

酸提碱沉-三氯甲烷萃取法进行比较,同时对样品进行了回流提取与超声提取的对比研究。结果显示,选择甲醇超声提取药材时,提取效果好、效率高。

本实验将薄层色谱与高效液相色谱法结合,该质量评价方法较以往单一评价指标更科学、系统。通过对广西不同时节、部位排钱草药材中有效成分含有量的测定结果可知,其叶与枝均不含 *N*, *N*-二甲基色胺,而根部则含有该成分,但由于其含有量较低,所以在薄层色谱中没有检测到相应斑点,而利用敏感度较高的 HPLC 色谱则检测到这一特征吸收峰。同时,排钱草的叶、枝、根部均含有 5-甲氧基-*N*, *N*-二甲基色胺,并且在 9 月份药材根部中,其含有量最高,另外叶中该成分的含有量明显高于枝。综上所述,在今后的质量控制中,应主要选择广西 9 月排钱草药材的根部进行重点研究,可达到更好的试验效果,而其他地方不同时节排钱草药材中有效成分的含有量测定还需作进一步研究。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海科学

技术出版社,1986: 2092.

- [2] 黄洁玲,钟鸣,余胜民,等. 排钱草总生物碱对人肝星状细胞增殖及肝纤维化相关胶蛋白、细胞因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13): 283-286.
- [3] 罗崇念,卞庆亚,王硕. 排钱草的药理研究与临床应用[J]. 广西医科大学学报,2009,26(1): 158-160.
- [4] 钟鸣,余胜民,杨增艳,等. 排钱草总生物碱对免疫性肝纤维化大鼠 I、III、IV 型胶原及 TGF- $\beta_1$  表达的影响[J]. 中西医结合肝病杂志,2005,15(1): 38-40.
- [5] 黄琳芸,钟鸣,杨增艳,等. 排钱草总生物碱对肝纤维化大鼠血清干扰素- $\gamma$  和肝脏组织病理学的影响[J]. 中国中药科技,2006,13(2): 101-102.
- [6] Joshi K C, Bansal R K, Singh P, et al. Components of the stem barks of *Phyllarthron-comorensense* and *Jacaranda-mimosaeifolia* and the roots of *Desmodium pulchellum* [J]. *Indian J Chem*, 1975, 13(8): 869-870.
- [7] Shen C C, Wang S T, Tsai S Y, et al. Cinnamylphenols from *Phyllodium pulchellum* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(5): 791-793.
- [8] 干宁,李天华,杨欣,等. 毛排钱草的化学成分分析及抗肿瘤活性研究[J]. 中草药,2009,40(6): 852-856.

## HPLC-ELSD 法同时测定不同产地白果药材中 4 种萜内酯类成分

张群群<sup>1</sup>, 李慧芬<sup>1,2</sup>, 张学兰<sup>1,2\*</sup>, 吴鹏<sup>1</sup>, 王均秀<sup>1</sup>, 宋梦晗<sup>1</sup>, 赵鑫<sup>1</sup>

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 国家中医药管理局中药炮制传承基地, 山东 济南 250355)

摘要: 目的 建立 HPLC-ELSD 法同时测定白果药材中白果内酯和银杏内酯 A、B、C。方法 白果乙酸乙酯萃取物的分析采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水 (38 : 62); 柱温 30  $^{\circ}$ C, 体积流量 0.8 mL/min。结果 白果内酯和银杏内酯 A、B、C 分别在 1.01 ~ 40.40  $\mu$ g、1.03 ~ 41.20  $\mu$ g、2.37 ~ 94.80  $\mu$ g、1.51 ~ 60.40  $\mu$ g 范围内线性关系良好 ( $r > 0.9995$ ), 平均回收率在 97.3% ~ 99.2% 之间。5 个不同产地 (山东济南、临沂、泰安, 广西桂林和江苏泰兴) 白果药材中四者的含有量分别为 75.55 ~ 219.73、54.79 ~ 135.88、200.37 ~ 853.39、119.31 ~ 498.06  $\mu$ g/g。结论 白果中 4 种萜内酯类成分的总含有量以江苏省泰兴市产者为最高。

关键词: 白果; 白果内酯; 银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 银杏内酯 C; 产地; HPLC-ELSD

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)01-0133-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2016.01.030

## Simultaneous determination of four terpene lactones in *Ginkgo Semen* from dif-

收稿日期: 2015-07-13

基金项目: 济南市高校自主创新计划项目 (201303027)

作者简介: 张群群 (1988—), 女, 硕士, 从事中药新药研发与中药炮制原理研究。Tel: 18753151090, E-mail: zhangqunqun01@163.com

\* 通信作者: 张学兰 (1963—), 女, 教授, 从事中药新药研发与中药炮制原理研究。Tel: (0531) 89628081, E-mail: zhang8832440@si-

na.com

## ferent growing areas by HPLC-ELSD

ZHANG Qun-qun<sup>1</sup>, LI Hui-fen<sup>1,2</sup>, ZHANG Xue-lan<sup>1,2\*</sup>, WU Peng<sup>1</sup>, WANG Jun-xiu<sup>1</sup>, SONG Meng-han<sup>1</sup>, ZHAO Xin<sup>1</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Traditional Chinese Medicine Processing Technology Helitage Base, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish a method for simultaneously determining the contents of bilobalide and ginkgolide A, B, C in *Ginkgo Semen* by HPLC-ELSD. **METHODS** The analysis of *Ginkgo Semen* ethyl acetate extract was performed on Kromasil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase was methanol-0.1% methanoic acid water (38:62), column temperature was maintained at 30 °C, and flow rate was 0.8 mL/min. **RESULTS**

Bilobalide and ginkgolide A, B, C had good linear relationships in the ranges of 1.01 - 40.40 μg, 1.03 - 41.20 μg, 2.37 - 94.80 μg and 1.51 - 60.40 μg, respectively ( $r > 0.9995$ ). Their average recoveries were 97.3% - 99.2%. The contents of these four constituents in *Ginkgo Semen* from five different growing areas (Jinan, Linyi, Taian in Shandong, Guilin in Guangxi and Taixing in Jiangsu) were 75.55 - 219.73 μg/g, 54.79 - 135.88 μg/g, 200.37 - 853.39 μg/g and 119.31 - 498.06 μg/g, respectively. **CONCLUSION** The total contents of four terpene lactones in *Ginkgo Semen* is the highest in Taixing (Jiangsu).

**KEY WORDS:** *Ginkgo Semen*; bilobalide; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgolide C; growing areas; HPLC-ELSD

白果为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥成熟种子, 其味甘、苦、涩, 性平, 有毒, 具有敛肺定喘、止带缩尿的功能<sup>[1]</sup>, 含有银杏酸、萜内酯、黄酮等成分<sup>[2-3]</sup>, 其中萜内酯类化合物有银杏内酯 A、B、C 和白果内酯等<sup>[4-5]</sup>。研究表明, 银杏酚酸类成分具有致敏性、细胞毒性和免疫毒性, 为白果的主要毒性成分<sup>[6]</sup>; 白果萜内酯是血小板活化因子的拮抗剂, 对心脑血管疾病具有独特的药理作用, 广泛用于治疗和预防心脑血管疾病<sup>[7]</sup>; 白果内酯具有提高痴呆小鼠的学习记忆功能和抗卡氏肺孢子虫肺炎作用<sup>[8-9]</sup>。关于白果药材的质量标准, 《中国药典》2010年版一部仅记载了成品的外观性状、粉末的显微特征及薄层色谱的定性鉴别, 缺乏有效成分或指标成分的含有量测定指标和参数, 难以控制白果药材的质量。李转梅等<sup>[10]</sup>建立了白果药材及炮制品中白果酸和总银杏酸含有量的测定方法, 罗曼等<sup>[11]</sup>建立了白果仁萜内酯类成分的 HPLC-ELSD 指纹图谱定性分析方法, 但未见对白果中萜内酯成分定量测定的相关报道。目前, 银杏叶及其制剂中该类成分的定量测定方法有 HPLC-ELSD、HPLC-MS/MS、UPLC-TQ-MS 等<sup>[12-14]</sup>。本实验建立了 HPLC-ELSD 同时测定白果药材中白果内酯和银杏内酯 A、B、C 的方法, 并测定了 5 个不同产地、批次白果药材中这些成分的含有量, 可为其质量控

制和评价提供科学依据。

### 1 仪器与试剂

Waters e2695 型 HPLC 色谱仪、e2424 型蒸发光散射检测器 (美国 Waters 公司); FA1604N 型电子天平 (十万分之一, 上海精密科学仪器有限公司); KQ-250E 型医用超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 对照品 (中国食品药品检定研究院, 供含有量测定用, 批号分别为 110865-200605、110862-200608、110863-200508、110864-200906)。HPLC 用甲醇为色谱纯; 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂均为分析纯。

白果药材的产地分别为山东省济南市长清区、临沂市、泰安市、广西省桂林市、江苏省泰兴市, 经山东中医药大学中药鉴定教研室李峰教授鉴定为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的成熟种子。除去杂质, 50 °C 下烘干, 备用。

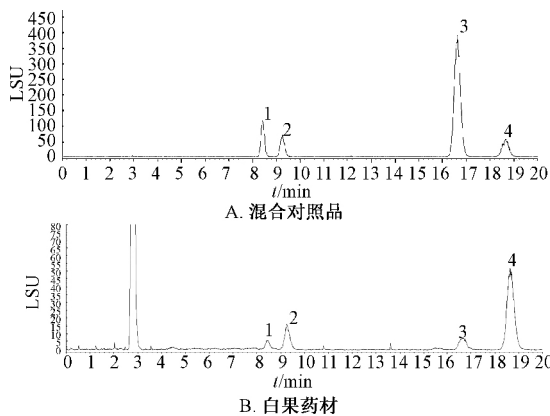
### 2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取白果内酯 5.05 mg、银杏内酯 A 5.15 mg、银杏内酯 B 4.74 mg、银杏内酯 C 3.02 mg, 置于 1 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品溶液。分别吸取四种对照品溶液 0.2、0.2、0.5、0.5 mL, 置于同一 2 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀,

制成每 1 mL 含白果内酯 0.505 mg、银杏内酯 A 0.515 mg、银杏内酯 B 1.185 mg、银杏内酯 C 0.755 mg 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取各样品粉末(过3号筛)5 g,分别置于索氏提取器中,加甲醇80 mL,水浴回流提取6 h至无色,减压回收甲醇蒸干,残渣加水20 mL,70℃水浴温热使其溶解。再往里加2%稀盐酸溶液2滴,乙酸乙酯萃取3次(15、10、10 mL),合并提取液,5%乙酸钠溶液20 mL洗涤,洗液再用乙酸乙酯10 mL洗涤,合并乙酸乙酯液及洗液,纯水洗涤2次,每次20 mL,合并水洗液,10 mL乙酸乙酯洗涤,合并乙酸乙酯液,回收至干,残渣用甲醇溶解,转移至1 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3 色谱条件 Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.1%甲酸水(38:62);柱温30℃;体积流量0.8 mL/min;蒸发光检测器的漂移管温度60℃;载气流量25 L/min。在上述条件下,白果内酯和银杏内酯A、B、C与其他成分均可达到基线分离,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  
1. bilobalide 2. ginkgolide C 3. ginkgolide A 4. ginkgolide B

图1 混合对照品与白果药材的HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of mixed reference substances and *Ginkgo Semen* samples

2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液2、10、20、40、80 μL,注入HPLC色谱仪,在“2.3”项色谱条件下进行测定,记录色谱峰峰面积,以进样量(μg)对数为横坐标(X),峰面积对数为纵坐标(Y)进行线性回归,计算回归方程。结果,各成分线性关系良好,见表1。

表1 4种内酯类成分的线性关系

Tab.1 Linear relationships of four terpene lactones

化合物	回归方程	r	线性范围/μg
白果内酯	$Y = 1.7786X + 3.8718$	0.9996	1.01 ~ 40.40
银杏内酯 A	$Y = 1.8335X + 4.3585$	0.9995	1.03 ~ 41.20
银杏内酯 B	$Y = 1.3624X + 4.3043$	0.9996	2.37 ~ 94.80
银杏内酯 C	$Y = 1.1522X + 4.3902$	0.9998	1.51 ~ 60.40

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(山东省济南市长清区)10 μL,注入HPLC色谱仪,连续进样6次,测定白果内酯和银杏内酯A、B、C的峰面积。结果,RSD分别为1.5%、1.5%、1.5%和1.8%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(山东省济南市长清区)适量,室温下分别在0、2、4、8、12、24 h进样10 μL,测定白果内酯和银杏内酯A、B、C的峰面积。结果,RSD分别为1.6%、1.3%、1.9%、1.8%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一产地白果药材粉末(山东省济南市长清区,过3号筛)6份,每份5 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取10 μL,在“2.3”项色谱条件下测定,计算白果内酯和银杏内酯A、B、C的含有量。结果,四种成分的平均含有量分别为80、57、204、141 μg/g,RSD分别为1.1%、1.9%、1.9%、2.5%,表明该方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验 精密称取含有量已知的白果药材(山东省济南市长清区,过3号筛)6份,每份2.5 g,精密加入白果内酯(0.01951 g/L)、银杏内酯A(0.01326 g/L)、银杏内酯B(0.05092 g/L)、银杏内酯C(0.03451 g/L)对照品溶液1 mL,甲醇补足至80 mL,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取10 μL,在“2.3”项色谱条件下测定,结果见表2。

2.9 样品测定 精密吸取混合对照品和供试品溶液各10 μL,注入HPLC色谱仪进行分析测定,计算样品中4种内酯类成分的含有量,结果见表3。

### 3 小结与讨论

白果萜内酯类成分在紫外末端有吸收,HPLC-UV测定时灵敏度低,杂质干扰大,重复性差。本实验首次建立了HPLC-ELSD法同时定量测定不同产地白果药材中白果内酯和银杏内酯A、B、C的含有量,对提取溶剂50%、70%、100%甲醇进行

表2 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests (n=6)

化合物	称样量/原有量		加入量/测得量		回收率/ %	平均回 收率/ %	RSD/ %
	g	μg	μg	μg			
白果内酯	2.502 8	199.82	195.1	385.3	95.1	97.3	2.1
	2.562 6	204.59	195.1	400.3	100.3		
	2.512 9	200.63	195.1	393.9	99.1		
	2.526 2	201.69	195.1	388.0	95.5		
	2.572 6	205.40	195.1	393.0	96.2		
	2.551 8	203.73	195.1	393.8	97.4		
银杏内酯 A	2.502 8	137.13	132.6	265.4	96.7	98.0	2.3
	2.562 6	140.40	132.6	273.2	100.1		
	2.512 9	137.68	132.6	264.2	95.4		
	2.526 2	138.41	132.6	272.0	100.8		
	2.572 6	140.95	132.6	268.0	95.8		
银杏内酯 B	2.502 8	512.20	509.2	1025.4	100.8	97.6	2.2
	2.562 6	524.44	509.2	1029.0	99.1		
	2.512 9	514.28	509.2	1012.2	97.8		
	2.526 2	517.00	509.2	1002.7	95.4		
	2.572 6	526.50	509.2	1021.4	97.2		
银杏内酯 C	2.502 8	351.43	345.1	690.1	98.1	99.2	1.5
	2.562 6	359.82	345.1	703.9	99.7		
	2.512 9	352.85	345.1	701.5	101.0		
	2.526 2	354.72	345.1	700.1	100.1		
	2.572 6	361.23	345.1	695.0	96.7		
2.551 8	358.31	345.1	701.1	99.3			

表3 4种萜内酯成分含有量的测定结果 (μg/g, n=2)

Tab. 3 Determination results of the contents of four ter-pene lactones (μg/g, n=2)

产地	白果 内酯	银杏内酯			总含 有量
		A	B	C	
山东省济南市长清区	79.84	54.79	204.66	140.42	479.70
山东省济南市长清区	79.45	57.96	200.37	144.24	482.02
山东省临沂市	111.37	90.45	301.53	210.80	714.15
山东省临沂市	113.21	94.60	294.89	199.68	702.38
山东省泰安市	82.19	63.65	277.64	166.75	590.24
山东省泰安市	79.81	63.04	277.41	167.43	587.69
广西省桂林市	77.47	60.22	372.04	133.57	643.31
广西省桂林市	75.55	59.40	368.34	119.31	622.61
江苏省泰兴市	219.73	135.88	853.39	498.06	1707.06
江苏省泰兴市	216.85	135.20	832.62	488.68	1673.36

比较,发现以甲醇为溶剂提取的4种萜内酯成分总含有量最高;对甲醇索式回流6h和甲醇超声1h进行比较,发现前者提取效果较好,而且色谱峰峰形理想,同时还对流动相等参数进行了考察。综上所述,该方法简便、可靠、有效,可用于白果药材中白果内酯和银杏内酯A、B、C成分的测定,为

其质量控制提供一定参考。

不同产地、批次白果药材中白果内酯和银杏内酯A、B、C成分的含有量相差较大,四者总含有量最高者是最低者的4倍。因此,建议将这4种成分的含有量限度纳入白果药材质量标准中,以期更全面地控制其质量。

由于白果中内酯类成分的含有量较低,测定时取样量大,而且甲醇提取液中含有较多色素等杂质,干扰测定,对仪器损害严重,故需作进一步纯化。本实验采用乙酸乙酯萃取法,将四种萜内酯类成分充分转移到乙酸乙酯中,可排除色谱测定时杂质的干扰,而且它们与其他成分分离度良好。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 100.
- [2] 傅丰永,于德泉,宋维良,等. 白果化学成分的研究[J]. 化学学报, 1992, 28(1): 52-56.
- [3] 王 琴,温其标. 银杏种仁中活性成分及其药理作用的研究进展[J]. 现代食品科技, 2006, 22(1): 164-167.
- [4] 周桂生,姚 鑫,唐于平,等. 白果仁化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(17): 1362-1366.
- [5] 周桂生,姚 鑫,唐于平,等. 银杏中种皮化学成分的分离及鉴定[J]. 植物资源与环境学报, 2013, 22(4): 108-110.
- [6] 杨剑婷,吴彩娥. 白果致过敏成分及其致敏机理研究进展[J]. 食品科技, 2009, 34(6): 282-286.
- [7] 叶 敏,果德安. 银杏萜内酯的研究概况[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2003, 5(1): 33-38.
- [8] 黄 欢,曹明成,朱正义,等. 白果内酯对血管性痴呆小鼠的保护作用[J]. 安徽医药, 2013, 17(3): 383-386.
- [9] 唐小葵,倪小毅,陈雅棠,等. 白果内酯抗大鼠卡氏肺孢子虫肺炎的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(10): 851-853.
- [10] 李转梅,张学兰,李慧芬,等. 白果不同部位及不同炮制品中白果酸和总银杏酸定量比较[J]. 中成药, 2015, 37(1): 164-168.
- [11] 罗 曼,鲍家科,熊慧林,等. 白果仁萜类内酯成分指纹图谱研究[J]. 中成药, 2011, 33(9): 1465-1469.
- [12] 巩丽丽,田景振. HPLC-ELSD法测定银杏叶提取物中萜内酯含量[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(1): 69-70.
- [13] 沈 涛,高彦慧,娄红祥. LC-MS/MS快速测定不同采摘时间银杏叶中银杏内酯和白果内酯的含量[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(5): 380-383.
- [14] 姚 鑫,周桂生,唐于平,等. 基于UPLC-TQ-MS考察不同树龄果用银杏叶萜内酯含量变化规律[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 376-380.