

- Pharm(中国医院药学杂志), 2009, 29(3): 228-232.
- [2] ZHANG S T. Pharmacokinetics of oral busulfan in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2009, 44(18): 1416-1419.
- [3] ZHANG S T. Pharmacokinetics of intravenous Busulfan in patients prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2010, 45(12): 935-939.
- [4] SUN X L. Immunological research progress of hematopoietic stem cell transplantation [J]. Acad J Jiangsu Univ Med(江苏大学学报: 医学版), 2003, 13(1): 75-78.
- [5] MCCUNE J S, GOOLEY T, GIBBS J P, et al. Plasma concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 2002, 30(12): 167-173.
- [6] SALINGER D H, BLOUGH D K, VICINI P, et al. A limited sampling schedule to estimate individual pharmacokinetic parameters of fludarabine in hematopoietic cell transplant patients [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(16): 5280-5287.
- [7] OP DEN BUIJSCH RA, VAN DE PLAS A, STOLK L M, et al. Evaluation of limited sampling strategies for tacrolimus [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2007, 63(11): 1039-1044.
- [8] MARCOS B, BOUZAS L, TUTOR J C. A limited sampling strategy for estimation of the area under the curve(0 to 8 hours) of mycophenolic acid administered three times daily to liver transplant recipients [J]. Ups J Med Sci, 2011, 116(5): 47-51.
- [9] ZHANG S T. Determination of busulfan in human plasma by HPLC with pre-column derivatization [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2007, 27(4): 458-461.

收稿日期: 2014-01-08

## HPLC 测定银杏叶制剂中 6-羟基犬尿喹啉酸的含量

乔洪翔<sup>1,2</sup>, 吴健<sup>1,2</sup>, 何厚洪<sup>1,2</sup>, 胡江宁<sup>1,2</sup>, 王如伟<sup>1,2\*</sup> (1.浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江省中药制药技术重点实验室, 杭州 310052; 2.浙江现代中药与天然药物研究院有限公司, 杭州 310052)

**摘要:** 目的 建立银杏叶制剂中 6-羟基犬尿喹啉酸(6-HKA)含量的测定方法。方法 色谱柱为 XDB-C<sub>8</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1%磷酸-乙腈-甲醇(94:5:1); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 350 nm。制剂样品经粉碎后, 用 50% 甲醇溶解, 过滤后进样测定。结果 6-HKA 在 5.025~100.5 μg·mL<sup>-1</sup> 内线性良好, 峰面积与进样量呈良好线性关系,  $r=1.0000$ ; 平均回收率为 99.86%。6 批银杏叶片剂中 6-HKA 的含量为 0.22%~0.35%。结论 建立的方法操作简便, 结果准确, 重复性好。

**关键词:** 银杏叶制剂; 6-羟基犬尿喹啉酸; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)10-1225-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.015

### Determination of 6-Hydroxykynurenic Acid in Ginkgo Preparation by HPLC

QIAO Hongxiang<sup>1,2</sup>, WU Jian<sup>1,2</sup>, HE Houhong<sup>1,2</sup>, HU Jiangning<sup>1,2</sup>, WANG Ruwei<sup>1,2\*</sup> (1.Zhejiang Conba Pharmaceutical Co., Ltd., Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China; 2.Zhejiang Institute of Modern TCM and Natural Medicine Co.,Ltd, Hangzhou 310052, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish the method of determining the 6-hydroxykynurenic acid (6-HKA) content with HPLC. **METHODS** XDB-C<sub>8</sub> column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. Mobile phase was mixture of 0.1% phosphoric acid-CH<sub>3</sub>CN-CH<sub>3</sub>OH(94:5:1). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The UV detector was operated at 350 nm. Tablets were comminution, dissolution with 50% methanol, and determination after filtration. **RESULTS** The linear range of 6-HKA was 5.025~100.5μg·mL<sup>-1</sup>( $r=1.0000$ ); the average recovery was 99.86%. The content of 6-HKA in 6 batches of Ginkgo tablets was 0.22%~0.35%. **CONCLUSION** The method is simple, the result is accurate, and the reproducibility is good.

**KEY WORDS:** Ginkgo preparation; 6-hydroxykynurenic acid; content determination; HPLC

银杏叶及其提取物中含有含量丰富的有机酸, 其在银杏标准提取物 EGb761 中的含量达 13%<sup>[1]</sup>。银杏有机酸类成分可以分为 2 大类<sup>[2]</sup>, 非

酚酸和酚酸, 前者包括抗坏血酸、D-葡萄糖酸、奎尼酸和莽草酸; 后者包括原儿茶酸、对羟基苯甲酸、香草酸、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸以及

基金项目: 国家重大新药创制项目(2011ZX09203-001-18); 浙江省重点实验室和中试基地计划项目(2009E10009)

作者简介: 乔洪翔, 男, 博士, 高级工程师 Tel: (0571)87774831  
E-mail: qiaohx@conbagroup.com  
\*通信作者: 王如伟, 男, 教授  
级高工, 博导 Tel: (0571)87774766 E-mail: wangrw@conbagroup.com

绿原酸。除了上述这些通常的酚酸外，还有一种罕见的含氮酚酸，6-羟基犬尿喹啉酸(6-hydroxykynurenic acid, 6-HKA)。6-HKA 是犬尿烯酸的衍生物，与犬尿烯酸一样，都是谷氨酸受体拮抗剂。

谷氨酸是脑内最主要的兴奋性神经递质，有 3 个不同的受体亚家族：*N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)、 $\alpha$ -氨基羟甲基恶唑丙酸(AMPA)和红藻氨酸盐(KA)受体<sup>[3]</sup>。若过分的刺激谷氨酸受体，则会产生明显神经毒性，表现为急性或慢性的中枢神经系统障碍性疾病<sup>[4]</sup>，因此临床上已有许多谷氨酸受体拮抗剂作为药物来治疗中枢神经系统疾病<sup>[3,5]</sup>。但是，临床研究发现，NMDA 受体拮抗剂可以导致认知障碍或其他严重的不良反应，而 AMPA 受体拮抗剂则相对更安全些。6-HKA 经研究证实<sup>[6]</sup>，对 NMDA 受体的结合能力不如犬尿烯酸，而对 AMPA 的结合能力显著高于犬尿烯酸，因此，6-HKA 比犬尿烯酸更具有成药的潜力。

目前为止，对于 6-HKA 的研究非常少。本实验通过建立银杏叶制剂中 6-HKA 的含量测定方法，为完善银杏叶提取物及其制剂的质量标准提供可靠的方法和实验依据。

## 1 仪器与试剂

1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); BS-210S 型电子天平(北京赛多利斯公司); XDB-C<sub>8</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m)。

6-HKA 对照品(浙江金华康恩贝生物制药有限公司, 批号: 120829, 含量 99.85%); 银杏叶片(厂家: KEB, 批号: 120301, 101102, 120104, 110705, 110105, 111107, 规格: 总黄酮醇苷 9.2 mg·片<sup>-1</sup>, 总内酯 2.4 mg·片<sup>-1</sup>, 折算至提取物 40 mg·片<sup>-1</sup>); 银杏胶囊(厂家: KEB, 批号: 20110203, 20110303, 20100801, 规格: 总黄酮醇苷 9.2 mg·粒<sup>-1</sup>, 总内酯 2.4 mg·粒<sup>-1</sup>, 折算至提取物 40 mg·片<sup>-1</sup>); 色谱甲醇(Merck, 批号: 1689507323); 色谱乙腈(Merck, 批号: 1714630343)。

## 2 6-HKA 的含量测定

### 2.1 测定方法

**2.1.1 色谱条件与系统适应性** 用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂，流动相：0.1%磷酸水溶液-乙-甲醇(94:5:1); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 350 nm。理论板数按 6-HKA 峰计算应 $\geq$ 3 000。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 取 6-HKA 对照品适量，精密称定，加 50%甲醇制成每 1 mL 含 6-HKA

0.1 mg 的溶液，摇匀，即得。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取 30 片/粒银杏叶片剂/胶囊，称重后，计算平均片重。研磨至细粉，过 80 目筛。称取一定量的银杏叶制剂粉末，折算至提取物重量约为 50 mg; 用 50%甲醇溶解并定容至 10 mL，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

**2.1.4 测定法** 分别精密吸取对照品溶液 20  $\mu$ L 与供试品溶液 20  $\mu$ L，注入液相色谱仪，测定，按外标法以峰面积计算，即得。对照品溶液与供试品溶液的色谱图见图 1。

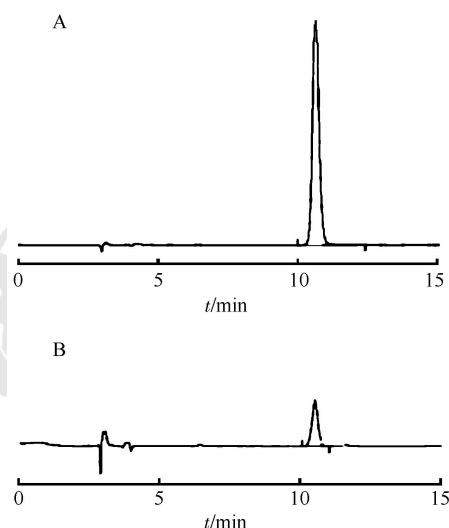


图 1 6-HKA 含量测定的高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品。

Fig.1 HPLC determination of 6-HKA

A-control; B-the sample.

### 2.2 方法学考察

**2.2.1 标准曲线** 分别精密量取 6-HKA 对照品溶液(浓度 201  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>)5.0, 2.5, 1, 0.5, 0.2 mL 置 10 mL 量瓶中，用 50%甲醇稀释至刻度，摇匀，分别精密吸取各浓度对照品溶液 20  $\mu$ L，注入液相色谱仪，测定。以对照品浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，进行线性回归处理，计算回归方程及相关系数。得  $Y=27\ 727X-2.106\ 6$ ,  $r=1.000\ 0$ 。结果表明，6-HKA 在 5.025~100.5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 内与峰面积呈良好线性关系。

**2.2.2 稳定性试验** 按“2.1.2”和“2.1.3”项下方法分别制备对照品溶液和供试品溶液，分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8 和 24 h 进样测定。结果 24 h 内对照品溶液峰面积的 RSD 为 0.79%，供试品溶液峰面积的 RSD 为 1.87%。说明对照品溶液和供试品溶液在室温放置 24 h，稳定性良好。

**2.2.3 重复性试验** 取一定量的银杏叶制剂粉

末,共6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.4”项下方法进行供试品溶液中6-HKA含量测定,结果该含量测定方法重复性试验RSD为0.75%。

**2.2.4 中间精密密度** 考察不同日期,不同人员,不同仪器的实验精密密度,按“2.1.3”和“2.1.4”的方法进行。结果该方法中间精密密度试验RSD为2.48%。

**2.2.5 回收率试验** 取一定量的银杏叶制剂粉末,共9份,加入10 mL量瓶中,分别加入6-HKA对照品溶液(8.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )0.8, 1.0, 1.2 mL,各3份,再用50%甲醇溶解并定容至10 mL,摇匀,滤过,取续滤液进样测定,考察加样回收结果,平均加样回收率为99.86%,RSD为1.03%。结果见表1。

表1 加样率回收试验结果

Tab. 1 The result of recovery test

取样量/ mg	样本含量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
119.2	8.01	6.44	14.41	99.41		
119.2	8.01	6.44	14.38	98.84		
119.3	8.01	6.44	14.38	98.83		
119.8	8.05	8.05	15.99	99.22		
119.6	8.03	8.05	16.08	99.95	99.86	1.03
119.5	8.03	8.05	16.02	99.28		
119.2	8.01	9.66	17.72	100.53		
119.4	8.02	9.66	17.85	101.73		
119.5	8.03	9.66	17.79	101.04		

### 2.3 制剂中6-HKA含量的测定

取KEB厂家生产的6批次银杏叶片和3批次银杏胶囊,按“2.1.3”和“2.1.4”项下方法进行6-HKA含量测定,该厂家生产的银杏叶片中6-HKA含量在0.22%~0.35%之间,结果见表2。

表2 制剂中6-HKA的含量测定结果

Tab. 2 Determination the content of 6-HKA in preparation

名称	批号	含量/%
银杏叶片	120301	0.345
	101102	0.221
	120104	0.249
	110705	0.255
	110105	0.308
	111107	0.216
银杏胶囊	20110203	0.262
	20110303	0.272
	20100801	0.309

## 3 讨论

之前已有研究用高效薄层色谱法(HPTLC)和高效液相色谱法(HPLC)测定制剂中6-HKA的含量<sup>[7]</sup>,但是前处理方法复杂,需通过提取、强阳离

子交换树脂纯化、重结晶等步骤,先将6-HKA从制剂中富集处理,再进行含量检测,测得银杏叶片剂的含量为0.1%~0.3%左右,其结果的准确性令人质疑。本研究建立了一种HPLC分析方法,对制剂无须过多的前处理,只需将制剂研磨至粉,用50%甲醇溶解、定量、过滤即可。前处理简单、操作方便、测定快速、结果准确。

徐静等<sup>[8]</sup>观察不同剂量的白果内酯对谷氨酸对神经元损害的影响,发现100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量下呈现最佳神经保护效果;徐静等<sup>[9]</sup>还研究了不同剂量的银杏内酯B对谷氨酸对神经元损害的影响,同样发现100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最佳保护剂量。将上述摩尔浓度换算成质量浓度,6-HKA对NMDA受体的结合能力 $\text{IC}_{50}$ 值为25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,对AMPA受体的结合能力 $\text{IC}_{50}$ 值为4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;白果内酯最佳神经保护效果浓度为33  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;银杏内酯B为43  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由此可见,银杏叶的活性成分中,6-HKA对神经细胞的保护作用最强。因此,研发6-HKA对于银杏产业及神经系统疾病的治疗都大有前景。

## REFERENCES

- [1] STUMPF K H. Organizing Committee for '97 International Seminar on Ginkgo (Ed.), Proceedings of '97 International Seminar on Ginkgo [C]. Beijing: The state Science and Technology Commission, 1997: 39.
- [2] VAN BEEK T A, MONTORO P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(11): 2002-2032.
- [3] DINGLEDINE R, BORGES K, BOWIE D. et al. The glutamate receptor ion channels [J]. Pharmacol Rev, 1999, 51(1): 7-61.
- [4] CHOI D W. Excitotoxic cell death [J]. J Neurobiol, 1992, 23(9): 1261-1276.
- [5] PARSONS C G, DANYSZ W, QUACK G. Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update [J]. Drug News Perspect, 1998, 11(9):523-569.
- [6] WEBER M, DIETRICH D, GRASEL I, et al. 6-Hydroxykynurenic acid and kynurenic acid differently antagonise AMPA and NMDA receptors in hippocampal neurons [J]. J Neurochem, 2001, 77(4): 1108-1115.
- [7] GRSEL I, REUTER G. Analysis of 6-hydroxykynurenic acid in *Ginkgo biloba*& Ginkgo preparations [J]. Planta Med, 1998, 64(6):566-570.
- [8] XU J, SUN C K, WANG D M, et al. Neuroprotective effect of bilobalide against neuronal damage by glutamate-induced excitotoxicity [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2009, 40(10): 1953-1957.
- [9] XU J, SUN C K, MA H, et al. Neuroprotective effect of extract of *Ginkgo biloba* against excitotoxicity compared with ginkgolide B in neuron cell of rat [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(1): 114-117.

收稿日期: 2013-11-26