.7078$, $R^2 = 0.9999$; 银杏内酯 C 的回归方程为 $\lg A = 1.0011 \lg m + 5.2775$, $R^2 = 0.9999$; 银杏内酯 A 的回归方程为 $\lg A = 0.9898 \lg m + 5.2614$, $R^2 = 0.9999$; 银杏内酯 B 的回归方程为 $\lg A = 1.009 \lg m + 5.271$, $R^2 = 0.9994$ 。实验表明白果内酯在 4.82~ 24.1 μ g 范围内,银杏内酯 C 在 3.81~ 19.0 μ g 范围内,银杏内酯 A 在 2.84~ 14.2 μ g 范围内,银杏内酯 B 在 1.90~ 9.50 μ g 范围内呈现良好的线性关系。

2.5 精密度试验 分别取白果内酯、银杏内酯 C、A、B 混合对照品溶液分别连续进样 5 次,测定其峰面积, RSD 分别为 0.27%, 0.88%, 0.56%, 0.60%, 结果显示精密度良好。

2.6 稳定性试验 取含量测定项下的样品溶液,分别于 1, 2, 4, 6, 8 h 进样 1 次,记录白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 的峰面积, RSD 分别为 0.52%, 0.47%, 0.53%, 0.90%, 结果表明样品在 8 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取银杏酮酯胶囊样品(批号: 20060301) 适量,按制备供试品方法分别制备供试品溶液 5 份,在上述色谱条件下,精密量取 10 μ L 进样,测定,记录白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 的峰面积, RSD 分别为 1.21%, 0.98%, 1.33%, 1.16%, 萜类内酯平均含量为 2.84 mg/粒, RSD 为 2.3% ($n = 5$), 重复性较好。

2.8 回收率试验 精密称取已知萜类内酯含量

(9.47 mg/g) 的银杏酮酯胶囊内容物 5 份,分别精密加入白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 混合对照溶液(浓度分别为 1.205, 0.952, 0.710, 0.475 mg/mL) 3 mL,按样品制备方法项下制备供试品溶液,测定萜类内酯的含量,计算回收率。结果表明加样回收率较好,结果见表 1。

表 1 萜类内酯加样回收试验数据表 ($n = 5$)

取样量 (g)	样品中萜类内酯量(mg)	加入对照品量(mg)	测得萜类内酯量(mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD %
1.276 4	12.09	10.03	21.85	97.3		
1.310 0	12.41	10.03	22.29	98.5		
1.346 3	12.75	10.03	22.51	97.3	97.8	0.55
1.285 9	12.18	10.03	21.99	97.8		
1.310 2	12.41	10.03	22.26	98.2		

2.9 样品的含量测定 分别精密吸取对照品溶液 10, 20 μ L, 供试品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪,测定,用外标两点对数方程分别计算白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的含量,即得。3 批样品(批号为 20060301, 20060302, 20060303) 中萜类内酯的含量(mg/粒)依次为 2.84, 3.02, 3.06。

3 讨论

试验结果表明分离度好,干扰少,前处理简便。灵敏度、稳定性及重复性均符合含量测定要求。

试验中需反复仔细调节参数,以便得到最优信噪比及平衡基线。

2005 年版中国药典一部银杏叶片项下测定萜类内酯所采用的流动相是正丙醇-四氢呋喃-水(1:15:84),较为复杂。经试验,本色谱条件用甲醇和水即可使待分析成分达到较好的分离,并具有较高的柱效,且主成分峰不受辅料的干扰,是一种有效地控制产品质量的检测方法。

[参考文献]

[1] 国家食品药品监督管理局. 新药转正标准[P]. 标准号: WS3-228(Z-029)-2002Z.

[2] 田南卉,王婕,厉进忠. 高效液相色谱法——蒸发激光散射检测器测定银杏叶提取物中内酯的含量[J]. 药物分析杂志, 1997, 17(4): 282-283.