

高效液相色谱法测定银杏内酯 B 滴丸的含量

邵胜荣^{1,2}, 蒋惠娣¹, 曾苏¹ (1. 浙江大学药学院药物分析与药物代谢研究室, 杭州 310031; 2. 浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江 兰溪 321100)

摘要:目的 建立银杏内酯 B 滴丸中银杏内酯 B 的含量测定方法。方法 采用 HPLC, 选择 EclipseXDB-C₁₈ (150mm × 4.6mm, 5μm) 色谱柱, 以甲醇-0.1% 磷酸溶液 (33.3:66.7) 为流动相; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 225nm。结果 银杏内酯 B 在 0.2650~4.240mg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r=1.000$); 平均加样回收率为 99.6% (RSD = 1.3%)。结论 此方法简便、快速、准确, 可作为银杏内酯 B 滴丸的含量测定方法。

关键词: 高效液相色谱法; 银杏内酯 B 滴丸; 银杏内酯 B; 含量测定

中图分类号: R917.798.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2006)03-0215-03

Determination of ginkgolide B in drop pill by HPLC

SHAO Sheng-rong^{1,2}, JIANG Hui-di¹, ZENG Su¹ (1. Department of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 2. Zhejiang Conba Pharmaceutical Co., LTD, Lanxi 321100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for determination of ginkgolide B in drop pill. **METHODS** The method was performed on EclipseXDB-C₁₈ (150mm × 4.6mm, 5μm) column, methanol-0.1% H₃PO₄ (33.3:66.7) was used as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The UV detector was set at 225 nm. **RESULTS** The calibration curve was good linear in the range from 0.2650mg · mL⁻¹ to 4.240mg · mL⁻¹. The average recovery was 99.6% with RSD = 1.3% ($n=6$). **CONCLUSION** The method developed is simple, rapid, accurate and sensitive. It can be applied to the quality control of ginkgolide B drop pill.

KEY WORDS: HPLC; ginkgolide B drop pill; ginkgolide B; assay

银杏内酯为银杏科植物银杏 (*Ginkgo biloba*) 的提取物, 是银杏叶中发现的一类具有特殊结构及显著药理活性的成分, 其在心、脑血管系统、中枢神经系统、血液系统、肝炎、肺炎治疗方面显示较好的应用前景。在抗血小板活化因子——PAF 及抗自由基方面也有着很好的疗效^[1], 特别是银杏内酯 B 由于其独特的药理作用和治疗价值已引起世界范围制药工业的极大兴趣。由于银杏内酯分子中没有共轭多烯结构, 其紫外吸收较弱, $\lambda_{\max} = 220\text{nm}$ 左右 ($\epsilon \approx 300$)^[2], 银杏叶提取物中的黄酮类成分紫外吸收则较强, 因而会干扰银杏内酯的紫外检测。因此现有文献以 HPLC 测定银杏叶提取物中的银杏内酯时, 多选用蒸发光散射检测器 (ELSD)^[3]、示差折光检测器 (RI)^[4]。也曾有文献报道, 以 HPLC-UV 测定银杏叶中 3 种内酯含量^[5], 但认为检测灵敏度低。因此, 中国药典 2000 版 (2002 增补本)^[6]、2005 版^[7] 中银杏叶提取物标准也采用 HPLC-ELSD 测定银杏内酯含量。但是, 本研究中用于制备滴丸制剂的银杏内酯 B 纯度高, 不会受到黄酮类化合物的干扰, 而且, 紫外检测器仍然是 HPLC 最常用的检测器, 因此本研究尝试建立 HPLC-UV 测定

银杏内酯 B 滴丸中银杏内酯 B 含量, 为该制剂的质量控制提供简便而容易普及的方法, 也为含银杏内酯 B 的其他中药制剂的质量控制提供参考。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

仪器: 760MC 型紫外分光光度计 (上海第一分析仪器厂); Agilent1100 高效液相色谱仪。

1.2 试剂、样品

银杏内酯 B 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0863-200103); 甲醇 (进口 HPLC 级); 磷酸为 AR 级。银杏内酯 B 滴丸由浙江康恩贝制药股份有限公司试制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: EclipseXDB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150mm, 5μm); 柱温: 28℃; 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液 (33.3:66.7); 流速 1.0 mL/min; 进样量: 10μL; DAD 检测器, 检测波长: 225nm。理论板数按银杏内酯 B 计应不低于 3000。

2.2 检测波长及流动相的选择

作者简介: 邵胜荣, 男, 工程师, 浙江大学药学院在职研究生。

本实验对银杏内酯 B 对照品溶液作了紫外扫描,其最大吸收波长为 225nm,而阴性对照在相应的波长处无吸收,故选择 225nm 作为检测波长。实验中曾选用甲醇-水^[2]、甲醇-1% 冰醋酸溶液作为流动相,发现主成分峰形不好,且分离不完全,后选用甲醇-0.1% 磷酸溶液作为流动相,经调整流动相比例(甲醇-0.1% 磷酸溶液 = 33.3:66.7),发现主成分峰峰形好,且分离完全,故选用甲醇-0.1% 磷酸溶液(33.3:66.7)作为流动相。

2.3 对照品溶液制备

精密称取银杏内酯 B 对照品 42.40mg,置 10mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得含银杏内酯 B 4.240mg · mL⁻¹ 的溶液,即得。

2.4 供试品溶液的制备

取银杏内酯 B 滴丸适量,研细,精密称取 50mg(约相当于银杏内酯 B 10mg)于 10mL 量瓶中,加甲醇 8mL,超声溶解,冷却后用甲醇定容至刻度,摇匀,以 0.45μm 滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.5 阴性对照品溶液的制备

取不含银杏内酯 B 的滴丸按供试品溶液制备方法,制成阴性对照溶液。

2.6 专属性试验

精密吸取阴性对照液、银杏内酯 B 对照液以及供试品溶液 10μL,分别注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,结果阴性对照液对银杏内酯 B 测定无干扰。

2.7 线性关系考察

精密吸取对照品溶液适量,用甲醇分别制成浓度为 4.240,2.120,1.060,0.530,0.2650mg · mL⁻¹ 的对照品溶液。分别精密吸取各浓度对照溶液 10μL 注入高效液相色谱仪,测定峰面积。以银杏内酯 B 浓度(mg · mL⁻¹)为横坐标 X,峰面积(mAU)为纵坐标 Y,绘制标准曲线,得线性回归方程为:Y = 268.69X - 3.6333,相关系数 r = 1.000。即当银杏内酯 B 在浓度为 0.2650 ~ 4.240mg · mL⁻¹ 范围内呈良好的线性关系。

2.8 仪器精密度试验

取浓度为 1.060mg · mL⁻¹ 的对照品溶液及批号为 041103 的供试品溶液照以上色谱条件,分别重复进样 5 次,测得对照品溶液峰面积平均值为 280.3, RSD = 0.60% (n = 5); 供试品溶液峰面积平均值为 366.5, RSD = 0.71% (n = 5)。

2.9 重复性试验

取同一批样品(批号:041103),按供试品溶液的制备方法平行制备 6 份,分别精密量取 10μL 注入高效液相色谱仪,在上述的色谱条件下测得峰面积,用外标法计算银杏内酯 B 含量。结果分别为 14.02, 13.94, 13.98, 13.85, 13.91, 13.83, 平均含量为 13.92%, RSD 为 0.53% (n = 6)。

2.10 稳定性试验

取浓度为 1.060mg · mL⁻¹ 的对照品溶液及批号为 041103 的供试品溶液,照上述色谱条件分别在 0, 2, 4, 6, 8,

12, 24h 测定银杏内酯 B 的峰面积,对照品溶液、供试品溶液 RSD 分别为 0.71%, 0.56% (n = 7)。

2.11 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品 25mg(批号:041103)共 6 份,分别加入银杏内酯 B 对照品 5mg,按供试品溶液制备方法处理样品并测定峰面积,以外标法计算银杏内酯 B 含量。结果见表 1。

表 1 银杏内酯 B 滴丸回收率试验结果(n = 6)

Tab 1 The result of recovery test(n = 6)

编号	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	5.30	5.22	98.5	99.6	1.3
2	5.30	5.38	101.5		
3	5.29	5.27	99.4		
4	5.30	5.22	98.5		
5	5.29	5.24	99.0		
6	5.30	5.35	100.9		

3 样品测定

取浙江康恩贝制药股份有限公司试制产品 10 批,按上述色谱条件分别测定峰面积(n = 2)。以外标法计算银杏内酯 B 含量。结果见表 2。

表 2 银杏内酯 B 滴丸含量测定结果(n = 2)

Tab 2 The result of the sample determination(n = 2)

批号	银杏内酯 B 含量(%)	RSD(%)
041101	12.30	1.21
041102	14.50	0.73
041103	14.01	0
041104	13.82	0.71
041105	12.69	0.72
041106	12.00	0.94
041107	14.21	0.65
041108	13.73	0.21
041109	12.97	0.88
041110	13.54	1.10

4 UV 和 ELSD 检测器测定结果的对比

取银杏内酯 B 滴丸 4 批,按上述色谱条件以 UV 检测器测定银杏内酯 B 的含量,同时按中国药典 2000 年版(2002 年增补本)中银杏叶提取物质量标准,以 ELSD 检测器测定银杏内酯 B 含量^[3]。结果见表 3。

表 3 银杏内酯 B 滴丸 UV 和 ELSD 检测器含量测定结果对比(n = 2)

Tab 3 The result of the sample determination(n = 2)

批号	UV 检测	ELSD 检测
041101	12.30	11.97
041102	14.50	14.62
041103	14.01	13.89
041104	13.82	13.76

6 讨论

6.1 检测器的选择

本研究结果显示,以 HPLC-UV 测定结果与 HPLC-ELSD 测定结果十分接近。鉴于 UV 检测器灵敏度较高,噪音低,线

性范围宽,对流速和温度波动不灵敏,ELSD 检测器对于有紫外吸收的检测器灵敏度不及 UV 检测器,而且在流动相的选择上受到一些限制,因此银杏内酯 B 滴丸含量测定中选用 UV 检测器更为实用。

6.2 专属性试验

研究表明,银杏内酯 B 滴丸中的辅料不影响测定。鉴于银杏内酯 B 在碱性条件下易开环,研究过程中我们进行了碱破坏、以及碱破坏再复原试验,结果表明,破坏后生成的产物不干扰银杏内酯 B 测定,碱破坏再复原后,所得图谱与破坏前基本一致。

参考文献

[1] 李砥晖,张秀荣,林天慕. 银杏内酯的药理作用研究[J]. 第四

军医大学吉林军医学院学报,2000,22(2):112.

[2] 卢定强,陈均. 银杏萜内酯的 HPLC 分析方法[J]. 江苏理工大学学报(自然科学版),2000,21(2):23.

[3] 单鸣秋,张丽,曹雨诞. HPLC - ELSD 法测定银杏叶提取物中内酯的含量[J]. 中草药,2004,35(12):1366.

[4] 管玉民,尤慧莲. 不同类型银杏叶中银杏内酯的含量测定[J]. 药物分析杂志,2001,21(2):107.

[5] 池静端,刘爱茹. HPLC 法测定银杏叶中 3 种内酯成分[J]. 药物分析杂志,1998,18(6):367-369.

[6] 中国药典 2000 年版. 2002 年增补本[S]. 2002:134.

[7] 中国药典 2005 年版一部[S]. 2005:281.

收稿日期:2005-06-09