

## HPLC-ELSD 法测定白果中银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C

秦建平<sup>1,2</sup>, 吴建雄<sup>1,2</sup>, 潘有智<sup>1,2</sup>, 黄文哲<sup>1,2</sup>, 王振中<sup>1,2</sup>, 萧伟<sup>1,2\*</sup>

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

**摘要:**目的 建立 HPLC-ELSD 法同时测定白果药材中银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 三个萜内酯成分。方法 采用 Agilent 5TC C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-四氢呋喃-水 (25:10:65) 为流动相, 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 °C, 蒸发光散射检测器检测, 对照品进样量为 10、20 μL, 供试品溶液进样量为 5~20 μL。结果 银杏内酯 A 在 0.37~5.92 μg、银杏内酯 B 在 2.8~44.8 μg、银杏内酯 C 在 0.65~10.4 μg 时线性关系良好。银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 平均回收率分别为 92.40%、95.03%、91.29%, RSD 值分别为 2.75%、2.06%、2.88%。结论 本法操作简单, 重复性好, 为白果药材的质量控制提供了依据。

**关键词:** 白果; 银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 银杏内酯 C; HPLC-ELSD

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)02-0155-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.02.006

## Determination of ginkgolide A, ginkgolide B, and ginkgolide C in *Ginkgo Semen* by HPLC-ELSD

QIN Jian-ping<sup>1,2</sup>, WU Jian-xiong<sup>1,2</sup>, PAN You-zhi<sup>1,2</sup>, HUANG Wen-zhe<sup>1,2</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>1,2</sup>, XIAO Wei<sup>1,2</sup>

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

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

**Abstract: Objective** To establish an HPLC-ELSD method for the determination of three terpene lactones ginkgolide A, ginkgolide B, and ginkgolide C in *Ginkgo Semen*. **Methods** The determination was carried out on Agilent 5TC C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol – tetrahydrofuran - water (25 : 10 : 65). The column temperature was set at 30 °C at a flow rate of 1.0 mL/min. ELSD was used as detector to determine the terpene lactones. The injection volumes were 10 and 20 μL for reference substance solution, and 5 — 20 μL for sample solution. **Results** The linear ranges of ginkgolide A, ginkgolide B, and ginkgolide C were 0.37 — 5.92 μg, 2.8 — 44.8 μg, and 0.65 — 10.4 μg, respectively. The average recoveries of three components were 92.40%, 95.03%, and 91.29% with RSD 2.75%, 2.06%, and 2.88%, respectively. **Conclusion** The method is simple and repeatable, which can be used in quantity control for *Ginkgo Semen*.

**Key words:** *Ginkgo Semen*; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgolide C; HPLC-ELSD

白果为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥成熟种子。由于其营养丰富, 自古以来被当作养生延年的上品。而白果的药用价值在许多医学著作中均有记载, 如《日用本草》《滇南本草》《本草纲目》《本草在新》等。白果主要功效为敛肺定喘、止带缩尿, 用于痰多喘咳、带下白浊、遗尿尿频。近年研究分析表明, 白果除含有蛋白质、脂肪、淀粉、糖

类、维生素、氨基酸外<sup>[1-2]</sup>, 还含有黄酮类成分<sup>[3]</sup>和萜内酯类成分<sup>[4-5]</sup>, 目前白果质量控制方法有银杏酸的限度检查<sup>[6]</sup>、总黄酮测定<sup>[3]</sup>、氨基酸测定<sup>[7]</sup>及其油脂的化学成分研究<sup>[3, 8-9]</sup>。本实验参照银杏叶及其制剂质量控制的文献报道<sup>[10-12]</sup>, 建立了 HPLC 法测定白果中银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C, 方法简便、准确, 为白果质量控制提供依据。

收稿日期: 2015-10-30

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2013ZX09402203)

作者简介: 秦建平 (1979—), 女 (苗族), 湖南省邵阳市人, 高级工程师, 硕士, 江苏康缘药业股份有限公司现代中药研究院新药研发人员, 研究方向为中药质量标准研究。Tel: (0518)81152321 E-mail: qinjianping111@126.com

\*通信作者 萧伟 (1959—), 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药制剂和创新中药的研究与开发。

## 1 仪器和试剂

Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪, ELSD 检测器(迪马公司); Mettler AE240 电子分析天平(瑞士梅特勒公司); BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司); Centrifuge 5415D 高速离心机(德国 Eppendorf 公司); KQ-250DB 型超声波清洗仪(昆山超声仪器有限公司)。

银杏内酯 A(批号 110862-201310, 质量分数 95.4%)、银杏内酯 B(批号 110863-201209, 质量分数 99.9%) 和银杏内酯 C(批号 110864-201307, 质量分数 94.7% 计) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、四氢呋喃(色谱纯, 美国天地公司), 其他分析纯试剂均购自南京化学试剂有限公司, 水(超纯水)。

白果药材经江苏康缘药业股份有限公司质量部鉴定为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥成熟种子, 共 6 批, 其中 3 批产地为江苏省邳州市(编号 1、2、3), 2 批产地为江苏省泰兴市(编号 4、5), 1 批产地为江苏省连云港市(编号 6)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Agilent 5TC C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-四氢呋喃-水(25:10:65)为流动相, 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 °C, 蒸发光散射检测器检测, 对照品进样量为 10、20 μL, 供试品溶液进样量为 5~20 μL。上述色谱条件下, 对照品和供试品溶液的色谱图见图 1。

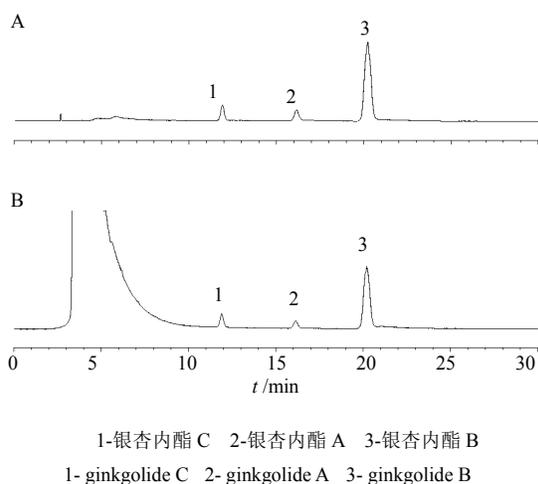


图 1 混合对照品(A)和白果(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Ginkgo Semen* (B)

### 2.2 对照品溶液的制备

取银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含银杏内酯 A 0.07 mg/mL、银杏内酯 B 0.40 mg/mL、银杏内酯 C 0.10 mg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

取白果药材粗粉约 5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加石油醚(30~60 °C) 100 mL, 回流提取 1 h, 滤过, 弃去石油醚(30~60 °C)液, 具塞锥形瓶、药渣和滤纸挥尽石油醚, 药渣和滤纸置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 100 mL, 回流提取 2 h, 滤过, 用少量甲醇洗涤具塞锥形瓶和滤器, 合并滤液和洗液, 水浴蒸干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 5 mL 量瓶, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

### 2.4 线性关系考察

称取银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含银杏内酯 A 0.296 mg/mL、银杏内酯 B 2.24 mg/mL、银杏内酯 C 0.52 mg/mL 的混合对照品溶液, 作为对照品母液。将对照品母液用甲醇逐倍稀释。分别精密吸取 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定。以峰面积的自然对数为纵坐标, 进样质量的自然对数为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程。银杏内酯 A:  $Y=1.419 4 X+0.535 8$ ,  $r=0.998 5$ ; 银杏内酯 B:  $Y=1.128 3 X+0.555 6$ ,  $r=0.998 3$ ; 银杏内酯 C:  $Y=1.488 4 X+0.523 0$ ,  $r=0.999 4$ 。结果表明银杏内酯 A 在 0.37~5.92 μg、银杏内酯 B 在 2.8~44.8 μg、银杏内酯 C 在 0.65~10.4 μg 时线性关系良好。

### 2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算 RSD 值, 结果银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 峰面积的 RSD 值分别为 1.52%、1.46%、1.93%。

### 2.6 稳定性试验

取编号 1 样品制备的供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算 RSD 值, 结果银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 峰面积的 RSD 值分别为 1.70%、1.45%、1.58%。

### 2.7 重复性试验

取编号 1 样品粗粉约 5 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 测定, 计算质量分数, 结果银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 的平均质

量分数分别为 0.011%、0.13%、0.015%，RSD 值分别为 2.92%、1.50%、2.09%。

### 2.8 回收率试验

取编号 1 样品粗粉约 2.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入含银杏内酯 A 0.136 mg/mL、银杏内酯 B 1.63 mg/mL、银杏内酯 C 0.189 mg/mL 混合对照品溶液 2 mL，制备供试品溶液，平行制备 6 份，测定，计算回收率。结果银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 平均回收率分别为 92.40%、95.03%、91.29%，RSD 值分别为 2.75%、2.06%、2.88%。

### 2.9 样品测定

取收集的 6 批白果药材，制备供试品溶液，注入高效液相色谱仪，测定，采用外标两点法对数方程计算银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的质量分数，结果见表 1。

表 1 白果中银杏内酯的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of ginkgolides in *Ginkgo Semen* (n=3)

样品编号	质量分数/%		
	银杏内酯 A	银杏内酯 B	银杏内酯 C
1	0.011 0	0.130 0	0.015 0
2	0.014 0	0.078 0	0.020 0
3	0.012 0	0.081 0	0.024 0
4	0.009 3	0.110 0	0.011 0
5	0.006 5	0.083 0	0.010 0
6	0.008 6	0.065 0	0.013 0

### 3 讨论

在供试品溶液的制备时，参考文献报道<sup>[13]</sup>银杏叶中银杏内酯测定的供试品溶液的制备方法，对索氏提取和回流提取作了对比研究，结果表明两种提取方法提取效果无明显差别，因此本实验采用回流提取方法进行供试品溶液的制备。

在前期的方法摸索中，选择了含白果内酯、银

杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的混合对照品溶液作为对照，结果白果药材中白果内酯的量很低，易引起数据的误差，因此最终选择了银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 作为质控指标。

从表 1 可知，不同批次白果药材中银杏内酯存在较大差异，可能与树龄、产地等有关，需进一步研究。本实验所建立的分析方法操作简单，重复性好，为白果药材的质量控制和深入研究提供了依据。

### 参考文献

- [1] 贾自力, 杨勤兵, 李淑媛. 不同树龄白果中营养成分的比较分析 [J]. 中国食物与营养, 2010(7): 72-75.
- [2] 白卫东, 黄国勇, 孔德俊. 不同产地白果的主要成分分析 [J]. 食品工业科技, 2004, 25(8): 140-141.
- [3] 张勇, 周亚球, 陈法贵. HPLC-ELSD 法测定银杏露中银杏内酯 B 和银杏内酯 C 含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(10): 1732-1734.
- [4] 中国药典[S]. 一部. 2015: 108-109.
- [5] 陈文英, 王成章, 高彩霞, 等. 白果中总黄酮的含量及其油脂的化学成分研究 [J]. 生物质化学工程, 2006, 40(6): 6-8.
- [6] 仰榴青, 吴向阳, 陈钧. HPLC 法测定白果中银杏酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2004, 24(6): 636-639.
- [7] 陈悦娇, 马应丹, 胡翔葵. 荧光光度法测定白果中游离氨基酸含量 [J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(2): 87-89.
- [8] 董福英, 程传格, 刘建华, 等. 白果中脂肪酸的 GC-MS 分析 [J]. 分析测试学报, 1999, 18(5): 72-73.
- [9] 邓乾春, 曾常敏, 田斌强, 等. 白果油的提取及脂肪酸组成分析 [J]. 中国油脂, 2007, 32(10): 76-79.
- [10] 钱大玮, 鞠建明, 朱玲英, 等. 不同树龄银杏叶在不同季节中总黄酮和总内酯的含量变化 [J]. 中草药, 2002, 33(11): 1025-1027.
- [11] 倪琳, 张秀娟, 高进贤, 等. HPLC 同时测定脉平片中白果内酯、银杏内酯 A 和银杏内酯 B、银杏内酯 C 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 66-68.
- [12] 高蓓. HPLC-ELSD 法测定银杏滴丸中银杏内酯 A、B、C 和白果内酯 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 236-238.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 316-317.