

构中酚羟基的解离,使峰形得以改善,但磷酸效果更好,峰形尖锐对称,并且随着甲醇体积分数的降低(60%→20%),祖师麻甲素的保留时间增加,并与杂质峰的分度增大。当甲醇体积分数降低到30%时,祖师麻甲素与杂质峰达到基线分离。为获得好的分离效果和短的分度时间,最终选定流动相为甲醇-0.5%磷酸溶液(30:70)。

3.2 检测波长的选择:采用二极管阵列检测器对样品的祖师麻甲素对照品进行扫描,结果祖师麻甲素在260、325 nm处有最大吸收波长,而365 nm处的吸光度远大于260 nm处的吸光度。为获得更高的灵敏度,选择325 nm作为检测波长。

3.3 基质去除方法的考察:中药橡胶膏剂,基质难于去除,因此,在采用HPLC法测定时,样品溶液的处理是关键。采用85%乙醇加热回流提取的方法,虽可使待测成分与橡胶基质分离,但在加热条件下,有一些辅料成分会被提取出来而混入提取液。因此,采用乙醇提取液经冰箱静置,使部分基质在低温下凝固析出,但仍残留有部分基质,需进一步除去。进一步采用85%甲醇-环己烷进行液液萃取,即可有

效除去基质,使溶液澄清,满足液相分析的要求。

3.4 提取条件的确定:文献报道的提取溶剂多为乙醇和85%甲醇,本实验考察了甲醇、85%甲醇、50%甲醇、乙醇、85%乙醇和50%乙醇的提取效果,结果85%乙醇对祖师麻甲素的提取率最高。同时,进行了提取次数的考察,样品分别加热回流提取1、2、3、4次(每次1 h),结果加热回流2次后,祖师麻甲素的含量不再增加。因此,提取采用85%乙醇加热回流提取2次,每次1 h。

References:

- [1] *Standards for New Drugs in Due Forms, Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Health, P. R. China* (中华人民共和国卫生部药品标准·新药转正标准) [S]. Vol 8. 1996.
- [2] Wang L X, Feng X R, Zhang B C. Determination of daphnetin in *Daphne tangutica* by TLC scanning [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1986, 17 (6): 13-14.
- [3] Wang X Y, Di L J, Liu J R. HPLC determination of daphnetin in Zushima Tablets [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2003, 17 (4): 232-233.
- [4] Egan D A, Duff C, Jordan L, et al. High performance liquid chromatographic determination of esculetin and daphnetin in urine and plasma [J]. *Chromatographia*, 2003, 58 (9/10): 649-652.

HPLC法测定银杏叶片中银杏内酯的含量

张雪琴^{1,2},周欣^{1*},袁牧¹,王道平¹,彭炳先^{1,2}

(1. 贵州省、中国科学院天然产物化学重点实验室,贵州 贵阳 550002; 2. 贵州大学 精细化工中心,贵州 贵阳 550025)

银杏萜类内酯是银杏叶中除黄酮类化合物外的另一组具有较强生物活性的化合物,即银杏萜内酯A、B、C、M、J和白果内酯。现代药理研究表明,银杏内酯成分除具有扩张冠状动脉血管、增加脑血流量、改善脑营养及抗菌作用外,还有较强的血小板活化因子抑制作用^[1,2],因此具有较高的研究开发价值。文献报道测定银杏叶提取物中的银杏内酯成分有HPLC-UV法^[3]、HPLC-ELSD法^[4]、HPLC-RID法^[5]、GC-MS法^[6]及HPLC-MS法^[7]等,但对银杏叶片中银杏内酯的测定未见报道,故本实验采用HPLC-RID法对不同厂家生产的银杏叶片中银杏内酯含量进行测定,同时考察了银杏内酯的提取方法,给银杏叶片生产厂家提供了质量控制依据。

1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪,甲醇为色谱纯,水为乐百氏纯净水,试剂均为分析纯,银杏叶片从各大药店购买;银杏内酯A、B、C及白果内酯对照品购自中国药品生物制品检定所,批号分别为0862-200004、0863-9902、0864-9902和0865-9601。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为Hypersil ODS2 (250 mm×4.0 mm, 5 μm);流动相:23% CH₃OH水溶液;体积流量:1.0 mL/min;柱温:25℃;进样量:10 μL;示差折光检测器(RID)。理论塔板数以银杏内酯B计算不低于5 000。色谱图见图1。

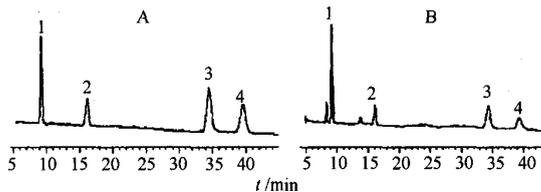
2.2 对照品溶液的制备:分别称取经减压干燥过夜

收稿日期:2004-06-05

基金项目:贵阳市科学技术计划项目(2002-24);贵州省优秀青年科技人才培养项目(2003-0311)

作者简介:张雪琴(1978—),女,江苏泰兴人,硕士研究生,从事药物分析研究。E-mail: zqx_7812@163.com

* 通讯作者 Tel: (0851) 3806327 E-mail: alice9800@sina.com.cn



1-白果内酯 2-银杏内酯 C 3-银杏内酯 A 4-银杏内酯 B
1-bilobalide 2-ginkgolide C 3-ginkgolide A 4-ginkgolide B

图 1 银杏萜类内酯对照品(A)和银杏叶片(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of ginkgolides reference substances (A) and *G. biloba* Leaf Tablet (B)

的白果内酯及银杏内酯 A、B、C 对照品 0.86、0.85、0.85、0.78 mg, 用 50% CH₃OH 溶解定容在 10 mL 量瓶中, 制成银杏内酯的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 采用均匀取样法从每个厂家的银杏叶片中取出 15 片银杏叶片, 去除包衣后, 研成粉末, 称取适量, 5% 双氧水 100 mL 回流提取 1 h, 滤过, 滤液用醋酸乙酯萃取多次, 萃取液用 1% NaHCO₃ 水溶液萃取多次后, 再用 1% Na₂SO₃ 水溶液萃取, 醋酸乙酯层继续用蒸馏水和 5% NaCl 溶液各萃取 1 次, 最后得到的醋酸乙酯萃取液回收溶剂至干, 用 50% CH₃OH 定容至 25 mL 量瓶中, 摇匀, 备用。

2.4 标准曲线与线性范围: 分别精密吸取上述银杏内酯对照品溶液 2.5、10、25、40、60 μL 进样, 以峰面积为纵坐标, 对照品质量为横坐标, 线性回归, 回归方程见表 1。

表 1 4 种银杏内酯的线性方程、相关系数与线性范围

Table 1 Linear equation, coefficient, and linear range of four ginkgolides

对照品	线性方程	r	线性范围/ng
白果内酯	Y=8.702 136 5 X+11.353 8	0.999 97	216.241 2~5 189.789 4
银杏内酯 A	Y=11.604 987 7 X+295.523 1	0.999 84	213.726 8~5 129.443 0
银杏内酯 B	Y=8.876 270 6 X+22.299 5	0.999 90	213.726 8~5 129.443 0
银杏内酯 C	Y=5.360 989 5 X+135.114 1	0.999 81	196.125 8~4 707.018 3

2.5 精密度试验: 取银杏内酯对照品溶液, 连续进样 5 次, 测定, 得银杏内酯 A、B、C 及白果内酯峰面积的 RSD 分别为 3.04%、3.47%、2.69%、2.05%。

2.6 重现性试验: 取贵州(20021124)银杏叶片, 平行制备 5 份供试品溶液, 进样测定, 计算得银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的 RSD 分别为 3.79%、3.19%、2.67%、0.99%。

2.7 稳定性试验: 取贵州信邦制药有限公司生产的银杏叶片, 制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 计算得银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的

RSD 分别为 3.05%、3.32%、1.95%、1.09%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验: 精密称取已测定含量的银杏叶片粉末约 12 mg, 定量加入 4 种银杏内酯对照品溶液(取银杏内酯 A 1.21 mg、银杏内酯 B 1.05 mg、银杏内酯 C 1.11 mg、白果内酯 2.97 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度) 2 mL, 制备供试品溶液 5 份, 进样测定, 结果银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的平均回收率分别为 91.15%、101.65%、103.12%、104.36%, 其 RSD 分别为 2.28%、2.62%、2.26%、1.12% (n=5)。

2.9 样品测定: 取不同厂家的银杏叶片制备供试品溶液, 进行测定, 结果见表 2。

表 2 银杏叶片中银杏内酯的测定结果 (n=2)

Table 2 Determination of ginkgolides in *G. biloba* Leaf Tablet (n=2)

批号	质量分数/(mg·片 ⁻¹)				
	银杏内酯 A	银杏内酯 B	银杏内酯 C	白果内酯	萜类总内酯
贵州(20021124)	1.25	0.85	0.78	2.16	5.04
江苏(021220)	1.06	0.80	0.60	0.32	2.78
河南(030303)	1.30	0.85	0.74	1.10	3.99
深圳(20020106)	0.96	0.78	0.68	0.79	3.21
泰州(030315)	0.99	0.66	0.44	2.82	4.91
德国(2980402)	0.30	0.20	0.44	0.91	1.85
上海 1(030104)	0.64	0.47	0.40	0.43	1.94
上海 2(20021214)	0.82	0.40	0.70	2.02	3.94
上海 3(030305)	0.90	0.66	0.91	1.72	4.19

3 讨论

3.1 文献报道银杏内酯的提取方法有醋酸乙酯索氏提取法^[8]、柱色谱法^[4]、液-液萃取法^[5], 本实验采用高效液相色谱-二极管阵列检测器在 220 nm 波长时将这 3 种提取方法与本实验所采取的提取方法进行了比较, 结果发现文献报道的 3 种提取方法产物杂质较多, 而本实验所采用的方法处理的样品则比较干净。

3.2 测定结果表明, 不同厂家生产的银杏叶片中银杏内酯的差异较大, 贵州和泰州的较高, 远远超出厂家标出的规格, 上海 1 和德国生产的银杏内酯的含量较低, 略低于厂家所标的规格。而银杏内酯是银杏叶片中的主要药效成分之一, 所以笔者认为, 采取一定的措施控制银杏叶片的质量势在必行。

References:

[1] van Beek T A. Concentration of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves in relation to the time of the year [J]. *Planta Med*, 1992, 58: 413.
[2] Sticher O. *Ginkgo biloba* eine standortbestimmung [J]. *Dtsch Apoth Ztg*, 1991, 131: 1827.

- [3] Chi D, Liu A R, Xu L X, *et al.* Determination of three ginkgolides in *Ginkgo biloba* leaves by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 1998, 18 (6): 367-369.
- [4] Yan Y Z, Xie P S. Assay of terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves by HPLC-ELSD [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21 (3): 173-176.
- [5] Guan Y M, You H L, Wang J, *et al.* Determination of ginkgolides in various *Ginkgo* leaves [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21 (2): 107-109.
- [6] Tang H F, Zheng Z Q, Zhu X Y, *et al.* Quality and quantity analysis of terpene lactones from *Ginkgo biloba* leaves by GC-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (3): 214-217.
- [7] Wang Y, Sheng L S, Lou F C. Analysis and structure determination of trace constituent in the total ginkgolide by using LC/DAD/ESI/MS [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36 (8): 606-608.
- [8] Dong X R, Wu G S. Extraction, purification and isolation of ginkgolides [J]. *Hubei Chem Ind* (湖北化工), 2001 (4): 27-28.

粗毛淫羊藿及其不同炮制品中多糖的测定

杨武德, 胡高翔

(贵阳中医学院 药理学系, 贵州 贵阳 550002)

粗毛淫羊藿 *Epimedium acuminatum* Franch. 的干燥地上部分是淫羊藿的来源之一, 具有补肾壮阳、强筋骨、祛风湿等功效。现代药理研究表明, 淫羊藿多糖具有明显的免疫活性, 用于调节免疫、抗肿瘤、抗衰老等, 是一种很有发展前途的生物调节剂^[1]。本实验采用苯酚-硫酸法对粗毛淫羊藿及其炮制品中多糖进行测定。

1 仪器与试剂

DU-70 分光光度计(美国贝克曼公司)。浓硫酸为优级纯, 葡萄糖对照品(北京化工厂, AR 级), 其他均为分析纯。粗毛淫羊藿药材采自贵州省贵阳市花溪区高坡, 经本院中药鉴定教研室魏升华鉴定。

2 方法与结果

2.1 炮制品的制备^[2]

2.1.1 羊脂炙: 取羊脂油加热熔化, 加入淫羊藿 50 g, 文火炒至均匀有泽, 取出, 放凉。100 kg 淫羊藿用羊脂(炼油)20 kg, 得率为 81.6%。

2.1.2 炒制: 取淫羊藿 50 g 置热锅中, 用微火炒至微焦, 呈微黄色, 取出, 放凉。得率为 86.5%。

2.1.3 酒制: 取淫羊藿 50 g 加黄酒喷匀炒干, 颜色稍加深时, 取出, 放凉。100 kg 淫羊藿用黄酒 24 kg, 得率为 93.2%。

2.1.4 盐炒: 取淫羊藿 50 g 放热锅内, 按质量比加食盐 2%, 兑水适量, 边炒边洒, 炒至水干, 边有焦色, 取出放凉。得率为 89.2%。

2.1.5 酥油制: 取酥油置锅内, 文火加热熔化, 再将淫羊藿 50 g 倒入, 炒拌均匀, 取出, 表面油亮光滑,

摊开, 放凉。得率为 77.8%。

2.1.6 烤制: 预热烘箱, 使箱内温度达到 120 ℃, 将放置拌羊脂油的淫羊藿 50 g 的烤盘放入, 烘烤 10 min, 取出翻动 1 次, 再烘烤 15 min, 至表面有亮色, 取出翻动后放凉。100 kg 淫羊藿用羊脂油(炼油)20 kg, 得率为 76.6%。

2.2 淫羊藿多糖的提取与精制: 称取已干燥的淫羊藿粉末(40 目)适量, 置索氏提取器中加入适量石油醚(60~90 ℃)回流, 残渣提取 3 次脱脂。弃提取液, 药粉挥干溶媒后, 加入 80%乙醇水浴回流提取 4 次(6、5、3、1 h)以除尽单糖、低聚糖和醇溶性杂质。药粉挥干溶媒, 加水煎煮提取 3 次(3、2、2 h), 合并滤液, 加入活性炭脱色。溶液抽滤, 浓缩, 放冷后加入乙醇, 使乙醇体积分数达 80%, 冰箱中放置 24 h, 离心, Seavage 法脱蛋白, 流水透析 24 h, 再用 95%乙醇和丙酮依次反复冲洗多次, 40 ℃烘干至恒重, 得精制多糖粉末, 并置于干燥器内备用。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取 105 ℃干燥至恒重的葡萄糖对照品 256 mg, 置 250 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 备用。

2.4 标准曲线的绘制^[3]: 精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL, 分置 25 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取 2 mL 于 10 mL 带塞试管中, 另取 2 mL 蒸馏水作空白对照。各管再加入 1.0 mL 苯酚溶液, 混匀, 迅速加入浓硫酸 5 mL, 摇匀后放置 5 min, 置沸水浴, 加热 15 min, 取出, 置冷水中冷却, 于 490 nm 处测定