

· 药物制剂与药品质量控制 ·

银杏叶总内酯对照提取物在银杏叶含量测定中的应用*

黄琴伟, 施贝, 张文婷, 董婷, 赵维良

(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要 目的 探讨选择银杏叶总内酯对照提取物替代单体成分对照品测定银杏叶中萜内酯类成分含量的可行性。方法 以定值的银杏叶总内酯对照提取物为对照, 采用高效液相-蒸发光散射检测 (HPLC-ELSD) 法, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, ELSD 检测器: 漂移管温度 105 °C; 氮气 (N₂): 3.0 L·min⁻¹。结果 银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯的进样量与峰面积分别在 0.735 ~ 5.879 μg ($r=0.999\ 6$)、0.404 ~ 6.060 μg ($r=0.999\ 6$)、0.296 ~ 4.439 μg ($r=0.999\ 6$)、1.001 ~ 6.006 μg ($r=0.999\ 7$) 范围内呈良好的对数线性关系; 平均回收率分别为 95.5%、97.4%、99.3%、100.4%, RSD 依次分别为 4.0%、4.5%、5.0%、2.1%。结论 银杏叶总内酯对照提取物可以替代相应的单体对照品用于银杏叶中萜内酯类成分的定量测定。

关键词 银杏叶; 银杏叶总内酯对照提取物; 萜类内酯; 对照品替代法

中图分类号 R927.2

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2017)06-0665-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.06.016

Applications of Reference Extract from Ginkgo Leaf Total Lactones for Quantitative Assay of *Ginkgo Folium*

HUANG Qinwei, SHI Bei, ZHANG Wenting, DONG Ting, ZHAO Weiliang (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT Objective To explore the feasibility of using the quantitative reference extract of ginkgo leaf total lactones instead of single component reference for the quantitative assay of *Ginkgo Folium*. **Methods** HPLC-ELSD method was performed by using a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with methanol-water as the mobile phase at the gradient elution mode. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The parameters of ELSD detector were as follows, the drift tube temperature was 105 °C, and the flow rate of nitrogen (N₂) was 3 L·min⁻¹. **Results** The linear ranges of ginkgolide A, ginkgolide B, ginkgolide C, and bilobalide were 0.735 ~ 5.879 μg ($r=0.999\ 6$), 0.404 ~ 6.060 μg ($r=0.999\ 6$), 0.296 ~ 4.439 μg ($r=0.999\ 6$), and 1.001 ~ 6.006 μg ($r=0.999\ 7$), respectively. The recoveries and RSD of the four components were 95.6% (4.0%), 97.3% (4.5%), 99.3% (5.0%), and 100.4% (2.1%), respectively. **Conclusion** The quantitative reference extract of ginkgo leaf total lactones can be used as the substitute for the determination of terpene lactones.

KEY WORDS *Ginkgo Folium*; Reference extract of ginkgo leaf total lactones; Terpene lactones; Reference substitution method

银杏叶为银杏科植物银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 的干燥叶, 具有很高的药用价值, 含有天然活性的黄酮类及萜类内酯类成分。从银杏叶药材中提取纯化制得的银杏叶提取物是银杏叶片等系列制剂的唯一原料。根据中药多成分、多靶点、多途径作用特点, 《中华人民共和国

药典》2010 年版一部^[1]等收录的银杏叶、银杏叶提取物及相关制剂的质量标准分别以槲皮素、山柰素、异鼠李素、银杏内酯 A、B、C 和白果内酯为指标成分建立黄酮类成分和萜类内酯成分含量测定方法。但由于质量标准中涉及的单一化学对照品价格较贵, 检验成本较高且存在对照品紧缺问题。一测多评^[2-4]、对照提取物替代^[5-7]等方法的开发应用成为解决这一问题的关键。笔者在前期研究中制备银杏叶总内酯对照提取物并对其中的主要萜内酯类成分进行溯源定量。现以通过和单体化学对照品比较, 进一步明确对照提取物在银杏叶质量控制中的适用性和可行性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1200 型系列高效液相色谱仪, 包括 G1311A 四元泵, G1322A 脱气机, G1329A 自动进样器,

收稿日期 2016-01-15 修回日期 2016-03-29

基金项目 * 浙江省食品药品监管系统科技计划项目 (2014005); 国家药品标准提高暨 2015 年版药典科研任务

作者简介 黄琴伟 (1983-), 女, 浙江瑞安人, 主管药师, 硕士, 主要从事中药质量分析。电话: 0571-87180337, E-mail: qingwei-h@163.com。

通信作者 赵维良 (1959-), 男, 浙江诸暨人, 主任药师, 硕士, 从事中药质量分析。电话: 0571-86452373, E-mail: zwl@zjyj.org.cn。

G1316A 柱温箱, Alltech 2000ES 蒸发光散射检测器。

1.2 试药 白果内酯对照品 (bilobalide, 简称 BB, 批号: 110865-200404)、银杏内酯 A 对照品 (ginkgolide A, 简称 GA, 批号: 110862-200004)、银杏内酯 B 对照品 (ginkgolide B, 简称 GB, 批号: 110863-200507)、银杏内酯 C 对照品 (ginkgolide C, 简称 GC, 批号: 110864-200906) 均由中国食品药品检定研究院提供, 供含量测定用; 银杏叶总内酯对照提取物 (批号: N120713, BB: 39.54%, GA: 29.03%, GB: 15.96%, GC: 11.69%) 由浙江康恩贝制药股份有限公司提供。银杏叶药材 (上海信谊百路达药业有限公司, 批号: 120710, 120704; 浙江康恩贝制药股份有限公司, 批号: 120712, 120833; 宁波立华制药有限公司, 批号: 130802, 130804), 经本单位郭增喜主任中药师鉴定为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶。甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以甲醇为流动相 A, 以水为流动相 B, 梯度洗脱, 见表 1; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; ELSD 检测器: 漂移管温度 105 ℃; 氮气 (N₂): 3.0 L·min⁻¹。

表 1 流动相梯度洗脱表

Tab.1 Gradient elution program of mobile phase %

时间/min	流动相 (A)	流动相 (B)
0 ~ 23	25→48	75→52
> 23 ~ 28	48	52
> 28 ~ 30	48→75	52→25
> 30 ~ 35	75→90	25→10
> 35 ~ 40	90→25	10→75

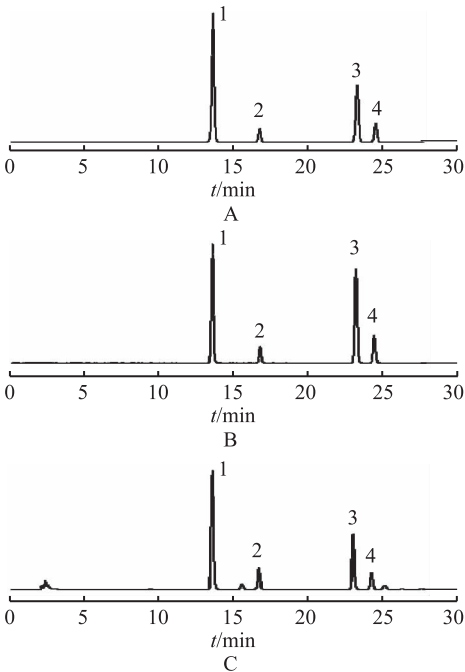
2.2 对照品溶液的制备 取银杏内酯 A 对照品、银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品和白果内酯对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇制成每毫升含银杏内酯 A 0.7 mg、银杏内酯 B 0.4 mg、银杏内酯 C 0.3 mg 和白果内酯 1.0 mg 的混合溶液, 即得。

2.3 对照提取物溶液的制备 取银杏叶总内酯对照提取物适量, 精密称定, 加 50% 甲醇制成每毫升含 2.5 mg 的溶液①; 精密吸取上述对照提取物溶液 20 mL, 置 250 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀即得, 作为对照提取物溶液②。

2.4 供试品溶液的制备 取本品中粉约 1.5 g, 精密称定, 加 90% 甲醇 50 mL, 加热回流 3 h, 滤过, 药渣用

90% 甲醇 30 mL 分次洗涤, 合并滤液及洗液, 蒸干, 残渣加磷酸盐缓冲液 (取磷酸氢二钠 1.19 g 与磷酸二氢钾 8.25 g, 加水 1 000 mL 使溶解, 调节 pH 值至 5.8) 10 mL 超声使溶解, 加在硅藻土柱 (545 型, 16 g, 内径 2.5 cm) 上 (注: 磷酸盐缓冲液的上样量不得超过 15 mL), 蒸发皿再用磷酸盐缓冲液洗 2 次, 每次 2.5 mL, 移至硅藻土柱上, 待缓冲液全部吸附于硅藻土后, 静置 15 min, 用石油醚 (30 ~ 60 ℃) 80 mL 洗脱, 弃去石油醚液, 再用乙酸乙酯 100 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加 50% 甲醇超声使溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 系统适应性实验 取混合对照品溶液, 对照提取物溶液, 供试品溶液适量, 按照“2.1”项色谱条件进样测定, 记录色谱图, 结果见图 1。



A. 混合对照品溶液; B. 银杏叶总内酯对照提取物溶液; C. 供试品溶液; 1. 白果内酯; 2. 银杏内酯 C; 3. 银杏内酯 A; 4. 银杏内酯 B

图 1 3 种溶液的 HPLC 色谱图

A. mixed reference solution; B. reference extract solution of ginkgo leaf total lactones; C. test solution; 1. bilobalide; 2. ginkgolide C; 3. ginkgolide A; 4. ginkgolide B

Fig.1 HPLC chromatogram of three kinds of solution

2.6 线性关系考察 精密吸取“2.3”项对照提取物溶液① 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 15.0 μL, 分别注入色谱仪, 以进样量 (ng) 的对数值 (lgW) 为横坐标 (X), 以峰面积的对数值 (lgA) 为纵坐标 (Y) 进行线

性回归,建立 4 种对照品的线性回归方程,见表 2。

表 2 4 种对照品的回归方程、相关系数及线性范围
Tab.2 Regression equations, correlation coefficient and linear range of four kinds of reference substance

对照品	回归方程	相关系数 (r)	线性范围/ μg
白果内酯	$Y=1.673\ 9X-4.634\ 3$	0.999 7	1.001~6.006
银杏内酯 A	$Y=1.693\ 4X-4.657\ 9$	0.999 6	0.735~5.879
银杏内酯 B	$Y=1.683\ 8X-4.600\ 5$	0.999 6	0.404~6.060
银杏内酯 C	$Y=1.665\ 2X-4.529\ 8$	0.999 6	0.296~4.439

2.7 精密度实验 精密吸取“2.3”项对照提取物溶液①6 μL,在“2.1”项色谱条件下,重复进样 6 次。白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 峰面积的 RSD 分别为 0.2%,0.2%,0.5%,0.3%。表明仪器进样精密度良好。

2.8 重复性实验 取同一批银杏叶(批号:120712)6 份,按“2.4”项方法制备,测定峰面积计算含量,结果白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 含量的 RSD 分别为 1.8%,2.0%,3.0%,3.1%。表明方法重复性良好。

2.9 溶液稳定性 精密吸取同一份供试品溶液,分别在 0,6,12,18,26,32,35,39,47,53 h 进样一次,白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 峰面积的 RSD 分别为 0.4%,0.3%,0.3%,0.2%。表明溶液在 53 h 内稳定。

2.10 加样回收实验 精密称取已知含量供试品(批号:120712)0.75 g,共 6 份,精密加入对照提取物溶液②10 mL,按“2.4”项方法制备,在“2.1”项色谱条件下进行分析,结果见表 3。

2.11 样品测定 取 6 批银杏叶样品,按“2.4”项方法制备,在“2.1”项色谱条件下进行分析,分别采用银杏叶总内酯对照提取物为对照和单体化学对照品为对照通过外标两点法对数方程计算银杏叶萜类内酯总量并计算相对平均偏差,结果见表 4。

3 讨论

3.1 流动相的优化 比较四氢呋喃-正丙醇-水、四氢呋喃-甲醇-水、甲醇-水系统,结果表明不同的流动相系统各指标成分均能达到较好地分离。由于四氢呋喃具有刺激和麻醉作用且有燃爆危险,故选择甲醇-水系统。

3.2 提取方法的优化 通过比较提取方法(索氏提取、水浴回流),提取溶剂(甲醇、90% 甲醇、80% 甲醇、70% 甲醇和 50% 甲醇)和提取时间(1.5,2,3,4 h)后确定采用 90% 甲醇回流 3 h。

表 3 5 种化合物的加样回收率测定
Tab.3 Recovery results of five kinds of compounds

对照品	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
	mg			%		
白果内酯	0.742	0.801	1.523	97.50	100.4	2.1
	0.761	0.801	1.585	102.87		
	0.761	0.801	1.586	103.00		
	0.753	0.801	1.551	99.63		
	0.751	0.801	1.552	100.00		
	0.752	0.801	1.549	99.50		
银杏内酯 A	0.408	0.588	0.970	95.58	95.5	4.0
	0.419	0.588	1.010	100.51		
	0.419	0.588	1.002	99.15		
	0.414	0.588	0.946	90.48		
	0.413	0.588	0.973	95.24		
	0.414	0.588	0.957	92.35		
银杏内酯 B	0.205	0.323	0.507	93.50	97.4	4.5
	0.210	0.323	0.528	98.45		
	0.210	0.323	0.548	104.64		
	0.208	0.323	0.520	96.59		
	0.207	0.323	0.525	98.45		
	0.207	0.323	0.506	92.57		
银杏内酯 C	0.263	0.237	0.486	94.09	99.3	5.0
	0.270	0.237	0.519	105.06		
	0.270	0.237	0.520	105.49		
	0.267	0.237	0.504	100.00		
	0.267	0.237	0.490	94.09		
	0.267	0.237	0.497	97.05		
总萜类内酯	1.618	1.949	3.486	95.84	98.3	3.0
	1.660	1.949	3.641	101.64		
	1.660	1.949	3.656	102.41		
	1.641	1.949	3.522	96.51		
	1.638	1.949	3.541	97.64		
	1.640	1.949	3.508	95.84		

表 4 化学对照品和对照提取物测得银杏叶中萜类内酯的含量
Tab.4 Content of terpene lactones in *Ginkgo Folium* determined with chemical reference or assigned values of reference extract

批号	以对照提取物 为对照	以对照品 为对照	相对平均 偏差
120710	0.23	0.22	2.2
120704	0.22	0.23	2.2
120712	0.28	0.27	1.8
120833	0.30	0.29	1.7
130802	0.37	0.36	1.4
130804	0.49	0.47	2.1

3.3 净化方法的优化 采用硅藻土液液萃取柱进行

净化处理,其工作原理是以硅藻土作为填料,硅藻土表面为多孔结构;加入样品后,样品的水溶液将柱中的硅藻土充分润湿,在每一个颗粒表面形成一层薄膜;接下来,向柱中注入与水互不相溶的萃取溶剂,萃取溶剂会在水膜外形成新薄膜,新薄膜迅速将水膜中的目标物萃取出来,并在重力作用下流出萃取柱。这种液液萃取柱简化了传统的液液萃取的步骤,并有效避免发生乳化现象。通过对不同型号、厂家的硅藻土进行比较,最终确定以 545 型硅藻土作为填料,比较硅藻土填料量、最大上样体积、洗脱溶剂和洗脱体积,最终确定了正文所述的净化方法。

3.4 耐用性考察 实验中比较不同柱温、不同流速、不同品牌或规格的色谱柱,结果发现在一定范围内,基线平稳,分离度符合规定,故认为方法耐用性较好。

3.5 单体对照品和对照提取物为对照的测定结果比较 本课题组前期研究结果表明,白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 的含量偏差小于 3.5%,总萜类内酯的含量偏差小于 2.5%,表明银杏叶总内酯对照提取物可以替代相应的单体对照品用以测定银杏叶中萜内酯类成分的定量,所建立的含量测定方法作为定量用银杏叶总内酯对照提取物实际应用一次尝试,为银杏叶系列质量标准的进一步研究提供思路。

中药提取物与原药材的量化关系明确,专属性较强,与化学对照品相比,价格低廉,可大大降低检验检测成本,因此,探索和推行以中药提取物为对照的质量评价体系具有实际意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:296-297.
- [2] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. 一测多评法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(23):1925-1928.
- [3] 高慧敏,宋宗华,王智民,等. 适合中药特点的质量评价模式-QAMS 研究概述[J]. 中国中药杂志,2012,37(4):405-416.
- [4] 匡艳辉,朱晶晶,王智民,等. 一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量[J]. 中国药理学杂志,2009,44(5):390-394.
- [5] 陆兔林,翟为民,蔡宝昌,等. 对照提取物在中药质量控制中的应用[J]. 中国药理学杂志,2013,48(3):462-465.
- [6] 逢瑜,孙磊,金红宇,等. 替代对照品法在中药多指标含量测定中的应用与技术要求探讨[J]. 药物分析杂志,2013,33(1):169-177.
- [7] 周超,何轶,鲁静,等. 黄芪异黄酮对照提取物的制备及其在黄芪药材含量测定中的应用[J]. 药物分析杂志,2014,34(3):523-528.

中心组合设计-响应面法优化 银杏活脑胶囊的提取工艺

漆立军,覃鸿恩,黄华斌

(湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院药学部,恩施 445000)

摘要 **目的** 探索银杏活脑胶囊的提取工艺,优化制剂工艺。**方法** 以加水倍数、煎煮时间为考察因素,以紫丁香苷和大黄素转移率及固形物保留率的权重化值为综合评价指标,采用中心组合设计-响应面法对银杏活脑胶囊水提部位的提取工艺进行筛选。**结果** 银杏活脑胶囊水提部位的优选提取工艺为:加水量 10 倍,提取时间 160 min,提取 2 次。**结论** 中心组合设计-响应面法用于筛选银杏活脑胶囊水提部位的提取工艺可行,预测性较高,所得优选工艺方法简便、可靠。

关键词 银杏活脑胶囊;中心组合设计-响应面法;提取工艺

中图分类号 R286;TQ460.6

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2017)06-0668-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.06.017

Extraction Process of Yinxing Huonao Capsule by Central Composite Design-Response Surface Method

QI Lijun, QIN Hongen, HUANG Huabin (Department of Pharmacy, the Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Hubei Province, Enshi 445000, China)

ABSTRACT Objective To explore the extraction process of Yinxing Huonao capsule. **Methods** Central composite