

2.8.1 精密性试验:取供试品溶液连续进样5次,按以上方法香丹注射液高效液相色谱指纹谱各色谱峰的相对峰面积和相对保留时间RSD均在2%内。

2.8.2 稳定性试验:取供试品溶液分别在0、2、8、16 h进样测定,结果高效液相色谱指纹谱各色谱峰的相对峰面积和相对保留时间RSD均在3%内。

3 讨论

3.1 气相色谱指纹图谱部分

3.1.1 预处理方法的选择:根据实验结果,香丹注射液不适合于顶空处理。因为香丹注射液中降香挥发油组分极其微量,致使顶空处理无法收到较好的效果。因此香丹注射液气相色谱样品预处理采用有机溶剂萃取。

3.1.2 萃取溶剂的确定:实验过程中选用了3种溶剂(乙醚、二氯甲烷和正己烷)处理香丹注射液。从萃取的效果看,乙醚与二氯甲烷相近,但都优于正己烷,挥发性组分在正己烷中的溶解性较差,二氯甲烷能够萃取得到香草醛,乙醚萃取液中未能找到香草醛。根据萃取过程的简易程度,二氯甲烷做萃取剂时不易乳化、层次分明和省时。乙醚萃取时则较易乳化,使得操作过程烦琐,重现性差。因此二氯甲烷适合萃取香丹注射液中挥发油的组分。

3.1.3 香丹注射液中挥发油成分组成:经GC-MS分析,香丹注射液中存在少量的香草醛、苦橙油醇和4种氧化苦橙油醇。

3.1.4 本实验针对香丹注射液中挥发油组分建立了香丹注射液的气相色谱指纹图谱的分析方法,并对此分析方法进行方法学考察,各峰相对峰面积和相对保留时间的相对标准偏差除个别峰外均小于5%,表明该法适合于香丹注射液气相色谱指纹图谱的分析。

3.2 液相色谱指纹图谱部分

3.2.1 pH值对分离的影响:采用pH 2.25、2.5、3.0流动相对香丹注射液液相色谱分离进行考察,发现流动相pH值越低,分离效果越好。但考虑到色谱柱的pH极限,本方法选用pH 2.5的流动相。

3.2.2 三氟醋酸与磷酸对分离的影响:考察了三氟醋酸与磷酸对香丹注射液分离的影响,结果表明流动相中添加三氟醋酸比磷酸分离效果好。

3.3 香丹注射液中组分的定性:实验采用对照品、紫外光谱法和液相色谱-质谱法对香丹注射液各组分进行定性,香丹注射液中存在丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸A、2种丹酚酸B异构体、丹酚酸C。综合上述结果,将香丹注射液指纹图谱划分为4部分:多羟基酚类化合物及鞣质类化合物、小分子酚类化合物、丹酚酸类化合物和脂溶性化合物。

References:

- [1] Gu J X. Thirty-two cases about application of Xiangdan Injection to curing myocardial ischemia [J]. *J Anhui Coll Tradit Chin Med* (安徽中医学院学报), 2001, 20 (3): 9-11.
- [2] Kuang R R, Wang F, Li G Z. Structural research of nerolid oxides in trunk of *Dalbergia odorifera* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (7): 736-737.

分析用银杏内酯对照品的制备研究

王帆¹, 胡小钟¹, 王婷², 杨尔宁²

(1. 湖北出入境检验检疫局, 湖北 武汉 430022; 2. 华中农业大学, 湖北 武汉 430070)

摘要:目的 研究银杏内酯制备提纯的工艺。方法 银杏叶提取物(EGb)经柱色谱制备出半成品,以HPLC法制备分离。结果 同时得到银杏内酯A、B、C和白果内酯纯品。结论 达到分析用对照品的要求。

关键词: 银杏内酯; 对照品; 制备

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)07-1008-03

Preparation of ginkgolide reference substance for analysis

WANG Fan¹, HU Xiao-zhong¹, WANG Ting², YANG Er-ning²

(1. Hubei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Wuhan 430022, China;

2. Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Key words: ginkgolide; reference substance; preparation

收稿日期: 2004-10-10

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局资助课题(B034;035;036;037-2000)

作者简介: 王帆(1963—),男,浙江嘉兴人,工程师,主要从事进出口商品化学分析的研究。E-mail: wangfan@hbcic.gov.cn

银杏内酯的分离方法有溶剂萃取法和柱色谱法,或两者相结合^[1,2]。单纯以溶剂萃取结晶,不可能得到高纯度的内酯单体,普通的柱色谱技术也很难分离出质量分数大于 95% 的对照品。目前,国内在检测中使用的银杏内酯对照品主要从国外公司购买,但价格昂贵。按照本实验提出的制备工艺,在设备上加以放大,各内酯成分可以达到克级制备水平,并且制备出的银杏内酯对照品成本低,各项技术指标完全满足作为对照品的要求,达到了研究的预期目的。

1 材料与仪器

银杏叶提取物由湖北省随州活化生物保健工程有限公司生产,批号 20020114。甲醇(色谱纯),酸性氧化铝(100~200 目,色谱用),聚酰胺(80~100 目,色谱用),溴化钾(光谱纯),其他试剂均为分析纯。

Prostar210 制备液相色谱仪(瓦里安公司),UV-265FW 紫外光谱仪(岛津公司),260-10 红外光谱仪(日立公司),1100LC/MSDTrap 液质联用仪(安捷伦公司)。

2 实验方法

2.1 混合内酯的分离和纯化:经活化的酸性氧化铝干法填充于色谱柱中,每次称银杏叶提取物 10 g,用 50 mL 甲醇加热溶解后上柱,采用无水乙醇为洗脱溶剂洗脱。收集洗脱液减压浓缩($\leq 50^{\circ}\text{C}$),于 4°C 冰箱中重复结晶两次。将所得浅黄色结晶再溶于无水乙醇-丙酮(60:40)中,用无水乙醇-丙酮(60:40)为洗脱溶剂重复上述柱色谱分离及结晶操作,得到含有银杏内酯 A(GA)、银杏内酯 B(GB)、银杏内酯 C(GC)和白果内酯(BB)的白色混合结晶。100 g 银杏叶提取物经上述两次分离后,最终得白色混合内酯结晶 2.96 g(收得率约为 3%),银杏叶提取物和混合结晶中内酯分析结果见表 1。

表 1 EGb 和混合结晶中内酯分析

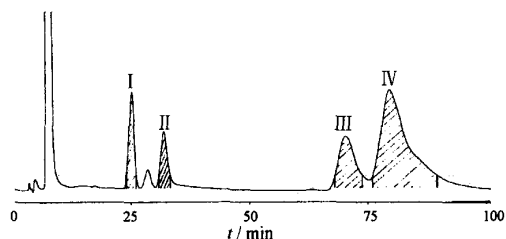
Table 1 Analytical result of lactone in EGb and mixed crystal

样 品	$\omega/\%$				总内酯
	GA	GB	GC	BB	
银杏叶提取物	2.47	2.03	0.85	1.32	6.67
混合内酯结晶	16.4	46.0	7.3	8.4	78.1

2.2 高效液相色谱制备

2.2.1 制备高效液相色谱的条件:Shim-Pack Prep-ODS 色谱柱(250 mm $\times$ 20 mm, 10 μm);柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;流动相:28% 甲醇水溶液;体积流量:8.0 mL/min;示差折光检测器,灵敏度:2.56 $\times 10^{-4}$ RIU;进样体积:200 μL ,组分收集器启动信号的门坎值为 40 mV。

2.2.2 方法:将上述混合内酯结晶用 20 mL 甲醇溶解,经过 0.45 μm 的膜滤过,供制备色谱用。混合内酯的高效液相色谱制备分离图见图 1。在所选择的色谱条件下各成分达到基线分离,色谱峰的阴影部分表示组分收集器收集到的洗脱液区带,在 87 次制备分离后,得到组分 I 3.5 L,组分 II 4.2 L,组分 III 10.5 L,组分 IV 23.5 L。将收集到的组分洗脱液减压浓缩($\leq 50^{\circ}\text{C}$)并在 4°C 冰箱中重复结晶两次,结晶置真空干燥箱中(45°C)干燥至恒重。最终得银杏内酯 A 176 mg、银杏内酯 B 457 mg、银杏内酯 C 78 mg、白果内酯 91 mg,供定性鉴定和纯度分析。



1-白果内酯 I-银杏内酯 C II-银杏内酯 A N-银杏内酯 B
1-bilobalide I-ginkgolide C II-ginkgolide A N-ginkgolide B

图 1 混合内酯的制备 HPLC 色谱图

Fig. 1 Preparative HPLC chromatograms of mixed Lactone

2.3 银杏内酯鉴定

2.3.1 银杏内酯定性分析:根据与对照品的比较及文献报道^[3,4],各组分在 UV、IR、ESI-LC/MS 分析图谱上的特征峰鉴定其分别是白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B(表 2)。

表 2 各组分的图谱数据

Table 2 Spectral data of components

鉴定项目	组分 I	组分 II	组分 III	组分 IV
紫外光谱(λ_{max} , nm)	203.2	205.8	205.2	207.4
红外光谱(cm^{-1})	3 450, 1 760	3 450, 1 760	3 450, 1 760	3 450, 1 760
质谱(m/z)	325.2	439.4	407.2	423.2
液相色谱	单一峰	单一峰	单一峰	单一峰
鉴别	白果内酯	银杏内酯 C	银杏内酯 A	银杏内酯 B

2.3.2 银杏内酯定量分析:用 HPLC-UV 法对各组分进行定量分析。高效液相色谱的条件:CLC-ODS 色谱柱(150 mm $\times$ 6.0 mm, 5 μm);柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;流动相:甲醇-水(38:62);体积流量:1 mL/min;紫外检测器的检测波长:220 nm。采用色谱峰面积归一法计算各组分的质量分数,结果为:银杏内酯 A 98.99%、银杏内酯 B 97.35%、银杏内酯 C 97.56%、白果内酯 93.12%。

3 结果与讨论

3.1 银杏内酯柱色谱分离条件的选择:聚酰胺、酸性氧化铝对黄酮类化合物均有很强的吸附能力,都

可用于柱色谱分离银杏叶提取物中的银杏内酯。本研究比较了聚酰胺、酸性氧化铝。在总内酯的洗脱率相近时,聚酰胺对黄酮类化合物的吸附能力只有酸性氧化铝的20%~40%,且不易再生,而酸性氧化铝柱材料的使用后,经700℃煅烧后可重复使用,因此选用酸性氧化铝为色谱净化材料。在酸性氧化铝柱上比较了甲醇、无水乙醇、丙酮、石油醚、醋酸乙酯洗脱溶剂对银杏内酯的洗脱率和黄酮类化合物分离效果,结果见表3、4。综合这两项指标,确定第1次色谱分离时采用无水乙醇为洗脱溶剂,第2次色谱分离时采用无水乙醇-丙酮(60:40)为洗脱溶剂。

表3 不同洗脱液对银杏内酯的洗脱效果

Table 3 Eluting effects of different eluents for ginkgolides

洗脱液	银杏内酯/mg	洗脱量/mg	洗脱率/%
甲醇	62.5	52.88	85
无水乙醇	62.5	57.05	91
丙酮	62.5	33.88	54
石油醚	62.5	11.7	19
醋酸乙酯	62.5	18.36	29

表4 不同洗脱液对黄酮类化合物的洗脱作用

Table 4 Eluting effects of different eluents for flavonoid

洗脱液	柱长 /cm	黄色色带迁 移距离/cm	洗脱液	柱长 /cm	黄色色带迁 移距离/cm
甲醇	9	8.5	石油醚	9	2
无水乙醇	9	6.5	醋酸乙酯	9	6
丙酮	9	3			

3.2 高效液相色谱制备分离及结晶纯化:制备色谱每次进样量约30 mg,主要受所用色谱柱承载量的限制,若使用直径更大的制备色谱柱,总上样量可达到克级水平。在结晶纯化时,由于大量的溶剂被浓缩,直接干燥的内酯结晶在颜色和纯度上仍不能达到要求,必须通过重结晶进一步纯化。银杏内酯在水中的溶解度极低,而在二甲基亚砜、甲醇中溶解度较大,本研究控制内酯结晶时溶剂中甲醇体积分数低于10%,获得了满意的去杂效果。

3.3 银杏内酯检测方法的选择:用高效液相色谱法

分析银杏内酯根据所用的检测器的不同可分为HPLC-UV法^[5]、HPLC-RI法^[6]和HPLC-ELSD法^[7]。使用紫外检测器,在波长220 nm处,银杏内酯的 E 值为 1×10^3 ,而黄酮类化合物为 1×10^5 ,样品中少量的杂质存在都会严重干扰检测,也正因为如此,本研究中以HPLC-UV法作为银杏内酯对照品的定量检测方法。用HPLC-RI法检测银杏叶及其提取物中银杏内酯,能大大降低样品中杂质对分析的干扰,检测限可达 $1 \mu\text{g}$ 。在本研究中对银杏叶提取物和经柱色谱纯化后,混合内酯结晶检测采用HPLC-RI法。蒸发光散射检测器(ELSD)是一种通用型质量检测器,适用于不挥发性物质的检测,HPLC-ELSD法被推荐为用于银杏内酯的分析,但是由于其价格昂贵,目前普及率较低。

3.4 本项研究所得的GA、GB、GC和BB纯品均能达到对照品的要求,提取工艺切实可行,达到了研究的预期目的。

References:

- [1] Han J Y, Chu Q W, Chang H Y, et al. Isolation and purification of ginkgolide A, B, and bilobalide [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (9): 652-653.
- [2] Han Y Q, Sui X. Study of the leaching technology of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Fine Chem* (精细化工), 2000, 17 (9): 505-506.
- [3] Du A Q, Wang X R, Zhou Z H. Isolation and identification of ginkgolide A, B, C and bilobalide from EGb [J]. *Jiangsu Pharm Clin Study* (江苏药学与临床研究), 2001, 9 (3): 1-3.
- [4] Lu D Q, Ouyang P K, Chen J. HPLC-electrospray ionization-mass spectrum analysis of ginkgo terpenelactones in *Ginkgo biloba* L. leaves [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2002, 22 (1): 9-11.
- [5] Chi J D, Liu A, Xu L X. 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.
- [6] Chen Y L, Xu C X, Xu L, et al. Detection of ginkgolide A in *Ginkgo* (*Ginkgo biloba*) callus culture by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30 (6): 425-427.
- [7] Lu F S, Chen W, Feng F, et al. The content of terpenelactones in the *Ginkgo* Injection [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32 (1): 34-36.

欢迎订阅《中草药》杂志 2004 年增刊

为了加速中药现代化进程,促进中药产业的技术创新,我部编辑出版了以“新技术在中药现代化中的应用”为主要内容的增刊。该增刊共收载论文120篇,总字数约50万字,每本定价60元,另加5.00元邮费。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅,款到寄刊。

编辑部地址:天津市南开区鞍山西道308号 邮编:300193 网址:www.tjpr.com

电话:(022) 27474913 23006821 传真:(022) 23006821 E-mail: zcyzzbjb@tjpr.com