

· 药剂与工艺 ·

银杏叶注射剂指纹图谱的研究

游 松¹, 王 亮¹, 蒋雅红¹, 贾 娴¹, 杨华峰², 姚新生^{1*}

(1. 沈阳药科大学 生物制药系, 辽宁 沈阳 110016 2. 丽珠集团丽宝生化制药有限公司, 广东 珠海 519020)

摘要: 目的 建立银杏叶药材、中间体及其注射剂中间体的指纹图谱。方法 以芦丁为内标物, 采用 HPLC 法分析银杏黄酮苷。结果 银杏叶药材、中间体及注射剂的指纹图谱有较好的相关性, 所有共有峰的参数符合国家药品监督管理局关于有关中药注射剂的技术要求。结论 本研究将有助于银杏叶药材的标准化种植及其制剂的质量控制。

关键词: 银杏叶; 注射剂; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.02; R283.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)03-0216-03

Studies on fingerprint of GINKGO LEAVES INJECTION

YOU Song¹, WANG Liang¹, JIANG Ya-hong¹, JIA Xian¹, YANG Hua-feng¹, YAO Xin-sheng¹

(1. Department of Biopharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang Liaoning 110016; China;

2. Libao Biopharmaceutical Company of Lizhu Group, Zhuhai Guangdong 519020, China)

Abstract **Object** To set up the fingerprints of *Ginkgo* leaves, its extract and injection so as to control quality of the injection. **Methods** HPLC with UV detector was used to analyze the patterns of the original flavone glycosides and rutin was used as internal standard compound. **Results** The fingerprints of *Ginkgo* leaves, its extract and injection were set up. Furthermore, the fingerprints of them showed an excellent correlation, and all the parameters of the main co-peaks meet the requirements for SDA's technical regulations on the injection of TCM. **Conclusion** The studies are useful for the quality control of *Ginkgo* leaves and its injection.

Key words *Ginkgo* leaves; injection; fingerprint; HPLC

中药现代化的重要任务之一就是要建立一套客观的质量控制方法用以规范中药生产。中药注射剂多数为多组分制剂, 其中未知非定量成分占有相当比例。为了确保中药注射剂的质量稳定和临床用药的安全, 国家药品监督管理局拟首先在中药注射剂质量标准中引入指纹图谱技术要求。近年有关银杏叶及用其提取物的制剂的研究很多, 特别是在提取工艺和含量测定方面。目前公认的银杏叶有效成分黄酮苷和萜类内酯, 大多数上市的银杏叶口服制剂以黄酮苷作为含量测定指标, 方法多以 HPLC 法间接测定黄酮苷元(槲皮素、山奈酚和异鼠李素)为主。在大部分尚不清楚的情况下间接测定总成分含量还不能真正反映原药材和制剂质量的稳定, 特别是中药注射剂。为此, 我们在多年对银杏叶化学成分和提取工艺研究的基础上^[1,2], 用 HPLC 法研究了银杏叶药材、注射剂中间体和注射剂三者的指纹图谱。这将有助于银杏叶药材的标准化种植, 银杏叶提取物

及其制剂的质量控制。

1 材料和方法

1.1 药品: 银杏科银杏属银杏秋季绿叶, 产于江苏省邳州铁富镇银杏叶种植园, 采于 1999 年 8 月 20 日到 9 月 20 日, 80℃以下风干, 按《中华人民共和国药典》规定中药材取样法取样 12 批; 银杏叶注射剂及其中间体为本课题组小试产品。

1.2 供试品的制备: 称取干银杏叶 50 g 放入圆底烧瓶中, 加 10 倍量 50% 乙醇, 水浴回流 2 h, 吸出 5 mL 回流液用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 再吸取 5 mL, 过 TOYOPAK ODS 柱, 滤液即为液相样品; 取银杏叶注射剂及其中间体适量用甲醇溶解备用。称取参照物芦丁 5 mg, 用甲醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶中, 再从中吸取 1 mL 用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 备用。

1.3 仪器、试剂与色谱条件: 日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪, SPD-10A 紫外检测仪; 乙腈为色

* 收稿日期: 2000-08-15

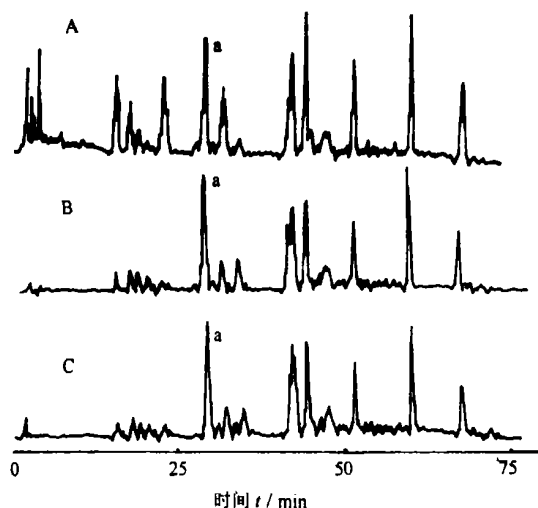
基金项目: 国家科技攻关项目 (94-Z-01-1)

作者简介: 游 松 (1963-), 男, 沈阳人, 博士学位, 沈阳药科大学教授、博士生导师, 1996 年赴日本东京大学留学, 主要研究领域为二次代谢产物合成和生物转化, 中药和天然药物的标准化。Tel 024-23843711 转 3942

谱纯,磷酸为分析纯;色谱柱: Diamonsil C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm);流动相: A(乙腈)-B(酸水,水-磷酸=100:1)进行梯度洗脱,83%~83% B(0~30 min),83%~80% B(30~40 min),80%~75% B(40~60 min),75%~85% B(60~80 min);流速:1 mL/min;进样量:20 μ L;检测波长:UV 360 nm

2 指纹图谱及各项技术参数

2.1 指纹图谱:银杏叶药材、注射剂中间体和注射剂指纹图谱见图1。原药材成分比中间体和制剂更复杂,可以看到有40多个峰。



a-内标物芦丁
A药材 B注射剂中间体 C注射剂

图1 银杏叶指纹图谱

表1 银杏叶药材、注射剂中间体和注射剂指纹图谱的共有峰及其参数 ($n=3$)

共有峰编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
相对保留时间	0.54	0.62	0.67	0.71	0.78	1.00	1.04	1.09	1.18	1.41
相对峰面积值	0.43	0.28	0.14	0.08	0.81	1.00	0.08	0.54	0.18	1.03

续表 1

共有峰编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
相对保留时间	1.47	1.54	1.57	1.64	1.70	1.76	1.84	1.91	1.98	2.23
相对峰面积值	0.96	0.04	0.32	0.07	0.57	0.03	0.10	0.12	0.80	0.59

注:6号峰为参照物芦丁的峰

定6次,对测定结果中各峰的相对保留时间和峰面积百分比进行了比较,占峰面积百分比5%以上峰的 $RSD < 3\%$ 。

3.3 重现性试验:取同一供试品,同法制备6个供试品溶液进行测定,对测定结果中各峰的相对保留时间和峰面积百分比进行了比较,占峰面积百分比5%以上峰的 $RSD < 3\%$ 。

4 讨论

4.1 供试品的制备:供试品的制备是依据银杏叶标准提取物提取工艺中确定的方法进行的。为了最大程度的保留原有成分,并保证分析的顺利进行,在样

品预处理时只使用了 TOYOPAK ODS柱除去脂溶性杂质。

2.2 共有指纹峰的标定、共有指纹峰面积比值和非共有峰面积:共有指纹峰的标定是根据对12批样品测定基础上进行的。在此首先阐明对共有峰标定的理解:由于中药注射液的制备都是经过对原料药多步纯化制得的,因此原料药的指纹图与中间体和制剂的存在很大的差别(图1)。为了更好地阐明它们之间的相关性,制定原药材指纹图应突出其制剂中保留成分的分离,在对共有峰峰面积比值计算时应重点参考中间体指纹图谱中峰的构成。只有这样,才能尽可能排除原药材供试品指纹图谱中杂质峰对计算共有指纹峰技术参数的影响。根据指纹图谱的技术要求和以上的考虑,将原料药材的指纹图谱峰分为共有指纹区(15 min以后)和杂质区(15 min以前)进行统计,从12批样品图谱的共有指纹区可以选出20个共有峰,其中6号峰为芦丁,应当说明的是:杂质区大多数峰也为原药材共有峰,其中最大峰的面积也小于5%。根据对12批样品测定的数据,以6号峰为参照计算共有峰面积比。12批样品非共有峰峰面积比均小于5%,共有峰的编号及有关参数见表1。

3 方法学考察

3.1 稳定性试验:取一新制备供试品溶液,连续测定6次,每次间隔2 h,供试品0,2,4,6,8和10 h的测定结果表明本方法稳定。

3.2 精密度试验:取一新制备供试品溶液,连续测

品预处理时只使用了 TOYOPAK ODS柱除去脂溶性杂质。

4.2 参照物的确定:银杏叶中有两类有效成分(黄酮苷类化合物和萜类内酯),它们的含量分别在含量测定项下进行了测定和规定。鉴于指纹图谱的目的是甄别原料和药品的真伪,为此,我们认为选定银杏叶中种类较多的黄酮苷类化合物^[3](20种以上)为检验对象能够起到指纹鉴别的作用。芦丁是银杏叶中含有的一种黄酮苷类化合物,也是中国药品生物制品检定所确认的黄酮苷类标准物质,因此被选定为本指纹图谱技术要求的参照物。

4.3 检测波长选定 UV 360 nm 为大多数黄酮苷类化合物的特征波长,也是芦丁的长波最大吸收波长。

参考文献:

[1] 游松,姚新生,崔承彬,等.银杏叶中银杏内酯的分离与结构

测定[J].中国药物化学杂志,1995,5(4):258-265.

[2] 游松,姚新生,崔承彬,等.银杏叶中金松双黄酮的核磁共振谱分析[J].沈阳药学院学报,1991,8(2):124-128.

[3] Sticher O. Quality of *Ginkgo* preparations[J]. *Planta Medica*, 1993, 59: 2.

黄芩苷稳定性研究

于波涛,张志荣*,刘文胜,王平**,杨婷***

(四川大学华西药学院,四川 成都 610041)

摘要:目的 研究黄芩苷在不同条件下的稳定性。方法 采用经典恒温法考察黄芩苷在不同 pH 值水溶液、甲醇、乙醇和氯仿以及小鼠肺匀浆、小鼠肝匀浆、小鼠血浆和小牛血清中的稳定性。结果 黄芩苷在酸性环境中稳定,在碱性环境中不稳定,在上述有机溶剂中稳定,而在上述生物样品中不稳定。结论 黄芩苷在不同条件下稳定性不同,在实际应用中应加以考虑。

关键词:黄芩苷;稳定性;反相高效液相色谱法;经典恒温法

中图分类号: R286.01 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)03-0218-03

Studies on stability of Baicalin

YU Bo-tao, ZHANG Zhi-rong, LIU Wen-sheng, WANG Ping, YANG Ting

(Huaxi School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu Sichuan 610041, China)

Abstract **Object** To investigate the stability of baicalin in different conditions. **Methods** The stability of baicalin in water with different pH values, methanol, ethanol, chloroform and in the mouse lung homogenate, mouse liver homogenate, mouse plasma and bovine serum was investigated by the classical isothermal method. **Results** The experiments showed the baicalin was stable in acidic water and these organic solutions, but unstable in basic water and these biological media. **Conclusion** The stability of baicalin in different media was different, which should be considered in practice.

Key words baicalin; stability; RP-HPLC; classical isothermal method

黄芩苷(baicalin)为黄酮类化合物,主要来源于唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi,具有抗菌、抗病毒、抗炎和抗过敏的药理作用。根据黄芩苷的性质^[1],本研究设计并考察其在水溶液、有机溶剂和生物样品中的稳定性,希望能为原料药的提取、制剂的生产和体内外实验条件的筛选提供科学依据。目前尚未见这方面的报道。

1 实验材料与色谱条件

1.1 仪器: Shimadzu 10ATVP型高效液相色谱仪, CLASS-V P 5.0 色谱数据处理工作站,日本岛津; Sartorius BP211D型电子分析天平,德国赛多利斯; TGL-16G 型台式高速离心机,上海医用分析仪器厂; QL-901型旋涡混合器,江苏海门麒麟医用仪器厂; pH-25型 pH计,上海精科雷磁

1.2 样品:黄芩苷原料(成都华福来制药厂提供);黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 0175-9909)。

1.3 试剂:甲醇、乙醇、氯仿均为色谱纯;磷酸盐缓冲液(A液:取磷酸 8.3 mL加水至 500 mL;B液:取 Na₂HPO₄ 71.63 g,加水使溶解成 1 000 mL;取 A、B 不同体积精确配制成 pH值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.4、8.0的溶液);磷酸二氢钠缓冲液(PBS)(用磷酸调 pH值为 4.0)。

1.4 材料:昆明种小鼠(华西医科大学动物实验中心提供)肺、肝匀浆(取健康小鼠肺、肝组织,置匀浆器中,加 2倍重量的 pH=4.0 的 PBS匀浆即得);昆明种小鼠血浆(取健康小鼠血液于肝素管中,振荡,10 000 r/min离心 10 min,取上清液即得);新生小

* 收稿日期: 2001-08-20

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(39925039)

作者简介: 于波涛(1965-),男,江苏涟水人,博士,主要从事靶向制剂的研究,近年来在核心期刊上发表论文 10余篇。

Tel (028)5503808 E-mail yub@263.net

* 联系人 ** 成都中医药大学药学院 2001届毕业生 *** 本校 2001届毕业生