

HPLC-ELSD 法测定注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K

伍清龙^{1,2}, 孙永成^{2,3}, 万 琴^{2,3}, 王振中^{2,3}, 毕宇安^{2,3}, 伍小艳^{1,2}, 萧 伟^{2,3*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 建立测定注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K 的 HPLC-ELSD 法。方法 采用 HPLC-ELSD 法, Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为四氢呋喃-甲醇-水, 梯度洗脱; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 ℃; 漂移管温度为 105 ℃, 氮气体积流量为 3.0 L/min。结果 注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K 分别在 1.70~8.50 μg ($r=0.999\ 7$)、2.45~12.5 μg ($r=0.999\ 8$)、0.30~1.50 μg ($r=0.999\ 7$)、0.25~1.25 μg ($r=0.999\ 7$) 呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 101.03%、100.86%、100.78%、101.02%, RSD 值分别为 0.87%、0.29%、1.30%、1.34%。

结论 该方法简便准确, 重复性好, 可用于注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K 的测定。

关键词: 注射用银杏二萜内酯; 银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 银杏内酯 C; 银杏内酯 K; 高效液相色谱-蒸发光散射

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)03-0255-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.03.009

Determination of ginkgolide A, B, C, and K in Diterpene Lactones from *Ginkgo biloba* for injection by HPLC-ELSD

WU Qing-long^{1,2}, SUN Yong-cheng^{2,3}, WAN Qin^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3}, BI Yu-an^{2,3}, WU Xiao-yan^{1,2}, XIAO Wei^{2,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210000, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang, 222001, China

3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co.Ltd, Lianyungang, 222001, China

Abstract: Objective To establish the method for determination of ginkgolide A, B, C, and K in Diterpene Lactones from *Ginkgo biloba* for injection by HPLC-ELSD. **Methods** HPLC-ELSD method was adopted. Phenomenex Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with mobile phase consisted of tetrahydrofuran-methanol-water in gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min. The temperature of column and drift tube was set at 30 and 105 ℃, respectively. The flow rate of gas maintained at 3.0 L/min. **Results** The liner ranges of ginkgolide A, B, C, and K were 1.70 — 8.50 μg/mL ($r=0.999\ 7$), 2.45 — 12.5 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.30 — 1.50 μg/mL ($r=0.999\ 7$), and 0.25 — 1.25 μg/mL ($r=0.999\ 7$); The average recoveries were 101.03%, 100.86%, 100.78%, and 101.02%, with RSD values of 0.87%, 0.29%, 1.30%, and 1.34% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method could be used for the determination of ginkgolide A, B, C, and K in Diterpene Lactones from *Ginkgo biloba* for injection with a good sensitivity, accuracy, and reproducibility.

Key words: Diterpene Lactones from *Ginkgo biloba* for injection; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgolide C; ginkgolide K; HPLC-ELSD

注射用银杏二萜内酯由江苏康缘药业股份有限公司生产的银杏二萜内酯葡胺注射液改剂型而成, 具有稳定性更好, 便于储存及运输的特点, 为临床

应用提供方便。注射用银杏二萜内酯具有活血通络之功效, 临床用于脑梗死的治疗^[1]。注射用银杏二萜内酯原料的主要成分是银杏内酯 A、B、C、K。

收稿日期: 2014-01-10

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2013ZX09402203)

作者简介: 伍清龙 (1988—), 江西省赣州市人, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂。Tel: 13851286064 E-mail: wuqinglong19881013@163.com

*通信作者 萧 伟, 男, 研究员级高级工程师, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152337 E-mail: wzzh-nj@163.net

研究表明, 银杏二萜内酯是很强的血小管活化因子拮抗剂, 具有抗血小板聚集、保护中枢神经系统、对缺血损伤的保护、抗动脉粥样硬化和抗炎等药理作用^[2-5]。本实验采用 HPLC-ELSD 法对注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K 进行测定研究。结果表明该方法简便、快速、准确, 为注射用银杏二萜内酯的质量控制提供了科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪包括自动进样器、四元低压梯度泵、柱温箱(美国安捷伦公司); Alltech 2000ES 蒸发光散射检测器(美国奥泰公司); XP6 型电子分析天平(梅特勒-托利多公司)。

甲醇(色谱纯, 上海星可生化有限公司); 四氢呋喃(色谱纯, 美国天地公司), 银杏内酯 A(批号 110862-201310)、银杏内酯 B(批号 110863-201209)、银杏内酯 C(批号 110864-201307)、银杏内酯 K(批号 111936-201201)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 注射用银杏二萜内酯(批号 20121005、20121008、20121011、20121015、20121018、20121021, 25 mg/支, 江苏康缘药业股份有限公司), 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 四氢呋喃(A)-水(B)-甲醇(C), 梯度洗脱见表 1; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 30 °C;

漂移管温度: 105 °C, 氮气体积流量: 3.0 L/min。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Program of gradient elution

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
0~13	10	30	60
14~20	10	60	30

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取银杏内酯 A、B、C、K 对照品适量, 加甲醇溶解制成含银杏内酯 A、B、C、K 分别为 0.34、0.49、0.06、0.05 mg/mL 混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取注射用银杏二萜内酯 5 支, 加水使溶解, 定量转移至 25 mL 量瓶中, 加水至刻度。精密量取 4 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 6 mol/L 盐酸 2 mL, 静置 3.5 h, 加甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按注射用银杏二萜内酯的处方工艺制备不含银杏二萜内酯原料的阴性样品, 按“2.2.2”项下制备方法, 制得阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

分别取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL, 在上述色谱条件下进样分析, 记录色谱图, 见图 1。结果表明银杏内酯 A、B、C、K 能达到良好分离, 阴性样品在银杏内酯 A、B、C、K 相应的保留时间处无干扰。

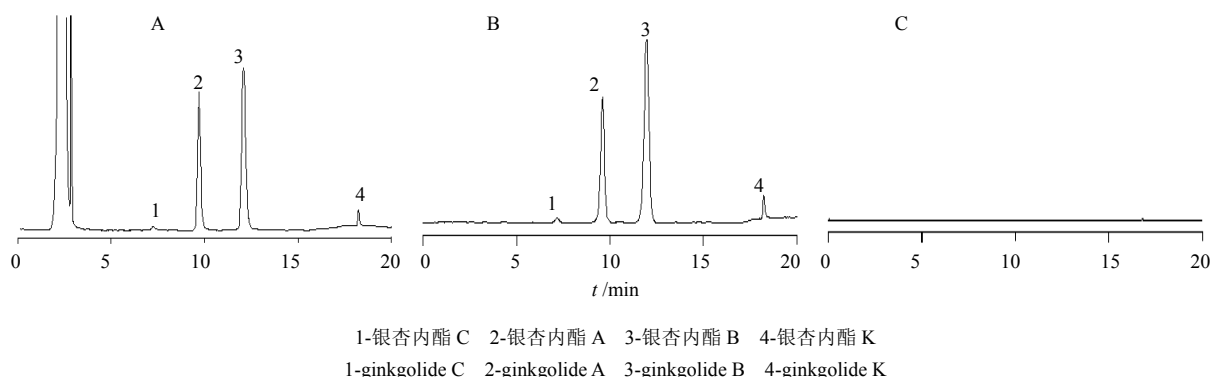


图 1 混合对照品(A)、注射用银杏二萜内酯(B)和阴性对照(C)的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC of mixed reference substance (A), Diterpene Lactones from *Ginkgo biloba* for injection (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 5、10、15、20、25 μL, 注入色谱仪中, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积常用对数为横坐标, 质量常用对数为纵坐标, 进行线性回归。结果见表 2。

2.5 定量限

精密吸取混合对照品溶液适量, 加甲醇溶解并稀释制成一系列质量浓度的溶液作为各混合对照品溶液, 分别精密吸取各混合对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 分别记录各成分的信噪比。

表 2 回归方程与线性范围

Table 2 Regression equations and linear ranges

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
银杏内酯 A	$Y=0.6957X-3.9284$	0.9997	1.70~8.50
银杏内酯 B	$Y=0.7328X-4.0793$	0.9998	2.45~12.25
银杏内酯 C	$Y=1.0432X-5.4740$	0.9997	0.30~1.50
银杏内酯 K	$Y=0.6185X-3.6070$	0.9997	0.25~1.25

银杏内酯 A、B、C、K 的定量限依次为 0.22、0.30、0.24、0.18 μg ($S/N=10$)。

2.6 精密度试验

取混合对照品溶液，连续进样 6 次，每次进样 10 μL ，测定银杏内酯 A、B、C、K 的峰面积，计算得峰面积的 RSD 值分别为 0.83%、0.67%、0.53%、1.38%。

2.7 稳定性试验

精密吸取批号为 20121002 的供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、6、12、24 h，进样 10 μL ，测定峰面积。计算银杏内酯 A、B、C、K 的峰面积，RSD 值分别为 1.32%、1.14%、1.31%、1.63% ($n=6$)，结果表明供试品溶液放置 24 h 稳定。

2.8 重复性试验

制备批号为 20121002 供试品溶液平行 6 份，进样测定，测得样品中银杏内酯 A、B、C、K 的平均质量浓度分别为 1.642、2.716、0.156、0.164 mg/mL，RSD 值分别为 1.79%、1.81%、1.47%、1.38% ($n=6$)。

2.9 加样回收率试验

取批号为 20121002 的注射用银杏二萜内酯 5 支，加水使溶解，定量转移至 25 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，精密量取 2 mL，置 10 mL 量瓶中，共 9 份，精密加入质量浓度分别为 1.635、2.686、0.153、0.168 mg/mL 银杏内酯 A、B、C、K 对照品溶液 1.6、2、2.4 mL，制备供试品溶液。按上述色谱条件测定，银杏内酯 A、B、C、K 的平均加样回收率分别为 101.03%、100.86%、100.78%、101.02%，RSD 值分别为 0.87%、0.29%、1.30%、1.34% ($n=9$)。

2.10 样品测定

取注射用银杏二萜内酯样品 6 批（批号分别为 20121005、20121008、20121011、20121015、20121018、20121021），制备供试品溶液，每次进样量 10 μL 。取混合对照品溶液，分别进样 5、15 μL 。按上述色谱条件测定，以峰面积的对数值按外标二点法计算，结果见表 3。根据测定结果暂定注射用银

杏二萜内酯样品中银杏内酯 A、B、C、K 应分别不得小于 1.2、2.2、0.1、0.1 mg/mL。

表 3 注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K 的测定结果 ($n=2$)

Table 3 Determination of ginkgolide A, B, C, and K in Diterpene Lactones of *Ginkgo biloba* for Injection ($n=2$)

批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)			
	银杏内酯 A	银杏内酯 B	银杏内酯 C	银杏内酯 K
20121005	1.610	2.683	0.153	0.162
20121008	1.594	2.664	0.154	0.164
20121011	1.641	2.713	0.159	0.161
20121015	1.677	2.648	0.152	0.163
20121018	1.623	2.563	0.153	0.166
20121021	1.618	2.637	0.151	0.163

3 讨论

3.1 检测器的选择

注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、K 含有一个碳碳双键，在 220 nm 紫外检测下都有很强的吸收峰，并呈良好的线性关系，且注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B 含量比较高，而银杏内酯 C 含量比较低且不含碳碳双键，在 220 nm 吸收峰很小，基线波动大，不适于含量较低的银杏内酯 C 的测定，因此紫外检测器不能满足同时检测银杏内酯 A、B、C、K 的要求。应用差示折光检测器虽能避免上述干扰，但由于流动相一般为多种有机溶剂的混合溶液，检测时会造成基线漂移，噪声增大^[6]。HPLC-ELSD 法可以满足同时测定注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K 的要求，弥补了因检测限问题不能用紫外检测器测定注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 C 的缺陷。该方法为注射用银杏二萜内酯的安全性和质量控制提供了一定的科学依据。

3.2 检测器参数选择

ELSD 检测器的两个关键参数为检测器的漂移管温度和载气体积流量。在 ELSD 的气化室中，载气体积流量对信号影响很大，太低或太高均导致信号不够准确。而漂移管温度较低时，溶剂挥发不够完全；温度高时则样品颗粒挥发导致检测仪响应下降^[6]。本方法使用的检测条件经过反复实验，在撞击器“开”的模式下，氮气为载气，体积流量为 3.0 L/min，漂移管温度为 105 $^{\circ}\text{C}$ 时，基线稳定。

3.3 流动相的选择

在选择流动相过程中,为保证银杏内酯 A、B、C、K 分离度,参考相关文献^[8-10],分别考察了四氢呋喃-甲醇-水、四氢呋喃-正丙醇-水、甲醇-水、乙腈-水、异丙醇-水等流动相系统,经比较最终采用四氢呋喃-甲醇-水系统时各成分色谱峰形、分离度最佳,基线平稳。由于银杏内酯 K 和银杏内酯 A、B、C 的极性相差较大,采用等度洗脱银杏内酯 K 出峰时间比较晚,分离时间较长。而本方法采用梯度洗脱使银杏内酯 A、B、C、K 能在 20 min 内达到快速分离且分离度较好。

参考文献

- [1] 赵宾江,王振中,凌 娅,等. 银杏二萜内酯葡胺注射液治疗动脉粥样硬化性血栓性脑梗死恢复期(痰瘀阻络证) III 期临床试验 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3525-3530.
- [2] Braquet P. The ginkgolides: potent platelet activating factor ant agonists isolated from *Ginkgo biloba* L: chemistry, pharmacology and clinical applications [J]. *Drugs Future*, 1987, 12(7): 643-699.
- [3] 卢 鑫,高 尔. 银杏苦内酯的药理作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2006, 17(3): 221-222.
- [4] 郑卫平,楼凤昌. 银杏内酯的研究概况 [J]. 药学进展, 1999, 23(2): 82-86.
- [5] 王 旋,张慧灵,顾振纶,等. 银杏内酯的药理研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 1741-1743.
- [6] 毕雨萌,孙国祥,于秀明. HPLC-ELSD 法测定银杏达莫注射液中萜类内酯的含量 [J]. 中南药学, 2007, 5(2): 124-126.
- [7] 吕伏生,陈 伟,冯 芳,等. ELSD 检测法测定银杏酮酯注射液银杏内酯 A、B 的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(1): 34-36.
- [8] 冯埃生,邹汉法,汪海林. 影响高效液相色谱-挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察 [J]. 药物分析杂志, 1996, 16(6): 414-416.
- [9] 陈祝霞,张 健. HPLC-ELSD 测定银葛中萜类的含量 [J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(4): 38-39.
- [10] 戴翔翎,凌 娅,等. HPLC-ELSD 法测定注射用银杏内酯中银杏内酯 A 与银杏内酯 B 的含量 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(1): 22-23.