

高效液相色谱分析银杏萜内酯的含量

李典鹏, 方宏, 梁小燕, 陈海珊, 文永新

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

R 931.71
R 927.2

摘要: 用高效液相色谱法测定银杏叶及提取物中银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的含量。采用 C₁₈ 分离柱, 示差检测器, 甲醇:水 (33:67) 为流动相, 方法回收率平均达 97% 以上, 变异系数 (CV) 为 2.1%。

关键词: 高效液相色谱; 银杏内酯 A、B、C; 白果内酯; 银杏叶提取物

中图分类号: Q946.851 文献标识码: A

Determination of lactone in extract of *Ginkgo biloba* leaves by high performance liquid chromatography (HPLC)

LI Dian-peng, FANG Hong, LIANG Xiao-yan, CHEN Hai-shan, WEN Yong-xin

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and Academia Sinica, Guilin 571129, China)

Abstract: A HPLC method had been developed for the determination of Ginkgolide A, B, C and Bilobalides in *Ginkgo biloba* leaves and its extract. A C₁₈ column using methanol, water (33:67) as mobile phase, and RI detector was used. The results have shown that the recoveries are over 97% and CV is 2.1%.

Key words: HPLC; Ginkgolide A, B, C; Bilobalide; extract of *Ginkgo biloba* L.

银杏叶中存在两类重要生理活性物质——黄酮类化合物 (flavonoids) 和萜内酯 (ginkgolides and bilobalide)。银杏叶黄酮类化合物具有捕获游离基、清除活性氧, 促进血液循环及脑代谢等功能, 萜内酯是银杏叶中所含的另一类重要有效成分, 尤其是银杏内酯 B 作为有效的血小板活化因子 (PAF) 拮抗剂在医药界已得到肯定, 白果内酯在治疗神经疾病中亦有良好的疗效, 90 年代以来, 国外有关银杏叶萜内酯的分析研究工作发表了多篇论文^[1, 2, 3], 但由于银杏叶成分复杂, 萜内酯在银杏叶中的含量很低, 需要经分离、纯化后才能进行测定, 预处理步骤较为复杂, 这就不可避免地造成对测定成分的损失, 且内酯的特征紫外吸收峰很弱, 用 UV 检测不灵敏。国内虽已有用高效液相色谱测定萜内酯的报道^[4], 但仅测定了银杏内酯 B 的含量。本研究通过简化预处理步骤, 并以

收稿日期: 1999-01-01

作者简介: 李典鹏 (1969-), 男, 助理研究员, 从事植物化学研究工作。

RI 检测器代替通常用的 UV 检测, 采用外标法对银杏叶及其提取物中萜内酯含量进行高效液相色谱分析。该方法简便可行、准确、精度高、适用性强。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

美国 Waters 公司高效液相色谱仪采用 510 泵, 810 色谱工作台、U6K 手动进样器、Waters410RI 检测器、梅特勒 AT200 电子天平。

1.2 试剂与样品

重蒸水(自制, Millipore HA0.45 μ m 滤膜过滤)、甲醇(色谱纯, Millipore FA0.5 μ m 滤膜过滤)、醋酸乙酯(分析纯)、白果内酯(Bilobalide)和银杏内酯 A、B(Ginkgolide A、B), 均自 Sigma 公司, 溶解于甲醇中、配制成 1mg/mL, 银杏叶采自本所银杏种植园, 银杏叶提取物自制。

2 样品处理

2.1 银杏叶提取物样品制备方法 准确称取银杏叶提取物 600 mg 于 100 mL 锥形瓶中, 加入 30 mL 5% 甲醇水溶液, 在 150 $^{\circ}$ C 油浴中煮沸 10~15 min, 冷却后, 溶液过滤至另一锥形瓶, 滤渣用少量热水洗 3~4 次, 滤液合并, 加 5% HCl 数滴调 pH 值 3~4 左右, 用醋酸乙酯萃取 6~7 次, 合并醋酸乙酯部分以水洗至水液呈中性, 再减压回收醋酸乙酯部分, 真空抽干至无醋酸乙酯味。以甲醇定容至 10 mL 容量瓶, 摇匀, 过滤, 待进样。

2.2 银杏叶样品制备方法 银杏叶经低温干燥粉碎后准确称重 5 g 于 100 mL 锥形瓶, 加 15% 甲醇 50 mL 回流提取 0.5 h, 提取液在小布氏漏斗上用滤纸趁热真空过滤, 叶渣重新放到锥形瓶中, 用 15% 甲醇以相同程序进行二次提取, 过滤后用 5 mL 50% 甲醇洗涤瓶子, 2 次滤液和洗液合并, 上至装有 5 g 聚酰胺的柱中, 用 15% 甲醇 50 mL 洗脱, 流出液合并, 减压回收, 蒸发至小体积, 以 5% HCl 调 pH 3~4, 以下步骤与银杏叶提取物的制备方法相同。

3 方法与结果

3.1 色谱条件 色谱柱: Spherisorb RP-18 (10 μ m) 250 \times 4 mm。流动相: 甲醇: 水 (33:67); 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 流速: 1 mL/min。进样量 10 μ L。

数据处理方法采用峰面积外标法的定量程序。

3.2 标准曲线与重现性 准确称取银杏内酯 A、银杏内酯 B、白果内酯各 5.0 mg 于 5 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度,

微量进样器分别进样 2 μ L、4 μ L、8 μ L、12 μ L、16 μ L、20 μ L 于高效液相色谱仪, 记录峰面积。峰面积对浓度进行回归计算, 得回归方程: 银杏内酯 A: $y=0.743x-0.032$ ($r=0.9986$)、银杏内酯 B: $y=0.726x-0.175$ ($r=0.9967$)、和白果内酯 $y=0.767x+0.131$ ($r=0.9973$), 线性良好。

另取上述标准品液进样 10 μ L, 共进样 7 次, 得变异系数均在 2.5% ($n=7$) 以内。

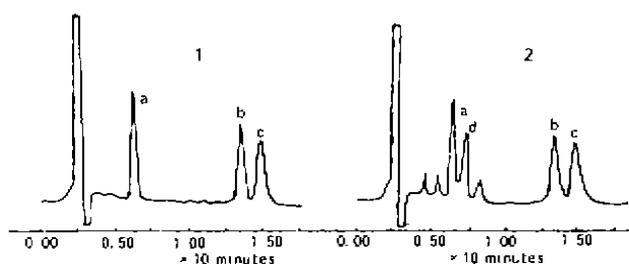


图 1 银杏叶内酯类化合物色谱图
Fig.1 The chromatogram of all Ginkgo lactones
1. Chromatogram of standards; 2. Chromatogram of samples.
a. 白果内酯(Bilobalide); b. 银杏内酯 A(Ginkgolide A);
c. 银杏内酯 B(Ginkgolide B); d. 银杏内酯 C(Ginkgolide C).

3.3 回收率考察

在数份银杏提取物样品中, 分别准确加入萜内酯对照品 1.00 mg, 然后按样品前处理法进行处理, 以 10 μ L 进样量进样测定各萜内酯回收率。结果见表 1:

3.4 样品测定

按银杏叶提取物及银杏叶样品处理方法, 分别对不同批号的银杏提取物及不同产地、不同采集时间的银杏叶进行测定, 结果见表 2。

4 讨论

在样品净化处理过程中, 我们用醋酸乙酯进行萃取, 醋酸乙酯较难除去且残留的醋酸乙酯峰对样品峰有干扰, 因此样品在最后步骤必须真空干燥, 将醋酸乙酯除尽。

由于缺乏银杏内酯 C 对照品, 在此, 我们根据分子量相似原理, 暂以银杏内酯 B 对照品对银杏内酯 C 进行外标法定量。

从测量结果我们看出, 不同的处理工艺 (银杏叶提取物 I、II、III 号为不同工艺) 得出的产品萜内酯含量不一样, 有些工艺对白果内酯的损失较大, 另外, 不同产地、不同采收期的银杏叶其萜内酯含量均有一定差异。

本研究承蒙本所成桂仁研究员指导、审阅, 陈秀珍高工参加部分工作, 在此一并致谢。

参考文献:

- (1) Pietta P G, Mauri P L, Rava A, Analysis of terpenes from *Ginkgo Biloba* L. Extracts by Reversed phase High-Performance Liquid chromatography [J]. *Chromatographia*, 1990, 29 (5 / 6), 251~253
- (2) Beek T A Scheeren H A Lelyveli G P, Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals [J] *Journal of Chromatography* 1991, 543: 375~387
- (3) Sticher, O, Quality of Ginkgo Preparations [J]. *Planta Med.*, 1993, 59: 2~11
- (4) 虞杏英, 庄向平, P. Braquaet, 等. 高效液相色谱分析银杏内酯B [J]. 药物分析杂志, 1993, 13 (2): 85

表 1 银杏各萜内酯的回收率

Table 1 Recoveries of Ginkgolides and Bilobalide

待测成分 component	银杏内酯 A Ginkgolide A	银杏内酯 B Ginkgolide B	白果内酯 Bilobalide
加入量 Added(mg)	1.0	1.0	1.0
测得量 Found(mg)	0.98 1.01 1.02 0.97 0.99	0.97 1.02 0.96 0.98 0.96	0.98 0.97 0.95 0.99 0.98
回收率 Recovery(%)	98.0 101.0 102.0 97.0 99.0	97.0 102.0 96.0 98.0 96.0	98.0 97.0 95.0 99.0 98.0
平均回收率 Average recovery(%)	99.4	97.8	97.4
CV(%)	2.1	2.5	1.8

表 2 不同样品的银杏萜内酯含量分析结果

Table 2 Content of Ginkgolides and Bilobalide in different samples

组分含量 Content	银杏叶提取物 Extract of <i>Ginkgo biloba</i> leaves			广西产银杏绿叶 (采收期 97.7) Green leaves from Guangxi province	广西产银杏黄叶 (采收期 97.11) Yellow leaves from Guangxi province	云南产银杏绿叶 (采收期 96.7) Green leaves from Yunnan province
	I 号	II 号	III 号			
白果内酯 Bilobalide(%)	1.60	0.31	4.28	0.041	未检出	0.110
银杏内酯 A Ginkgolide A(%)	2.67	2.68	3.09	0.067	0.043	0.071
银杏内酯 B Ginkgolide B(%)	0.91	1.35	1.54	0.031	0.035	0.045
银杏内酯 C Ginkgolide C(%)	1.10	0.45	1.98	0.023	0.011	0.028
总萜内酯 Total lactone(%)	6.28	4.79	10.89	0.162	0.089	0.254