

ATLAS-LEXT NHD 自动前处理装置用于银杏叶提取物中萜类内酯的含量分析

LC-285

摘要： 本文使用 ATLAS-LEXT NHD 自动前处理装置，参考《中国药典》分析方法，自动液液萃取银杏叶提取物中萜类内酯，使用超高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法 (UHPLC-ELSD) 进行定量分析。结果显示：萜类内酯检出限在 0.007 μg ~0.030 μg 之间，定量限在 0.024 μg ~0.099 μg 之间，加标回收率为 97.8 %~103.6 %。与手动液液萃取相比，在本例中，自动液液萃取较手动液液萃取试剂和样品消耗量降低 95%、耗时缩短 40%、通量提升 6 倍。

关键词： ATLAS-LEXT NHD 银杏叶提取物 萜类内酯 ELSD

萜类内酯是银杏叶提取物中一类重要的活性成分，具有独特的十二碳骨架结构，对血小板活化因子 (PAF) 受体有强大的特异性抑制作用，被认为是最有临床应用前景的天然 PAF 受体拮抗剂。

《中国药典》中提供了银杏叶提取物中萜类内酯含量的测定方法，并对萜类内酯总量提出要求。药典采用液液萃取方法，使用高效液相色谱 -- 蒸发光散射

检测器进行定量分析。

本文参考《中国药典》分析方法，采用 ATLAS-LEXT NHD 自动前处理装置对银杏叶提取物进行自动化液液萃取，试剂和样品消耗量小、耗时短、通量大、人力成本低，且具有优异的回收率和重复性，可供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

ATLAS-LEXT NHD 自动前处理装置及岛津 LC-40-ELSD 液相色谱系统。



图 1 ATLAS-LEXT NHD (左) 和 LC-40-ELSD (右)

1.2 试验条件

1.2.1 ATLAS-LEXT NHD 前处理条件

混合强度：9 级

离心速度：5000 rpm

样品瓶架类型：3

进样针排液高度：70 mm

混合时间：180 sec

离心时间：60 sec

清洗溶液：30 % 甲醇 - 水

1.2.2 LC 分析条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 3 μm; P/N: 227-30008-05, SGLC)

流速：0.4 mL/min

进样量：0.5-1 μL

柱温：35°C

洗脱方式：等度洗脱

流动相：正丙醇：四氢呋喃：水 (1：15：84)

检测器：ELSD, 漂移管 40°C, 增益 Wide, 过滤器 4 s

1.3 对照提取物溶液的制备

取银杏叶总内酯对照提取物适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含 2.5 mg 的溶液，即得。注：本文使用的银杏叶总内酯对照提取物各成分百分含量为：白果内酯：35.81%，银杏内酯 A：27.41%，银杏内酯 B：16.67%，银杏内酯 C：13.00%。

1.4 供试品溶液的制备方式

1.4.1 手动液液萃取流程

照《中国药典》处理，取银杏叶提取物 150 mg，精密称定，加水 10 mL，置水浴中温热使溶散，加 2% 盐酸溶液 2 滴，用乙酸乙酯振荡提取 4 次 (15 mL、10 mL、10 mL、10 mL)，合并提取液，用 5% 醋酸钠溶液 20 mL 洗涤，取醋酸钠溶液层，再用乙酸乙酯 10 mL 洗涤，合并乙酸乙酯提取液及洗涤液，用水洗涤 2 次，每次 20 mL，取水层，用乙酸乙酯 10 mL 洗涤，合并乙酸乙酯液，回收溶剂至干，残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，混匀，0.22 μm 滤膜过滤，即得。

1.4.2 ATLAS-LEXT NHD 自定义程序自动液液萃取过程

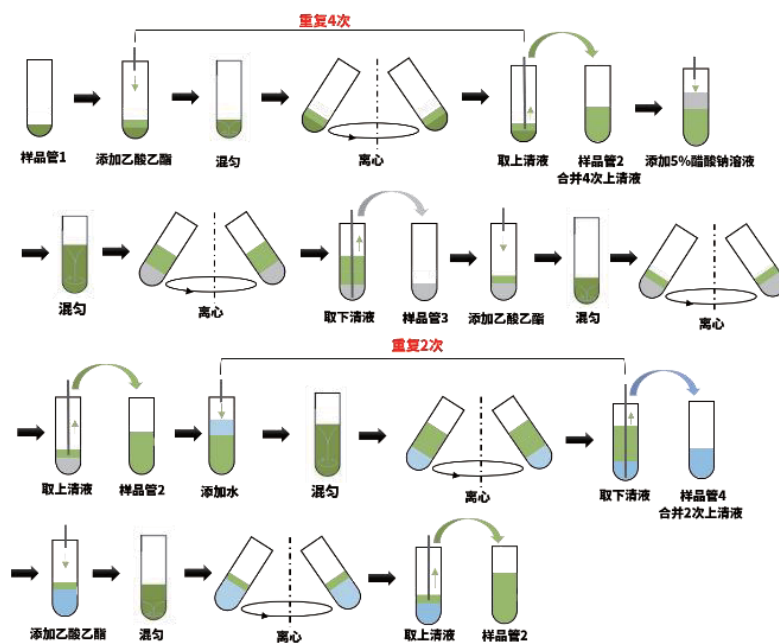


图 2 ATLAS-LEXT NHD 自动液液萃取过程和软件命令控制

取银杏叶提取物 7.5 mg，精密称定，加水 0.5 mL，置水浴中温热使溶散，加 2 % 盐酸溶液 3 μ L，置于 ATLAS-LEXT NHD 样品盘中，利用 ATLAS 自定义程序完成样品液液萃取过程。流程如下：用乙酸乙酯振摇提取 4 次（0.75 mL、0.5 mL、0.5 mL、0.5 mL），进样针吸液高度 6.9 mm，合并提取液，用 5 % 醋酸钠溶液 1 mL 洗涤提取液，进样针吸液高度 0.1 mm，分取醋酸钠溶液，再用乙酸乙酯 0.5 mL 洗涤，进样针吸液高度 10.9 mm，合并乙酸乙酯提取液及洗涤液，用水洗涤 2 次，每次 1 mL，进样针吸液高度 0.1 mm，分取水液，用乙酸乙酯 0.5 mL 洗涤，进样针吸液高度 18.4 mm，合并乙酸乙酯液。氮吹至干，用 250 μ L 甲醇复溶，混匀，0.22 μ m 滤膜过滤，即得。

1.5 测定法

分别精密吸取对照提取物溶液 5 μ L、10 μ L，供试品溶液 5 μ L，注入液相色谱仪，测定，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。

■ 结果与讨论

2.1 手动与自动前处理对比

分别采用手动液液萃取和 ATLAS-LEXT NHD 自动化液液萃取，比较了萃取过程中的试剂用量、时间消耗等，部分对比结果见表 1 和图 3。结果显示，自动液液萃取较手动液液萃取试剂和样品消耗量降低 95%、耗时缩短 40%、通量提升 6 倍。

表 1 手动与自动前处理试剂用量、耗时及通量对比

液液萃取过程	试剂用量 (mL/ 样品)		时间 (min/ 样品)		通量	
	手动萃取	自动萃取	手动萃取	自动萃取	手动萃取	自动萃取
乙酸乙酯提取	45	2.25	20	12	1	6
醋酸钠溶液洗涤	20	1	5	3	1	6
乙酸乙酯洗涤	10	0.5	5	3	1	6
水洗涤	40	2	10	6	1	6
乙酸乙酯洗涤	10	0.5	5	3	1	6
合计	125	6.25	45	27	-	-

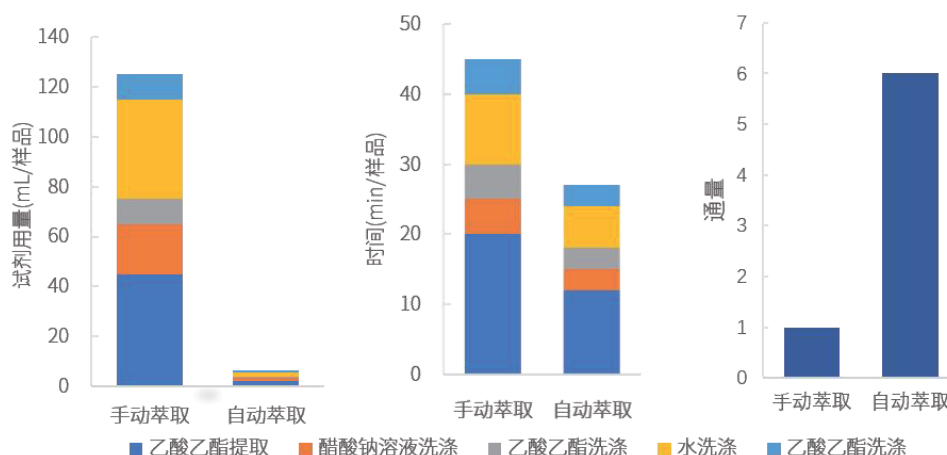


图 3 手动与自动前处理试剂用量、耗时及通量对比图

2.2 特征图谱

按照 1.2.2 分析条件，对空白溶剂、对照提取物溶液分别上机分析，空白溶剂和对照提取物溶液色谱图对比如图 3 所示，目标物出峰处无干扰。

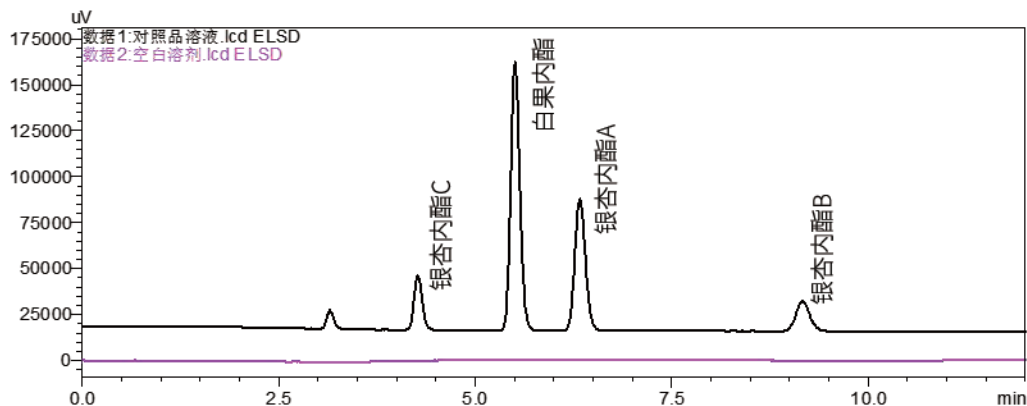


图 3 空白溶剂和对照提取物溶液色谱图

2.3 系统适用性考察

理论塔板数按白果内酯峰计算为 9573，《中国药典》系统适用性项下规定应不低于 2500，本实验结果满足《中国药典》规定。

2.4 检出限、定量限及精密度

Labsolutions 软件依据信噪比自动计算检出限 (S/N=3) 及定量限 (S/N=10)，结果见表 2。进样量 0.5 μL ，将对照提取物溶液连续测定 6 次，考察 HPLC 系统精密度。萜类内酯的保留时间 RSD 值在 0.04 %~0.10 % 之间，峰面积 RSD 值在 2.04 %~2.80 % 之间，仪器精密度良好，详见表 2。

表 2 HPLC 方法学考察结果

化合物	检出限 (μg)	定量限 (μg)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
白果内酯	0.007	0.024	0.04	2.59
银杏内酯 A	0.011	0.037	0.05	2.57
银杏内酯 B	0.030	0.099	0.10	2.04
银杏内酯 C	0.013	0.043	0.06	2.80

2.5 加标回收率

精密称取已知萜类内酯含量的银杏叶提取物样品 2 组，每组 6 份，再分别加入银杏叶总内酯对照提取物。第一组按照“1.4.1 手动液液萃取流程”，第二组按照“1.4.2 ATLAS-LEXT NHD 自定义程序自动液液萃取过程”制备供试品溶液，上机分析并计算回收率。添加量及加标回收率结果如下图表所示。结果显示，ATLAS-LEXT NHD 自动化液液萃取的回收率和重复性与手动液液萃取相当。

表 3 加标回收率结果 (n=6)

前处理方式	化合物	样品测定值 (μg)	添加量 (μg)	实测值 (μg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
手动萃取	白果内酯	0.5408	0.0895	0.6238	92.7	3.32
	银杏内酯 A	0.3611	0.0685	0.4271	96.4	5.90
	银杏内酯 B	0.2077	0.0417	0.2461	92.1	1.52
	银杏内酯 C	0.2139	0.0325	0.2468	101.2	3.23
自动萃取	白果内酯	0.4755	0.0895	0.5645	99.4	2.76
	银杏内酯 A	0.3092	0.0685	0.3802	103.6	1.81
	银杏内酯 B	0.1976	0.0417	0.2404	102.6	2.28
	银杏内酯 C	0.1901	0.0325	0.2219	97.8	2.40

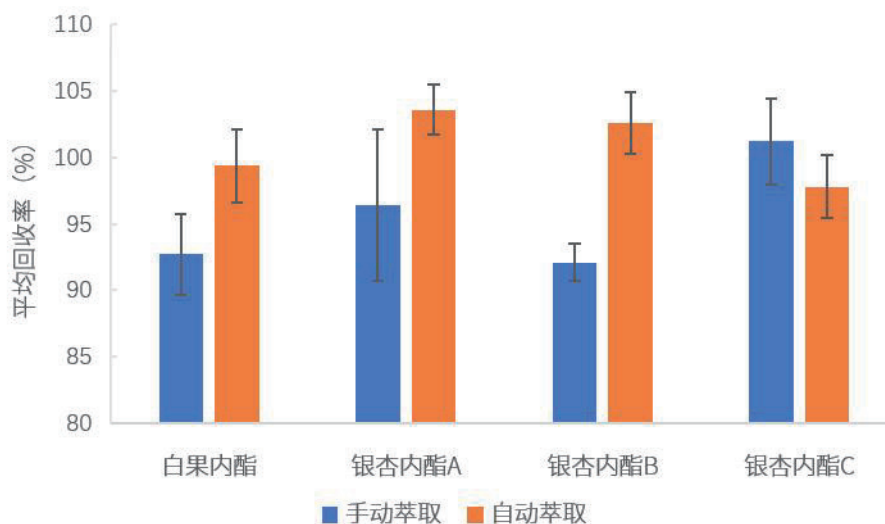


图 4 手动萃取和自动萃取对待测物回收率的影响

2.6 实际样本分析的应用

按照“1.4.2 ATLAS-LEXT NHD 自定义程序自动液液萃取过程”平行制备 6 个样本供试品溶液，上机分析，测定结果见表 4。

表 4 样品测定结果

化合物	测定值 (μg)						平均值 (μg)	RSD (%)	样品量 (mg)	萜类内酯占比 (%)
	1	2	3	4	5	6				
白果内酯	247.5	235.6	231.8	244.0	235.2	232.4	237.8	2.73	7.49	7.83
银杏内酯 A	157.0	151.0	149.0	159.6	158.7	152.4	154.6	2.84		
银杏内酯 B	96.10	100.05	97.60	101.4	100.8	96.90	98.8	2.24		
银杏内酯 C	99.65	93.20	93.20	96.05	95.55	92.75	95.05	2.76		

■ 结论

本文建立了 ATLAS-LEXT NHD 自动化液液萃取银杏叶提取物中萜类内酯，使用超高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法 (UHPLC-ELSD) 进行定量分析的方法。ATLAS-LEXT NHD 可进行自定义液液萃取过程，试剂和样品消耗量小、耗时短、通量大、人力成本低，且具有优异的回收率和重复性，为中药材自动化前处理提供新的方案，可供相关人员参考。

岛津应用云

