



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103163252 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201310111707. 5

审查员 李倩

(22) 申请日 2012. 04. 23

(62) 分案原申请数据

201210121252. 0 2012. 04. 23

(73) 专利权人 成都百裕科技制药有限公司

地址 611130 四川省成都市温江区成都海峡两岸科技产业开发园柳台大道西段433号

(72) 发明人 孙毅 朱永红 童正兵 王婕

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101757049 A, 2010. 06. 30,

CN 1853674 A, 2006. 11. 01,

CN 101757050 A, 2010. 06. 30,

CN 102283870 A, 2011. 12. 21,

US 6030621 A, 2000. 02. 29,

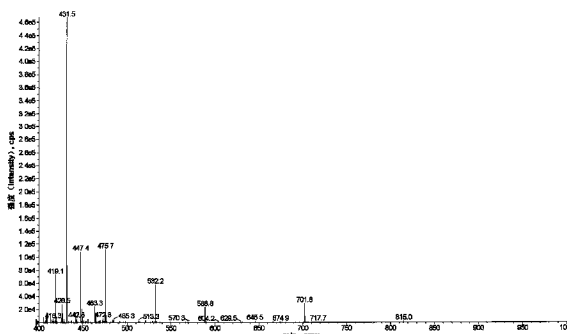
权利要求书1页 说明书20页 附图4页

(54) 发明名称

银杏内酯组合物中总银杏酸的测定方法

(57) 摘要

本发明涉及植物提取领域,具体涉及一种银杏内酯组合物中总银杏酸的测定方法。本发明提供的银杏内酯提取分离方法可得到组分固定的银杏内酯组合物。在总银杏酸的测定方法中,精密吸取供试品溶液、对照品溶液及定位用对照溶液各20μl,注入液相色谱仪,计算供试品溶液中与总银杏酸对照品相应色谱峰的总峰面积,以白果新酸对照品外标法计算总银杏酸含量。



1. 银杏内酯组合中总银杏酸的测定方法,特征在于,

色谱条件与系统适用性试验:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以 90 : 10 甲醇-1%冰醋酸为流动相,流速 1.0ml/min,检测波长为 310nm,理论板数按白果新酸峰计应不低于 4000 ;

对照品溶液的制备:取白果新酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1ml 含 5 μ g 的溶液作为对照品溶液,另取总银杏酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1ml 含 100 μ g 的溶液,作为定位用对照溶液 ;

供试品溶液的制备:取由银杏叶提取得到的银杏内酯组合物 5g,精密称定,置烧瓶中,加正己烷 50ml,加热回流 2 小时,取出,放冷,滤过,残渣再用少量正己烷洗涤,合并滤液与洗涤液,置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并稀释至 2ml,摇匀,作为供试品溶液 ;

测定法:精密吸取供试品溶液、对照品溶液及定位用对照溶液各 20 μ l,注入液相色谱仪,计算供试品溶液中与总银杏酸对照品相应色谱峰的总峰面积,以白果新酸对照品外标法计算总银杏酸含量。

2. 根据权利要求 1 的测定方法,其特征在于测得的总银杏酸含量小于 5ppm。

银杏内酯组合中总银杏酸的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物提取领域,具体涉及一种银杏内酯组合中总银杏酸的测定方法。

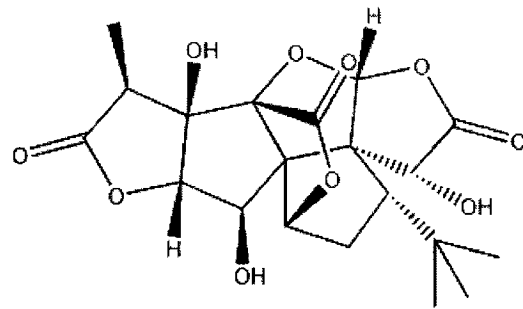
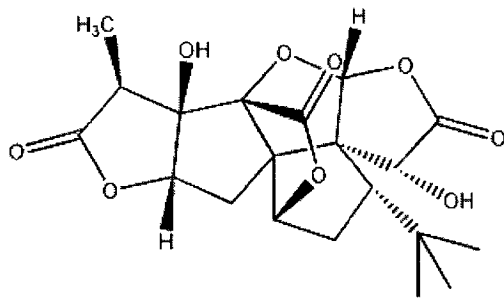
背景技术

[0002] 自上世纪 60 年代开始,许多国家采用现代分离技术对银杏叶的化学成分进行研究,经药理实验和临床验证,发现银杏叶的多方面生物活性与其所含特定化学成分有关。德国 Dr. Willar Schwabe 首次注册了银杏叶的一种简单提取物,于 1972 年申请了专利 (W Schwabe DE 176708 和 DE2117429),定名为 EGb761,用于治疗心脑血管疾病和神经系统疾病,具有显著疗效,且无毒副作用,银杏内酯类化合物 (ginkgolids) 具有强血小板活化因子 (PAF) 拮抗作用。银杏制剂被列为治疗药物的国家有德国、法国和中国,其他国家均用为保健食品或非处方用药,美国开发出的银杏保健食品已经获得 FDA 批准。

[0003] 银杏内酯属于萜类化合物,称为萜类内酯,由倍半萜内酯和二萜内酯组成,是银杏叶中一类重要的活性成分。白果内酯 (bilobalide) 属倍半萜内酯,由 R. T. Major 于 1967 年和 K. Weinges 于 1969 年分离得到,目前从银杏叶中发现的唯一的倍半萜内酯化合物,银杏内酯 A、B、C、M、J (ginkgolid A、B、C、M、J) 为二萜内酯化合物,于 1932 年由 S. Furukawa 首次从银杏叶中分离出来,1967 年才由 K. Nakanish、M. Maruyama 和 K. Okabe 等人进一步分离和确定其化学结构。从结构上看,白果内酯类分子骨架由 15 个碳原子组成,具有互相稠合在一起的 4 个五元环,其中有 1 个五元碳环,3 个五元内酯碳环,五元环上连有 1 个天然产物中罕见的叔丁基。白果内酯有很强的生物活性,具有促进神经生长的作用,可防止脑细胞线粒体氧化应激引起的功能改变,改善老年记忆功能,防止老年痴呆的发生,以及防止脑、脊髓神经脱髓鞘作用,其神经营养、神经保护作用比银杏内酯强。银杏内酯 B 有抗炎、抗休克、保护心脑血管、治疗急性胰腺炎等作用。而银杏内酯类化合物的分子骨架由 20 个碳原子组成,具有 6 个五元环,其中有 2 个五元碳环,3 个五元内酯环,1 个四氢呋喃环,两个五元碳环以螺环的形式连接在一起,其余的环以稠合的方式连接,形成一个刚性笼状的特殊立体化学结构。银杏内酯分子中均具有天然产物中罕见的叔丁基。银杏内酯包括二萜类和倍半萜类内酯,二萜类内酯主要有银杏内酯 A、B、C、J、M 等,半萜类内酯有白果内酯。

[0004] 自 20 世纪 70 年代初发现了 PAF 后,药理学家对银杏内酯进行了研究,明确银杏萜内酯是强血小板活化因子拮抗剂,免疫系统、中枢神经系统、缺血损伤有保护作用,并有抗休克、抗过敏及抗炎作用。银杏内酯 A、B、C、M、J 结构差别在于含有的羟基数目和羟基连接的位置不同。银杏内酯均为强血小板活化因子拮抗剂,是银杏叶中特殊生理活性的关键成分。

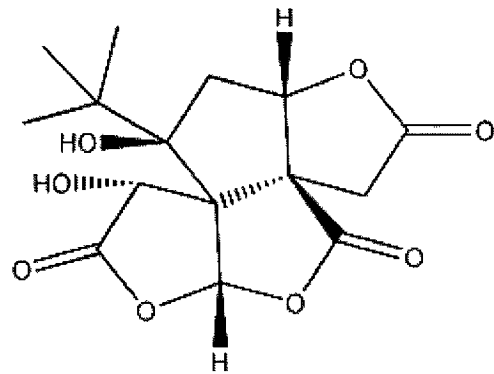
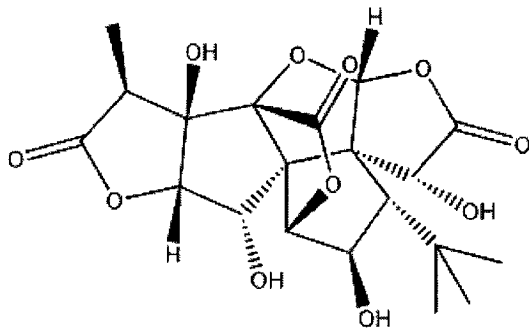
[0005]



[0006] 银杏内酯 A 结构式 银杏内酯 B 结构式

[0007] 分子式 : $C_{20}H_{24}O_9$ 分子量 :408.4 分子式 : $C_{20}H_{24}O_{10}$ 分子量 :424.4

[0008]



[0009] 银杏内酯 C 结构式 白果内酯结构式

[0010] 分子式 : $C_{20}H_{24}O_{11}$ 分子量 :440.4 分子式 : $C_{15}H_{18}O_8$ 分子量 :326.3

[0011] 银杏内酯对血小板活化因子 PAF 受体有强大的特异性抑制作用,其中银杏内酯的抗 PAF 活性最高。PAF 是血小板和多种炎症组织分泌产生的一种内源性磷脂,是迄今发现的最有效的血小板聚集诱导剂,它与许多疾病的产生、发展密切相关。而银杏内酯目前被认为是最有临床应用前景的天然 PAF 受体拮抗剂,其拮抗作用活性与化学结构密切相关。当内酯结构中 R3 为羟基或羟基数目增多时,对 PAF 的拮抗活性减弱,而当 R2 为羟基且 R3 为 H 时,则活性显著增强,其中以银杏内酯 B 对 PAF 产生的拮抗作用最强。

[0012] 银杏内酯的提取及纯化方法较多,主要有:溶剂萃取法、柱提取法、溶剂萃取-柱提取法、超临界提取法及色谱或柱层析纯化法等。这些方法都不能有效地分离出高含量的银杏内酯,且银杏内酯各组成比例不确定,因此,在临床使用上药效各不相同,由于其含量不高,也存在一定的安全风险,无完整的药理毒理及临床试验数据,因此,上述方法均处于试验阶段,未实施于药品生产过程,在中国虽有银杏内酯注射液相关专利,但其组成均与本发明不同,经 ICH 成员国多家官方网站检索,迄今尚无其它银杏内酯注射剂产品上市。银杏内酯类成分的测定目前多采用 HPLC-UV 法、HPLC-MS 和 HPLC-ELSD 法,这些方法仅能对银杏内酯各成分的含量进行测定,由于缺乏对其产品中不良反应物质的严格控制,并不能真实的反映出药品的质量特性,不形成一个完善的药品质量控制体系,尽管银杏内酯的发明专利很多,由于控制方法过于简单,银杏内酯组成比例不定,都无法制成中药注射剂,不能保证临床疗效和应用的安全性。

[0013] 尽管在中国、德国等国家有诸多关于银杏内酯的专利和报道,但本发明的工艺过程、质量控制技术和临床适应症与其它发明专利有截然不同之处,尤其是不同的分离纯化工艺得到的萜类内酯的成分各不相同,迄今为止,尚无 4 种组分(银杏内酯 A、B、C 和白果内

酯)比例固定的提取银杏内酯有效部位组合物的工艺报道,也没有对银杏内酯中4种组分指纹图谱控制技术及可能残留的大分子、蛋白质检查方法的报道。本发明制备的银杏内酯注射液已获得国家食品药品监督管理局批准文号,国药准字:Z20110035,是目前国际上第一个银杏有效部位注射剂,产品结构清晰、明确。

发明内容

[0014] 本发明所解决的技术问题是提供一种银杏内酯的提取分离方法,该提取分离方法可得到组分固定的银杏内酯。该方法步骤如下:

[0015] A、提取:粉碎银杏叶,加有机溶剂提取,浓缩提取液中加抗氧化保护剂,用pH调节剂调pH值至4~5,浓缩、冷藏。

[0016] 其中,提取有机溶剂为乙醇、丙酮或乙酸乙酯,浓度为50~80% v/v,用量为5~12倍量,最佳用量6~10倍;

[0017] 提取方法为:回流提取或煎煮提取。

[0018] 1) 回流提取:

[0019] 50~80% v/v 乙醇:提取温度75~85℃,提取次数2~3次,时间每次1~2小时;

[0020] 50~80% v/v 丙酮:提取温度45~55℃,提取次数2~3次,时间每次1~2小时;

[0021] 50~80% v/v 乙酸乙酯:提取温度55~65℃,提取次数2~3次,时间每次1~2小时;

[0022] 真空度:-0.02~0.08MPa

[0023] 优选提取条件为:提取3次,每次1.5小时;乙醇浓度宜选择65% v/v;丙酮浓度宜选择50% v/v;乙酸乙酯浓度宜选择60% v/v。

[0024] 2) 煎煮提取:

[0025] 50~80% v/v 乙醇:提取温度80~90℃,提取次数2~3次,时间每次1~2小时;

[0026] 50~80% v/v 丙酮:提取温度50~60℃,提取次数2~3次,时间每次1~2小时;

[0027] 50~80% v/v 乙酸乙酯:提取温度60~65℃,提取次数2~3次,时间每次1~2小时;

[0028] 优选提取条件为:提取3次,每次1.5小时;乙醇浓度宜选择65% v/v;丙酮浓度宜选择50% v/v;乙酸乙酯浓度宜选择60% v/v。

[0029] 提取液在浓缩过程中受热后银杏内酯易分解,需加入保护剂和pH调节剂。加入保护剂是为了防止银杏内酯受热氧化分解,可用的抗氧化保护剂主要有中性氨基酸,包括:丝氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、苏氨酸中至少一种,优选蛋氨酸。

[0030] pH调节剂主要是有机弱酸,包括:枸橼酸、苹果酸、山梨酸中至少一种,优选枸橼酸用于调pH值,是利用其弱酸性作为稳定剂,防止银杏内酯在碱性条件下开环。原因是银杏内酯结构为5元环,在弱酸性条件下稳定,枸橼酸为弱酸,可以防止银杏内酯在碱性条件下开环。

[0031] 步骤 A 冷藏的目的是为了使油水分离,以除去水中脂溶性杂质。

[0032] B、萃取:将浓缩液先用正己烷或石油醚萃取 2~3 次(优选等体积的正己烷或石油醚萃取),水相用脂溶性溶剂萃取 4~5 次(优选等体积的乙酸乙酯萃取),再用水饱和仲丁醇(正丁醇)-乙酸乙酯混合溶剂萃取 4~5 次(优选等体积水饱和仲丁醇-乙酸乙酯混合溶剂萃取),合并有机相萃取液,减压浓缩。

[0033] 其中,先用正己烷或石油醚萃取是为了除去叶绿素、银杏酚酸等杂质。

[0034] 再用脂溶性溶剂萃取银杏内酯,可用的脂溶性溶剂有乙酸乙酯、甲酸乙酯、丙酮、丁酮中的至少一种。

[0035] 银杏萜类内酯易溶于乙酸乙酯,银杏黄酮在乙酸乙酯中溶解性相对较低,在热水中和含水醇中溶解度较大,故可用乙酸乙酯萃取银杏内酯,将其与银杏黄酮类化合物分离,分离得的银杏内酯粗品可进一步用活性炭、硅胶或树脂柱吸附层析,进一步除去杂质,然后在含水醇中结晶即可得到比较纯的银杏内酯。

[0036] C、过柱:萃取液过聚酰胺(30~60 目)树脂柱,依次用 1~5BV 水、3~5BV20%~40% v/v 乙醇、2~3BV60%~90% v/v 乙醇洗脱,控制洗脱液流速为 2~3BV/h;合并洗脱液,减压浓缩,干燥;

[0037] D、析晶:将过柱后的干燥物加入沸水中,搅拌溶解,冷却,上清液用等体积乙酸乙酯、甲酸乙酯或丙酮萃取 4~5 次,合并萃取液,减压浓缩,蒸干,加 5~8 倍量 30%~50% v/v 乙醇加热搅拌溶解,过滤,冷藏,析出晶体,滤过,滤液 I 备用,晶体用 30%~50% v/v 乙醇洗涤,减压干燥,得到晶体 I。

[0038] 滤液 I 浓缩至含醇量为 10%~30% v/v,冷藏,析出晶体,滤过,滤液 II 备用;用 30%~50% v/v 乙醇洗涤,减压干燥,得晶体 II。

[0039] 浓缩滤液 II,加 0.1~0.5% (g/L) 活性炭吸附,过滤,滤液浓缩至含醇量为 10~30% v/v,冷藏,析出晶体,滤过,滤液 III 备用;晶体用 30%~50% v/v 乙醇洗涤,减压干燥,得晶体 III。

[0040] 滤液 III 浓缩,过活性炭-硅胶(体积比 1:1~1:3)柱,先用 30%~50% v/v 乙醇洗脱,再用 70%~90% v/v 乙醇洗脱,收集洗脱液浓缩至含醇量为 10%~30% v/v,冷藏析晶,滤出晶体,滤液 IV 备用;晶体用 30%乙醇洗涤,减压干燥,得晶体 IV。

[0041] 浓缩滤液 IV,冷藏,析出晶体,滤过,晶体用 30% v/v 乙醇洗涤,减压干燥,得晶体 V。

[0042] 根据 HPLC 对母液中残余银杏内酯的检测结果,考虑是否对滤液 IV 进行结晶。

[0043] E、混晶:将晶体 I、II、III、IV、V 混合均匀,粉碎,得到类白色晶体组合物,该晶体组合物有效部位(白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 之和)的 HPLC 含量大于 95%。

[0044] 采用本发明取分离方法得到的银杏内酯的参数如下:

[0045] a) 性状:类白色或微黄色结晶性粉末。在乙酸乙酯中易溶,在甲醇、乙醇中溶解,在水中几乎不溶。

[0046] b) 水分:小于 5.0%。

[0047] c) 蛋白质:在 595nm 波长处吸光度小于 0.05。

[0048] d) 鞣质、树脂、草酸盐、钾离子:不得检出。

[0049] e) 残留溶剂:乙醇和乙酸乙酯均小于 0.5%,正己烷小于 0.029%,己内酰胺小于 0.0015%。

[0050] f) 总银杏酸:HPLC 法测定总银杏酸含量小于 5ppm。

[0051] g) 大分子和聚合物:凝胶色谱法测定无残留大分子和聚合物。LC-MS 法测定无分子量大于 1000 的大分子物质和聚合物。

[0052] h) 重金属:小于 10ppm。

[0053] i) 砷盐:小于 2ppm。

[0054] k) 异常毒性:制成每 1ml 中含 0.2mg 的溶液,符合静脉注射法给药。

[0055] l) 指纹图谱:HPLC 法测定,以白果内酯对照品、银杏内酯 A 对照品、银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品为参照物,按中药色谱指纹图谱相似度评价系统,四个共有峰相似度大于 0.95。

[0056] m) 含量:HPLC 法测定,按干燥品计算,含白果内酯 ($C_{15}H_{18}O_8$) 25.0% ~ 50.0%、银杏内酯 A ($C_{20}H_{24}O_9$) 20.0% ~ 45.0%、银杏内酯 B ($C_{20}H_{24}O_{10}$) 10.0% ~ 30.0%、银杏内酯 C ($C_{20}H_{24}O_{11}$) 5.0% ~ 15.0%,且白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 总量大于 95%。

附图说明

[0057] 图 1 洗脱体积对洗脱率的影响。

[0058] 图 2 乙醇流速对洗脱率的影响。

[0059] 图 3 银杏内酯 LC-MS 图谱(分子量 400 ~ 1000)。

[0060] 图 4 银杏内酯 LC-MS 图谱(分子量 400 ~ 3000)。

[0061] 图 5 银杏内酯对照指纹图谱;

[0062] 共有峰中峰 2:银杏内酯 C,峰 3:白果内酯,峰 4:银杏内酯 A,峰 5:银杏内酯 B。

具体实施方式

[0063] 以下为本发明银杏内酯制备方法中的关键条件筛选试验。

[0064] 一、萃取方案筛选试验

[0065] 方法一:将浓缩液先用等体积的正己烷萃取 2 ~ 3 次,水相用 8 倍量的丁酮-丙酮(4 : 6) 在温热下提取 5 次,合并萃取液,减压浓缩。

[0066] 方法二:将浓缩液先用等体积的正己烷萃取 2 ~ 3 次,水相再用等体积乙酸乙酯萃取 4 ~ 5 次,用等量水饱和的仲丁醇-乙酸乙酯(7 : 3) 萃取 4 ~ 5 次,合并萃取液,减压浓缩,干燥。

[0067] 以上两种萃取分离纯化方法筛选试验,用 HPLC-ELSD 法分别测定两种试验中银杏内酯的总量,试验结果见表 1。

[0068] 表 1 萃取方案筛选试验结果

[0069]

考察项目	方法一	方法二
外观性状	棕色粉末	棕色粉末

总内酯含量(%)	14.1	10.8
----------	------	------

[0070] 方法二所得总内酯含量均较高,乙酸乙酯和仲丁醇为安全性极高的溶剂,因此,选用方法二作为萃取离纯化工艺。

[0071] 二、层析条件筛选试验

[0072] 由于萃取液中尚含有大量银杏黄酮类物质及其它杂质,要得到纯度极高银杏内酯,必须将黄酮与银杏内酯有效的分离,目前普遍采用的分离方法包括聚酰胺树脂柱分离法、氧化铝柱层析法和硅胶柱层析法,发明人对比研究过程及结果如下:

[0073] 方法一:将萃取液过聚酰胺树脂柱,先用2~3倍量的30%乙醇洗脱,继用70%乙醇洗脱,洗脱速度为2BV/h,浓缩洗脱液,蒸干。

[0074] 方法二:将萃取液过酸性氧化铝柱,将萃取液与等量氧化铝混合,烘干,干法上柱,用4~6倍量的乙酸乙酯洗脱,洗脱速度为2BV/h,浓缩洗脱液,蒸干。

[0075] 方法三:将萃取液过硅胶柱,将萃取液与等量柱层析硅胶混合,烘干,干法上柱,先用用4~6倍量的石油醚-乙酸乙酯(2:1)洗脱,洗脱速度为2BV/h,再用正己烷-乙酸乙酯(5:1)洗脱,洗脱速度为2BV/h,浓缩洗脱液,蒸干。

[0076] 用HPLC-ELSD法分别对三种试验中银杏内酯的总量进行测定,试验结果见表2。

[0077] 表2 柱层析试验结果

[0078]

考察项目	方法一	方法二	方法三
外观性状	黄色粉末	黄色粉末	黄色粉末
总内酯含量(%)	47.8	35.5	38.2

[0079] 由上可见,采用聚酰胺树脂柱得到的银杏内酯含量较高,分离效果较好。

[0080] 聚酰胺树脂对黄酮有较好的吸附作用,因此,可以有效地将银杏内酯和银杏黄酮进行有效地分离,对过柱洗脱工艺参数考察。

[0081] 1、水洗体积的选择:蒸馏水洗涤树脂柱能起到很好的除杂作用,用5BV的水洗涤树脂柱,流速1~2BV/h,流出的颜色由深变浅,收集水洗液5BV,流出液清亮,检测结果显示,水体积达到3BV时,柱中的水溶性杂质已经基本干净,检测不出银杏内酯,所以选用3BV的水洗体积。洗脱体积对洗脱率的影响见图1。

[0082] 2、乙醇洗脱浓度对洗脱效果的影响:将萃取物分别上不同聚酰胺柱,吸附30min,先用3BV水洗,再分别使用10%、30%、40%、50%、70%、90%乙醇洗脱,流速1BV/h,分别收集乙醇洗脱液,测定各浓度洗脱液中银杏内酯的量,随着乙醇浓度的升高,洗脱量和洗脱率都随之上升,但是至40%的乙醇时洗脱量提升缓慢,至90%的乙醇时洗脱量差别不大,30%的乙醇洗脱基本上达到最佳洗脱率,因此,采用30%乙醇作为最佳洗脱浓度。

[0083] 3、乙醇解析流速的洗脱效果影响:将萃取物分别上不同聚酰胺柱,吸附30min,先用3BV水洗,再用40%乙醇洗脱,流速1BV/h。为选取较优的乙醇解析流速,分别以1、2、3、4、5BV/h的流速过柱,洗脱并收集3BV洗脱液,测定银杏内酯量。洗脱流速与解析率有很大的关联性,随着流速提高,解析率增加,但到3BV/h时反而下降,这是速度加快导致乙醇洗脱

液不能很好的与吸附的银杏内酯交换,因而不能达到很好的洗脱效果。最佳流速 2 ~ 3BV/h。乙醇流速对洗脱率的影响见图 2。

[0084] 三、析晶条件筛选试验:

[0085] 虽然过柱、萃取后提取物中银杏内酯的含量有所增加,黄酮类物质也得到有效分离,但银杏内酯的含量尚不能达到注射剂要求,需进一步结晶纯化。银杏内酯在乙醇、乙酸乙酯等溶剂中易溶,而在水、正己烷等溶剂中不溶,因此只有选用极性合适混合溶剂作为结晶溶剂。

[0086] (1) 30% v/v 乙醇溶剂:取待析晶提取物 10g,分别加 4、6、8、10 倍量 30%乙醇,加热溶解,低温(0 ~ 6℃)静置,滤过,减压干燥,分别测定晶体重量,试验结果见表 3。

[0087] 表 3 30%乙醇结晶试验结果

[0088]

溶剂加入量(倍)	4	6	8	10
加热溶解情况	未溶完	溶解完全	溶解完全	溶解完全
晶体量(g)	3.8	4.5	4.2	2.4

[0089] 析晶时加 5 ~ 8 倍量 30%乙醇比较合适,析出的晶体相对较多。

[0090] (2) 正己烷-乙酸乙酯(8 : 1)溶剂:取待析晶提取物 10g,分别加 4、6、8、10 倍量正己烷-乙酸乙酯(8 : 1)混合溶剂,加热溶解,低温(0 ~ 6℃)静置,滤过,减压干燥,分别测定晶体重量,试验结果见表 4。

[0091] 表 4 正己烷-乙酸乙酯混合溶剂结晶试验结果

[0092]

溶剂加入量(倍)	4	6	8	10
加热溶解情况	溶解完全	溶解完全	溶解完全	溶解完全
晶体量(g)	2.3	3.5	3.8	3.2

[0093] 正己烷-乙酸乙酯混合溶剂析晶量少于 30%乙醇溶剂析出晶体量。

[0094] (3) 10% v/v 乙酸乙酯溶剂:取待析晶提取物 10g,分别加 4、6、8、10 倍量 10%乙酸乙酯加热溶解,低温(0 ~ 6℃)静置,滤过,减压干燥,分别测定晶体重量,试验结果见表 5。

[0095] 表 5 10%乙酸乙酯结晶试验结果

[0096]

溶剂加入量(倍)	4	6	8	10
加热溶解情况	未溶完	溶解完全	溶解完全	溶解完全
晶体量(g)	2.3	3.5	3.3	2.2

[0097] 10%乙酸乙酯溶剂析晶量少于 30%乙醇溶剂析出晶体量。

[0098] 根据实验结果,结晶溶剂选用 5 ~ 8 倍量 30%乙醇比较合适。

[0099] 以下为采用本发明方法制备银杏内酯的实例。

[0100] 实施例 1

[0101] 银杏叶粗粉 50kg, 加 65% 乙醇加热回流提取 3 次 (10、8、6 倍量), 每次 1.5 小时, 合并提取液, 滤过, 减压浓缩, 加 0.05% 蛋氨酸搅拌溶解, 用枸橼酸溶液调节 pH 值至 4~5, 继续浓缩, 低温放置, 过滤。先用等量正己烷萃取, 再用等量乙酸乙酯萃取, 最后用水饱和和仲丁醇-乙酸乙酯混合溶剂萃取, 过聚酰胺 (30~60 目) 树脂柱, 先用水洗脱, 继用 30% 乙醇洗脱, 再用 70% 乙醇洗脱, 合并洗脱液, 减压浓缩。加入 2~3 倍量沸水中, 搅拌溶解, 静置, 放冷, 用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩, 加乙醇加热搅拌溶解, 过滤, 放冷, 析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 I (主要为白果内酯和银杏内酯 B); 滤液继续浓缩, 加乙醇至 30%, 静置, 析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 II (主要为银杏内酯 A、B、C); 滤液加入药用炭, 搅拌吸附, 过滤, 浓缩, 放冷, 析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 III (主要为银杏内酯 A 和 B); 将滤液浓缩, 过药用炭-硅胶 (1:1) 柱, 先用 2 倍量 30% 乙醇洗脱, 再用 4 倍量 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 浓缩, 加乙醇至 30%, 放冷, 静置, 析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 IV; 滤液浓缩, 加乙醇至 30%, 放冷, 静置, 析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 V。将晶体混合均匀, 得银杏内酯 91.6g, HPLC 含量 97.2%, 其中白果内酯 ($C_{15}H_{18}O_8$) 为 42.5%、银杏内酯 A ($C_{20}H_{24}O_9$) 为 25.4%、银杏内酯 B ($C_{20}H_{24}O_{10}$) 为 18.7%、银杏内酯 C ($C_{20}H_{24}O_{11}$) 为 10.6%。

[0102] 实施例 2

[0103] 银杏叶粗粉 200kg, 加 6 倍量 80% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1.5 小时, 合并提取液, 滤过, 滤液减压回收乙醇至无醇味, 加 0.05% 蛋氨酸搅拌溶解, 用枸橼酸溶液调节 pH 值至 4~5, 继续浓缩, 低温放置, 过滤。先用正己烷萃取, 再用乙酸乙酯萃取, 最后用水饱和和仲丁醇-乙酸乙酯混合溶剂萃取, 过聚酰胺 (30~60 目) 树脂柱, 先用 30% 乙醇洗脱, 继用 70% 乙醇洗脱, 合并洗脱液, 减压浓缩。加入沸水中, 搅拌溶解, 静置放冷, 用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩, 加乙醇加热搅拌溶解, 过滤, 放冷, 析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 I (主要为白果内酯和银杏内酯 B); 滤液继续浓缩, 加乙醇, 静置析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 II (主要为银杏内酯 A、B、C); 滤液加入药用炭, 搅拌吸附, 过滤, 浓缩, 加乙醇, 放冷, 析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 III (主要为银杏内酯 A 和 B); 将滤液浓缩, 过药用炭-硅胶 (1:1) 柱, 先用 2 倍量 30% 乙醇洗脱, 再用 4 倍量 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 浓缩, 加乙醇至 30%, 放冷, 静置, 析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 IV; 滤液浓缩, 加乙醇至 30%, 放冷, 静置, 析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 V。将晶体混合均匀, 得银杏内酯 362.8g, HPLC 含量 96.8%, 其中白果内酯 ($C_{15}H_{18}O_8$) 为 31.2%、银杏内酯 A ($C_{20}H_{24}O_9$) 为 28.8%、银杏内酯 B ($C_{20}H_{24}O_{10}$) 为 28.2%、银杏内酯 C ($C_{20}H_{24}O_{11}$) 为 8.6%。

[0104] 实施例 3

[0105] 银杏叶粗粉 200kg, 加 8 倍量 75% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1.5 小时, 合并提取液, 滤过, 滤液减压回收乙醇至无醇味, 加 0.05% 蛋氨酸搅拌溶解, 用枸橼酸溶液调节 pH 值至 4~5, 继续浓缩, 低温放置, 过滤。先用正己烷萃取, 再用乙酸乙酯萃取, 最后用水饱和和仲丁醇-乙酸乙酯混合溶剂萃取, 过聚酰胺 (30~60 目) 树脂柱, 先用 30% 乙醇洗脱, 继用 75% 乙醇洗脱, 合并洗脱液, 减压浓缩。加入沸水中, 搅拌溶解, 静置放冷, 用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩, 加乙醇加热搅拌溶解, 过滤, 放冷, 析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 I (主要为白果内酯和银杏内酯 B); 滤液继续浓缩, 加乙醇, 静置析出晶体, 滤过, 干燥, 得晶体 II (主

要为银杏内酯 A、B、C) ;滤液加入药用炭,搅拌吸附,过滤,浓缩,加乙醇,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 III(主要为银杏内酯 A 和 B) ;滤液浓缩,上药用炭-硅胶(1 : 1) 柱,用 60% 乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 IV ;将晶体混合均匀,得银杏内酯 375.5g, HPLC 含量 97.1%,其中白果内酯($C_{15}H_{18}O_8$) 为 35.8%、银杏内酯 A($C_{20}H_{24}O_9$) 为 28.5%、银杏内酯 B($C_{20}H_{24}O_{10}$) 为 26.2%、银杏内酯 C($C_{20}H_{24}O_{11}$) 为 6.6%。

[0106] 实施例 4

[0107] 取银杏叶粗粉 200kg,加 10 倍量 75% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 1.5 小时,合并提取液,滤过,滤液减压回收乙醇至无醇味,加 0.05% 蛋氨酸搅拌溶解,用枸橼酸溶液调节 pH 值至 4 ~ 5,继续浓缩,低温放置,过滤。先用正己烷萃取,再用乙酸乙酯萃取,最后用水饱和的仲丁醇-乙酸乙酯混合溶剂萃取,过聚酰胺(30 ~ 60 目) 树脂柱,先用 25% 乙醇洗脱,继用 65% 乙醇洗脱,合并洗脱液,减压浓缩。加入沸水中,搅拌溶解,静置放冷,用乙酸乙酯萃取,减压浓缩,加 50% 乙醇加热搅拌溶解,过滤,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 I(主要为白果内酯和银杏内酯 B) ;滤液继续浓缩,加乙醇,静置析出晶体,滤过,干燥,得晶体 II(主要为银杏内酯 A、B、C) ;滤液加入药用炭,搅拌吸附,过滤,浓缩,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 III(主要为银杏内酯 A 和 B) ;滤液浓缩,上药用炭-硅胶(1 : 1) 柱,用 60% 乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 IV ;滤液浓缩,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 V ;将晶体混合均匀,得银杏内酯 362.2g, HPLC 含量 96.5%,其中白果内酯($C_{15}H_{18}O_8$) 为 35.5%、银杏内酯 A($C_{20}H_{24}O_9$) 为 26.0%、银杏内酯 B($C_{20}H_{24}O_{10}$) 为 26.2%、银杏内酯 C($C_{20}H_{24}O_{11}$) 为 8.8%。

[0108] 实施例 5

[0109] 银杏叶粗粉 200kg,加 8 倍量 60% 乙酸乙酯加热回流提取 3 次,每次 1.5 小时,合并提取液,滤过,滤液减压回收乙酸乙酯,加 0.05% 蛋氨酸搅拌溶解,用枸橼酸溶液调节 pH 值至 4 ~ 5,继续浓缩,低温放置,过滤。先用石油醚萃取,水相再用乙酸乙酯萃取,最后用水饱和的仲丁醇-乙酸乙酯混合溶剂萃取,过聚酰胺(30 ~ 60 目) 树脂柱,先用 30% 乙醇洗脱,继用 75% 乙醇洗脱,合并洗脱液,减压浓缩。加入沸水中,搅拌溶解,静置放冷,用丙酮萃取,减压浓缩至干,加 50% 乙醇加热搅拌溶解,过滤,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 I(主要为白果内酯和银杏内酯 B) ;滤液继续浓缩,加乙醇,静置析出晶体,滤过,干燥,得晶体 II(主要为银杏内酯 A、B、C) ;滤液加入药用炭,搅拌吸附,过滤,浓缩,加乙醇,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 III(主要为银杏内酯 A 和 B) ;滤液浓缩,上药用炭-硅胶(1 : 1) 柱,用 60% 乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 IV ;将晶体混合均匀,得银杏内酯 350.6g, HPLC 含量 97.4%,其中白果内酯($C_{15}H_{18}O_8$) 为 40.0%、银杏内酯 A($C_{20}H_{24}O_9$) 为 22.5%、银杏内酯 B($C_{20}H_{24}O_{10}$) 为 27.2%、银杏内酯 C($C_{20}H_{24}O_{11}$) 为 10.3%。

[0110] 实施例 6

[0111] 银杏叶粗粉 200kg,加 8 倍量 50% 丙酮加热回流提取 3 次,每次 1.5 小时,合并提取液,滤过,滤液减压回收丙酮,加 0.05% 蛋氨酸搅拌溶解,用枸橼酸溶液调节 pH 值至 4 ~ 5,继续浓缩,低温放置,过滤。先用石油醚萃取,水相再用乙酸乙酯萃取,最后用水饱和的仲丁醇-乙酸乙酯混合溶剂萃取,过聚酰胺(30 ~ 60 目) 树脂柱,先用 30% 乙醇洗脱,继用 70% 乙醇洗脱,合并洗脱液,减压浓缩。加入沸水中,搅拌溶解,静置放冷,用乙酸乙酯萃取,减压浓缩至干,加 30% 乙醇加热搅拌溶解,过滤,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 I(主要为

白果内酯和银杏内酯 B) ;滤液继续浓缩,加乙醇,静置析出晶体,滤过,干燥,得晶体 II(主要为银杏内酯 A、B、C) ;滤液加入药用炭,搅拌吸附,过滤,浓缩,加乙醇,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 III(主要为银杏内酯 A 和 B) ;滤液浓缩,上药用炭-硅胶(1 : 1) 柱,用 60% 乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 IV ;滤液浓缩,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 V ;将晶体混合均匀,得银杏内酯 343.5g, HPLC 含量 96.2%,其中白果内酯($C_{15}H_{18}O_8$) 为 38.2%、银杏内酯 A($C_{20}H_{24}O_9$) 为 28.3%、银杏内酯 B($C_{20}H_{24}O_{10}$) 为 24.2%、银杏内酯 C($C_{20}H_{24}O_{11}$) 为 9.3%。

[0112] 实施例 7

[0113] 银杏叶粗粉 200kg,加 8 倍量 70% 乙醇加热至微沸煎煮提取 3 次,每次 1.5 小时,合并提取液,滤过,滤液减压回收丙酮,加 0.05% 蛋氨酸搅拌溶解,用枸橼酸溶液调节 pH 值至 4~5,继续浓缩,低温放置,过滤。先用石油醚萃取,水相再用乙酸乙酯萃取,最后用水饱和和仲丁醇-乙酸乙酯混合溶剂萃取,过聚酰胺(30~60 目) 树脂柱,先用 30% 乙醇洗脱,继用 70% 乙醇洗脱,合并洗脱液,减压浓缩。加入沸水中,搅拌溶解,静置放冷,用乙酸乙酯萃取,减压浓缩至干,加 30% 乙醇加热搅拌溶解,过滤,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 I(主要为白果内酯和银杏内酯 B) ;滤液继续浓缩,加乙醇,静置析出晶体,滤过,干燥,得晶体 II(主要为白果内酯和银杏内酯 A、B) ;滤液加入药用炭,搅拌吸附,过滤,浓缩,加乙醇,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 III(主要为银杏内酯 A 和 C) ;滤液浓缩,上药用炭-硅胶(1 : 1) 柱,用 60% 乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 IV ;滤液浓缩,放冷,析出晶体,滤过,干燥,得晶体 V ;将晶体混合均匀,得银杏内酯 362.6g, HPLC 含量 97.4%,其中白果内酯($C_{15}H_{18}O_8$) 为 36.5%、银杏内酯 A($C_{20}H_{24}O_9$) 为 25.3%、银杏内酯 B($C_{20}H_{24}O_{10}$) 为 28.2%、银杏内酯 C($C_{20}H_{24}O_{11}$) 为 7.4%。

[0114] 综上,采用本发明所使用的提取分离纯化方法可得到纯度较高组分相对固定的银杏内酯,其中,含白果内酯($C_{15}H_{18}O_8$) 25.0%~50.0%、银杏内酯 A($C_{20}H_{24}O_9$) 20.0%~45.0%、银杏内酯 B($C_{20}H_{24}O_{10}$) 10.0%~30.0%、银杏内酯 C($C_{20}H_{24}O_{11}$) 5.0%~15.0%,且白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 总量大于 95%。

[0115] 本发明银杏内酯的分项检测方法及其检测结果如下:

[0116] a) 性状:类白色或微黄色结晶性粉末。

[0117] 在乙酸乙酯中易溶,在甲醇、乙醇中溶解,在水中几乎不溶。

[0118] b) 水分:60℃ 减压干燥减失重量小于 5.0%。

[0119] c) 蛋白质:在 595nm 波长处吸光度小于 0.05。

[0120] 取本发明银杏内酯约 24mg,加乙醇 2ml 溶解后,加水稀释至 50ml,作为供试品溶液。照考马斯亮蓝法(Bradford 法) 测定,以相应的试剂为空白,在 595nm 波长处吸光度小于 0.05。

[0121] d) 鞣质、树脂、草酸盐、钾离子

[0122] 可采用的检测方法有:

[0123] 鞣质:取蛋白质检查项供试品溶液 1ml,加入稀醋酸 1 滴,再加明胶氯化钠试液 5 滴,摇匀,放置 10 分钟,未出现浑浊或沉淀。

[0124] 树脂:取蛋白质检查项供试品溶液 5ml,加盐酸 1 滴,放置 30 分钟,无树脂状物质析出。

[0125] 草酸盐:取蛋白质检查项供试品溶液 2ml,用稀盐酸调节 pH 值至 1~2,滤过,滤液用氨水调节 pH 值为 5~6,加 3%氯化钙溶液 3 滴,放置 10 分钟,未出现浑浊或沉淀。

[0126] 钾离子:取蛋白质检查项供试品溶液 2ml,置 10ml 纳氏比色管中,加碱性甲醛溶液 0.6ml、3% EDTA 溶液 2 滴、3% 四苯硼钠溶液 0.5ml,加水稀释至 10ml,另取标准氯化钾溶液 0.8ml,同法试验,供试品溶液的浊度不高于对照溶液。

[0127] 结果:未检出鞣质、树脂、草酸盐、钾离子。

[0128] e) 残留溶剂

[0129] (1) 乙醇、乙酸乙酯和正己烷:含乙醇和乙酸乙酯均小于 0.5%,正己烷小于 0.029%。

[0130] (2) 树脂残留量:含己内酰胺小于 0.0015%。

[0131] f) 总银杏酸:含总银杏酸小于 5ppm。

[0132] g) 大分子和聚合物:凝胶色谱法测定无残留大分子和聚合物。LC-MS 法测定,结果无分子量大于 1000 的大分子和聚合物。

[0133] 测定方法:

[0134] (1) 凝胶色谱法色谱柱:Phenomenex BioSep-SEC-S2000,300×7.8mm,5 μ m,流动相:0.71% (内含 0.02%的叠氮化钠) 硫酸钠溶液,柱温:35℃,检测器温度:35℃,流速:0.5ml/min。结果:无残留大分子和聚合物。

[0135] (2) HPLC-MS 联用法流动相:甲醇-水(90:10)、色谱柱:Agilent RX-C₁₈(2.1×50mm) 柱温:25℃,流速:0.3ml/min。结果:结果无分子量大于 1000 的大分子和聚合物。

[0136] h) 重金属:小于 10ppm。

[0137] i) 砷盐:小于 2ppm。

[0138] k) 异常毒性:制成每 1ml 中含 0.2mg 的溶液,符合静脉注射法给药。

[0139] 供试品溶液的制备:取本发明银杏内酯约 25mg,用乙醇 2ml 溶解后加氯化钠注射液制成每 1ml 中含 0.2mg 的溶液。

[0140] 检查法:取体重 17~20g 小鼠 5 只,注入小鼠尾静脉供试品溶液 0.5ml,48 小时无死亡。

[0141] 1) 指纹图谱:HPLC 法测定,记录 60 分钟的色谱图。按中药色谱指纹图谱相似度评价系统,四个共有峰相似度大于 0.95。

[0142] m) 含量:HPLC 法测定,按干燥品计算,含白果内酯(C₁₅H₁₈O₈) 应为 25.0%~50.0%、银杏内酯 A(C₂₀H₂₄O₉) 应为 20.0%~45.0%、银杏内酯 B(C₂₀H₂₄O₁₀) 应为 10.0%~30.0%、银杏内酯 C(C₂₀H₂₄O₁₁) 应为 5.0%~15.0%,且白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 总量大于 95%。

[0143] 1) 指纹图谱和 m) 含量测定采用的检测方法相同,条件如下:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-四氢呋喃-水(25:10:65) 为流动相;用蒸发光散射检测器,漂移管温度:105℃;载气流速:3.00L/min;柱温:40℃;理论板数按白果内酯峰计算应不低于 2500。白果内酯峰与银杏内酯 C 峰的分离度应大于 1.5。

[0144] n) 热原检查:体温升高低于 0.6℃。

[0145] 供试品溶液的制备:精密称取本发明银杏内酯 20mg,加入 2ml 乙醇使溶解,再加入

0.9%氯化钠注射液 100ml 中。

[0146] 检查法:取家兔 3 只,测定其正常体温后 15 分钟内,按家兔体重每 1kg 注射 5ml 自耳静脉缓缓注入供试品溶液,每隔 30 分钟测定体温 1 次,共测 6 次,体温升高均应低于 0.6℃,并且 3 只家兔体温升高总和低于 1.3℃。

[0147] 发明人对上述发明内容进行了大分子及聚合物测定研究与说明,用于证明本发明的技术效果。下述试验用于进一步说明与解释本发明,但不限制本发明。

[0148] (1) 试验仪器及试剂

[0149] Agilent1200 型高效液相色谱仪,紫外检测器,示差折光检测器。

[0150] Phenomenex BioSep-SEC-S2000 凝胶色谱柱。

[0151] 右旋糖酐对照品 D2000(蓝色葡聚糖 2000),中检所,批号 140646-2000-01

[0152] 葡萄糖对照品(D0),含量:99.5%,批号 086K0166, SIGMA。

[0153] 超纯水用 Millipore-Q 超纯水系统制得。

[0154] 其余试剂为分析纯。

[0155] (2) 流动相的选择

[0156] 选取 0.71% (内含 0.02%的叠氮化钠) 硫酸钠溶液作为流动相。

[0157] (3) 检测器的选择

[0158] 选用通用型检测器示差折光检测器,该检测器对于存在折光系数差异的物质均有良好的响应。

[0159] (4) 拟确定的色谱条件

[0160] 色谱柱:Phenomenex BioSep-SEC-S2000, 300×7.8mm, 5 μ m

[0161] 流动相:0.71% (内含 0.02%的叠氮化钠) 硫酸钠溶液

[0162] 柱温:35℃,检测器温度:35℃,流速:0.5ml/min

[0163] (5) 银杏内酯各成分的分子量

[0164]

银杏内酯	银杏内酯 A	银杏内酯 B	银杏内酯 C	白果内酯	银杏内酯 J
分子式	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₁	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀
分子量	408.4	424.4	440.4	326.3	424.4

[0165] (6) 方法学研究

[0166] ①将右旋糖酐和葡萄糖对照品分别加流动相制成 10mg/ml 的溶液,分别精密吸取对照品溶液各 20 μ l,注入色谱仪,记录色谱图,结果右旋糖酐在保留时间 9.816' 出峰,葡萄糖在保留时间 18.712' 出峰,表明采用凝胶色谱法,分子量大的物质先出峰,分子量小的物质后出峰。

[0167] ②取本发明银杏内酯约 10mg,加乙醇 2ml 溶解,加入右旋糖酐对照品溶液(10mg/ml) 1ml,混匀,精密吸取 10 μ l,注入色谱仪,记录色谱图,结果在保留时间 9.698' 检出右旋糖酐,银杏内酯注射液成分峰均在 18min 以后出峰,表明分子量在 180 ~ 450 出峰时间在 18min 左右,分子量 5000 ~ 2000000 出峰时间在 9min 左右,采用凝胶色谱法来检测大分子物质是可行的。

[0168] 为了再一次验证本品中不含大分子及聚合物,故又进行了 LC-MS 试验。

[0169] 色谱条件:甲醇-水(90:10)为流动相、Agilent RX-C₁₈(2.1×50mm)色谱柱,柱温 25℃流速 0.3ml/min。

[0170] 供试品溶液的制备:精密称取本发明银杏内酯 10mg 置 10ml 量瓶中,加适量 1%乙酸使溶解,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

[0171] LC-MS 联用测试:根据确定的试验方法,分别取供试品溶液各 10 μl,在 400 ~ 1000 和 400-3000 分子量范围内分别测试,记录色谱图。试验结果见表 6。

[0172] 表 6 LC-MS 联用分子量测定结果

[0173]

[M+Na] ⁺	M
419.1、431.5、447.4、463.3、475.7、532.2、588.8、701.8	396.1、408.5、424.4、440.3、452.7、509.2、678.8

[0174] 从 LC-MS 联用分子量测定结果来看,分别检出银杏内酯 A(分子量 408.5)、银杏内酯 B(分子量 424.4)、银杏内酯 C(分子量 440.4),与本发明银杏内酯的有效成份完全一致,由于测试分子量范围在 400-3000 之间,未对白果内酯进行测试,本发明银杏内酯中未检出分子量大于 700 以上的物质,其它不同分子量的物质可能是其它杂质的存在,经 LC-MS 对银杏内酯中不同成份的分子量测试,说明本品中不含大分子或聚合物。银杏内酯 LC-MS 图谱见图 3 ~ 4。

[0175] 实施例 8

[0176] 银杏内酯质量控制——总银杏酸检查

[0177] 色谱条件与系统适用性试验:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-1%冰醋酸(90:10)为流动相;流速 1.0ml/min;检测波长为 310nm。理论板数按白果新酸峰计应不低于 4000。

[0178] 对照品溶液的制备:取白果新酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1ml 含 5 μg 的溶液作为对照品溶液;另取总银杏酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1ml 含 100 μg 的溶液,作为定位用对照溶液。

[0179] 供试品溶液的制备:取本发明银杏内酯 5g,精密称定,置烧瓶中,加正己烷 50ml,加热回流 2 小时,取出,放冷,滤过,残渣再用少量正己烷洗涤,合并滤液与洗涤液,置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并稀释至 2ml,摇匀,作为供试品溶液。

[0180] 测定法:精密吸取供试品溶液、对照品溶液及定位用对照溶液各 20 μl,注入液相色谱仪,计算供试品溶液中与总银杏酸对照品相应色谱峰的总峰面积,以白果新酸对照品外标法计算总银杏酸含量,总银杏酸小于 5ppm。

[0181] 发明人对上述发明内容进行了研究与说明,用于证明本发明的技术效果。下述试验用于进一步说明与解释本发明,但不限制本发明。

[0182] a、方法一

[0183] 供试品溶液的制备:取本发明银杏内酯 5g,精密称定,置烧瓶中,精密加入石油醚(60 ~ 90℃)50ml,回流 2 小时,取出,放冷,滤过,残渣再用少量石油醚洗涤 1 次,合并滤液与洗涤液,置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并稀释至 2ml,摇匀,作为供试品溶液(1)。

[0184] 空白样品溶液的制备:取石油醚(60~90℃)50ml,置锥形瓶中,回流2小时,置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并稀释至2ml,摇匀,作为空白溶液(1)。

[0185] b、方法二(正己烷替换石油醚)

[0186] 供试品溶液的制备:取本发明银杏内酯5g,精密称定,置烧瓶中,精密加入正己烷50ml,回流2小时,取出,放冷,滤过,残渣再用少量正己烷洗涤1次,合并滤液与洗涤液,置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并稀释至2ml,摇匀,作为供试品溶液(2)。

[0187] 空白样品溶液的制备:取正己烷50ml,置烧瓶中,回流2小时,置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并稀释至2ml,摇匀,作为空白溶液(2)。

[0188] 测定法:精密吸取供试品溶液和空白溶液各20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图。试验结果见表7。

[0189] 表7 两种方法检测结果表

[0190]

方法	样品	保留时间(min)/A
方法一 (石油醚)	空白溶液(1)	22.207'/12408
	供试品溶液(1)	22.315'/12701
方法二 (正己烷)	空白溶液(2)	未检出色谱峰
	供试品溶液(2)	未检出色谱峰

[0191] 试验结果表明:采用方法一(石油醚)制备样品,空白溶液中检出色谱峰,其峰面积与供试品溶液检出的色谱峰面积基本一致,说明空白试验有干扰;而采用方法二(正己烷)制备样品,空白溶液与供试品溶液均未检出色谱峰,故发明人拟采用方法二来做加样回收试验,以此来验证方法二的可行性。

[0192] c、总银杏酚酸的加样回收试验

[0193] 供试品溶液的制备:取本发明银杏内酯5g,精密称定,置烧瓶中,精密加入浓度为1.032mg/ml的总银杏酸对照品溶液0.2ml,再精密加入正己烷50ml,回流2小时,放冷,滤过,残渣再用少量正己烷洗涤,合并滤液与洗涤液,置水浴蒸干,残渣加甲醇溶解并稀释至2ml,摇匀,作为供试品溶液。

[0194] 对照品溶液的制备:精密量取浓度为1.032mg/ml的总银杏酸对照品溶液0.2ml,置2ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

[0195] 测定法:精密吸取供试品溶液和对照品溶液各20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图。

[0196] 结果:供试品溶液在与总银杏酸对照品色谱相应的位置上能检出总银杏酸色谱峰,从峰面积来看,供试品溶液与对照品溶液峰面积一致,说明回收率较好。试验结果见表8。

[0197] 表8 加样回收率试验结果

比较项目		检查结果				
		峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5 和 6
[0198] 对照品溶液	峰面积	120499	652974	19447	39935	429380
	保留时间	20.520	22.225	26.225	35.587	37.728
供试品溶液	峰面积	120173	644470	19338	39743	423083
	保留时间	21.027	22.708	26.730	36.327	38.335

[0199] d、重现性试验

[0200] 对照品溶液的制备：取白果新酸对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含 5 μ g 的溶液作为对照品溶液。另取总银杏酸对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含 100 μ g 的溶液，作为定位用对照溶液。

[0201] 供试品溶液制备：取本发明银杏内酯 5g，精密称定，共称取 6 份，分别置烧瓶中，加正己烷 50ml，回流 2 小时，放冷，滤过，残渣用少量正己烷洗涤，合并滤液与洗涤液，置水浴上蒸干，残渣加甲醇溶解并稀释至 2ml，摇匀，作为供试品溶液。

[0202] 测定法：精密吸取供试品溶液、对照品溶液及定位用对照溶液各 20 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图。试验结果见表 9。

[0203] 表 9 重现性试验结果

[0204]

编号	1#	2#	3#	4#	5#	6#
总银杏酸检查结果	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

[0205] 试验结果表明，本发明银杏内酯中无银杏酚酸。

[0206] e、回收率试验

[0207] 供试品溶液制备：取本发明银杏内酯 5g，精密称定，共称取 3 份，分别置烧瓶中，分别加入浓度为 3.04 μ g/ml 白果新酸对照品溶液 1.6ml、2.0ml、2.4ml，再分别加正己烷 50ml，回流 2 小时，放冷，滤过，残渣用少量正己烷洗涤，合并滤液与洗涤液，置水浴上蒸干，残渣加甲醇溶解并稀释至 2ml，摇匀，作为供试品溶液。

[0208] 对照品溶液的制备：同重现性试验项。

[0209] 测定法：精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 20 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图。每个浓度测定三次，共 9 次。计算回收率、RSD 值。试验结果见表 10。

[0210] 表 10 回收率试验结果表

[0211]

编号	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#
加入量 (μg)	4.864			6.080			7.296		
回收量 (μg)	5.291	4.811	5.090	6.454	6.374	6.389	7.563	7.446	7.542
回收率 (%)	108.77	98.90	104.66	106.16	104.84	105.09	103.66	102.06	103.38
平均回收率 (%)	104.17								
RSD (%)	2.62								

[0212] 试验结果表明,回收率较好。

[0213] 实施例 9

[0214] 银杏内酯质量控制——指纹图谱检查

[0215] 色谱条件与系统适用性试验:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-四氢呋喃-水(25:10:65)为流动相;用蒸发光散射检测器,漂移管温度:105℃;载气流速:3.00L/min;柱温:40℃;理论板数按白果内酯峰计算应不低于2500。白果内酯峰与银杏内酯C峰的分离度应大于1.5。

[0216] 参照物溶液的制备:分别精密称取白果内酯对照品、银杏内酯A对照品、银杏内酯B对照品、银杏内酯C对照品适量,加甲醇制成每1ml分别含0.15mg、0.12mg、0.1mg、0.1mg的混合溶液,摇匀,作为参照物溶液。

[0217] 试品溶液的制备:取本发明银杏内酯6mg,精密称定,置10ml量瓶中加甲醇1ml溶解,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

[0218] 测定法:分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液各20μl,注入液相色谱仪,记录60分钟的色谱图。

[0219] 按中药色谱指纹图谱相似度评价系统,供试品指纹图谱与对照指纹图谱相似度大于0.95。

[0220] 发明人对上述发明内容进行了研究与说明,用于证明本发明的技术效果。下述试验用于进一步说明与解释本发明,但不限制本发明。

[0221] 在银杏内酯指纹图谱中,其中峰2为银杏内酯C、峰3为白果内酯、峰4为银杏内酯A、峰5为银杏内酯B,本品中有效部位4个特征峰在指纹图谱中均能一一对应。银杏内酯对照指纹图谱见图5。

[0222] 首先采用国家药典委员会2004年指纹图谱指定软件——中药色谱指纹图谱相似度评价系统A版分别对10批银杏内酯生成对照指纹图谱,将不同批次的供试品指纹图谱与对照指纹图谱用相似度软件进行计算相似度。试验结果见表11。

[0223] 表11 10批银杏内酯相似度结果

[0224]

批号	100401	100402	100403	100404	110101
相似度	0.992	0.997	0.991	0.996	0.982
批号	110102	110103	110601	110602	110603
相似度	0.999	0.997	0.992	0.993	0.989

[0225] 10 批银杏内酯指纹图谱的相似度均大于 0.95。

[0226] 实施例 10

[0227] 银杏内酯质量控制——残留溶剂测定

[0228] (1) 乙醇、乙酸乙酯和正己烷

[0229] 供试品溶液的制备：取本发明银杏内酯约 0.1g，精密称定，置顶空瓶中，精密加入 N,N-二甲基甲酰胺 5ml 使溶解，密封，作为供试品溶液。

[0230] 对照品溶液的制备：取乙醇、乙酸乙酯和正己烷适量，精密称定，用 N,N-二甲基甲酰胺定量稀释制成每 1ml 中各约含 30 μg 的溶液，精密量取 5ml，置顶空瓶中，密封，作为对照品溶液。

[0231] 测定法：以 6% 氰丙基苯基-94% 二甲基聚硅氧烷（或极性相近）为固定液，起始温度为 50℃，维持 3 分钟，以每分钟 40℃ 的速率升温至 160℃，维持 3 分钟；进样口温度 200℃；检测器温度为 250℃；顶空瓶平衡温度为 80℃，平衡时间为 30 分钟。取对照品溶液顶空进样，各成分峰之间的分离度应符合要求；再取供试品溶液与对照品溶液分别顶空进样，记录色谱图，按外标法以峰面积计算。

[0232] 含乙醇和乙酸乙酯均小于 0.5%，正己烷小于 0.029%。

[0233] (2) 树脂残留量

[0234] 对照品溶液的制备：取 N,N-二甲基乙酰胺适量，精密称定，用水制成每 1ml 约含 0.1mg 的溶液，摇匀，作为内标溶液；精密称取己内酰胺适量，加内标溶液制成每 1ml 约含己内酰胺 37.5 μg 的溶液，作为对照品溶液。

[0235] 供试品溶液的制备：取本发明银杏内酯约 2.5g，精密称定，置锥形瓶中，加正己烷 25ml，回流 2 小时，取出，放冷，滤过，用少量正己烷洗涤，合并滤液与洗涤液，于 60℃ 水浴蒸干，残渣加内标溶液 1ml 使溶解，作为供试品溶液。

[0236] 测定法：以聚乙二醇 (PEG-20M)（或极性相近）为固定液；起始温度为 100℃，维持 2 分钟，以每分钟 40℃ 的速率升温至 160℃，维持 3 分钟，再以 40℃ 的速率升温至 220℃，维持 7 分钟；进样口温度为 240℃；检测器温度为 260℃。精密量取对照品溶液与供试品溶液各 1 μl，注入气相色谱仪，记录色谱图。按内标法以峰面积计算，供试品溶液中己内酰胺峰面积与内标峰面积的比值小于对照品溶液中己内酰胺峰面积与内标峰面积的比值。

[0237] 己内酰胺未检出。

[0238] 实施例 11

[0239] 银杏内酯质量控制——含量测定

[0240] 色谱条件与系统适用性试验：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-四氢呋喃-水 (25 : 10 : 65) 为流动相；用蒸发光散射检测器，漂移管温度：105℃；载气流速：3.00L/min；柱温：40℃；理论板数按白果内酯峰计算应不低于 2500。白果内酯峰与银杏内酯 C 峰的分度应大于 1.5。

[0241] 对照品溶液的制备：分别精密称取白果内酯对照品、银杏内酯 A 对照品、银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品适量，加甲醇制成每 1ml 分别含 0.15mg、0.12mg、0.1mg、0.1mg 的混合溶液，摇匀，作为对照品溶液。

[0242] 供试品溶液的制备：取本发明银杏内酯 6mg，精密称定，置 10ml 量瓶中加甲醇 1ml 溶解，加流动相稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。

[0243] 测定法：分别精密量取对照品溶液 10 μl、20 μl 和供试品溶液 10 ~ 20 μl，注入高效液相色谱仪，记录色谱图，用外标两点法对数方程分别计算白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的含量。

[0244] 按干燥品计算，白果内酯 (C₁₅H₁₈O₈) 为 42.5%、银杏内酯 A (C₂₀H₂₄O₉) 为 25.4%、银杏内酯 B (C₂₀H₂₄O₁₀) 为 18.7%、银杏内酯 C (C₂₀H₂₄O₁₁) 为 10.6%，且白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 总量 97.2%。

[0245] 实施例 12

[0246] 银杏内酯质量控制——异常毒性检查

[0247] 供试品溶液的制备：取本发明银杏内酯，加氯化钠注射液制成每 1ml 中含 0.2mg 的溶液。

[0248] 检查法：取体重 17 ~ 20g 小鼠 5 只，分别注入小鼠尾静脉供试品溶液 0.5ml，48 小时内无死亡。

[0249] 实施例 13

[0250] 银杏内酯质量控制——热原检查

[0251] 供试品溶液的制备：取本发明银杏内酯 10mg，加入到 0.9% 氯化钠注射液 50ml 中，摇匀。

[0252] 检查法：取家兔 3 只，测定其正常体温后 15 分钟内，按家兔体重每 1kg 注射 5ml 自耳静脉缓缓注入供试品溶液，每隔 30 分钟测定体温 1 次，共测 6 次，体温升高均低于 0.6℃，并且 3 只家兔体温升高总和低于 1.3℃。

[0253] 实施例 14

[0254] 银杏内酯注射液质量控制——有关物质检查

[0255] 注射液处方：

[0256]

银杏内酯：以萜类内酯计	1-10mg/ml
甘 油	0.2-0.5ml/ml
乙 醇	0.4-0.7ml/ml
注射用水	0-0.5ml/ml。

[0257] 制备方法为：

[0258] a) 配制：混合乙醇和甘油，加入银杏内酯、溶解，补加乙醇或注射用水至全量，用 5 ~ 10% 枸橼酸溶液或 1 ~ 10% 盐酸溶液调节 pH 值至 3.2 ~ 3.8；

[0259] b) 过滤除菌；

[0260] c) 灌封；

[0261] d) 灭菌。

[0262] (1) 蛋白质：取银杏内酯注射液 2ml，加水制成 50ml，作为供试品溶液。称取考马斯亮蓝 G-250 约 50mg，溶于 25ml 乙醇中，再加入 85% (w/v) 的磷酸 50ml，加水稀释至 500ml，摇匀，过滤，精密量取滤液 5ml 置试管中，再加入 1ml 供试品溶液，摇匀，放置 3min。同法做空白，于 595nm 波长下，测定吸光度，供试品溶液吸光度小于 0.05。

[0263] (2) 鞣质：取蛋白质检查项供试品溶液 1ml 加入稀醋酸 1 滴，再加明胶氯化钠试液

5 滴,摇匀,放置 10 分钟,未出现浑浊或沉淀。

[0264] (3) 树脂:取蛋白质检查项供试品溶液 5ml,加盐酸 1 滴,放置 30 分钟,无树脂状物质析出。

[0265] (4) 草酸盐:取蛋白质检查项供试品溶液 2ml,用稀盐酸调节 pH 值至 1~2,滤过,滤液用氨水调节 pH 值为 5~6,加 3%氯化钙溶液 3 滴,放置 10 分钟,未出现浑浊或沉淀。

[0266] (5) 钾离子:取蛋白质检查项供试品溶液 2ml,置 10ml 纳氏比色管中,加碱性甲醛溶液 0.6ml、3% EDTA 溶液 2 滴、3%四苯硼钠溶液 0.5ml,加水稀释至 10ml,另取标准氯化钾溶液 0.8ml,同法试验,浊度低于对照溶液。

[0267] 实施例 15

[0268] 银杏内酯注射液质量控制——溶血与凝聚检查

[0269] 供试品溶液的制备:取银杏内酯注射液(按实施例 14 制备)6ml,加入到 0.9%氯化钠注射液 100ml 中摇匀。

[0270] 检查法:取洁净玻璃试管 5 只,编号,1、2 号管为供试品管,3 号管为阴性对照管,4 号管为阳性对照管,5 号管供试品对照管。按表 12 所示依次加入 2%红细胞悬液、0.9%氯化钠溶液、蒸馏水,混匀后立即置 37℃ ±0.5℃ 的恒温箱中进行温育。

[0271] 表 12 溶血和凝聚试验加入量

[0272]

试管编号	1	2	3	4	5
2%红细胞悬液 /ml	2.5	2.5	2.5	2.5	
0.9%氯化钠溶液 /ml	2.2	2.2	2.5		4.7
蒸馏水 /ml				2.5	
供试品溶液 /ml	0.3	0.3			0.3

[0273] 如试管中的溶液呈澄明红色,底部无细胞残留或有少量红细胞残留,表明有溶血发生;如红细胞全部下沉,上清液无色澄明,或上清液虽有色澄明,但 1、2 号管和 5 号管肉眼观察无明显差异,则表明无溶血发生。3 小时后观察未产生溶血和凝聚反应。

[0274] 实施例 16

[0275] 银杏内酯注射液质量控制——指纹图谱检查

[0276] 色谱条件与系统适用性试验:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-四氢呋喃-水(25:10:65)为流动相;用蒸发光散射检测器,漂移管温度:105℃;载气流速:3.00L/min;柱温:40℃;理论板数按白果内酯峰计算应不低于 2500。白果内酯峰与银杏内酯 C 峰的分离度应大于 1.5。

[0277] 参照物溶液的制备:分别精密称取白果内酯对照品、银杏内酯 A 对照品、银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品适量,加甲醇制成每 1ml 分别含 0.15mg、0.12mg、0.1mg、0.1mg 的混合溶液,摇匀,作为参照物溶液。

[0278] 供试品溶液的制备:取[含量测定]项下的供试品溶液。

[0279] 测定法：分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液各 $20\ \mu\text{l}$ ，注入液相色谱仪，记录 60 分钟的色谱图。

[0280] 按中药色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度大于 0.95。

[0281] 实施例 17

[0282] 银杏内酯注射液质量控制——含量测定

[0283] 色谱条件与系统适用性试验：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-四氢呋喃-水 (25 : 10 : 65) 为流动相；用蒸发光散射检测器，漂移管温度： 105°C ；载气流速： $3.00\text{L}/\text{min}$ ；柱温： 40°C ；理论板数按白果内酯峰计算应不低于 2500。白果内酯峰与银杏内酯 C 峰的分离度应大于 1.5。

[0284] 对照品溶液的制备：分别精密称取白果内酯对照品、银杏内酯 A 对照品、银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品适量，加甲醇制成每 1ml 分别含 0.15mg 、 0.12mg 、 0.1mg 、 0.1mg 的混合溶液，摇匀，作为对照品溶液。

[0285] 供试品溶液的制备：精密量取银杏内酯注射液（按实施例 14 制备） 1ml ，加磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH}6.5$) 14ml ，摇匀，上 Extrelut-20 柱，吸附 15 分钟，用乙酸乙酯 100ml 洗脱，收集洗脱液，于水浴上蒸干，残渣用流动相溶解并转移至 10ml 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，用 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过，作为供试品溶液。

[0286] 测定法：分别精密吸取对照品溶液 $10\ \mu\text{l}$ 、 $20\ \mu\text{l}$ ，供试品溶液 $15\ \mu\text{l}$ ，注入高效液相色谱仪，记录色谱图，用外标两点法对数方程分别计算白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的含量。

[0287] 银杏内酯注射液中每 1ml 含银杏萜类内酯 5.15mg 。

[0288] 银杏内酯注射液中每 1ml 含银杏萜类内酯以白果内酯 ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_8$)、银杏内酯 A ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_9$)、银杏内酯 B ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$) 和银杏内酯 C ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$) 的总量计为 $1\text{--}10\text{mg}$ ，优选 $4.25\ \sim\ 5.75\text{mg}$ 。

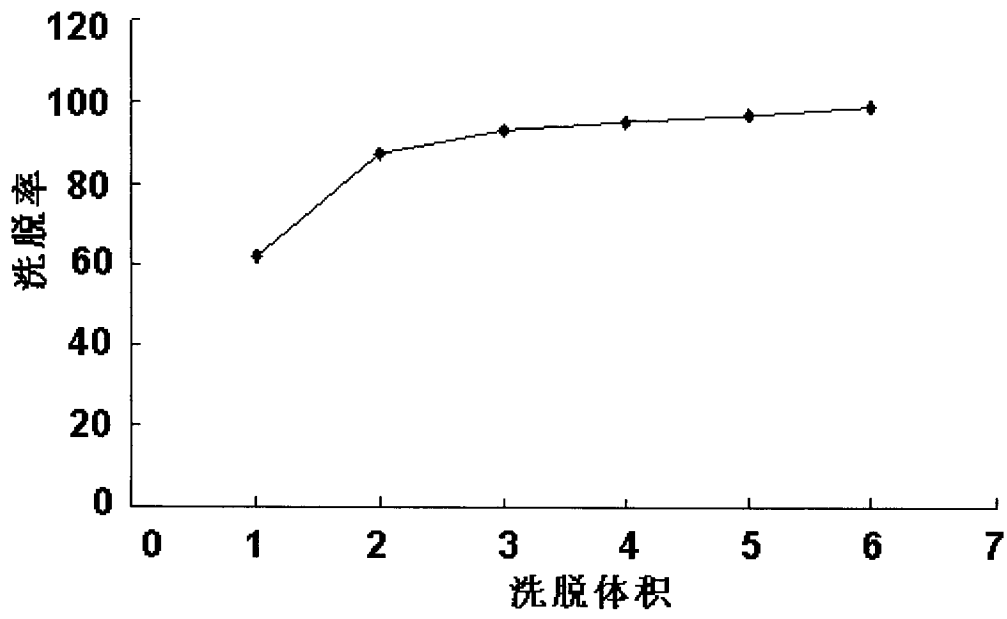


图 1

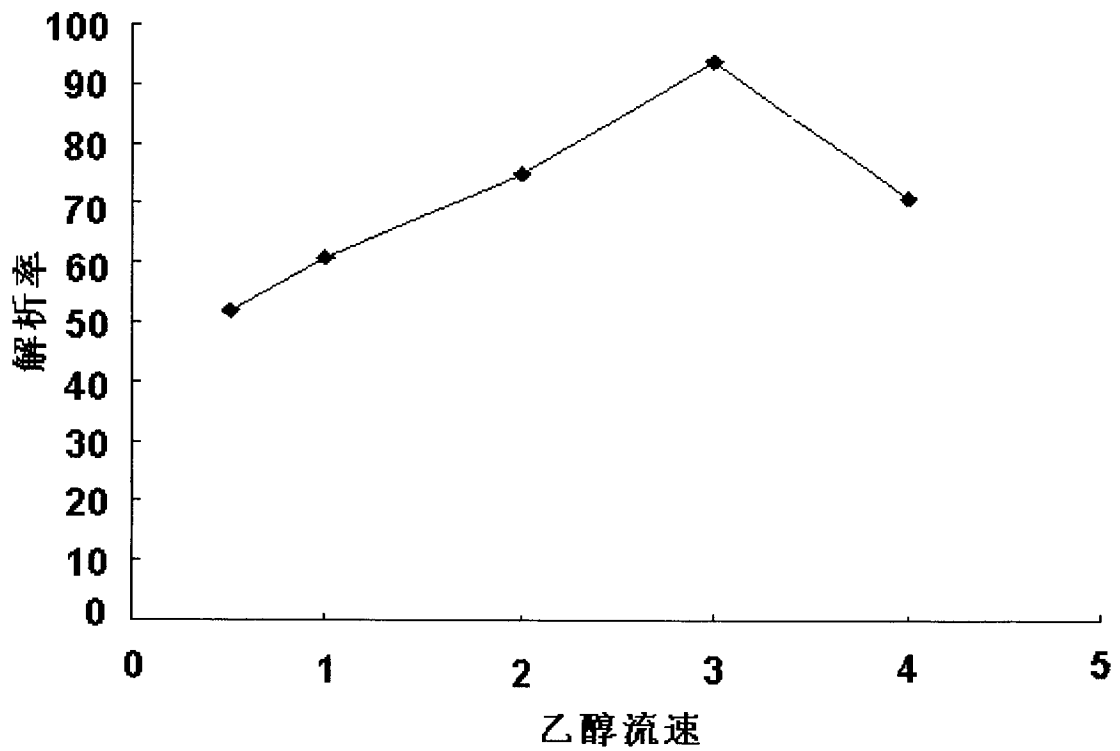


图 2

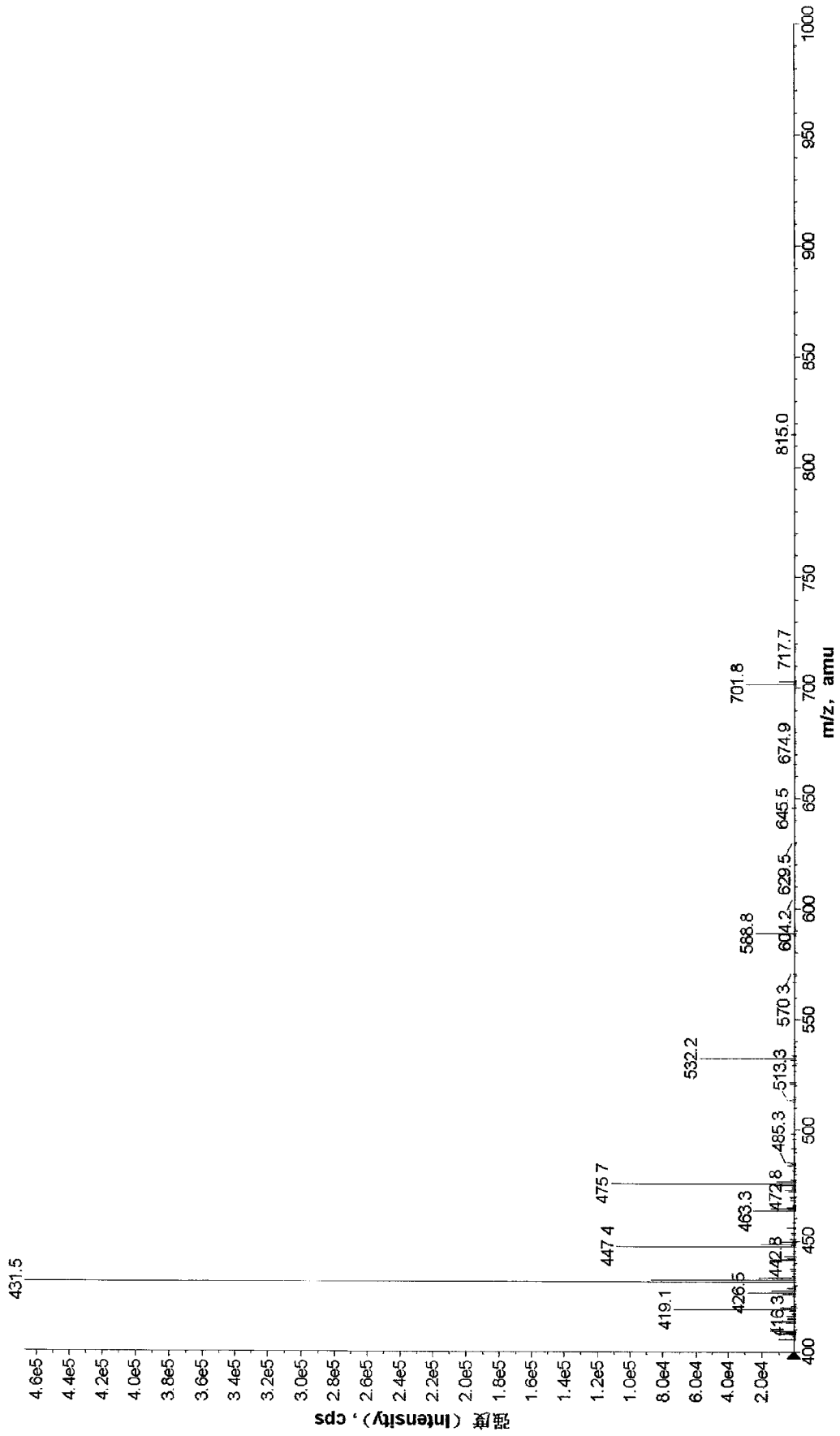


图 3

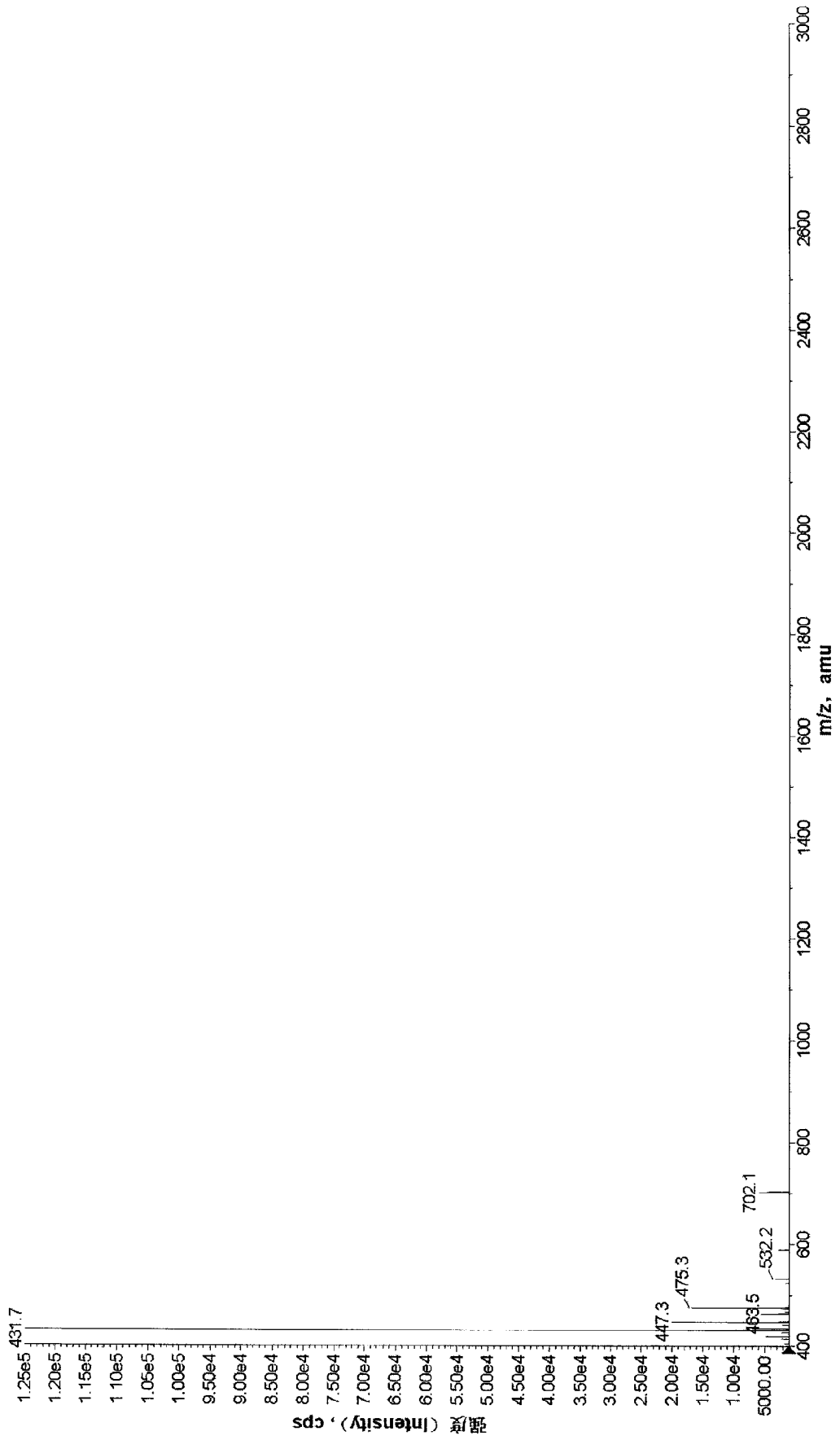


图 4

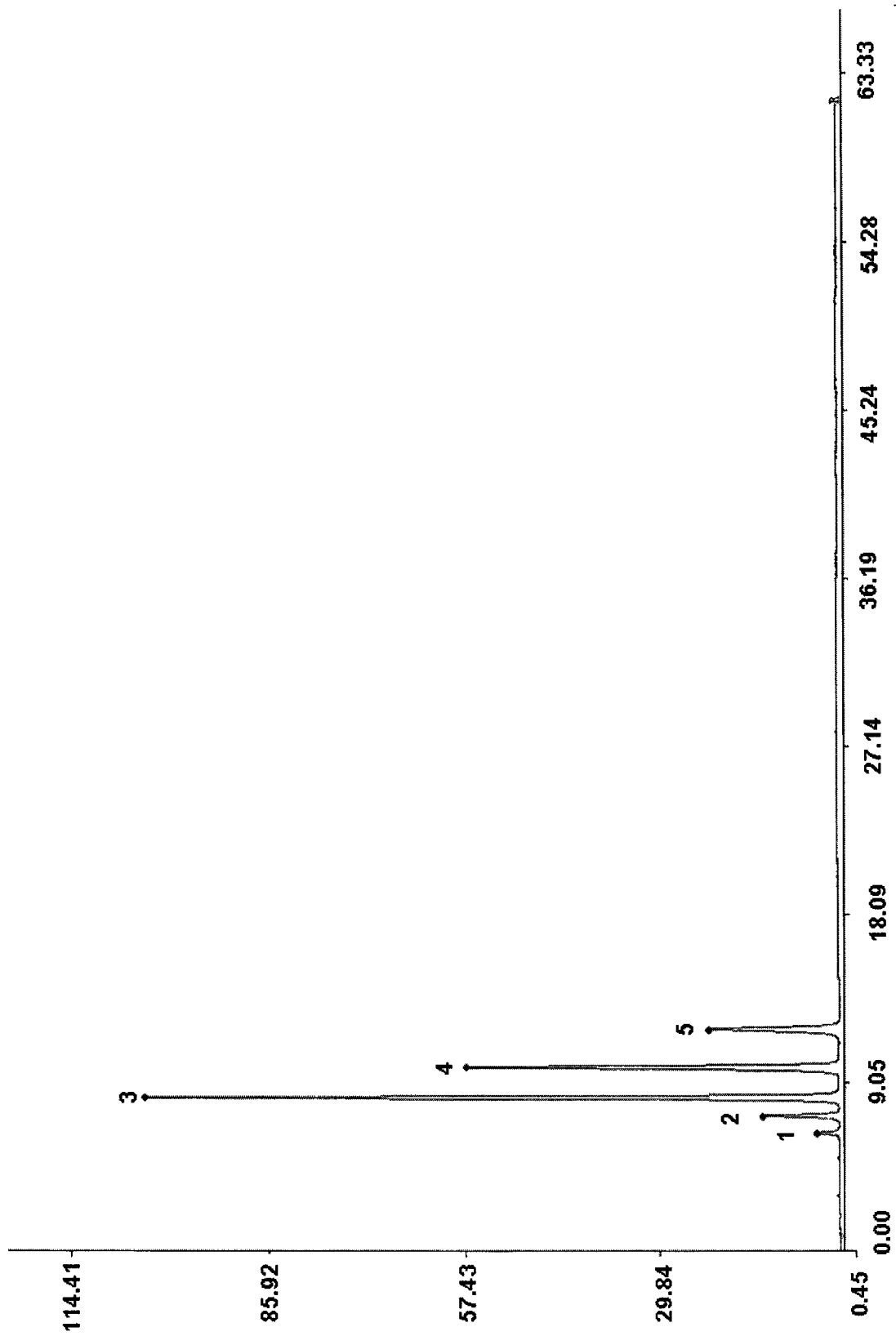


图 5