

银杏叶内酯成分的指纹图谱研究

陆晓峰*, 彭国平, 金灯萍

(南京中医药大学植物药研究与新药开发中心, 南京 210029)

摘要: 以白果内酯为参照物, 应用 HPLC 法建立银杏叶药材的内酯指纹图谱研究。采用: 色谱柱: Kromasil C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-四氢呋喃-水梯度洗脱; 检测器: 蒸发光散射检测器; 柱温: 35 ℃; 流速: 0.8 mL/min。本方法精密度和重复性试验均符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》中要求, 主要指纹峰 9 个。

关键词: 银杏; 银杏内酯; 指纹图谱; HPLC; ELSD

中图分类号: R284.1

HPLC Fingerprint of the Ginkgolide Component of *Ginkgo biloba* L.

LU Xiaofeng*, PENG Guoping, JIN Dengping

(Plant Refinement Engineering Center of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: Bilobalide was used as internal standard compound for the HPLC fingerprint establishment of the ginkgolide of *Ginkgo biloba* L. The method is as follow: Column: Kromasil C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Mobile phase: methanol-tetrahydrofuran-water with gradient elution; Detector: Evaporative light scattering detector (ELSD); Column temperature: 35 ℃. The precision and the retest are in accordance with the requirement. Nine peaks are taken as fingerprint peaks. This method can be used for the quality control of *Ginkgo biloba* L.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; ginkgolide; fingerprints; HPLC; ELSD

银杏叶为银杏科植物银杏(*Ginkgo biloba* L.)的干燥叶。性甘、苦、涩、平, 具有敛肺, 平喘, 活血化瘀, 止痛的功效, 为常用中药。现代研究表明, 银杏叶中含有黄酮类、萜类、酚类、生物碱类、聚异戊二烯、多糖等多种具有药理作用的活性成分^[1]。根据分析测定, 黄酮类化合物、萜类内酯被认为是主要活性成分^[2,3]。

不同产地、气候及采收季节对银杏叶所含各类成分影响较大, 但目前常用的检测银杏质量的方法是对其中的银杏总内酯含量进行测定, 以这种成分总含量的高低来评价中药质量的优劣有其显在的缺点, 例如, 不能对每个主要成分的百分含量作要求, 也不能对除银杏内酯 A、B、C 和白果内酯以外的成分进行质量控制。我们根据国家药典委员会颁布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[4],

对江苏邳州银杏基地产的银杏叶药材进行了指纹图谱研究, 测定了十批银杏叶(2003 年 10 月于邳州铁富镇采收), 建立了银杏叶内酯指纹图谱, 作为控制其质量的标准。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 液相色谱仪, Alltech 500 蒸发光散射检测器, Rheopyne 进样器, WDL-95 液相色谱工作站。甲醇为色谱纯(Tedia company), 四氢呋喃为色谱纯(CALDON LABORATORIES LTD.), 水为亚沸蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。参照物白果内酯由中国药品生物制品检定所提供(批号: 865-9601)。

2 实验结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 淮阴汉邦科技有限公司), 流动相: 甲醇-四氢呋喃-水(见表 1); 柱温: 35 ℃; 流速: 0.8 mL/min。蒸发光

收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-11-01

* 通讯作者 Tel: 86 25 86798186; E-mail: kfeng28@yahoo.com.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

散射检测器检测, 参照物(白果内酯)峰计算应不低于3000。

表1 梯度洗脱表
Table 1 Gradient elution

时间Time	A% (四氢呋喃 水= 10: 75) A% (Tetrahydrofuran: water= 10: 75)	B% (甲醇) B% (Methanol)
0 $\rightarrow$ 20	75	25
20 $\rightarrow$ 60	75 $\rightarrow$ 32	25 $\rightarrow$ 68

2.2 参照物溶液的制备

精密称取于60℃干燥至恒重的白果内酯参照物适量, 用流动相制成每1 mL含2 mg的溶液, 即得。

2.3 银杏叶供试溶液的制备

取银杏叶粉末(过20目筛)25 g, 用60%的乙醇渗漉(先浸润2 h), 流速为1 mL/min, 收集渗漉液250 mL, 水浴蒸至近干(约20 mL), 加2%盐酸溶液5滴, 用石油醚(60~90℃)振摇提取2次(20、20 mL), 分取水液, 用醋酸乙酯振摇提取4次(30、20、20、20 mL), 分取醋酸乙酯液, 用5%醋酸钠溶液20 mL洗涤, 分取醋酸钠液, 再用醋酸乙酯10 mL洗涤。分取醋酸乙酯洗液, 用水洗涤2次, 每次20 mL, 分取水洗液, 用醋酸乙酯20 mL洗涤, 合并醋酸乙酯液, 回收醋酸乙酯至干, 残渣用丙酮溶解并转移至5 mL量瓶中, 加丙酮至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 方法学考察

对照试验: 吸取参照物溶液5 μ L, 注入高效液相色谱仪, 色谱图见图1。

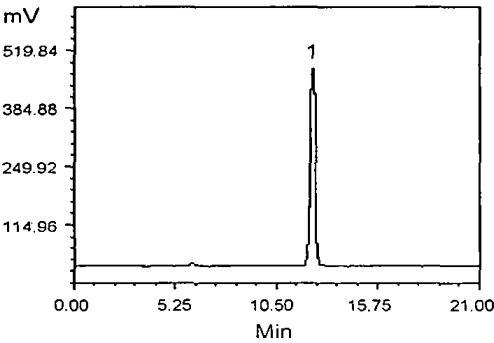


图1 银杏叶内酯指纹图谱参照物(白果内酯)色谱图
Fig. 1 HPLC figure of the standard compound (bilobalide)

精密度试验: 取同一供试品溶液(批号1#)连续进样6次, 测得各共有峰的相对保留时间及主要峰的相对峰面积RSD小于3%, 表明精密度良好。

重复性试验: 取供试品(批号1#)6份, 精密称定, 制备供试品溶液, 分别进样, 测得各共有峰的相对保留时间及主要峰的相对峰面积的RSD小于3%, 表明其重复性试验较好。

稳定性试验: 取同一供试品溶液(批号1#), 分别在0, 3, 6, 9, 12, 15 h进样, 测得各共有峰的相对保留时间及主要峰的相对峰面积RSD小于3%, 表明供试品溶液在15 h内稳定。

2.5 银杏叶粉针内酯标准指纹图谱的建立

比较十批供试品溶液的谱图给出的相关参数, 其中9个峰是各批供试品共有的, 因此确定这9个峰为其共有指纹峰, 白果内酯峰最大, 选作为S峰(见图2), 十批银杏叶内酯指纹图谱共有峰的相对保留时间见表2。

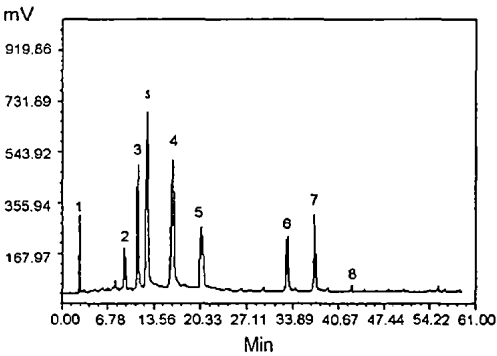


图2 银杏叶内酯 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC figure of ginkgolide

表2 十批银杏叶药材内酯指纹图谱共有峰的相对保留时间
Table 2 Relative reserve time of public peaks in ginkgolide fingerprints of ten *Ginkgo biloba* L. samples

样品号 No.	序号 Serial number								
	1	2	3	S	4	5	6	7	8
1#	0.205	0.741	0.890	1.0	1.309	1.653	2.734	3.063	3.506
2#	0.178	0.730	0.884	1.0	1.321	1.678	2.802	3.145	3.607
3#	0.207	0.739	0.888	1.0	1.298	1.632	2.627	2.948	3.382
4#	0.204	0.728	0.878	1.0	1.245	1.641	2.659	2.986	3.428
5#	0.200	0.728	0.878	1.0	1.232	1.639	2.642	2.961	3.394
6#	0.203	0.728	0.879	1.0	1.232	1.637	2.649	2.969	3.400
7#	0.200	0.725	0.877	1.0	1.231	1.640	2.660	2.976	3.406
8#	0.207	0.729	0.879	1.0	1.232	1.632	2.634	2.954	3.385
9#	0.203	0.729	0.879	1.0	1.228	1.632	2.657	2.991	3.439
10#	0.201	0.729	0.880	1.0	1.251	1.646	2.668	2.977	3.399
平均值 Average	0.201	0.731	0.881	1.0	1.258	1.643	2.673	2.997	3.435

此外, 3、4、5、6、7号峰的峰面积相对较大, 占到总峰面积的5%以上, 故需考虑这几个峰的峰面积

比值, 其余各共有峰按其相对保留时间定性, 计算其 主要峰的相对峰面积及其占总峰峰面积, 见表 3。

表 3 十批银杏叶药材内酯指纹图谱共有峰的相对峰面积										
Table 3 Relative peak area of public peaks in ginkgolide fingerprints of ten <i>Ginkgo biloba</i> L. samples										
样品号 Sample No.	主峰 1 Main peak 1		主峰 2 Main peak 2		主峰 3 Main peak 3		主峰 4 Main peak 4		主峰 5 Main peak 5	
	$\ln(A_1)$ / $\ln(A_s)$	A_1/A_e	$\ln(A_2)$ / $\ln(A_s)$	A_2/A_e	$\ln(A_3)$ / $\ln(A_s)$	A_3/A_e	$\ln(A_4)$ / $\ln(A_s)$	A_4/A_e	$\ln(A_5)$ / $\ln(A_s)$	A_5/A_e
1	0.958	13.718	0.994	23.576	0.938	9.982	0.919	7.547	0.938	10.015
2	0.969	14.785	1.000	23.897	0.945	10.256	0.926	7.723	0.939	9.445
3	0.976	14.858	1.005	23.123	0.958	11.188	0.941	8.679	0.950	9.974
4	0.973	14.531	0.996	20.737	0.957	11.298	0.938	8.436	0.952	10.480
5	0.980	15.641	0.997	20.296	0.959	11.178	0.940	8.254	0.951	9.923
6	0.965	20.985	0.990	20.432	0.950	10.807	0.926	7.435	0.947	10.393
7	1.011	20.318	1.016	21.981	0.981	12.904	0.941	7.073	0.940	6.914
8	1.015	21.067	1.019	22.230	0.984	13.262	0.947	7.528	0.943	7.171
9	1.003	18.929	1.011	21.541	0.977	12.825	0.945	7.908	0.949	8.424
10	0.985	17.546	0.995	20.374	0.963	12.314	0.927	6.949	0.947	9.632
平均值 Average	0.984	16.436	1.002	21.818	0.961	11.601	0.935	7.753	0.946	9.237

根据上述数据建立相应的银杏叶内酯标准指纹图谱, 见表 4。(括号中标示的是相对保留时间或相对峰面积的 ln 值所允许的波动范围)

表 4 银杏叶药材内酯的标准指纹图谱		
Table 4 The standard fingerprint of <i>Ginkgo biloba</i> L. ginkgolide		
项目 Item	标准图谱 Standard fingerprint	
序号 Serial number	相对保留时间 Relative reserve time	峰面积比值(自然对数) Peak area ratio, natural logarithm
1	0.201 (0.141~ 0.261)	
2	0.731 (0.511~ 0.950)	
3	0.881 (0.617~ 0.969)	0.984 (0.738~ 1.230)
S	1	1
4	1.258 (1.069~ 1.635)	1.002 (0.802~ 1.203)
5	1.643 (1.150~ 2.136)	0.961 (0.721~ 1.201)
6	2.673 (1.871~ 3.475)	0.935 (0.655~ 1.216)
7	2.997 (2.098~ 3.896)	0.946 (0.662~ 1.230)
8	3.435 (2.404~ 4.465)	

3 讨论

由于药材内酯指纹图谱是由蒸发光散射检测器检测的, 它的 ln(浓度) 与 ln(峰面积) 呈正比, 故我们

采用 $\ln(\text{主要峰面积}) / \ln(\text{对照峰面积})$ 比值作为范围。

银杏叶粉针内酯类主要有效成分为白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 等, 四个成分均在药典附有对照品。在这 4 个成分中, 白果内酯、银杏内酯 A 的成分含量高, 银杏内酯 B、银杏内酯 C 含量较低, 峰面积相对较小。其中白果内酯的峰面积最大, 峰型也较好, 因此选择白果内酯作为参照物。

参考文献

1 Zhuang LH(庄玲华), Li H(李晖). General situation survey in studies on active components of ginkgo leaves. *J Med Study Huaxi*(华西药 学杂志), 2002, 17: 437-439

2 Zhang FJ(张富捐), Advance in studies on active components of ginkgo leaves. *J Xuchang Teachers Coll* (许昌师 专学报) 2002, 21(5): 18-22

3 Li KQ(李开泉), Chen W(陈武). Chemical study of ginkgo leaves. *J Jiangxi Coll Tradit Chinese Med* (江西中 医学院学 报), 2002, 14(1): 61-63

4 State of Food and Drug Administration. Technique Require of Fingerprint of Chinese Traditional Medicine Injection〔中药注 射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行) 〕