

高效薄层色谱 (HPTLC) 测定银杏叶中的银杏内酯 A、B、C 及白果内酯



作者：从左到右。前排：Dmitry demchenko、Dr.Svetlana Ivanova、Dr. Vera Kosman 后排：Dr. Irina Urakova、Prof.Dr.Alexander Shikov、Dr.Marine Karlina、Dr.Olga Pozharitskaya

圣彼得堡药理学研究所标准化与新技术系使用多种色谱分离技术，特别是应用平面色谱技术开发定性定量的分析方法，用于药用植物、天然产品研究以及药品中萜类、酚类、维生素类以及其它生物活性成分的检测。

简介

银杏是世上最古老树种之一、银杏科唯一至今仍存活的一个种。该植物的特征性成分是二萜内酯类(银杏内酯与白果内酯)与黄酮类成分。银杏内酯是一类含 20 个碳原子的带笼状结构二萜化合物，该类成分为银杏叶所特有。已知的 5 个银杏内酯有：银杏内酯 A、B、C、J、M，以及含相似结构的 15 个碳的倍半萜白果内酯(常与二萜归为一类)。银杏内酯 A 与 B 具有调节糖皮质激素合成的作用，银杏内酯 B 和白果内酯具有抗细胞凋亡的活性。由于在治疗记忆相关的病痛的良好声望，银杏叶引起了巨大的关注。

目前已报道了 HPLC、TLC、GC 及 MPLC (中压层析) 等多种分析技术检测和分离银杏叶及其提取物与植物药制剂中银杏内酯与白果内酯。本研究描述了一种适合在实验室日常分析中采用的经济方便的高效薄层色谱方法检测银杏叶及其产品中主要萜类化合物(银杏内酯 A、B、C 及白果内酯)的方法，该方法也同样适用于研究该类制剂的体外释放率。

对照品溶液的制备

银杏内酯 A、B、C 与白果内酯配成浓度为 1.0 mg/ml 的甲醇溶液。

供试品溶液的制备

银杏叶样品于 2007 年采自圣彼得堡植物园，40℃干燥，粉碎，取 30 g 用 400 ml 水煮沸 20min，滤过，滤液加入活性炭 10 g，室温下搅拌 12 小时，离心 (1000 g, 15 min)，弃去上清液，活性炭用 20 ml 丙酮混悬，滤过，滤液蒸干，残渣于点样前加 3 ml 甲醇溶解，作为供试品溶液。

溶出度研究

银杏叶水提取物制成的硬胶囊，在 37℃ 下篮法进溶出度试验，水、人工胃液 (pH 1.2)、人工肠液 (pH 6.8) 作溶出介质，于 15、30、45、60 分钟时取样并滤过，滤液直接进行 HPTLC 检测。

薄层板

HPTLC 硅胶 60 F₂₅₄ 高效预制薄层板 (10*10 cm, Merck)，浸入含 4% 醋酸钠的甲醇-水 (3:2) 溶液中 5 秒，室温下干燥 1 小时。

点样

用 CAMAG Linomat 5 型半自动点样仪条带状点样，条带款 6 mm，间距 10 mm，共点 9 个条带，条带距底边 10 mm，距侧边 10 mm，点样量 1-20 μl 。

色谱条件

双槽展开缸展开，展开剂甲苯-丙酮（7：3），预饱和 20 min，展开两次，每次展距：6 cm（每次展开约 6 min），第一次展开后晾干，第二次展开后 150°C 干燥 1 小时，以检测活性成分

编者注：如以甲苯-乙酸乙酯-丙酮-甲醇（20：10：10：1.2）作展开剂只展开一次即可（参见 CAMAG 应用报告 F-16A）。

扫描

采用 CAMAG TLC Scanner 3 和 WinCATs 工作站软件在 254 nm 与 400 nm 下以吸收方式扫描。

结果与讨论

银杏内酯 A、B、C 以及白果内酯的校正曲线的相关系数 ≥ 0.9971 ，相对标准偏差 $\leq 2.0\%$ ；日内精密度 1.1-1.2%、日间精密度 1.1-1.3%；回收率 98.5-104.6% $\pm 1.2-2.2\%$ ；显示本法可行。精密度的以对照品在 3 组每个条带点样量 50 ng 的条件下测定的。加样回收率在 3 组银杏叶样品中加入含量相当于 0.05%、0.1%、0.5% 三个浓度的银杏内酯 A、B、C 与白果内酯对照品储备液重复测定而得。

成分	R_f	回归方程	r	RSD	范围(μg)
银杏内酯 A	0.44	$Y=65.6+23.9X-0.035X^2$	0.9998	1.7	20-200
银杏内酯 B	0.40	$Y=30.6+20.4X-0.012X^2$	0.9998	1.6	17-175
银杏内酯 C	0.17	$Y=81.6+14.4X-0.024X^2$	0.9971	2.0	14-135
白果内酯	0.57	$Y=-3.7+30.8X-0.058X^2$	0.9999	0.3	10-130

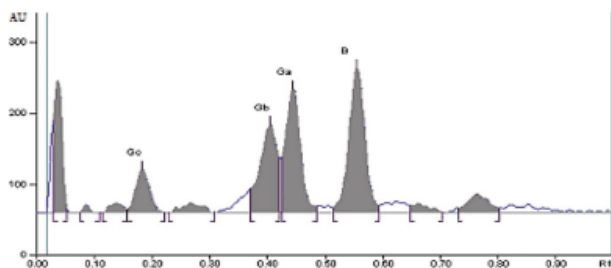
银杏叶中银杏内酯 A、B、C 以及白果内酯的含量测定以 3 组进行 结果以干燥品计，平均含量为银杏内酯 A 0.078 $\pm 0.008\%$ 、银杏内酯 B 0.072 $\pm 0.007\%$ 、银杏内酯 C 0.076 $\pm 0.008\%$ ，白果内酯 0.062 $\pm 0.006\%$ ，二萜内酯的总量为 0.29%。



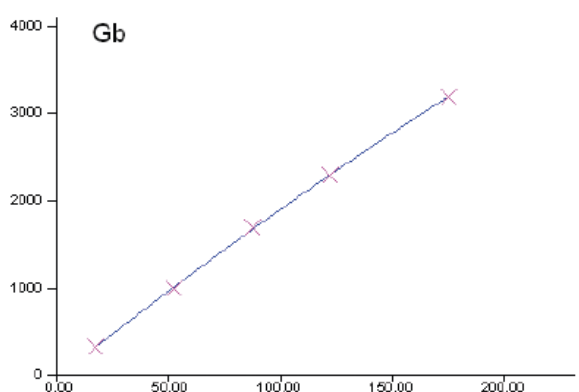
本试验成功地选择 CAMAG Linomat 5 进行条带状点样，对有效分离银杏内酯 A 与银杏内酯 B 起到了重要作用。喷雾点样使斑点条带很窄，保证了最高的分离效能。

CAMAG Linomat 5 采用非接触式喷雾点样技术，允许点大体积样品，因为点样时溶剂几乎全部蒸发掉，甚至强极性溶剂，如本试验中使用的甲醇或水性溶剂，点样后其斑点仍然紧凑。

CAMAG Linomat 5 的另一个优势是它支持针对薄层板不同厚度的自我调整功能，从而允许不同厚度的薄层板点样而无需对点样针高度进行调整。这使得 CAMAG Linomat 5 作为点样设备很具吸引力，在此不同的操作者应用不同的薄层板可以使用同一台点样设备。



银杏叶提取物在 254nm 下的扫描图，显示银杏内酯 A (Ga), B (Gb), C (Gc) 以及白果内酯(B) 的分离 (其余 6 个色谱峰在本文中未做鉴别)



银杏内酯 B 的多项式回归曲线

银杏叶中银杏内酯含量极低，而且黄酮等其它含量较高的成分的存在可对内酯类成分的检测产生干扰。本试验以活性炭吸附纯化二萜内酯类化合物。通过往水溶性胶体溶液中加入活性炭，可吸附黄酮类化合物，但相对小极性的化合物絮凝下来不再沉溶解，因此可通过过滤除去而不对分析产生干扰。

研究了银杏叶胶囊中银杏内酯与白果内酯的体外释放度。二萜内酯类成分在水、人工胃液(pH 1.2)、人工肠液 (pH 6.8) 的释放度(最小二乘法) 分别为 1.67min^{-1} 、 0.87min^{-1} 、 0.42min^{-1} 。

总而言之，本试验报道的 HPTLC 方法同时测定银杏叶中银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的方法简单、灵敏、经济，适宜于大量植物性样品的常规快速测定。溶出度研究显示不同的介质中，银杏内酯在水中释放度最高，人工胃液次之。

参考文献

- [1] Van Beek TA, Lelyveld GP. *Phytochem Anal* 4(1993) 109.
- [2] Tallevi SG, Kurz WGW. *J Nat Prod* 54 (1991) 624
- [3] Van Beek T.A. et al., *J Chromatogr* 543(1991) 376

作者通讯方式

Prof. Dr. Alexander Shikov, Saint Petersburg Institute of Pharmacy, 47/5, Piskarevsky prospect, 195067, St-Petersburg, Russia, spb.pharmacy@gmail.com