

银杏叶提取物的 HPLC/UV 指纹图谱研究

帅英丽,于红艳,李志强

天津生物化学制药有限公司,天津 300308

[摘要] 目的:建立银杏叶提取物的 HPLC/UV 指纹图谱。方法:以银杏叶提取物的 HPLC/UV 指纹图谱为参照物,采用 HPLC 法分析,并加以计算机辅助相似性评价系统对指纹图谱进行了相似度分析。采用 Diamonsil(C₁₈,250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱;以流动相(A)水-乙腈-异丙醇-柠檬酸(1 000:470:50:6.08)、流动相(B)水-乙腈-异丙醇-柠檬酸(1 400:200:30:6.88)进行梯度洗脱;流速:1.0 ml/min,检测波长:360 nm。结果:在本试验条件下进行测试,可以建立银杏叶提取物以及银杏叶指纹图谱检测方法,得到分离度、重复性均较好的银杏叶提取物 HPLC/UV 指纹图谱,标示了 13 个共有峰,可以方便简单、并且有效控制不同厂家来源的银杏叶提取物。结论:银杏叶提取物指纹图谱的建立,为其质量控制提供了依据,也为银杏叶提取物以及银杏叶的指纹图谱国家标准的确立提供了更为科学的依据和有效的鉴别方法。

[关键词] 银杏叶提取物;指纹图谱;HPLC/UV

[中图分类号] R917

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2011)05(c)-055-03

Study on the Fingerprints Chromatograms of Ginkgo biloba Extract by HPLC/UV

SHUAI Yingli, YU hongyan, LI Zhiqiang

Tianjin Biological Chemical Pharmaceutical Company, Tianjin 300308, China

[Abstract] Objective: To establish the fingerprints chromatograms of Ginkgo biloba extract by HPLC/UV. **Methods:** Ginkgo biloba extract with HPLC/UV fingerprint as the reference method using HPLC analysis and to computer-aided similarity evaluation system for the similarity analysis of fingerprints. Separation was performed of Diamonsil (C₁₈, 250 mm×4.6 mm, 5 μm). Gradient elute was performed by the mobile phase consisting of water-acetonitrile-Isopropanol-citric acid (1 000:470:50:6.08) and water-acetonitrile-Isopropanol-citric acid (1 400:200:30:6.88) with the flow rate of 1.0 ml/min. The detecting wave length was set at 360 nm. **Results:** Perfect fingerprints chromatograms were obtained which can be used for the evaluation of Ginkgo biloba extract, 13 common peaks were confirmed in fingerprints chromatograms. **Conclusion:** Ginkgo biloba extract Fingerprinting, provides a basis for quality control, but also for Ginkgo biloba extract and Ginkgo biloba fingerprint to establish national standards to provide a more scientific basis and effective method of identifying.

[Key words] Ginkgo biloba extract; Fingerprints chromatograms; HPLC/UV

银杏叶提取物是从我国特有的银杏科植物银杏(*Ginkgo biloba* L.)的干燥叶中得到的提取物,具有敛肺、活血化瘀等功效,20世纪60年代以来,国内外学者对银杏叶的化学成分、药理及临床做了大量的工作,现国内外已有多种制剂上市。其主要含有黄酮类、萜类内酯类和酚酸类化合物,《中国药典》2005年版(一部)对银杏叶提取物中黄酮及萜类内酯类的含量均有规定,但是因为中药成分的复杂性,往往控制这两种成分还不能真实反映其质量,而色谱指纹图谱分析可以使中药所含多种化学成分的整体可视化,为更好地控制产品的质量提供了可行性。为了更好地控制产品的质量,采用高效液相色谱法对本品指纹图谱进行了研究,得到了分离度、重现性均较好的银杏叶提取物特征指纹图谱,为其质量控制提供了依据,也为银杏叶提取物以及银杏叶的指纹图谱国家标准的确立提供了更为科学的依据和有效的鉴别方法^[1]。

1 仪器和试剂

Shimadzu LC-10AT VP 双泵高效液相色谱仪,Shimadzu SPD-10A VP 紫外检测器,Classvp 色谱工作站。乙腈、异丙醇为色谱纯,磷酸、磷酸二氢钾、柠檬酸均为分析纯,芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100080-200707),银杏叶对照提取物(中国药品生物制品检定所,批号:100080-

200609),银杏叶提取物(北京康立生医药技术开发有限公司,批号:00601、00602、00603、00701、00702、00703、00801、00802、00803、00901)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 参照物溶液的制备 精密称取芦丁对照品适量,加 50% 甲醇制成每 1 ml 含 0.03 mg 的溶液,即得。

2.1.2 对照提取物的制备 精密称取银杏叶对照提取物 0.087 5 g,置于 25 ml 量瓶中,水浴加热使溶解,用水稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取银杏叶提取物 0.087 5 g,置于 25 ml 量瓶中,水浴加热使溶解,用水稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.1.4 测定法 分别精密吸取参照物溶液、对照提取物溶液与供试品溶液各 10 ml,注入液相色谱仪,测定,记录 0~100 min 的色谱峰,即得。

2.2 色谱条件

Diamonsil(C₁₈,250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱;检测波长:360 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:25℃;流动相(A):水-乙腈-异丙醇-柠檬酸(1 000:470:50:6.08);流动相(B):水-乙

腈-异丙醇-柠檬酸(1 400:200:30:6.88);梯度洗脱条件见表1。

表1 梯度洗脱条件

时间(min)	A(%)	B(%)
0~10	10→10	90→90
11~30	10→25	90→75
31~45	25→25	75→75
46~80	25→70	75→30
81~100	70→100	30→0
100~100.01	100→10	0→90

2.3 方法学考察

2.3.1 检测波长的选择 取芦丁对照品溶液,在200~400 nm波长范围进行扫描,结果在255 nm和360 nm波长处有最大吸收;另取槲皮素、山奈素、异鼠李素的线性范围分别为0.050~0.400 μg,0.005~0.040 μg,0.005~0.040 μg,在200~400 nm波长范围对槲皮素、山奈素、异鼠李素对照品溶液进行扫描,结果分别在368 nm、366 nm、370 nm波长处有最大吸收,考虑到指纹图谱检测的色谱峰主要是黄酮醇苷,所以选择360 nm作为检测波长。

2.3.2 参照物确定试验 银杏叶提取物中芦丁的含量较大,在此色谱条件下所获得的色谱相应值较高,所以选择芦丁作为

参照物,照“2.1”项下的要求制备参照物溶液,进样10 μl,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,其主峰的保留时间用于确定银杏叶提取物中芦丁峰的峰位^[2]。

2.3.3 精密度试验 取同一份供试品溶液,连续进样6次,各主要色谱峰的相对保留时间及相对峰面积比值的RSD分别为2.68%和2.44%,均<3%,表明精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一批银杏叶提取物,照“2.3”项下的要求制备供试品溶液,进样10 μl,分别在0、2、6、12、24 h不同时间点进样,各主要色谱峰的相对保留时间及相对峰面积比值的RSD分别为2.48%和2.88%,均小于3%,表明供试品溶液至少在24 h内稳定。

2.3.5 重复性试验 取同一批银杏叶提取物6份,按供试品溶液的制备和检测方法分别进行检测,各主要色谱峰的相对保留时间及相对峰面积比值的RSD分别为2.89%和2.15%,均小于3%。表明本方法的重复性良好。

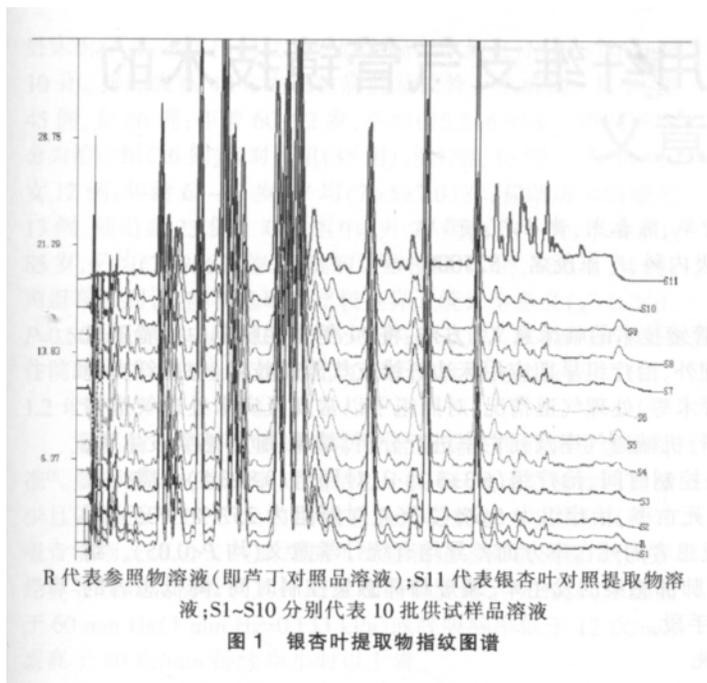
2.3.6 样品测定及结果 13个共有峰相对保留时间及相对峰面积的RSD均<3.0%,经中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件计算,除有个别峰有一定的差别,10批样品相互之间相似度均>0.90。说明样品间质量重复性较好,符合测试要求。见表1、2及图1。

表1 不同批次银杏叶提取物指纹图谱的测定结果(相对保留时间)

峰号	批次										RSD(%)
	00601	00602	00603	00701	00702	00703	00801	00802	00803	00901	
1	0.570	0.580	0.569	0.576	0.570	0.570	0.569	0.561	0.572	0.589	1.33
2	0.837	0.836	0.836	0.837	0.837	0.837	0.836	0.839	0.859	0.846	0.88
3	0.959	0.959	0.960	0.960	0.959	0.959	0.982	0.952	0.964	0.972	0.89
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	1.068	1.068	1.068	1.068	1.068	1.068	1.058	1.078	1.074	1.084	0.67
6	1.134	1.134	1.134	1.134	1.134	1.134	1.127	1.160	1.169	1.191	1.85
7	1.366	1.366	1.366	1.366	1.366	1.366	1.354	1.334	1.359	1.381	0.88
8	1.426	1.427	1.427	1.427	1.426	1.426	1.413	1.409	1.430	1.447	0.70
9	1.505	1.506	1.507	1.506	1.505	1.505	1.497	1.503	1.529	1.543	0.94
10	1.619	1.620	1.621	1.621	1.620	1.619	1.606	1.601	1.628	1.653	0.85
11	2.000	2.001	2.001	2.001	2.000	1.976	1.990	2.005	2.027	2.084	1.46
12	2.388	2.391	2.392	2.391	2.389	2.383	2.403	2.361	2.399	2.432	0.74
13	2.741	2.743	2.744	2.743	2.742	2.716	2.696	2.713	2.755	2.763	0.75

表2 不同批次银杏叶提取物指纹图谱的测定结果(相对峰面积)

峰号	批次										RSD(%)
	00601	00602	00603	00701	00702	00703	00801	00802	00803	00901	
1	0.382	0.382	0.385	0.385	0.381	0.385	0.385	0.372	0.387	0.389	1.20
2	0.648	0.648	0.649	0.649	0.648	0.649	0.649	0.651	0.644	0.641	0.46
3	0.372	0.373	0.379	0.374	0.377	0.381	0.382	0.379	0.375	0.372	0.99
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	0.316	0.316	0.317	0.317	0.316	0.317	0.318	0.325	0.314	0.322	1.02
6	0.413	0.406	0.402	0.415	0.408	0.408	0.421	0.411	0.422	0.413	1.54
7	0.446	0.446	0.454	0.454	0.446	0.454	0.458	0.456	0.452	0.449	0.99
8	0.635	0.635	0.640	0.640	0.635	0.640	0.644	0.647	0.641	0.635	0.67
9	0.938	0.939	0.941	0.942	0.938	0.941	0.952	0.939	0.955	0.954	0.73
10	0.514	0.498	0.518	0.518	0.514	0.518	0.519	0.522	0.509	0.526	1.48
11	0.593	0.594	0.588	0.588	0.594	0.588	0.602	0.599	0.589	0.596	0.85
12	0.372	0.372	0.366	0.366	0.372	0.366	0.378	0.369	0.385	0.374	1.61
13	0.382	0.382	0.385	0.385	0.381	0.385	0.388	0.378	0.386	0.384	0.73



3 讨论

3.1 流动相的选择

银杏叶提取物中所含成分极性跨度很大,其含量最多的黄酮类成分含有多个酚羟基^[3],呈弱酸性,故使用酸性缓冲体系,分别选用了醋酸体系和柠檬酸体系,实验结果发现使用柠檬酸体系可以得到更好的分离条件及峰形,又比较了甲醇-柠檬酸与乙腈-柠檬酸体系,发现乙腈-柠檬酸体系更

好,同时发现流动相中加入适量的异丙醇可以使峰形对称度更好。

3.2 色谱柱的选择

由于银杏叶提取物中所含的成分主要为黄酮醇苷类^[4],故选择了 C₁₈ 反相柱,实验中分别使用了四种不同厂家的 C₁₈ 反相柱。①Kromasil(C₁₈,250 mm×4.6 mm,5 μm);②Agilent(C₁₈,250 mm×4.6 mm,5 μm);③Diamonsil(C₁₈,250 mm×4.6 mm,5 μm)。结果表明实验所用的 Diamonsil(C₁₈,250 mm×4.6 mm,5 μm)分离效果最佳,重现性好。

3.3 样品测定

测定本品 10 批样品,本品指纹图谱中出现 13 个共有峰,以对照提取物为对照,经中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件计算,10 批样品与对照提取物相似度均>0.90,故规定本品与对照提取物,经中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件计算,相似度不得<0.90。

[参考文献]

- [1] 王京辉,杜小伟,王萌萌,等.舒血宁注射液、银杏叶提取物及银杏叶指纹图谱研究[J].药物分析杂志,2008,28(7):1026-1030.
- [2] 国家食品药品监督管理局.中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S].2003.
- [3] Teris A van Beek Analysis and Quality control of Ginkgo biloba Leaves and Standardised Extracts [J]. Proceedings of 97 International Seminar on Ginkgo,1997:158.
- [4] 叶秀波,岑帼英,李瑞明.HPLC 法测定银杏叶软胶囊中总黄酮的含量[J].中国医药导报,2010,7(33):29-30.

(收稿日期:2011-03-07)

· 编读往来 ·

论文写作技巧——摘要

1. 摘要应着重反映研究中的创新内容和作者的独到观点;不要简单地重复题名中已有的信息。
2. 研究性文章摘要的内容应包括研究目的、研究方法、主要发现(包括关键性或主要的数据)和主要结论,一般应写成冠以“目的(Objective)”、“方法(Methods)”、“结果(Results)”和“结论(Conclusion)”小标题的结构式摘要。
3. 综述类文章摘要的内容应包括综述的主要目的、资料来源、综述时所选择的研究数目及这些研究是如何选择的、提炼数据的规则及这些规则是如何应用的、数据综合的最重要的结果和结论。可以写成结构式摘要,也可写成指示性或报道-指示性摘要。
4. 中文摘要一般使用第三人称撰写,不列图、表,不引用文献,不加评论和解释。
5. 摘要中首次出现的缩略语、代号等,除了公知公认者外,首次出现时须注明全称或加以说明。新术语或尚无合适汉语译名的术语,可使用原文或在译名后括号中注明原文。
6. 英文摘要一般与中文摘要内容相对应,但为了对外交流的需要,可以略详。
7. 中文摘要一般置于题名和作者姓名下方,英文摘要(含英文题名、汉语拼音作者姓名及工作单位)可置于中文摘要的下方。