

银杏达莫注射液中黄酮类和萜类内酯7种成分的定量测定

杨青波², 靳风云¹, 陈伟², 姚鹏¹, 杜守颖^{3*}

1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002

2. 贵州益佰制药股份有限公司, 贵州 贵阳 550008

3. 北京中医药大学, 北京 100102

摘要: 目的 建立银杏达莫注射液定量测定方法。方法 黄酮类成分(槲皮素、山柰素和异鼠李素)采用 Agela C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.4%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 360 nm, 柱温 35 °C。内酯类成分(银杏内酯 A、B、C 及白果内酯)采用 Agela C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-四氢呋喃水溶液(10:75)为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.8 mL/min, 用蒸发光散射检测器检测, 柱温 30 °C。结果 分别取 10 个批次的银杏达莫注射液, 测定 7 个主要成分的量, 槲皮素 12.4 μg/mL、山柰素 20.8 μg/mL、异鼠李素 5.5 μg/mL、银杏内酯 A 7.2 μg/mL、银杏内酯 B 2.6 μg/mL、银杏内酯 C 4.7 μg/mL、白果内酯 102.0 μg/mL。结论 建立的方法稳定性、重复性、精密度等方面考察均符合要求, 可作为银杏达莫注射液质量控制方法。

关键词: 银杏达莫注射液; 黄酮; 萜类内酯; 槲皮素; 山柰素; 异鼠李素; 银杏内酯; 白果内酯

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)22-3279-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.012

Study on quantitative determination method of flavonoids and terpene lactone components in Dipyridamole Injection

YANG Qing-bo², JIN Feng-yun¹, CHEN Wei², YAO Peng¹, DU Shou-ying³

1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

2. Guizhou Yi Bai Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550008, China

3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To establish a method for quantitative determination of Dipyridamole Injection. **Methods** The flavonoids were determined using Agela C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), acetonitrile-0.4% phosphoric acid (gradient) as the mobile phase with flow rate 1.0 mL/min, detection wavelength of 360 nm, column temperature of 35 °C. The lactones were determined using Agela C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), methanol-tetrahydrofuran and water (10 : 75) solution (gradient) as the mobile phase with flow rate 0.8 mL/min, with evaporative light scattering detector, and column temperature of 30 °C. **Results** Respectively taking 10 batches of Dipyridamole Injection, the contents of seven major components such as quercetin, kaempferide, isorhamnetin, ginkgolide A, ginkgolide B, ginkgolide C, and bilobalide were determined as 12.4, 20.8, 5.5, 7.2, 2.6, 4.7, and 102.0 μg/mL. **Conclusion** The established method is with good stability, repeatability, and precision, which conforms to the requirements and can be used for the quality control of Dipyridamole Injection.

Key words: Dipyridamole Injection; flavonoids; terpenoid lactones; quercetin; kaempferide; isorhamnetin; ginkgolide; bilobalide

银杏达莫注射液是一种疗效显著的心脑血管药物, 具有扩张冠脉血管、脑血管, 改善脑缺血产生的症状和记忆功能, 其主要活性成分是银杏黄酮和银杏萜类内酯^[1]。现代研究表明, 白果内酯对老年

痴呆症和神经系统疾病具有一定疗效^[2]; 银杏内酯为血小板凝聚因子, 用于冠心病的临床治疗, 对于预防心肌缺血-再灌注损伤具有较显著的作用^[3-4]; 因而在临床治疗中银杏萜类内酯被认为是治疗神经

收稿日期: 2014-07-19

基金项目: 贵州省科技基金(黔中合重大专项字[2011]6019-06号)

作者简介: 杨青波, 男, 贵州益佰制药股份有限公司技术研发部部长。Tel: (0851)4716756 E-mail: 67510872@qq.com

*通信作者 杜守颖, 女, 博士, 北京中医药大学教授, 博士生导师。E-mail: dushouying@263.net

和心脑血管系统疾病起关键作用的活性成分^[5]。近年来,我国银杏叶提取物的生产厂家逐渐增多,产量随之提高,但银杏叶提取物相关产品质量却参差不齐,劣质产品频频出现,严重威胁患者的用药安全^[6]。测定银杏达莫注射液中银杏总黄酮的分析方法很多^[7-8],也有很多方法测定银杏达莫注射液中银杏萜类内酯^[9-11],可是将两者一起研究未见报道。为进一步提高银杏达莫注射液的质量控制标准,本实验将对银杏达莫注射液中总黄酮和萜类内酯成分两者的量一起研究,旨在为银杏达莫注射液的质量控制提供客观的科学依据。

1 仪器与材料

Mettler Toler AL204/AB135-S 电子天平,梅特勒-托利多国际股份有限公司; HENGAOT&D 抽滤器, 250 mL, 上海精密科学仪器有限公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

对照品山柰素(批号 110861-200808, 质量分数 99.9%)、槲皮素(批号 10081-200406, 质量分数 99.9%)、异鼠李素(批号 110860-200608, 质量分数 99.9%)、银杏内酯 A(批号 110862-200305, 质量分数 99.9%)、银杏内酯 B(批号 110863-200305, 质量分数 99.9%)、银杏内酯 C(批号 110864-200, 质量分数 99.9%)、白果内酯(批号 110865-200404, 质量分数 99.9%), 均购于贵阳市食品药品监督管理局; 乙腈、甲醇及四氢呋喃为色谱纯, 其余试剂均为分析纯; 试验用银杏达莫注射液(批号 20091108、20100104、20100301、20100509、20100604、20100707、20120401、20120405、20120406、20120501) 由贵州益佰制药股份有限公司提供, 规格 10 mL/瓶。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 黄酮类成分定量测定供试品溶液 取银杏达莫注射液 10 mL, 置于 150 mL 磨口锥形瓶中挥干, 加入甲醇-25%盐酸水溶液(4:1)混合溶液 25 mL, 加热回流 30 min, 放冷, 滤过, 滤液转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度线, 摇匀, 即得。

2.1.2 内酯类成分定量测定供试品溶液 精密量取银杏达莫注射液 20 mL, 加 2%盐酸溶液 2 滴, 用醋酸乙酯萃取 4 次, 每次分别加醋酸乙酯 15、10、10、10 mL, 合并醋酸乙酯萃取液, 用 5%醋酸钠溶液 20 mL 洗涤。分取醋酸钠液, 再用醋酸乙酯 10 mL 洗涤。合并醋酸乙酯洗液, 用水洗涤 2 次, 每次 20 mL,

分取水洗液, 用醋酸乙酯 10 mL 洗涤, 合并醋酸乙酯液, 回收醋酸乙酯, 蒸干, 残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 黄酮类成分定量测定阴性对照溶液 取缺银杏叶提取物及达莫的注射液 10 mL, 置于 150 mL 磨口锥形瓶中挥干, 加入甲醇-25%盐酸水溶液(4:1)混合溶液 25 mL, 加热回流 30 min, 放冷, 滤过, 滤液转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度线, 摇匀, 即得。

2.1.4 内酯类成分定量测定阴性对照溶液 精密量取缺银杏叶提取物及达莫的注射液 20 mL, 加 2%盐酸溶液 2 滴, 用醋酸乙酯萃取 4 次, 每次分别加醋酸乙酯 15、10、10、10 mL, 合并醋酸乙酯萃取液, 用 5%醋酸钠溶液 20 mL 洗涤。分取醋酸钠液, 再用醋酸乙酯 10 mL 洗涤。合并醋酸乙酯洗液, 用水洗涤 2 次, 每次 20 mL, 分取水洗液, 用醋酸乙酯 10 mL 洗涤, 合并醋酸乙酯液, 回收醋酸乙酯, 蒸干, 残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 色谱条件

2.2.1 流动相选择

(1) 黄酮类成分的定量测定: 对甲醇-0.4%磷酸水溶液、乙腈-0.4%磷酸水溶液、乙腈-0.4%乙酸水溶液等不同配比流动相系统进行考察。经梯度或等度试验比较, 结果表明, 以乙腈-0.4%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱分离效果较好, 所检测的 6 个成分色谱峰既能达到基线分离, 又缩短了分析时间。

(2) 内酯类成分的定量测定: 分别对甲醇-(四氢呋喃-水)(10:75), 乙腈-(四氢呋喃-水)(10:75) 等不同配比流动相系统进行考察, 经梯度或等度试验比较, 结果表明, 以甲醇-(四氢呋喃-水)(10:75) 为流动相梯度洗脱分离效果较好, 所检测的 4 个成分色谱峰既能达到基线分离, 又缩短了分析时间。

2.2.2 色谱柱选择 照上述各自流动相条件, 黄酮类成分定量测定分别用 Shimadzu 柱、Dikma 柱、Agela 柱 Agilent 柱进行分析, 萜类内酯类成分定量测定分别用 Kromasil 柱、Dikma 柱、Agela 柱、Agilent 柱进行分析, 比较分离结果, 4 种色谱柱相比较, 峰形有一定差异, 黄酮类成分定量测定中 Shimadzu 柱与 Dikma 柱、Agela 柱、Agilent 柱差异较大, 萜类内酯类成分定量测定中 Dikma 柱与 Kromasil 柱 Agela 柱、Agilent 柱差异较大, Agela 柱的峰形都

较好, 出峰保留时间差异较大, 分离效果 Agela 柱比较好, 故都确定 Agela 柱作为定量测定分析柱。

2.2.3 柱温考察 按照上述实验选择的色谱条件, 分别将柱温设为 25、30、35、40 °C 进行考察, 当柱温每升高 5 °C, 黄酮类成分出峰时间前移 2 min、内酯类成分出峰时间前移 1 min, 峰整体平移, 但峰形不变, 黄酮类成分在 40 °C 时峰形有一定下移, 说明耐用性好, 对分析不产生影响, 黄酮类成分在 35 °C 柱温下基线较为平稳, 故选择柱温 35 °C。内酯类成分 25 °C 柱温时基线不平稳, 当柱温到 35 °C 及 40 °C 时峰形有一定下移, 总体说明耐用性好, 对分析不产生影响, 故选择柱温 30 °C。

2.2.4 体积流量考察 按照上述实验选择的色谱条件, 黄酮类成分分别将体积流量设为 0.9、1.0、1.1 mL/min, 内酯类成分分别将体积流量设为 0.7、0.8、0.9 mL/min 进行考察, 体积流量的改变仅影响了出峰时间, 但峰形基本一致, 说明色谱条件的耐用性好, 黄酮类成分 0.9 mL/min 色谱图基线有一定下移, 1.1 mL/min 体积流量对柱子压力较大, 故最终确定体积流量为 1.0 mL/min。内酯类成分 0.7 mL/min 与 0.9 mL/min 体积分量的色谱图基线较 0.8 mL/min 不平稳, 故最终确定体积流量为 0.8 mL/min。

2.2.5 波长选择 按照上述实验选择的色谱条件, 黄酮类成分波长的选择, 照上述确定的黄酮类色谱条件, 分别将波长设为 360、254 nm 进行考察, 254 nm 与 360 nm 的峰形出峰时间基本一致, 但 254 nm 峰形较小, 不便于观察分析, 360 nm 主要为黄酮的最大吸收波长, 故选择 360 nm 作为吸收波长分析。内酯类成分检测器为蒸发光检测器, 故未对其吸收波长进行考察。

2.2.6 记录时间的选择 按选定的方法制备供试品溶液, 黄酮类成分定量测定时吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 按上述条件依法测定, 记录色谱图。银杏原药材记录 120 min 色谱图, 当色谱图到 75 min 后所测成分已无峰形出现, 故确定记录 75 min 内的色谱图。

按选定的条件制备供试品溶液, 内酯类成分定量时吸取供试品 20 μL, 注入液相色谱仪, 按上述条件依法测定, 记录色谱图。当色谱图到 50 min 后所测成分已无峰形出现, 故确定记录 60 min 内的色谱图。

2.2.7 色谱条件的确定

(1) 黄酮类成分: 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶

液(梯度), 色谱柱为 Agela C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为 35 °C, 波长为 360 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 梯度洗脱程序: 0~30 min, 15%~17%乙腈; 30~40 min, 17%~20%乙腈; 40~60 min, 20%~25%乙腈; 60~80 min, 25%~80%乙腈; 80~90 min, 80%~15%乙腈。

(2) 内酯类成分: 流动相为甲醇-(四氢呋喃-水)(10:75)(梯度), 色谱柱为 Agela C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为 30 °C, 体积流量为 0.8 mL/min。蒸发光条件为温度 50 °C, 压力: 350 kPa, 增益: 7, 过滤器: 5 s, 梯度洗脱程序: 0~20 min, 25%甲醇; 20~60 min, 25%~68%甲醇; 60~70 min, 68%~25%甲醇。

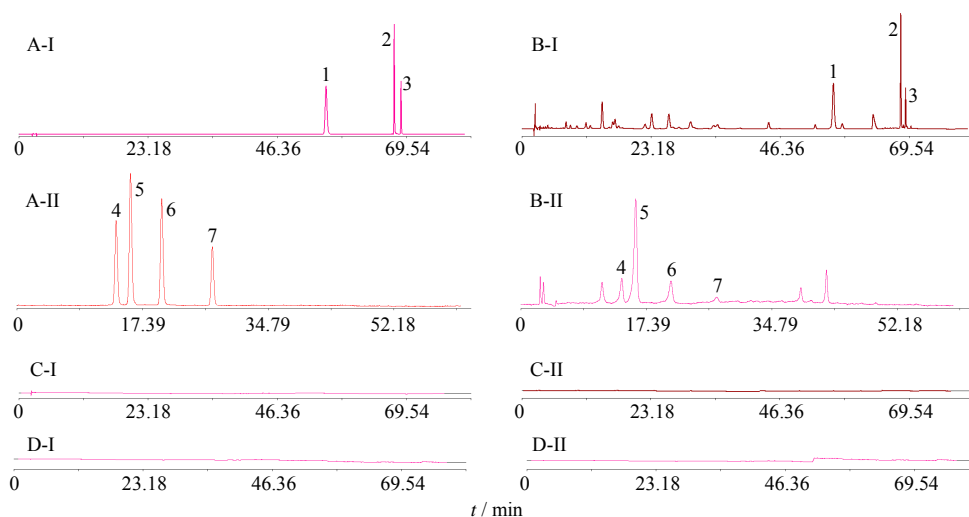
2.3 专属性试验

黄酮类成分采用 HPLC-二级管阵列检测器, 内酯类采用 HPLC-ELSD(蒸发光检测器), 按拟定的色谱条件, 分别吸取对照品溶液、供试品溶液、流动相溶剂及阴性对照溶液进行测定, 黄酮类成分检测波长为 360 nm。测定结果表明, 在黄酮类成分和内酯类成分定量测定供试品溶液中, 槲皮素, 山柰素, 异鼠李素, 银杏内酯 A、B、C 及白果内酯成分的色谱峰紫外光谱图都与各自对照品紫外光谱图一致, 流动相溶剂及阴性对照色谱图中未对槲皮素, 山柰素, 异鼠李素, 银杏内酯 A、B、C 及白果内酯成分的色谱峰形成干扰, 供试品溶液色谱中各被测化合物峰纯度均在 99%以上, 说明所确定的色谱条件能对供试品中上述化合物有较好的分离, 所建立的方法具有良好的专属性, 结果见图 1。

2.4 线性关系考察

2.4.1 黄酮类成分定量测定 精密称取槲皮素、山柰素、异鼠李素适量, 加甲醇溶解制成质量浓度分别为 0.137、0.090、0.067 mg/mL 的对照品溶液, 按拟定的色谱条件注入 HPLC 测定。槲皮素进样量分别为 2、6、10、14、18 μL, 山柰素进样量分别为 15、20、25、30、35 μL, 异鼠李素进样量分别为 5、10、15、20、25 μL。以峰面积(Y)对进样质量(X)进行线性回归, 得各被测成分的回归方程、相关系数(r)及线性范围, 结果槲皮素 $Y=10\ 833\ X+11.413$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 0.274~2.446 μg; 山柰素 $Y=5\ 200.2\ X+16.058$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 1.350~3.150 μg; 异鼠李素 $Y=6\ 772.3\ X-1.527\ 5$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.335~1.675 μg。

2.4.2 内酯类成分定量测定 精密称取银杏内酯 A、



1-槲皮素 2-山柰素 3-异鼠李素 4-银杏内酯 C 5-白果内酯 6-银杏内酯 A 7-银杏内酯 B
1-quercetin 2-galangal 3-isorhamnetin 4-ginkgolide C 5-bilobalide 6-ginkgolide A 7-ginkgolide B

图 1 混合对照品 (A)、银杏达莫注射液 (B)、流动相溶剂 (C) 及阴性对照 (D) 的 HPLC-UV (I) 和 HPLC-ELSD (II) 图
Fig. 1 HPLC-UV (I) and ELSD (II) chromatograms of mixed reference substances (A), Dipyridamole Injection (B), mobile phase solvents (C), and negative control substances (D)

B、C 和白果内酯适量，加甲醇溶解制成质量浓度分别为 0.425、0.103、0.097、0.163 mg/mL 的对照品溶液，按拟定的色谱条件注入 HPLC 测定。银杏内酯 A 进样量分别为 1、3、5、7、9 μL ，银杏内酯 B 进样量分别为 2、4、6、8、10 μL ，银杏内酯 C 进样量分别为 4、8、12、16、20 μL ，白果内酯进样量分别为 5、10、15、20、25 μL 。以峰面积 (Y) 对进样质量 (X) 进行线性回归，得各被测成分的回归方程、相关系数及线性范围，结果银杏内酯 A $Y=5\,977.9X-26.620$, $r=0.999\,4$, 线性范围 0.425~3.825 μg ；银杏内酯 B $Y=4\,632.9X-23.995$, $r=0.999\,7$, 线性范围 0.206~1.030 μg ；银杏内酯 C $Y=9\,449.0X-260.06$, $r=0.999\,2$, 线性范围 0.388~1.940 μg ；白果内酯 $Y=23\,205X-1\,116.7$, $r=0.999\,8$, 线性范围 0.815~4.075 μg 。

2.5 稳定性试验

分别照银杏达莫注射液供试品溶液制备方法制备制剂供试品溶液，按 0、2、4、8、12 h 分别进样 10 μL 测定黄酮类成分 (批号 20100604)，20 μL 测定内酯类成分 (批号 20100604)，测定各指标成分峰面积。结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定，各成分的 RSD 分别为 1.15%、0.83%、0.97% 和 0.56%、0.82%、0.96%、1.83%，稳定性良好。

2.6 精密度试验

分别取制剂 (批号 20100604) 的供试品溶液 10

μL 测定黄酮类成分，20 μL 测定内酯类成分，分别连续进样 6 次，测定峰面积，结果各成分 6 次峰面积 RSD 分别在 0.62%~0.76% 和 0.62%~2.08%，精密度良好。

2.7 重复性试验

取同一批号 (批号 20100604) 的银杏达莫注射液照供试品溶液制备方法制备供试品溶液，取 10 μL 测定黄酮类成分，20 μL 测定内酯类成分，计算各指标成分量的 RSD 分别在 1.10%~1.35% 和 0.49%~2.48%，重复性良好。

2.8 回收率试验

采用加样回收率法，按上述样品溶液制备方法分别对样品进行处理，测定黄酮类成分 (批号 20100604) 加入适量 0.161 mg/mL 槲皮素、0.401 mg/mL 山柰素、0.155 mg/mL 异鼠李素对照品溶液；测定内酯类成分 (批号 20100604) 加入适量银杏内酯 A 19.8 $\mu\text{g/mL}$ 、B 10.9 $\mu\text{g/mL}$ 、C 20.1 $\mu\text{g/mL}$ 及白果内酯 40.9 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液，制成低、中、高 3 种不同质量浓度供试品溶液。按上述色谱条件进行测定，计算各成分的回收率，结果槲皮素、山柰素、异鼠李素、银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的平均回收率分别为 100.13%、100.29%、99.83%、100.11%、100.79%、100.93%、101.00%，RSD 分别为 2.57%、1.72%、2.46%、2.85%、2.31%、2.86%、2.25%。

2.9 样品测定

分别取 10 个批次的银杏达莫注射液, 按“2.1”

项方法分别制备供试品溶液, 按拟定的色谱条件, 测定 7 个主要成分的量, 测定结果见表 1。

表 1 银杏达莫注射液定量测定结果

Table 1 Quantitative determination of Dipyridamole Injection

批号	含量 / (mg·瓶 ⁻¹)						
	槲皮素	山柰素	异鼠李素	银杏内酯 A	银杏内酯 B	银杏内酯 C	白果内酯
20120501	0.125	0.207	0.055	0.072	0.027	0.046	0.101
20091108	0.121	0.209	0.052	0.072	0.026	0.045	0.101
20100104	0.131	0.213	0.057	0.073	0.026	0.047	0.103
20100301	0.123	0.211	0.052	0.074	0.026	0.048	0.101
20100509	0.122	0.203	0.056	0.071	0.024	0.049	0.103
20100604	0.127	0.204	0.053	0.074	0.025	0.047	0.102
20100707	0.117	0.207	0.056	0.072	0.027	0.046	0.101
20120401	0.119	0.214	0.057	0.071	0.026	0.045	0.101
20120405	0.123	0.210	0.055	0.072	0.026	0.045	0.103
20120406	0.121	0.201	0.056	0.071	0.025	0.049	0.101

3 讨论

本研究建立的定量测定方法重复性、稳定性与精密度均较好, 可作为银杏达莫注射液质量控制的依据, 有利于全面提升对该制剂质量的控制和评价。结果表明, 贵州益佰制药股份有限公司在 2009 年到 2012 年生产的 10 批次银杏达莫注射液样品中槲皮素平均为 0.124 mg/瓶; 山柰素平均为 0.208 mg/瓶; 异鼠李素平均为 0.055 mg/瓶; 银杏内酯 A 平均为 0.072 mg/瓶; 银杏内酯 B 平均为 0.026 mg/瓶; 银杏内酯 C 平均为 0.047 mg/瓶; 白果内酯平均为 0.102 mg/瓶。由于各批次银杏叶原药材有一定差异, 进而影响到银杏达莫注射液中各有效成分的量。本品每瓶槲皮素、山柰素、异鼠李素、银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的定量限还需进一步研究后确定。

参考文献

[1] 王倬暄, 顾峥嵘, 丁建. HPLC 测定银杏达莫注射液中游离芦丁和槲皮素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(10): 1902-1904.
 [2] 何璐, 何照范, 张勇民, 等. DA201 型大孔吸附树脂分离银杏叶提取物中银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的研究 [J]. 中草药, 2004, 35(12): 135-136.
 [3] 张煜, 黄芸. 银杏叶提取物预防心肌缺血再灌注

损伤的研究进展 [J]. 国外医学—心血管疾病分册, 2000, 27(1): 29-31.

[4] 邹美南, 宋林立, 魏云. 银杏内酯对局灶性脑缺血大鼠血液流变性和生化指标的影响 [J]. 中南药学, 2006, 4(3): 207-208.
 [5] 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.
 [6] 陈凡. 银杏叶提取物的 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 534-538.
 [7] 徐晓光, 杨德宝, 俞仁昌. 银杏叶中黄酮类成分及含量测定的方法研究 [J]. 山东医药工业, 1999, 18(4): 20-21.
 [8] 佳红, 柳正良. SFE-HPLC 测定银杏叶粗提取物中黄酮类化合物的含量 [J]. 中草药, 2000, 31(2): 101-103.
 [9] 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.
 [10] 杨义方, 夏野鹰. 银杏叶及其制剂中萜内酯含量测定方法研究进展 [J]. 国外医药—植物药分册, 2000, 15(2): 61-66.
 [11] 吕伏生, 陈伟, 冯芳, 等. ELSD 检查法测定银杏酮酯注射液中银杏内酯 A、B 的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(1): 34-36.