

银杏叶提取物的 HPLC – DAD – ELSD 指纹图谱研究*

陈凡

(漳州师范学院生物科学与技术系, 福建 漳州 363000)

摘要 目的: 建立银杏叶提取物的 HPLC – DAD – ELSD 多维指纹图谱研究方法。方法: 使用 SepaxGP – C₁₈ (3.0 mm × 150 mm, 3 μm) 为分析柱, 以 1% 甲酸水溶液、甲醇和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.4 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C; DAD 检测器扫描范围为 200 ~ 400 nm; ELSD 检测器氮气流量 1.5 L · min⁻¹, 漂移管温度 60 °C, 增益值为 1。结果: 利用该法获得了银杏叶对照提取物的多维指纹图谱, 并对 5 种不同的银杏叶提取物进行了指纹图谱相似度计算, 取得满意的效果。结论: 该法操作简单、图谱信息丰富、稳定性、重复性好, 可作为各类银杏叶原料、中间产物及银杏叶提取物产品的质量控制依据。

关键词: 银杏叶提取物; 指纹图谱; HPLC; DAD; ELSD

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 – 1793(2011)03 – 0534 – 05

HPLC – DAD – ELSD study on the finger print chromatograms of *Ginkgo biloba* extracts*

CHEN Fan

(Department of Biological and Biotechnology of ZhangZhou Normal University, FuJian, ZhangZhou, 363000, China)

Abstract Objective: To establish a HPLC – DAD – ELSD method for the determination of fingerprint chromatograms of *Ginkgo biloba* extracts. **Method:** A SepaxGP – C₁₈ (3.0 mm × 150 mm, 3 μm) was used as analysis column and 1% formic acid/methanol/acetonitrile as mobile phase at the flow rate of 0.4 mL · min⁻¹ with gradient elution. The column temperature was set to 35 °C, DAD detector's scan range was between 200 nm and 400 nm, N₂ flow rate of ELSD was 1.5 L · min⁻¹, the temperature of drift tube was set to 60 °C and the gain number was set to 1. **Result:** This method was successfully applied to acquire the fingerprint chromatograms of standardized EGb and determine the similarities between standardized EGb and 5 EGBs that from different manufacturers. **Conclusion:** The method was proved convenient, informative, stable and repeatable. It can be applied to the quality control of ginkgo leaves, its extracts and relative products.

Key words: *Ginkgo biloba* extracts; fingerprint; HPLC; DAD; ELSD

银杏(*Ginkgo biloba* L.) 为银杏科银杏属植物, 又名公孙树或白果树, 为现存古代子遗植物, 在我国分布甚广^[1], 占世界总量的 70% 以上。目前的研究成果显示: 银杏叶主要含黄酮类和萜烯内酯类化合物, 具有扩张血管、改善脑循环、抑制血小板活化因子(PAF) 作用^[2]。是一种极有开发利用前途的天然植物药资源。

近年来, 随着我国银杏叶提取物产量的提高和生产厂家的增多, 相关领域的竞争愈发激烈, 导致银杏叶提取物相关产品质量参差不齐, 劣质产品频频

出现, 严重威胁患者的用药安全。而目前国内使用较多的银杏叶提取物指纹图谱检测手段大多基于对黄酮类物质的检测, 与内酯类等紫外吸收较弱的物质有关的指纹图谱检测手段则鲜有报道。本研究建立了以 HPLC – DAD – ELSD 为基础的银杏叶提取物指纹图谱检测手段, 丰富了指纹图谱信息, 使银杏叶提取物中的内酯和黄酮两类物质能够被同时检测, 为相关产品的质量判定提供了科学的依据。

1 仪器与试剂

Agilent LC1200 高效液相色谱仪(四元泵, 在线

* 漳州师范学院科学研究资助项目(SK09021)

作者 Tel(0596) 2528735; E-mail: 119220@163.com

脱气机,手动进样器,柱温箱,DAD 检测器以及 ChemStation 色谱工作站);Alltech 3300 蒸发光散射检测器(ELSD);HH-4 型数显恒温水浴锅,广东深圳国华电器有限公司。Sartorius BS 124S 电子天平;Millipore Simplicity 超纯水系统。

银杏叶对照提取物(批号:110866-200202)、芦丁(批号:100080-200306)、槲皮素(批号:100081-200406)、银杏内酯 A(批号:110862-200407)、银杏内酯 B(批号:110863-200406)、银杏内酯 C(批号:110864-200505)、白果内酯(批号:110865-200404),中国药品生物制品检定所。其他银杏叶提取物分别购于杭州绿天生物技术有限公司、邳州市常春银杏苗圃有限公司、临沂爱康药业有限公司、浙江康恩贝制药股份有限公司和徐州康瑞莱生物制品有限公司。色谱纯甲醇、乙腈,TEDIA 公司。甲酸、乙醇均为分析纯,购于汕头市西陇化工厂。

2 色谱条件

色谱柱:SepaxGP-C₁₈(3.0mm×150mm,3μm)。流动相及洗脱程序见表1,洗脱过程柱温为35℃,流速0.4mL·min⁻¹,进样量4μL,DAD 检测器采集波长为200~400nm;ELSD 检测器氮气流速为1.5L·min⁻¹,漂移管温度为60℃,增益值为1。待DAD与ELSD数据采集完毕后,以芦丁峰保留时间为基准,将DAD谱图与ELSD谱图对齐,以补偿两种检测器联用时流动相在连接管路上消耗的时间。

表1 流动相及洗脱程序

Tab 1 Mobile phase and gradient elution program

时间(time) /min	乙腈 (acetonitrile) /%	甲醇 (methanol) /%	1%甲酸 (1% formic acid) /%
0	0.2	29.8	70
16	0.2	41.8	58
25	0.2	41.8	58
45	25	35	40

3 供试溶液的配制

银杏叶提取物溶液:精密称取银杏叶提取物6.0mg,溶于甲醇中,配成6mg·mL⁻¹的溶液,以0.22μm有机滤膜过滤后备用。

内标溶液:精密称取银杏叶对照提取物6.0mg,与少量内标物(银杏内酯A、B、C、白果内酯、芦丁、槲皮素)混合后溶于甲醇中配成溶液,经0.22μm有机滤膜过滤后备用。

4 稳定性试验

取同一对照提取物溶液,分别在0,6,12,18,24h

等不同时间点检测指纹图谱(360nm图谱和ELSD图谱),测得不同时间点各指纹峰的相对保留时间与相对峰面积,分别计算其RSD值,以评价样品的稳定性。

5 仪器精密度试验

取同一对照提取物溶液,连续进样5次,测得每次进样各指纹峰的相对保留时间与相对峰面积,分别计算其RSD值,以评价仪器的精密度。

6 重现性实验

按“3”项下方法配制5份银杏叶对照提取物溶液,分别进样测试,测得每份样品各指纹峰的相对保留时间与相对峰面积,分别计算其RSD值,用以评价该方法的重现性。

7 不同来源银杏叶提取物与对照提取物的相似度计算

将不同来源地银杏叶提取物分别按照“3”项下方法配制溶液,每种溶液各进样检测3次,得到3组指纹图谱。取3组对照提取物指纹图谱和3组待比较的银杏叶提取物指纹图谱共同导入相似度计算软件,分别计算待比较图谱与3组对照提取物平均图谱的相似度,最后取3次计算的平均值为其指纹图谱相似度。

8 结果

8.1 DAD 指纹图谱的建立与分析 由于银杏叶对照提取物中的内酯类物质无明显紫外吸收,故将DAD指纹图谱(图1)中的360nm部分作单独讨论,用以考察黄酮极类似物质的分布情况(图2)。图2中可见峰共36个,其中编号为1~17的峰以及R(芦丁)峰占总峰面积的95%以上,可认定为主要的指纹峰,其相对保留时间、比峰面积(以芦丁峰为基准)以及结合图1数据判断的DAD扫描吸收峰等情况见表2。以表2中的数据为基础,可将各指纹峰的吸收峰情况分为四种类型,即:(1)在255nm与355nm附近有最大吸收峰,与一般黄酮类物质的吸收曲线相符合;(2)在265nm与355nm附近有最大吸收峰,可能为木犀草素衍生物,应属黄酮类物质^[3,4];(3)在240nm、265nm、325nm、355nm等附近有最大吸收峰,可能是黄酮类物质与其他物质的混合物,未完全分离;(4)在265nm和315nm附近,或265nm和340nm附近有最大吸收峰,应属非黄酮类物质,其具体属性有待进一步研究阐明。综合以上分析,可初步推断:在本实验所用色谱条件下,黄酮类物质的保留时间应在40min以内,且多数黄酮类物质的保留时间在25min以内。此外,图2中标注为

“Q”的色谱峰所代表的物质为槲皮素,其在银杏叶对照提取物中含量极低。故该峰的大小可作为判断厂商是否向产品中人为添加槲皮素的重要依据。

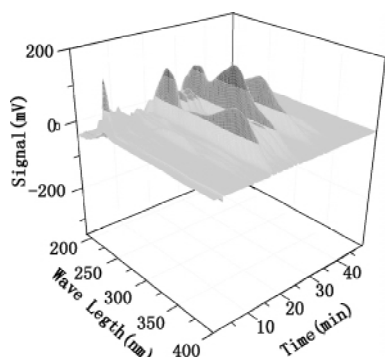


图1 银杏叶对照提取物 HPLC-DAD 图谱

Fig 1 HPLC-DAD chromatogram of standardized EGb

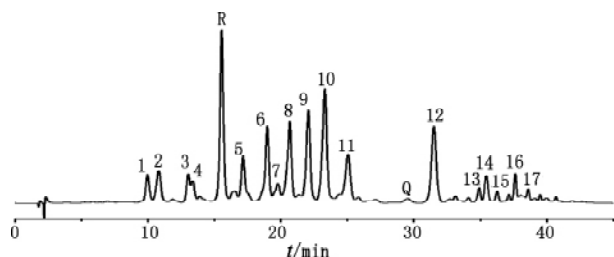


图2 银杏叶对照提取物指纹图谱(360 nm)

Fig 2 HPLC-DAD chromatogram of standardized EGb at 360 nm

表2 银杏叶对照提取物指纹峰(360 nm)所示物质特性表

Tab 2 The properties of components represented by the fingerprint peaks of standardized EGb acquired by HPLC-DAD at 360 nm

编号 (peak name)	相对保留时间 (relative retention time) /min	相对峰面积 (relative peak area)	吸收峰 (absorption peak) /nm
1	0.648	0.166	238,266,352
2	0.697	0.193	238,266,324
3	0.838	0.171	242,266,344
4	0.86	0.131	244,266,352
R	1	1	256,354
5	1.104	0.273	252,354
6	1.22	0.449	256,350
7	1.271	0.113	256,340
8	1.329	0.473	266,346
9	1.419	0.538	254,354
10	1.498	0.669	266,316
11	1.611	0.283	264,340
12	2.026	0.448	266,316
13	2.244	0.089	265,340
14	2.278	0.160	265,344
15	2.332	0.070	268,338
16	2.419	0.174	266,338
17	2.482	0.083	266,336

8.2 ELSD 指纹图谱的建立与分析 银杏叶对照提取物的 ELSD 指纹图谱见图3,其中共有可见峰32个,编号为BB、GC、GA、GB、R及编号1~9的峰占总峰面积95%以上,可视为主要指纹峰,其相对保留时间、比峰高(以芦丁峰为基准)等情况见表3。结合图3与表3可见,ELSD 指纹图谱在相对保留时间0.422,0.535,0.874,0.942附近具有4个明显的峰形。加入内酯标准物质后,可判断这4个峰分别为白果内酯(BB)、银杏内酯C(GC)、银杏内酯A(GA)和银杏内酯B(GB)。可见在ELSD 指纹图谱上,几种银杏内酯均能够被较好地检出。但ELSD本质上属于通用检测器,其灵敏度相对较低,故整个图谱仍表现得相对粗糙,基线不够平滑。而从本实验所得结果来看,对于银杏叶提取物中某些含量较大的物质,ELSD 图谱已经能够提供一定的定性和定量依据。值得注意的是:ELSD 指纹图谱中4种内酯类物质峰面积的比例与单纯的内酯检测(参考颜玉贞等^[9]的方法)所得的数据不同,即BB在总内酯中所占的比例有所降低。其原因可能在于:本实验配制银杏叶对照提取物溶液时采用的溶剂为无水甲醇,不利于BB的溶解;且为了保证ELSD检测结果的准确,本研究将溶液浓度配置在较高($6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的水平,致使BB因溶解不完全而受到损失。故配制待测液所使用的溶剂仍有待于进一步研究选择。

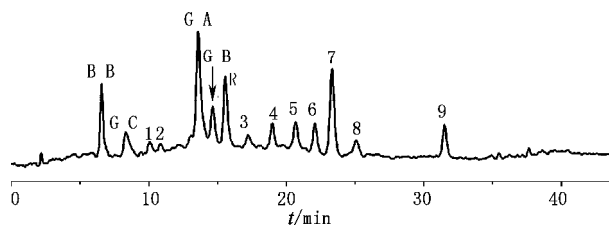


图3 银杏叶对照提取物 HPLC-ELSD 指纹图谱

Fig 3 HPLC-ELSD chromatogram of standardized EGb

表3 银杏叶对照提取物指纹峰(ELSD)所示物质特性表

Tab 3 The properties of components represented by the fingerprint peaks of standardized EGb acquired by HPLC-ELSD

编号 (peak name)	相对保留时间 (relative retention time) /min	相对峰面积 (relative peak area)
BB	0.422	0.824
GC	0.535	0.508
1	0.65	0.156
2	0.7	0.082
GA	0.874	1.611
GB	0.942	0.459
R	1	1

续表 3

编号 (peak name)	相对保留时间 (relative retention time) /min	相对峰面积 (relative peak area)
3	1.106	0.238
4	1.221	0.354
5	1.33	0.433
6	1.42	0.455
7	1.499	1.383
8	1.614	0.333
9	2.026	0.475

8.3 稳定性试验 按“4”项下方法进行稳定性实验,360 nm 谱图各指纹峰相对保留时间的 RSD 值小于 0.59%,相对峰面积 RSD 值小于 1.32%; ELSD 谱图各指纹峰相对保留时间的 RSD 值小于 0.68%,相对峰面积 RSD 值小于 2.47%。说明供试溶液在 24 h 内基本稳定,没有明显变化,符合指纹图谱检测的要求。

8.4 仪器精密度试验 按“5”项下方法进行仪器精密度实验,360 nm 谱图各指纹峰相对保留时间的 RSD 值小于 0.42%,相对峰面积 RSD 值小于 1.13%; ELSD 谱图各指纹峰相对保留时间的 RSD 值小于 0.55%,相对峰面积 RSD 值小于 1.96%。说明实验仪器的总体精密度良好,符合指纹图谱检测的要求。

8.5 重现性实验 按“6”项下方法进行重现性实验,360 nm 谱图各指纹峰相对保留时间的 RSD 值小于 0.48%,相对峰面积 RSD 值小于 1.69%; ELSD 谱图各指纹峰相对保留时间的 RSD 值小于 0.61%,相对峰面积 RSD 值小于 2.66%。说明实验的总体重现性良好,符合指纹图谱检测的要求。

8.6 不同来源银杏叶提取物相似度计算结果 实验中 5 种不同来源银杏叶提取物相似度计算结果见表 4。分析表 4 所示数据可发现: 5 个样本的 360 nm 指纹图谱相似度普遍高于 ELSD 指纹图谱相似度,且最低相似度为 0.87,最高为 0.95,说明国内厂家的生产过程中可能考虑了指纹图谱相似性的问题,故产品与标准品区别不大。而对于 ELSD 谱图来说,其相似度最低为 0.81,最高为 0.95,变化范围较大。其原因可能在于: 目前国内主流的银杏叶提取物指纹图谱检测方法为 HPLC - UV 或 HPLC - DAD 法,厂家对产品质量的检测也更多地参考了这两种方法,导致应用 ELSD 指纹图谱的必要性不足、重视度不够,故各厂家产品的 ELSD 指纹图谱相似度区别较大。此外,ELSD 属于通用检测器,对样品

中的不同组分基本没有选择性,故样品中杂质对图谱的干扰要明显大于 DAD 检测器在特定波长下所获得的数据,这可能使结果图中出现基线不平或小杂峰较多的情况。再加上 ELSD 本身的灵敏度较低,基线噪音大等不足之处,都可能对相似度的计算产生影响,故从实验结果来看,ELSD 不论是谱图相似度还是仪器精密度等,都略逊于 DAD。

表 4 不同来源银杏叶提取物相似度计算结果

Tab 4 Results of the fingerprint similarity of EGbs from different manufactures

样品号 (sample number)	DAD 指纹图谱相似度 (fingerprint similarity of DAD) /360 nm	ELSD 指纹图谱相似度 (fingerprint similarity of ELSD)
1	0.90	0.81
2	0.95	0.90
3	0.87	0.85
4	0.93	0.95
5	0.89	0.87

9 讨论

9.1 本研究在常规 HPLC 法的基础上,以联用的 DAD - ELSD 检测器作为指纹图谱测定手段,对银杏叶提取物进行了研究,建立了相应的多维指纹图谱。相比以往单波长指纹图谱,本法充分利用了 DAD 检测器的优势,对谱图进行深入分析,在考察特定波长谱图相似度的同时,也将不同物质的吸光特性作为参考依据。而相比谱图信息最为全面的 HPLC - DAD - MS - MS 法^[8]而言,本法以 ELSD 替代 MS,使运行成本大大降低,虽然在灵敏度方面不及 MS,但其测定结果已能基本满足银杏叶内酯及其他含量较高成分的分析需要。

9.2 通过本课题的研究发现: 向流动相中少量添加乙腈后,对内酯 A、B 峰的保留时间具有极大影响,而对指纹图谱中其他组分的保留时间则影响较小。总体而言,降低乙腈含量将使内酯 A、B 峰的保留时间减少,增加乙腈含量则使内酯 A、B 峰的保留时间增加,直至合并为 1 个峰(在本实验所用色谱柱上,当流动相中乙腈含量提升至 5% 以上时,GA、GB 峰合并)。故实际操作中,可根据色谱柱的特性,适当调整流动相中乙腈的比例,使内酯 A、B 峰的保留时间处于一个合适的范围,尽量减少其他物质对内酯检测的影响。根据这一原则,本实验控制色谱流动相中乙腈的组成为 0.2%,在此条件下,银杏内酯 A 和 B 的保留时间位于图 2 中的 4#峰与 R 峰之间,有效地降低了非内酯类物质的干扰,保证了

检测结果的准确。

9.3 随着 HPLC 及其各类配套检测器普及化程度的日益提高,联用不同类型检测器获得的中药制剂指纹图谱,将能够更加完整细致地表征待测物的内在质量,以把控药物品质。但检测器联用后产生的多维指纹图谱数据在应用上仍缺少一定的标准。如本研究所涉及的 DAD-ELSD 联用谱图在最终相似度结果中的权重,以及如何将 DAD 谱图中各物质的吸光度曲线应用于相似度的评价等问题,都亟待解决。故作者在此建议相关部门应进一步完善中药指纹图谱的技术标准,开发使用新的指纹图谱测定方法,以杜绝某些不良商家的以次充好现象,保证患者的用药安全。

参考文献

- SHI Qing-wen(史清文), LIU Su-yun(刘素云), ZHANG Wen-su(张文素), *et al.* The survey of the research and development of the leaves of *Ginkgo biloba* L(银杏叶的研究开发概况). *Nat Product Res Develop*(天然产物研究与开发), 1995, 7(3): 71
- JU Jian-ming(鞠建明), DUAN Jin-ao(段金廠), QIAN Da-wei(钱大玮), *et al.* Comparison of fingerprints of *Ginkgo biloba* leaves at different ages of trees in different collecting seasons(不同树龄邳州银杏叶在不同采收期指纹图谱比较). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2005, 36(9): 1388
- Teris A van Beek. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. *J Chromatogr A*, 2002, 967: 21
- LING Yun(凌云), HE Ban-zuo(何板作), BAO Yan-yan(鲍燕燕), *et al.* Studies on the chemical constituents of common ducksmeat (*Spirodela polyrrhiza*) (浮萍的化学成分研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1999, 30(2): 88
- YAN Yu-zhen(颜玉贞), XIE Pei-shan(谢培山). Assay of terpenes lactones in *Ginkgo biloba* leaves by RP-HPLC-ELSD(RP-HPLC-ELSD 法测定银杏叶中的 4 种萜类内酯含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2001, 21(3): 173
- MA Xin(马欣), SUN Yu-qin(孙毓庆). Studies of multi-dimensional fingerprint chromatograms of extracts of *Ginkgo Leave*(银杏叶提取物的多维指纹图谱研究). *Chin J Chromatogr*(色谱), 2003, 11, 21(6): 562
- QIAN Hao-quan(钱浩泉), XIE Pei-shan(谢培山). Methodology study of HPLC fingerprint of herbal medicine—A case analysis of the fingerprint of total flavonoids extracted from *Ginkgo Biloba* leaves(中药液相色谱指纹图谱的方法学研究——银杏叶总黄酮指纹图谱个例剖析). *J Inst Anal*(分析测试学报), 2004, 23(5): 7

(本文于 2010 年 6 月 22 日收到)