

· 论 著 ·

用 HPLC-ELSD 法测定复方银灵通胶囊中银杏总内酯的含量

肖莹¹, 陈亮², 黄杰³, 马静洁^{3*}, 钱一帆^{2*}

(1. 中国药科大学理学院分析化学教研室, 南京 211198; 2. 南京中科药业股份有限公司质量部, 南京 210008; 3. 延边大学药学院药剂学教研室, 吉林延吉 133002)

[摘要] 目的: 建立 HPLC-ELSD 法测定复方银灵通胶囊中银杏总内酯的含量。方法: 采用 Shim Pack VP-ODS C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 35 ℃, 流动相为甲醇-四氢呋喃-水(25:10:65), 流速 1.0 ml/min, 用蒸发光散射检测器(ELSD)检测。结果: 银杏内酯 A、B、C 和白果内酯在指定范围内线性关系良好, 精密度的 RSD 均 < 3%。测定银杏总内酯的重复性 RSD 为 1.7%。样品溶液在配制后 8 h 内稳定性较好, 平均回收率为 101.5% (RSD=1.5%, n=6)。6 批样品中银杏总内酯的含量均 > 0.1%。结论: 该方法准确、简便、可靠, 分离效果好, 可用于复方银灵通胶囊的质量评价。

[关键词] 复方银灵通胶囊; 银杏总内酯; 含量测定; 色谱法; 高效液相; 蒸发光散射检测法

[中图分类号] R927.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-2838(2016)03-0200-03

DOI: 10.5428/pcar20160310

Content determination of ginkgolides in compound Yinlingtong capsules by HPLC-ELSD method

XIAO Ying¹, CHEN Liang², HUANG Jie³, MA JingJie^{3*}, QIAN YiFan^{2*} (1. Department of Analytical Chemistry, School of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. Department of Quality, Nanjing Zhongke Pharmaceutical Co. Ltd., Nanjing 210008, China; 3. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Yanbian University, Jilin Yanji 133002, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a HPLC-ELSD method for content determination of ginkgolides in compound Yinlingtong capsules. **Methods:** The separation was performed on Shim Pack VP-ODS C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm) at the column temperature of 35 ℃. The mobile phase was composed of methanol-tetrahydrofuran-water(25:10:65) at a flow rate of 1.0 ml/min. Detection was made by using the evaporative light-scattering detector(ELSD). **Results:** The contents of ginkgo lactone A, B, C and bilobalide were in good linearity with peak areas. The precision RSD were all less than 3%. The repetition RSD of ginkgolides determination was 1.7%. Sample solution was stable within 8 hours after preparation and the average recovery rate was 101.5% (RSD=1.5%, n=6). Contents of ginkgolides in 6 batches of samples were all more than 0.1%. **Conclusion:** The method is accurate, simple, reliable, and could be used for quality control of compound Yinlingtong capsules.

[KEY WORDS] compound Yinlingtong capsule; ginkgolide; content determination; chromatography, high performance liquid; evaporative light-scattering detector

[Pharm Care Res, 2016, 16(3): 200-202]

复方银灵通胶囊是由银杏叶、灵芝、天麻等药材制成的复方制剂, 具有益气养阴、活血、化痰、通络醒脑的功能, 能全面保护脑健康、改善记忆力和脑功能障碍, 也可用于半身不遂、肢体无力、口舌歪斜、言语蹇涩、智能减退、口角流涎等中风后遗症。复方银灵通胶囊的处方来源于名老中医的临床验方, 以银杏叶为主药, 主要有效成分为萜内酯类成分。文献报道银杏内酯具有强效的脑保护作用, 可明显改善神经症状, 减轻脑水肿, 缩小脑梗死面积^[1]。目前, 有

研究者用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法, 测定银杏叶提取物^[2,3]和含银杏叶提取物单一制剂中^[4,5]银杏内酯的含量。本研究将运用 HPLC-ELSD 法测定复方银灵通胶囊中银杏内酯的含量, 为其质量控制提供标准。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪, 包括 G1310A 等度泵、Agilent 380 蒸发光散射检测器、Agilent B 04.03 化学工作站(美国 Agilent 公司); DT-230A 柱温箱(天津市东康科技有限公司); 电子天平[精度 0.01 mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); 低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器

作者简介 肖莹(女), 博士, 讲师。

E-mail: xyxyhello@sina.com

* 通信作者(Corresponding author): 马静洁, E-mail: jjma@ybu.edu.cn; 钱一帆, E-mail: qyfzhongke@126.com

厂);R-52 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司)。

1.2 药品和试剂 复方银灵通胶囊(批号 20120401、20120402、20120403、20130601、20130602、20130603,南京中科药业股份有限公司);银杏内酯 A 对照品(批号 110862-200608)、银杏内酯 B 对照品(批号 110863-200508)、银杏内酯 C 对照品(批号 110864-200906)、白果内酯对照品(批号 110865-200605)购自中国食品药品检定研究院。甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);四氢呋喃(色谱纯)、乙醇乙酯(分析纯,南京化学试剂有限公司);石油醚(沸程 60~90 ℃,分析纯,无锡市亚盛化工有限公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法和结果

2.1 溶液的制备 (1)对照品溶液:分别取银杏内酯 A 对照品、银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品、白果内酯对照品适量,加 50% 甲醇制成每 1 ml 含银杏内酯 A 0.18 mg、银杏内酯 B 0.08 mg、银杏内酯 C 0.10 mg、白果内酯 0.20 mg 的混合对照品溶液,置冰箱中 4 ℃ 冷藏保存备用。(2)供试品溶液:取复方银灵通胶囊内容物粉末约 3 g,精密称定,置 30 ml 玻璃离心管中。加石油醚 30 ml,超声(350 W,50 kHz,以下同)处理 30 min,804.96×g 离心 5 min,弃去石油醚,同法处理两次。向离心管中加入甲醇 30 ml,超声处理 30 min,804.96×g 离心 5 min,同法处理两次,合并甲醇提取液。减压回收甲醇至干,残渣加入 20 ml 温水,用 20 ml 乙酸乙酯振荡萃取 3 次,合并乙酸乙酯萃取液,回收溶剂至干。残渣用 5 ml 甲醇分次溶解并转移至 10 ml 量瓶中,加水约 4.5 ml,超声处理 30 min,取出,放冷,加甲醇至刻度,摇匀。用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。(3)阴性样品溶液:以不添加银杏叶药材的处方按照制剂工艺制成胶囊内容物,取内容物粉末 3 g,按供试品溶液的制备方法得到阴性样品溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱为 Shim Pack VP-ODS C₁₈

柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),柱温 35 ℃,流动相为甲醇-四氢呋喃-水(25:10:65),流速 1 ml/min。ELSD 检测条件:雾化温度 60 ℃,漂移管温度 110 ℃,载气流速 1.0 标准升/min(SLM)。

2.3 线性关系的考察 分别称取银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 和白果内酯对照品适量,加 50% 甲醇制成每 1 ml 约含银杏内酯 A 0.9 mg、银杏内酯 B 0.4 mg、银杏内酯 C 0.5 mg、白果内酯 1 mg 的混合对照品溶液,作为储备液。精密移取储备液 0.5 ml 置 10 ml 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,作为对照品溶液 A。精密移取储备液 1 ml 置 5 ml 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,作为对照品溶液 B。精密移取储备液 1 ml 置 2 ml 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,作为对照品溶液 C。精密吸取对照品溶液 A 5、10、20 μl,对照品溶液 B 10、20 μl,以及对照品溶液 C 12 μl,注入 HPLC 仪,记录色谱图和峰面积,得到色谱图见图 1。以各组分进样量的对数值(lg m)对峰面积的对数值(lg A)进行线性回归,结果见表 1。

表 1 银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的线性方程
Table 1 Linear equations of ginkgo lactone A, B, C and bilobalide

对照品	保留时间 (t/min)	线性方程	相关系数 (r)	线性范围 (m/μg)
银杏内酯 C	5.94	$\lg A = 1.3075 \lg m + 2.6835$	0.9997	0.130~3.126
白果内酯	6.93	$\lg A = 1.3452 \lg m + 2.6788$	0.9999	0.256~6.132
银杏内酯 A	8.12	$\lg A = 1.3477 \lg m + 2.7058$	0.9999	0.233~5.580
银杏内酯 B	10.36	$\lg A = 1.2641 \lg m + 2.6466$	0.9995	0.105~2.514

2.4 精密度实验 精密吸取 2.3 项下的对照品溶液 A 20 μl,注入 HPLC 仪测定,共进样 6 次,记录色谱图和峰面积。计算得到银杏内酯 C、白果内酯、银杏内酯 A 和银杏内酯 B 的峰面积 RSD 分别为 2.4%、1.6%、1.4%和 1.9%(n=6),表明精密度较好。

2.5 重复性实验 分别取 6 份复方银灵通胶囊(批

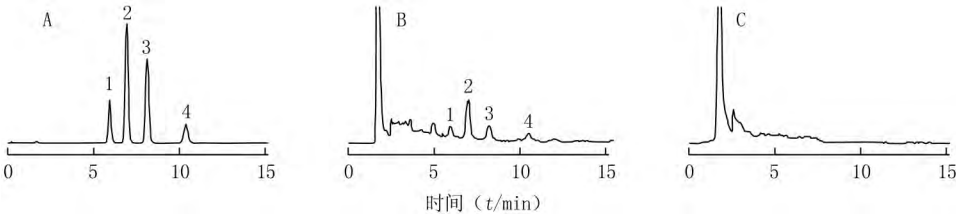


图 1 银杏内酯的 HPLC 谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of ginkgolides

:对照品溶液;B:供试品溶液;C:阴性样品溶液;1:银杏内酯 C;2:白果内酯;3:银杏内酯 A;4:银杏内酯 B

号 20120401) 内容物粉末 3 g, 按 2.1(2) 项下方法制备供试品溶液。精密吸取各溶液 20 μ l, 注入 HPLC 仪测定, 记录色谱图和峰面积。按表 1 中线性方程计算样品中银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 和白果内酯的含量分别为 0.021%、0.016%、0.022%、0.044%, 总内酯的含量为 0.103% (RSD=1.7%, $n=6$), 表明该方法重复性较好。

2.6 稳定性考察 取供试品溶液分别于配制后 0、2、4、6、8 h 进样, 按 2.3 项下线性方程计算总内酯含量 RSD 为 3.0%, 表明样品溶液中总内酯含量在配制后 8 h 内稳定性较好, 因此样品溶液在配制后 8 h 内测定即可。

2.7 回收率实验 取 6 份复方银灵通胶囊(批号 20120401) 内容物粉末 1.5 g, 置 30 ml 玻璃离心管中, 向每支离心管中加入相当于 1.5 g 样品所含的银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 和白果内酯对照品, 按 2.1(2) 项下方法制备供试品溶液。精密吸取各溶液 20 μ l, 注入 HPLC 仪。记录色谱图和峰面积, 计算加样回收率。结果 4 种成分的加样回收率为 99.2%~103.1%, 银杏总内酯的平均加样回收率为 $(101.5 \pm 1.52)\%$ ($n=6$)。

2.8 样品含量测定 取复方银灵通胶囊(批号 20120401、20120402、20120403、20130601、20130602、20130603) 内容物粉末各 3 g, 每个批号取两份, 按 2.1(2) 项下方法制备供试品溶液。精密吸取各溶液 20 μ l, 注入 HPLC 仪, 记录色谱图和峰面积。根据线性方程计算样品中银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯和总内酯的含量。结果测得上述 6 个批号样品中银杏总内酯的含量分别为 0.105%、0.112%、0.118%、0.111%、0.108%、0.107% ($n=2$)。

3 讨论

3.1 样品前处理方法 《中华人民共和国药典》2015 年版^[6] 中对银杏叶中银杏内酯采用索氏提取和氧化铝柱层析除去杂质后用 HPLC-ELSD 法测定。作者在测定复方银灵通胶囊中的银杏总内酯含量时, 考察了索氏提取法和超声提取法。发现超声提取法的银杏总内酯得率优于索氏提取法(0.118% vs 0.056%), 液液萃取法得率优于氧化铝柱层析(0.132% vs 0.118%)。因此本研究采用超声提取-液液萃取作为复方银灵通胶囊的前处理方法。

3.2 色谱条件考察 本研究考察了不同比例的流动相(甲醇:四氢呋喃:水=25:10:65, 30:10:60, 25:15:60, 20:10:70) 和不同品牌的色谱柱(BDS Hypersil C₁₈ 柱, Shim-Pack ODS 柱, Eclipse

Plus C₁₈ 柱, Kromasil C₁₈ 柱) 对银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 和白果内酯的分离情况。结果发现不同的流动相和色谱柱对分离效果影响不大, 因此最终按《中华人民共和国药典》规定的方法中的流动相和色谱柱进行测定。

3.3 测定结果 6 批样品中银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 和白果内酯的含量均 < 0.05%, 含量太低误差率较大, 因此单独的一种内酯不适宜作为含量测定指标。参照《中华人民共和国药典》2015 年版^[6] 中银杏叶药材的含量测定项下规定, 计算了本品中银杏总内酯的含量, 结果均 > 0.1%, 因此可将银杏总内酯作为复方银灵通胶囊的含量指标。本研究结果可为含有银杏叶的复方制剂中银杏总内酯的含量测定提供参考。

【参考文献】

- [1] 蒋文潇, 王保和. 银杏内酯对缺血性脑血管疾病的药理研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(2): 441-444.
JIANG WenXiao, WANG BaoHe. Progress on pharmacology of ginkgolides for ischemic cerebrovascular diseases[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2015, 42(2): 441-444. In Chinese with English abstract.
- [2] 田南卉, 王 劼, 厉进忠, 等. 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.
TIAN NanHui, WANG Jie, LI JinZhong, et al. Content determination of lactones in ginkgo leaf extraction by HPLC-ELSD method[J]. Chin J Pharm Anal, 1997, 17(4): 282-283. In Chinese with English abstract.
- [3] 颜玉贞, 谢培山. HPLC-ELSD 法测定银杏叶中的 4 种萜类内酯含量[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(3): 173-176.
YAN YuZhen, XIE PeiShan. Assay of terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves by RP-HPLC-ELSD[J]. Chin J Pharm Anal, 2001, 21(3): 173-176. In Chinese with English abstract.
- [4] 刘利群, 刘天杨, 金 涛. HPLC-ELSD 法测定银杏叶口腔崩解片中的银杏内酯含量[J]. 中国药师, 2006, 9(6): 529-531.
LIU LiQun, LIU TianYang, JIN Tao. Determination of the content of terpene lactones in *Ginkgo biloba* L. buccal tablets by HPLC-ELSD[J]. China Pharmacist, 2006, 9(6): 529-531. In Chinese with English abstract.
- [5] 朱洲华, 杨 娟. 高效液相色谱法测定银杏叶胶囊中银杏内酯的含量[J]. 内蒙古中医药, 2009, (7): 11-14.
ZHU ZhouHua, YANG Juan. Content determination of ginkgolides in *Ginkgo biloba* capsules[J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med, 2009, (7): 11-14. In Chinese with English abstract.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2015 年版 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 316-317.
State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2015 ed. Volume 1[S]. Beijing: Chinese Medical Science Press, 2015: 316-317. In Chinese.

【收稿日期】 2015-08-24

【修回日期】 2016-03-22

【本文编辑】 兰 芬