

高效液相色谱 – 电雾式检测器法测定银杏叶提取物中萜类内酯含量

刘丽娜¹, 金红宇^{1*}, 潘媛媛², 刘晓达², 金燕², 马双成^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 北京 100007)

摘要 目的: 建立采用高效液相色谱 – 电雾式检测器 (HPLC-CAD) 测定银杏叶提取物中萜类内酯含量的方法。方法: 采用 CAPCELL PAK MG II C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 40 °C, 以甲醇 – 水 (30:70) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹; 以 CAD 检测器检测, 雾化温度 40 °C。结果: 本方法对白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 的定量下限分别为 14、14、28 和 27 ng, 检测下限分别为 4、6、10 和 10 ng; 各萜类内酯线性关系良好, 相关系数在 0.999 6~0.999 8 之间; 加样回收率 (n=6) 分别为 101.6%、95.4%、102.1% 和 105.1%, 重复性试验的 RSD 分别为 2.6%、3.0%、2.6% 和 3.0%。3 批次银杏叶提取物中白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A 和银杏内酯 B 含量分别为 3.04%~3.18%、1.05%、1.22%~1.24% 和 0.63%~0.64%。结论: 该方法可用于银杏叶提取物中萜类内酯的含量测定, 且该方法具有更高的灵敏度。
关键词: 银杏叶提取物; 萜类内酯; 白果内酯; 银杏内酯; 高效液相色谱; 电雾式检测器

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 07-1269-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.07.25

Determination of terpene lactones in ginkgo leaf extract by high performance liquid chromatography-charged aerosol detector

LIU Li-na¹, JIN Hong-yu^{1*}, PAN Yuan-yuan², LIU Xiao-da²,
JIN Yan², MA Shuang-cheng^{1*}

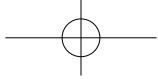
(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Thermo Fisher Scientific Corporation, Beijing 100007, China)

Abstract Objective: To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) – charged aerosol detector (CAD) method for the determination of the terpene lactones in ginkgo leaf extract. **Methods:** HPLC analysis was performed on a CAPCELL PAK C₁₈ MG II column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol – water (30:70) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, and the column temperature was 40 °C. CAD was equipped as the detector with the evaporation temperature of 40 °C. **Results:** The limit of quantification for bilobalide, ginkgolide C, ginkgolide A and ginkgolide B were 14 ng, 14 ng, 28 ng and 27 ng, respectively and the detection limits were 4 ng, 6 ng, 10 ng and 10 ng, respectively. There was a good linear relationship for the four terpene lactones. The average recoveries for bilobalide, ginkgolide C, ginkgolide A and ginkgolide B were 101.6%, 95.4%, 102.1% and 105.1%, and RSD values of repeatability test were 2.6%, 3.0%, 2.6% and 3.0%. The contents of bilobalide, ginkgolide C, ginkgolide

* 通信作者 金红宇 Tel: (010) 67095424; E-mail: jhyu@nifdc.org.cn

马双成 Tel: (010) 67095272; E-mail: mase@nifdc.org.cn

第一作者 Tel: (010) 67095424; E-mail: kllln@163.com



A and ginkgolide B in 3 samples were 3.04%–3.18%, 1.05%, 1.22%–1.24% and 0.63%–0.64%, respectively.

Conclusion: The established method can be applied to the determination of terpene lactones in ginkgo leaves extract with higher sensitivity.

Keywords: ginkgo leaf extract; terpene lactones; bilobalide; ginkgolide; high performance liquid chromatography; charged aerosol detector

银杏叶提取物^[1]为银杏叶经加工制成的提取物,收载于《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2015年版一部。银杏叶及其制剂中最重要的活性成分是黄酮类和银杏内酯类化合物,还有有机酸、酚、聚戊烯醇、原花青素等类化合物。《中国药典》对银杏叶提取物的两大类活性成分进行含量测定,其中,银杏内酯类化合物属于萜类化合物,因其紫外吸收较弱,以 HPLC-ELSD 法对萜类内酯进行含量测定。

电雾式检测器(charged aerosol detector, CAD)是一种通用型检测器^[2-3],其检测信号不依赖于被检测物质的化学结构,其响应值不依赖于被测物质的光学性质和离子化效率,能检测大部分非挥发性或半挥发性的物质,被誉为新型通用型检测器。研究表明,与蒸发光散射检测器(ELSD)比较,CAD 具有更高的检测灵敏度^[4-5]和更加均匀一致的响应因子^[6]。自 2004 年问世以来,CAD 主要被应用于检测脂^[7]、皂苷^[2]、胆酸^[8-10]、糖及氨基糖苷^[11-12]等类具有弱紫外吸收的物质,已成功应用于中药活性成分含量测定与指纹图谱研究^[10]。

本文使用 HPLC-CAD 法测定银杏叶提取物中白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A 和银杏内酯 B 4 个萜类内酯的含量,结果显示本方法可用于测定银杏叶提取物中萜类内酯的含量测定,且灵敏度优于 HPLC-ELSD 方法。

1 仪器和材料

Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱单元(Thermo 公司),配 Corona Veo RS CAD 检测器(Thermo 公司);AE 240 型十万分之一电子分析天平(METTLER 公司);Milli-Q 超纯水处理系统(默克密理博公司)。

银杏叶提取物由浙江康恩贝制药股份有限公司、贵州信邦制药股份有限公司、贵州益佰制药股份有限公司及德国威玛舒培博士药厂提供;银杏叶总内酯对照提取物(批号 610017-201501)由中国食品药品

检定研究院提供;甲醇、乙腈均为色谱纯(Fisher 公司),水为高纯水。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液 取银杏叶总内酯对照提取物适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含银杏叶总内酯对照提取物 2 mg 的溶液,即得。

2.2 供试品溶液 取银杏叶提取物样品 100 mg,精密称定,置烧杯中,加磷酸盐缓冲液(pH 6.5)(取磷酸二氢钾 6.25 g,磷酸氢二钠二水合物 3.96 g,加水稀释至 1 000 mL)7 mL,搅拌 10 min,转移至 Merck Extrelut NT 20 硅藻土柱中,以磷酸盐缓冲液(pH 6.5)5 mL 冲洗烧杯,洗液并入柱中,静置 15 min 使其被固定相吸附。用乙酸乙酯 100 mL 洗脱,收集洗脱液,60 ℃以下浓缩至干,残渣用流动相溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,即得。

3 色谱条件

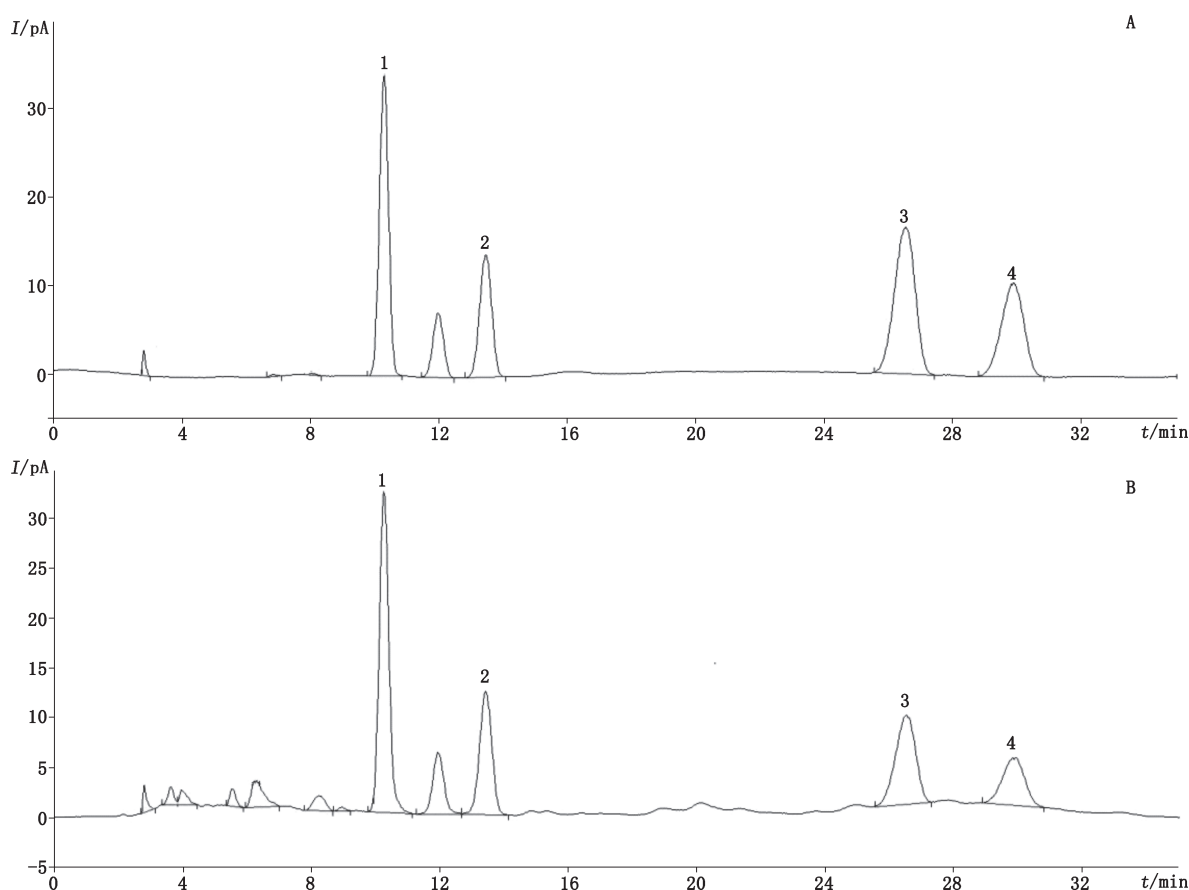
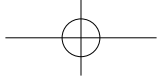
采用资生堂 CAPCELL PAK MG II C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 40 ℃,以甲醇-水(30:70)为流动相,流速 1.0 mL · min⁻¹;以 CAD 检测,CAD 雾化温度 40 ℃;进样量 10 μL。取对照品溶液及供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,色谱图见图 1。

4 方法学考察

4.1 检测下限与定量下限测定 将对照品溶液以甲醇适当稀释后制得一系列不同浓度的溶液,进样分析;S/N=3 时测得白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 4 个成分的检测下限分别为 14、14、28、27 ng, S/N=10 时测得上述 4 个成分的定量下限分别为 4、6、10、10 ng。

4.2 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下对照品溶液 1、3、5、10、15 μL,分别注入液相色谱仪,测定峰面积,以进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 的线性方程分别为:

$$Y = -2.378X^2 + 17.611X + 0.940 \quad r = 0.9996$$



1. 白果内酯 (bilobalide) 2. 银杏内酯 C (ginkgolide C) 3. 银杏内酯 A (ginkgolide A) 4. 银杏内酯 B (ginkgolide B)

图1 银杏叶总内酯对照提取物 (A) 和银杏叶提取物样品 (B) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of total reference extract (A) of ginkgo leaves and ginkgo leaf extract (B)

$$Y = -5.967X^2 + 23.979X + 0.301 \quad r = 0.9998$$

$$Y = -3.473X^2 + 24.223X + 0.741 \quad r = 0.9997$$

$$Y = -4.077X^2 + 30.222X + 0.228 \quad r = 0.9998$$

线性范围分别为 0.65~17.08、0.26~6.95、0.55~14.4、0.31~8.21 μg 。

4.3 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL , 连续进样 7 次, 测定峰面积, 计算白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 峰面积的 RSD 分别为 0.24%、0.42%、0.91%、0.64%。

4.4 重复性试验 平行称取同一批样品 (德国威玛舒培, 批号 098) 6 份, 按供试品溶液的制备方法处理, 依法测定, 并计算含量; 结果白果内酯平均含量为 2.92%, RSD 为 2.6%; 银杏内酯 C 的平均含量为 1.01%, RSD 为 3.0%; 银杏内酯 A 的平均含量为 1.19%, RSD 为 2.6%; 银杏内酯 B 的平均含量为

0.61%, RSD 为 3.0%。

4.5 回收率试验 取银杏叶萜类内酯对照提取物约 40 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得加样回收液。精密量取加样回收液 1 mL, 置烧杯中, 挥干溶剂, 精密加入已知含量的同一批号的样品 (德国威玛舒培, 批号 098, 白果内酯含量 2.92%, 银杏内酯 C 含量为 1.01%, 银杏内酯 A 含量 1.19%, 银杏内酯 B 含量为 0.61%) 50 mg, 按供试品溶液的制备方法, 自“加磷酸盐缓冲液 (pH 6.5)”起开始操作, 制备供试溶液 (平行制备 6 份), 并照上述色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 1~4。白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 平均回收率 ($n=6$) 分别为 101.6%、95.4%、102.1% 和 105.1%, RSD 分别为 2.9%、3.0%、1.3% 和 2.5%。

表 1 白果内酯回收率试验

Tab. 1 Recovery of bilobalide

序号 (No.)	取样量 (sampling amount)/mg	含量 (original)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (mean)/%	RSD/%
1	52.93	1.546	1.479	2.972	96.5	101.6	2.9
2	52.22	1.525		3.050	103.2		
3	51.80	1.513		2.987	99.7		
4	51.59	1.506		3.049	104.3		
5	53.44	1.560		3.074	102.4		
6	50.90	1.486		3.016	103.4		

表 2 银杏内酯 C 回收率试验

Tab. 2 Recovery of ginkgolide C

序号 (No.)	取样量 (sampling amount)/mg	含量 (original)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (mean)/%	RSD/%
1	52.93	0.535	0.602	1.095	93.1	95.4	3.0
2	52.22	0.527		1.130	100.0		
3	51.80	0.523		1.081	92.6		
4	51.59	0.521		1.103	96.7		
5	53.44	0.540		1.120	96.3		
6	50.90	0.514		1.079	93.8		

表 3 银杏内酯 A 回收率试验

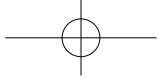
Tab. 3 Recovery of ginkgolide A

序号 (No.)	取样量 (sampling amount)/mg	含量 (original)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (mean)/%	RSD/%
1	52.93	0.630	1.247	1.904	102.2	102.1	1.3
2	52.22	0.621		1.885	101.4		
3	51.80	0.616		1.876	101.0		
4	51.59	0.614		1.910	104.0		
5	53.44	0.636		1.925	103.4		
6	50.90	0.606		1.859	100.5		

表 4 银杏内酯 B 回收率试验

Tab. 4 Recovery of ginkgolide B

序号 (No.)	取样量 (sampling amount)/mg	含量 (original)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (mean)/%	RSD/%
1	52.93	0.323	0.711	1.017	105.8	105.1	2.5
2	52.22	0.319		0.998	103.6		
3	51.80	0.316		0.995	103.5		
4	51.59	0.315		1.018	106.9		
5	53.44	0.326		1.041	108.8		
6	50.90	0.310		0.978	101.8		



5 样品测定

按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“3”项

下色谱条件进行分析,3批银杏叶提取物的测定结果见表5。

表5 银杏叶提取物萜类内酯含量测定结果

Tab. 5 Determination of the content of terpene lactones in ginkgo leaf extract by HPLC-CAD

生产厂家 (manufacturer)	批号 (lot No.)	含量 (content) /%				总量 (total content) /%
		白果内酯 (bilobalide)	银杏内酯 C (ginkgolide C)	银杏内酯 A (ginkgolide A)	银杏内酯 B (ginkgolide B)	
贵州益佰 (Guizhou Yibai)	20161101	3.11	1.05	1.24	0.64	6.04
浙江康恩贝 (Zhejiang Conbe)	161014	3.04	1.05	1.23	0.63	5.95
贵州信邦 (Guizhou Xinbang)	20160901	3.18	1.05	1.22	0.63	6.08

注 (note): 含量测定结果未扣除水分 (moisture content was not deducted from the result of content determination)

6 讨论

6.1 银杏叶萜类内酯的测定方法 常用的检测方法有《中国药典》和美国药典采用的 HPLC-ELSD^[1,13]

及欧洲药典采用的 HPLC-IR^[14], 本实验比较了 CAD 与 ELSD 和示差折光检测器 (RID) 的灵敏度 (表6), 结果表明 CAD 的灵敏度优于 ELSD 和 RID。

表6 不同检测器灵敏度比较

Tab. 6 Sensitivity of different detectors

检测器 (detector)		白果内酯 (bilobalide)	银杏内酯 C (ginkgolide C)	银杏内酯 A (ginkgolide A)	银杏内酯 B (ginkgolide B)
检测下限 (LOD) /ng	电雾式检测器 (CAD)	4	6	10	10
	蒸发光散射检测器 (ELSD)	67	68	142	243
	示差折光检测器 (RID)	296	44	213	146
定量下限 (LOQ) /ng	电雾式检测器 (CAD)	14	14	28	27
	蒸发光散射检测器 (ELSD)	202	206	427	811
	示差折光检测器 (RID)	1 011	147	708	489

6.2 流动相 《中国药典》2015 年版银杏萜类内酯的含量测定方法, 采用正丙醇-四氢呋喃-水为流动相, 其中, 四氢呋喃具有腐蚀性, 正丙醇的沸点接近 100℃, 挥发性差, 容易导致 CAD 噪音增加。故本实验改用甲醇-水为流动相, 使得检测器噪音明显降低, 灵敏度提高。

6.3 线性关系 本文比较了 ELSD、CAD、RID 对银杏叶萜类内酯的线性关系, 结果表明, RID, 一元线性关系较好; ELSD 及 CAD, 二元线性及对数线性线性关系均较好。已有研究表明 CAD 在低浓度或浓度范围较窄的情况下, 校正曲线接近线性。

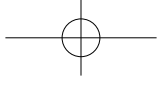
6.4 响应一致性 有文献报道^[15] CAD 的响应不依赖于化合物的化学结构, 而与分析物颗粒的质量有

关, 具有较为一致的响应值, 本文将各成分单位质量产生的峰面积以银杏内酯 A 为基准做比较, 比较几种银杏叶萜类内酯类的响应一致性, 并与 ELSD 做比较, 结果见表7, 可以看出 CAD 与 ELSD 比较, 响应值较为一致。

表7 银杏叶萜类内酯响应一致性比较

Tab. 7 Response uniformity of terpene lactones from ginkgo leaves

检测器 (detector)	白果内酯 (bilobalide)	银杏内酯 C (ginkgolide C)	银杏内酯 A (ginkgolide A)	银杏内酯 B (ginkgolide B)
CAD	0.74	0.99	1.00	1.23
ELSD	1.44	0.35	1.00	0.29



参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 416
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 416
- [2] 白长财, 柴兴云, 王海龙, 等. 利用电雾式检测器建立三七药材液相色谱指纹图谱[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(1): 54
BAI CC, CHAI XY, WANG HL, *et al.* HPLC fingerprint of Radix et Rhizoma Notoginseng with charged aerosol detector (CAD) [J]. J China Pharm Univ, 2009, 40(1): 54
- [3] VEHOVEC T, OBREZA A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(10): 1549
- [4] DIXON RW, PETERSON DS. Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging[J]. Anal Chem, 2002, 74(13): 2930
- [5] WIPE P, WERNER S, TWINING LA, *et al.* HPLC determinations of enantiomeric ratios[J]. Chirality, 2007, 19(1): 5
- [6] BRUNELLI C, GORECKI T, ZHAO Y, *et al.* Corona-charged aerosol detection in supercritical fluid chromatography for pharmaceutical analysis[J]. Anal Chem, 2007, 79(6): 2472
- [7] MOREAU RA. The analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector[J]. Lipids, 2006, 41(7): 727
- [8] BAI CC, HAN SY, CHAI XY, *et al.* Sensitive determination of saponins in Radix et Rhizoma Notoginseng by charged aerosol detector coupled with HPLC[J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2008, 32(2): 242
- [9] VERTZONI M, ARCHONTAKI H, REPPAS C. Determination of intraluminal individual bile acids by HPLC with charged aerosol detection[J]. J Lipid Res, 2008, 49(12): 2690
- [10] 王一博, 王春雨, 曲范娜, 等. 高效液相色谱-电雾式检测器同时测定猪、牛、羊、熊胆粉中 5 种胆汁酸的含量[J]. 分析化学, 2014, 42(1): 109
WANG YB, WANG CY, QU FN, *et al.* Simultaneous determination of five bile acids in Pulvis Fellis Suis, Pulvis Billis Bovis, Pulvis Fellis Caprinus and Pulvis Fellis Galli by high performance liquid chromatography-charged aerosol detector[J]. Chin J Anal Chem, 2014, 42(1): 109
- [11] SHINSUKE I, JUN ZM, TOSHIMASA T. Direct detection method of oligosaccharides by high performance liquid chromatography with charged aerosol detection[J]. Biomed Chromatogr, 2010, 21(4): 338
- [12] DIXON RW, BALTZELL G. Determination of levoglucosan in atmospheric aerosols using high performance liquid chromatography with aerosol charge detection[J]. J Chromatogr A, 2006, 1109(2): 214
- [13] USP 40-NF 35[S]. 2017: 7005
- [14] EP 9.0[S]. 2017: 1368
- [15] 刘路, 高旋, 杨永健. HPLC-电雾式检测器的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(3): 227
LIU L, GAO X, YANG YJ. Application of HPLC-charged aerosol detection[J]. Chin J Pharm, 2012, 43(3): 227

(本文于 2017 年 9 月 22 日收到)