

银杏叶中萜类内酯的稳定性研究

林春颖¹, 梁莉君², 曾翠梅¹(1. 广州中医药大学第三附属医院芳村分院, 广东 广州 510360; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院, 广东 广州 510120)

摘要: **目的** 以银杏叶中萜类内酯化合物的含量为指标, 评估其在不同环境下的稳定性。**方法** 将银杏叶在酸、碱、氧化、加热及光照的加速降解条件下放置后, 采用 HPLC 法测定银杏叶中银杏内酯 A、B、C 和白果内酯共 4 种萜类内酯的含量。色谱条件: 费罗门 C₁₈ 分析柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 甲醇-水 (30 : 70) 为流动相; 漂移管温度: 40 ℃; 氮气压强 3.4 bar。**结果** 银杏内酯 A、B、C 和白果内酯分别在 0.995~24.875 μg、0.568~14.200 μg、0.489~12.225 μg、0.495~12.375 μg 范围内线性关系良好, 在酸碱条件, 特别是酸性条件下出现降解现象。**结论** 银杏叶中的萜类内酯在酸及氧化条件下稳定性稍差, 储藏时需注意。

关键词: 银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 银杏内酯 C; 白果内酯; 稳定性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)06-0622-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.025

Study on Stability of Terpene Lactones from Ginkgo Leaf

LIN Chunying¹, LIANG Lijun², ZENG Cuimei¹(1. Fangcun Branch Hospital of the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510360 Guangdong, China; 2. Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the stability of terpene lactones from ginkgo leaf. **Methods** Ginkgo leaf was exposed to acids, alkalis, oxidation, heating and light for accelerating the degradation. And then the contents of terpene lactones of ginkgolide A, ginkgolide B, ginkgolide C and bilobalide in the compounds were determined by HPLC. The chromatographic conditions were as follows: Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5μm), mobile phase consisting of MeOH-H₂O (30 : 70), the temperature of drift tube being 40 ℃ and the nebulizer nitrogen pressure at 3.4 bar. **Results** The reliable liner range of ginkgolide A, ginkgolide B, ginkgolide C and bilobalide was 0.995~24.875 μg, 0.568~14.200 μg, 0.489~12.225 μg, 0.495~12.375 μg, respectively. The degradation of ginkgo leaf was obvious especially under acidic condition. **Conclusion** Terpene lactones from ginkgo leaf show instability in acidic and oxidation conditions, which should be noted during storage.

Keywords: Ginkgolide A; Ginkgolide B; Ginkgolide C; Bilobalide; Stability

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L 的干燥叶, 其化学成分较为复杂, 近 20 年来国内外学者对银杏叶提取物的化学成分、药理作用等分别进行了大量的研究。目前, 分析测定出银杏叶提取物(EGb)中含有 160 多种成分, 主要生理活性成分为黄酮类化合物及萜类内酯。此外, 还有有机酸、烷基酚和烷基酸、甾体化合物及微量元素^[1]。临床试验表明, 银杏叶提取物对心脑血管及外周血管循环障碍性疾病的疗

效颇为满意^[2]。其中, 银杏内酯包括银杏内酯 A、B、C、M、J 均为二萜内酯, 白果内酯(bilobalide, BB)为倍半萜内酯^[3], 它们是银杏叶提取物中的重要有效成分, 是特异血小板活化因子(PAF)拮抗剂^[4]。故本研究对银杏叶中萜类内酯进行稳定性观察。

1 仪器与试药

Agilent 2100 高效液相色谱仪, 包括 G1312A

收稿日期: 2013-05-15

作者简介: 林春颖, 女, 主管药师, 研究方向: 医院药学。Email: wing762929@163.com。

BinBump 双元泵, G1313 ALS 自动进样器, G1316A COLCOM 柱温箱, 美国 Agilent 公司; SEDEX85 LT-ELSD SEDERE 蒸发光检测器, 迪马公司; 银杏内酯 A、B、C 和白果内酯, 均购自中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110862, 110863, 110864, 110865; 甲醇(色谱纯, 分析纯), 乙酸乙酯、盐酸、醋酸钠、NH₄OH(分析纯), 广州化学试剂厂; 蒸馏水; 银杏叶饮片, 购自广东省中医院药房, 批号: 20120716。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: 费罗门十八烷基键合硅胶柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(30 : 70); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 蒸发光散射检测器参数: 漂移温度 40 ℃; 载气压强 3.4 bar; 进样量 20 μL。

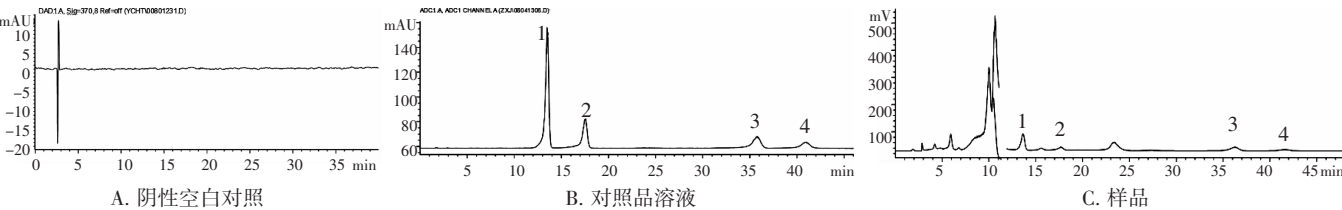
2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 和白果内酯对照品适量, 加入甲醇制成含量比例为 2 : 1 : 1 : 1 的混合溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取银杏叶 5 g, 剪细成小片,

精密称取 2 g 于碘量瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 超声处理 20 min, 放冷, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL 于 50 mL 圆底烧瓶中, 水浴蒸干, 残渣加蒸馏水 10 mL, 置水浴中温热使溶解, 加 2 % 盐酸溶液 2 滴, 用乙酸乙酯萃取 10 mL, 共 4 次, 合并乙酸乙酯层, 加 5 % 醋酸钠溶液 20 mL 萃取, 分取醋酸钠层, 用 10 mL 乙酸乙酯萃取, 合并所有乙酸乙酯层, 用蒸馏水萃取 2 次, 每次 20 mL, 分取水液每次用乙酸乙酯 10 mL 萃取, 合并所有乙酸乙酯层, 水浴蒸干, 残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容, 0.45 μm 微孔滤膜过滤即得。

2.4 系统适应性考察 任取一对照品溶液、供试品溶液连续进样 5 针, 测得白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 的塔板数在 5000~8000、平均分离度均大于 2, 拖尾因子在 0.9~1.1 之间, 表面系统适应性良好。

2.5 专属性考察 分别测定对照品、样品及不含有银杏叶提取溶剂的阴性空白对照溶液的 HPLC 图谱, 见图 1。



1. 白果内酯; 2. 银杏内酯 C; 3. 银杏内酯 A; 4. 银杏内酯 B

图 1 样品 HPLC 图谱

Figure 1 HPLC chromatogram of the sample

2.6 线性关系考察 分别精密吸取 2.2 项下所配制的对照品溶液 200, 400, 600, 800, 1000 μL 于 5 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 过滤(0.45 μm), 取样注入液相色谱仪, 以峰面积的常用对数为纵坐标, 以进样量的常用对数为横坐标, 得回归方程, 见表 1。

表 1 4 种萜类内酯的回归方程、相关系数和线性范围
Table 1 Regression equation, correlation coefficient and linear range of four kinds of terpene lactones

对照品	回归方程	相关系数	线性范围/μg
银杏内酯 A	$Y=1.4597X+2.9745$	0.9999	0.995~24.875
银杏内酯 B	$Y=1.4864X+3.7866$	0.9999	0.568~14.200
银杏内酯 C	$Y=2.5642X+1.7645$	0.9999	0.489~12.225
白果内酯	$Y=1.7568X+3.7865$	0.9998	0.495~12.375

2.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液 20 μL, 重复

进样 5 次, 银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的峰面积 RSD 分别为 3.4 %、4.2 %、1.9 %、2.2 %。

2.8 稳定性试验 取待测供试品溶液, 于 0, 2, 4, 6, 8 h 进行测定, 银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的峰面积 RSD 分别为 2.3 %、3.8 %、2.7 %、3.1 %。

2.9 重现性试验 取同一批次的银杏叶各 5 份, 按照 2.3 项供试品溶液制备项下操作, 按前述测定方法测定, 银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的含量 RSD 分别为 3.6 %、1.8 %、2.3 %、3.7 %, 表明重现性良好。

2.10 加样回收率试验 取同一批银杏叶 6 份, 每份约 2 g, 分别精密加入银杏内酯 A 对照品 0.939 mg, 银杏内酯 B 对照品 0.762 mg, 银杏内酯 C 对照品 1.274 mg 和白果内酯对照品 1.883 mg, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按照上述色谱条件进样测定,

平行测定 2 次, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 银杏叶中萜类内酯的加样回收率试验(n=6)

测定成分	样品含量/mg	对照品加入量/mg	测得值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
银杏内酯 A	2.0100	0.939	3.0410	103.13	100.3	1.7
	2.0109	0.939	2.9485	99.98		
	2.0106	0.939	2.9389	99.66		
	2.0111	0.939	2.8823	97.38		
	2.0108	0.939	2.9601	100.40		
	2.0110	0.939	2.9732	100.80		
银杏内酯 B	1.4700	0.762	2.1732	97.36	97.31	2.6
	1.4706	0.762	2.1513	96.38		
	1.4704	0.762	2.0999	94.08		
	1.4708	0.762	2.2753	101.90		
	1.4706	0.762	2.1601	96.78		
	1.4706	0.762	2.1720	97.31		
银杏内酯 C	3.3600	1.274	4.6835	101.10	100.4	1.5
	3.3615	1.274	4.7106	101.60		
	3.3609	1.274	4.6558	100.50		
	3.3619	1.274	4.7236	101.90		
	3.3613	1.274	4.5789	98.81		
	3.3617	1.274	4.5603	98.41		
白果内酯	3.0900	1.883	4.8814	98.16	97.06	1.4
	3.0914	1.883	4.7901	96.32		
	3.0908	1.883	4.8612	97.75		
	3.0917	1.883	4.8365	97.26		
	3.0912	1.883	4.8799	98.13		
	3.0915	1.883	4.7125	94.76		

2.11 样品测定^[4-5] 分别取同一批次银杏叶约 10 g (W_样), 参照 2010 版第二分册附录, 在酸、碱、氧化、加热及光照条件下进行加速降解实验, 加速条件见表 3, 同时留样一份, 控制条件: 温度 25 ℃, 相对湿度低于 75 %, 无酸碱, 避光真空条件下保存作为对比样品, 取约 10 g (W_对) 平行测定, 对银杏叶的稳定性进行考察。将加速降解各样品在完成实验后按照 2.2 项下进行操作, 将测得的峰面积与对比样品进行对比, 比值=(峰_样/W_样)/(峰_对/W_对)。在忽略误差情况下, 比值约为 1, 表明样品稳定, 低于 1, 说明样

表 3 加速降解实验结果

样品的降解条件	时间	银杏内酯	银杏内酯	银杏内酯	白果内酯
		A 比值	B 比值	C 比值	比值
酸(0.1 mol/L HCl, 室温)	160 h	0.93	0.98	0.87	0.82
碱(0.01 mol/L NH ₄ OH, 室温)	3 h	0.71	0.93	1.01	0.67
氧化(3 % H ₂ O ₂ , 室温)	12 h	0.99	0.99	1.02	0.99
加热(60 ℃)	2 个月	1.00	1.02	1.04	1.02
光照(3000 Flux)	7 周	1.01	0.99	1.06	1.03

品发生了降解, 越低表明降解越明显。

从数据可知, 银杏内酯 A 对酸和碱较为敏感, 特别是在碱性条件下降解更为明显, 降解了约 30 %, 而银杏内酯 B 在各条件下较为稳定, 银杏内酯 C 则对酸较为敏感, 降解了 13 %, 白果内酯同样在酸碱条件下不稳定, 但是在碱性条件下更不稳定, 含量下降了约 33 %。

3 讨论

实验发现, 银杏叶提取物所含内酯类成分紫外吸收较差, λ_{max}=219 nm, 且含量较低, 如采用常用的紫外检测器, 受试剂影响很大, 使分析很难进行, 而如果采用示差检测器则灵敏度、稳定性和选择性均相对较差; 而 ELSD 蒸发光检测器为质量型检测器, 且不受外部环境的干扰, 试剂在检测器中全部蒸发, 不干扰检测, 灵敏度及稳定性亦能符合含量测定的要求, 故选用蒸发光检测器。

如果某一成分在某药材中含量 C 不变, 则表示该成分稳定, 而 C 用 HPLC 测定时, 单位质量的 C 则与峰面积成正比, 特别是固定检测条件下, 其误差几乎忽略, 因此, 成分是否降解, 可以通过 C_样/C_对=(峰_样/W_样)/(峰_对/W_对) 来评价, 一般认为, 低于 1 表示发生了降解。

从数据结果可知, 4 种内酯对酸碱变化, 特别是在碱性条件下稳定性较差, 这可能与内酯开环有关, 而在氧化、加热及强光条件下非常稳定。然而, 银杏内酯 C 在碱性条件下亦十分稳定, 这可能与其空间结构有一定的关系, 需进一步探讨。

鉴于时间及条件限制, 我们在考察各加速条件时, 并未将两两因素或更多条件叠加进行考察, 因此, 建议在储藏该药材及相关制剂时, 尽量避免恶劣环境。

参考文献:

[1] Ta VB, Taylor LT. Sample preparation of standardized extracts of Ginkgo biloba of supercritical fluid extraction[J]. Phytochemical Analysis, 1996, 7: 185-189.

[2] Teris A, Van B, Gerrit P. Preparative isolation and separation procedure for Ginkgolides A, B, C, Jand Bilobalide[J]. J Nat Prod, 1997, 60(7): 735-738.

[3] 杨顺年. 探讨银杏叶制剂的药理与临床应用 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(4): 62-63.

[4] 沙东旭, 张满来. 高效液相色谱蒸发光散射测定银杏叶软胶囊中 4 种萜类内酯的含量[J]. 中国药品标准, 2004, 5(3): 62-63.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 194, 199.

(编辑: 宋威)