

银杏叶提取物 HPLC 指纹图谱研究及共有峰的 LC-MS 鉴定^{*}

何厚洪^{1,2}, 杜昕^{1,2}, 金辉辉^{1,2}, 沈姚丹^{1,2}, 徐斌^{1,2}, 王如伟^{1,2}, 姚建标^{1,2**}

(1. 浙江康恩贝制药股份有限公司, 杭州 310052; 2. 浙江省中药制药技术重点实验室, 杭州 310052)

摘要 目的: 建立银杏叶提取物的 HPLC 指纹图谱, 为银杏叶提取物掺假鉴别提供依据。**方法:** 采用 HPLC 梯度洗脱建立银杏叶提取物的指纹图谱, 以 0.1% 甲酸溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~40 min, 10%B → 36%B; 40~45 min, 36%B → 50%B; 45~50 min, 50%B → 100%B; 50~55 min, 100%B; 55~56 min, 100%B → 10%B; 56~65 min, 10%B), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C。并运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对不同批次的银杏叶提取物进行相似度评价; 采用 LC-MS 方法对共有峰进行鉴定。**结果:** 建立了银杏叶提取物的特征指纹图谱, 标定了 20 个共有峰, 并结合 LC-MS 分析, 确定了 10 个峰对应的化合物, 分别为 6-羟基犬尿喹啉酸、3,4-二羟基苯甲酸、芦丁、异槲皮素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、异鼠李素 3-O-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素。疑似掺假提取物的色谱图与对照指纹图谱相比芦丁 (峰 6) 响应低, 而槲皮素 (峰 18)、山柰酚 (峰 19)、异鼠李素 (峰 20) 响应值高, 两者差异极大。**结论:** 本文建立的银杏叶提取物指纹图谱对银杏叶提取物掺假评判具有指导意义。

关键词: 银杏叶提取物; 芦丁; 槲皮素; 山柰酚; 异鼠李素; 指纹图谱; 色谱峰鉴定; 液质联用

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 06-1107-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.06.24

HPLC fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts and the structural identification of common peaks by LC-MS^{*}

HE Hou-hong^{1,2}, DU Xin^{1,2}, JIN Hui-hui^{1,2}, SHEN Yao-dan^{1,2}, XU Bin^{1,2},
WANG Ru-wei^{1,2}, YAO Jian-biao^{1,2**}

(1. Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd, Hangzhou 310052, China;

2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the fingerprint analysis of *Ginkgo biloba* extracts (GBE). **Methods:** The analysis was carried on Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with mobile phase consisting of 0.1% formic acid-water solution (A), and the gradient elution (B) (0-40 min, 10%B → 36%B; 40-45 min, 36%B → 50%B; 45-50 min, 50%B → 100%B; 50-55 min, 100%B; 55-56 min, 100%B → 10%B; 56-65 min, 10%B) was used. The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength

* 浙江省科技重大专项 (2013C03005)

** 通信作者 Tel: (0571) 87774836; E-mail: yaojb@conbagroup.com

第一作者 Tel: (0571) 87774795; E-mail: hehh@conbagroup.com

was set at 245 nm and the column temperature was 30 °C. The HPLC fingerprints of GBE were established by analyzing 10 batches of GBE with “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM”, and the result was used to compare with the HPLC fingerprint of adulterated extracts. Meanwhile, the 10 common peaks were analyzed by LC-MS. **Results:** The mutual mode of GBE HPLC fingerprint was set up with 20 common peaks and the structural identification of 10 common peaks was performed by LC-MS. The 10 compounds were 6-hydroxy kynurenic acid, 3, 4-dihydroxybenzoic acid, rutin, isoquercetin, kaempferol-3-O-rutinoside, 3-O-rutinoside, quercitrin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin. Compared with the reference fingerprint, the batches of adulterated extracts had low peak 6 (rutin) response and high peak 18-20 (quercetin, kaempferol, isorhamnetin), and there was significant difference between them. **Conclusion:** The established fingerprints of GBE have direct guiding significance for identification of adulterants in GBE.

Keywords: *Ginkgobiloba* extracts; rutin; quercetin; kaempferol; isorhamnetin; chromatographic peaks identification; fingerprint; LC-MS

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶,银杏叶提取物已成为国内外普遍使用的重要原料以及制剂之一。银杏叶提取物中的主要有效化学成分为黄酮和萜类内酯。现代药理研究表明,银杏黄酮和萜类内酯均具有改善心血管系统,调血脂,抗氧化,抗衰老等作用^[1-3]。目前国际通用的银杏叶提取物的标准是以德国 Schwabe 药厂专利工艺生产的 EGB761 作为依据^[4],要求银杏中黄酮类化合物的占比需高于 24%,其主要由小分子黄酮苷元如槲皮素、山柰酚、异鼠李素和其糖苷类化合物组成^[5-7]。

由于黄酮类化合物是银杏叶提取物中的主要有效成分,而市面上的银杏叶提取物质量良莠不齐,许多不法商家在银杏叶中掺入槐角提取物以提高黄酮类化合物的含量^[8]。本文在已报道的银杏叶提取物相关文献^[9-14]的基础上,对 10 批银杏叶提取物进行分析,建立更加完善的银杏叶提取物 HPLC 指纹图谱,以判定银杏叶提取物的真伪优劣,并将市售疑似掺假提取物的色谱图与对照指纹图谱相对比,成功地鉴别出掺假提取物。另外,本次实验结合 LC-MS 分析,对指纹图谱中的 20 个共有峰进行了结构鉴定,大部分为黄酮类化合物,其中结合文献确定了 10 个峰对应的化合物,为银杏叶提取物的科学鉴定和质量标准提供参考依据。

1 仪器与试剂

安捷伦公司 Agilent 1200 液相色谱仪; UPLC-Triple-TOF 5600+ 飞行时间液质联用仪; 安捷伦公司 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶) 色谱柱。AL104 型梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司电子分析天平。

乙腈为色谱纯,甲酸为分析纯,水为重蒸水。

对照品芦丁(批号 100081-200907)、槲皮素(批号 100081-201509)、山柰酚(批号 110861-201209)、异鼠李素(批号 110860-201410)购自中国食品药品检定研究院; 本实验收集了 13 批银杏叶提取物(信息见表 1),其中 S5~S10 批购于不同的生产厂家,经检验合格; 因 S11~S13 批检测出含量较高的染料木素和槐角苷,疑似掺假,为异常批提取物。S1~S4 批为根据标准工艺,自制提取物,原料为不同产地的银杏叶,经检验均合格。

表 1 样品来源

Tab. 1 Origins of GBE

批号 (lot No.)	名称 (name)	来源 (source)
S1	银杏叶提取物 (GBE)	自制 (made by ourselves)
S2	银杏叶提取物 (GBE)	自制 (made by ourselves)
S3	银杏叶提取物 (GBE)	自制 (made by ourselves)
S4	银杏叶提取物 (GBE)	自制 (made by ourselves)
S5	银杏叶提取物 (GBE)	市售 (commercially available)
S6	银杏叶提取物 (GBE)	市售 (commercially available)
S7	银杏叶提取物 (GBE)	市售 (commercially available)
S8	银杏叶提取物 (GBE)	市售 (commercially available)
S9	银杏叶提取物 (GBE)	市售 (commercially available)
S10	银杏叶提取物 (GBE)	市售 (commercially available)
S11	异常批银杏叶提取物 (suspect GBE)	市售 (commercially available)
S12	异常批银杏叶提取物 (suspect GBE)	市售 (commercially available)
S13	异常批银杏叶提取物 (suspect GBE)	市售 (commercially available)

2 方法与结果

2.1 色谱条件及质谱条件

色谱条件: 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱 (0~40 min, 10%B → 36%B; 40~45 min, 36%B → 50%B; 45~50 min, 50%B → 100%B; 50~55 min, 100%B; 55~56 min, 100%B → 10%B; 56~65 min, 10%B), 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C。理论板数按芦丁峰计算应不低于 5 000。

质谱条件: 采负离子扫描模式, 扫描范围 *m/z* 100~1 500, 雾化气 (GS1) 344.8 kPa, 干燥气 (GS2) 344.8 kPa, 气帘气 (CUR) 241.3 kPa, 离子源温度 (TEM) 550 °C, 离子源电压 (IS) -4.5 kV; 一级扫描: 去簇电压 (DP) 80 V, 聚焦电压 (CE) 10 V; 二级扫描: 使用 TOF MS~Product Ion~IDA 模式采集质谱数据, CID 能量为 -20、-40 和 -60 V, 进样前, 用 CDS 泵做质量轴校正, 使质量轴误差小于 2×10^{-6} 。

2.2 供试品溶液的制备

取银杏叶提取物 (GBE) 约 100 mg, 精密称定, 加甲醇约 5 mL 超声溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 参照物溶液的制备

取芦丁、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含芦丁 200 μg, 槲皮素 10 μg, 山柰酚 5 μg, 异鼠李素 5 μg 的混合溶液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份银杏叶提取物供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 将图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版本) 软件, 进行相似度评价。结果显示, 各次测定样品共有峰相似度均大于 0.90, 说明本法仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一银杏叶提取物样品 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 考察色谱峰相似度。结果显示, 各供试品共有峰之间相似度均大于 0.90, 说明本法重复性良好。

2.4.3 中间精密度 由 3 组人员, 3 个时间点按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 于不同液相色谱仪 (安捷伦 Agilent 1260 液相色谱仪、Agilent 1200

液相色谱仪) 上使用相同色谱柱进行检测, 记录色谱图, 考察色谱峰相似度。结果显示, 各共有峰之间相似度均大于 0.90, 说明本法中间精密度良好。

2.4.4 溶液稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、18、24 h 内按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 考察色谱峰相似度, 结果显示, 在 24 h 内, 各共有峰之间相似度均大于 0.90。供试品溶液在 24 h 内稳定。

3 结果

3.1 指纹图谱的确定及共有峰的标记

以“2.2”项方法制备的 10 批提取物的供试品溶液, 按“2.1”项条件进行测定, 得到 10 批银杏叶提取物的 HPLC 指纹图谱, 见图 1, 根据色谱峰中各色谱峰的相对保留时间, 确定共有峰, 并选取其中 20 个共有峰作为特征指纹峰, 建立了银杏叶提取物的对照指纹图谱, 见图 2。

3.2 共有峰的指认

为进一步阐述银杏叶提取物的化学成分组成, 通过 UPLC-Triple-TOF 5600+ 飞行时间液质联用仪负离子扫描获得了银杏叶提取物指纹图谱中部分色谱峰对应化合物的结构信息, 并采用芦丁、槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品对色谱峰进行指认, 同时结合相关文献报道^[15], 确定了 10 个共有峰对应的化合物, 分别为 6-羟基犬尿喹啉酸、3,4-二羟基苯甲酸、芦丁、异槲皮素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、异鼠李素 3-O-芸香糖苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素。

3.3 10 批银杏叶提取物指纹图谱相似度评价

10 批银杏叶提取物, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进行检测, 记录色谱图, 以特征指纹图谱共有模式为对照, 计算各批次样品的相似度 (见表 2)。10 批提取物与对照指纹图谱的相似度分别为 0.999、0.999、0.997、0.997、0.999、0.999、0.999、0.999、0.998、0.998, 各样品的相似度值均大于 0.95, 相似度符合相关规定, 表明各批银杏叶提取物质量稳定。

4 讨论

4.1 色谱条件的优化

参考美国药典中银杏叶提取物游离黄酮测定条件, 并对其进行优化, 获得最终色谱条件。该色谱条件下, 色谱峰能达到有效分离。

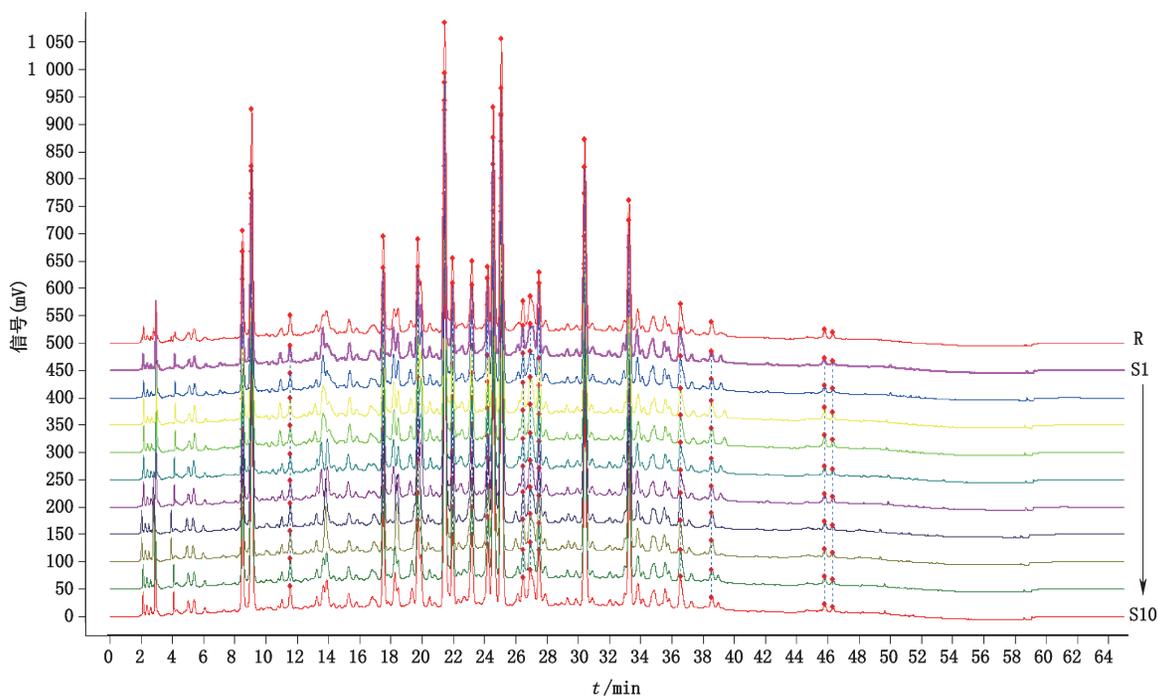
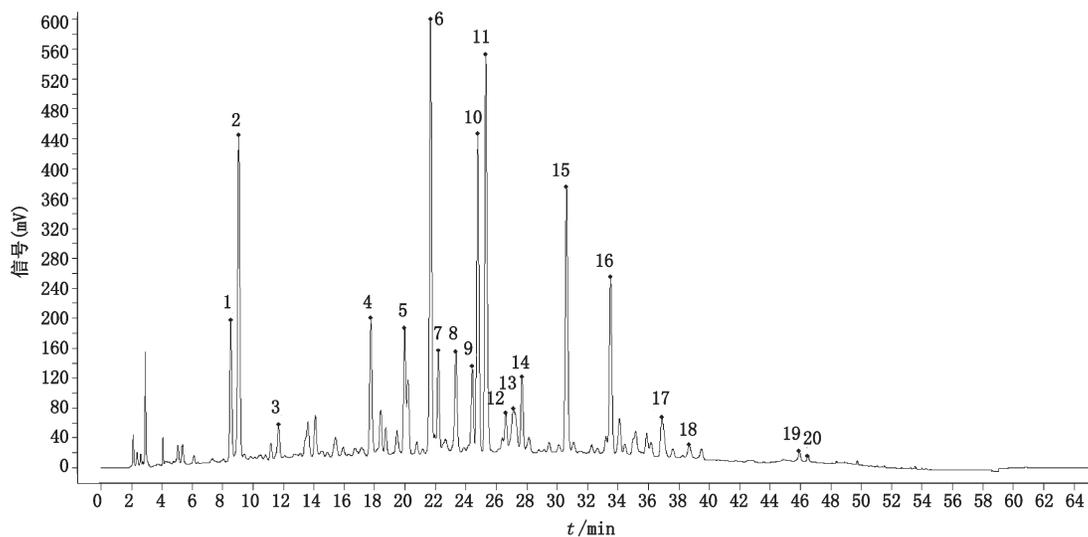


图 1 10 批银杏叶提取物的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 10 batches of samples



1. 6-羟基犬尿喹啉酸 (6-hydroxy kynurenic acid), 2. 3,4-二羟基苯甲酸 (3,4-dihydroxybenzoic acid), 3. 芦丁 (rutin) 8. 异槲皮素 (isoquercetin), 10. 山柰酚-3-O-芸香糖苷 (kaempferol-3-O-rutinoside) 11. 异鼠李素 3-O-芸香糖苷 (3-O-rutinoside), 13. 槲皮苷 (quercitrin) 18. 槲皮素 (quercetin) 19. 山柰酚 (kaempferol) 20. 异鼠李素 (isorhamnetin)

图 2 对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of GBE

表 2 10 批银杏叶提取物的指纹图谱

Tab. 2 HPLC fingerprints of 10 batches of GBE samples

样品 (sample)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱 (reference fingerprint)
S1	1	1	0.994	0.994	0.999	0.999	0.998	0.998	0.997	0.997	0.999
S2	1	1	0.994	0.994	0.999	0.999	0.998	0.998	0.997	0.997	0.999
S3	0.994	0.994	1	1	0.993	0.993	0.994	0.994	0.994	0.994	0.997
S4	0.994	0.994	1	1	0.993	0.993	0.994	0.994	0.994	0.994	0.997
S5	0.999	0.999	0.993	0.993	1	1	0.999	0.999	0.996	0.996	0.999
S6	0.999	0.999	0.993	0.993	1	1	0.999	0.999	0.996	0.996	0.999
S7	0.998	0.998	0.994	0.994	0.999	0.999	1	1	0.994	0.994	0.999
S8	0.998	0.998	0.994	0.994	0.999	0.999	1	1	0.994	0.994	0.999
S9	0.997	0.997	0.994	0.994	0.996	0.996	0.994	0.994	1	1	0.998
S10	0.997	0.997	0.994	0.994	0.996	0.996	0.994	0.994	1	1	0.998
对照指纹图谱 (reference fingerprint)	0.999	0.999	0.997	0.997	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.998	1.000

4.2 检测波长的选择

指纹图谱检测的色谱峰主要为黄酮类物质,而该类物质基本在 254、360 nm 处有最大吸收。用二极管阵列检测器对供试品溶液进行全波长扫描,发现 254 nm 下色谱峰个数较多,响应值较高,部分黄酮类成分如槐角苷、染料木素等在 254 nm 有最大响应,而 360 nm 波长处的响应极低,故确定检测波长为 254 nm。

4.3 参照峰的确

对多批银杏叶提取物进行检测,记录色谱图。发现银杏叶提取物中芦丁的含量较高,在此色谱条件下获得的色谱峰响应值较高,分离度良好,所以选择芦丁作为参照峰。

4.4 色谱柱考察

取同一供试品溶液,比较 3 个厂家色谱柱 [安捷伦公司 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,岛津 Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,北京迪马科技有限公司 Diamosil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱] 对色谱峰的分离情况及相似度影响,结果显示,不同厂家色谱柱对色谱峰的分离影响较大。其中色谱柱 2 与色谱柱 3 对色谱分离情况相似,共有峰均能达到良好分离,但色谱柱 1 对于峰 12、13 与峰 17、18 的分离效果差。建议使用色谱柱 2 与色谱柱 3。

4.5 柱温考察

取同一供试品溶液,考察不同柱温 (25、30、35 ℃) 下,各共有峰的分离及相似度变化情况。结果显示,随着柱温的升高,各共有峰的保留时间略有提前,但分离均良好。各共有峰之间相似度均大于 0.90。柱温的耐用性考察结果良好。

4.6 检测波长考察

取同一供试品溶液,考察不同检测波长 (252、254、256 nm) 下,各共有峰相似度变化情况。结果显示,波长微小调整,各共有峰的相似度均大于 0.90。

4.7 实验分析及结论

本研究建立了银杏叶提取物的 HPLC 指纹图谱,其精密度、稳定性、重复性符合中药指纹图谱相关技术参数要求,证明此方法可操作性强。本法共确定了 20 个共有峰,对银杏叶提取物中的共有峰化合物进行结构鉴定,共鉴定了 10 个成分。另将疑似掺假的银杏叶提取物与其他批次的提取物进行相似度评价,发现其相似度差异极大。仔细对比各图谱之间的差异,发现异常批次的提取物较其他批次的提取物,色谱图中芦丁 (峰 6) 响应低,而槲皮素 (峰 18)、山柰酚 (峰 19)、异鼠李素 (峰 20) 响应值高。因而,通过 HPLC 指纹图谱的方法,可以明显地区别提取物是否正常,证明此次建立的银杏叶提取物指纹图谱对银杏

叶提取物疑似掺假评判具有指导意义, 可用来甄别银杏叶提取物的真伪优劣。

参考文献

- [1] 汪素娟, 康安, 狄留庆, 等. 银杏叶提取物主要活性成分药动学研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(5): 626
WANG SJ, KANG A, DI LQ, *et al.* Progress in pharmacokinetic study on main active ingredients of *Ginkgo biloba* leaf extract [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2013, 44(5): 626
- [2] 李红梅, 刘顺良, 姜静岩. 银杏叶提取物对心脑血管疾病的药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(2): 105
LI HM, LIU SL, JIANG JY. Research progress in pharmacological action of *Ginkgo biloba* extract on cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2002, 13(2): 105
- [3] HOSSEINI-SHARIFABAD M, ANVARI M. Effects of *Ginkgo biloba* extract on the structure of Cornu Ammonis in aged rat: amorphometric study [J]. *Iran J Basic MedSci*, 2015, 18(9): 932
- [4] SCHWABE WILLMAR DR, KLOSS PETER DR. Verfahren zur Gewinnung eines vas oaktiven Arzneimittel saus den Blaettern von *Ginkgo biloba*; German Patent, DE1767098 [P]. 1972-05-31
- [5] 冯小龙, 王伟, 张兰桐. 银杏叶总黄酮及其水解物静脉注射给药后在大鼠体内的药动学研究[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1402
FENG XL, WANG W, ZHANG LT. Study on pharmacokinetics of total flavones in *Ginkgo* leaves and its hydrolysate in rats after intravenous administration [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2009, 40(9): 1402
- [6] 张颖, 刘建勋, 林力, 等. HPLC-ECD 法测定大鼠血浆中银杏叶黄酮成分及药代动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(1): 10
ZHANG Y, LIU JX, LIN L, *et al.* HPLC-ECD determination of flavonols from *Ginkgo biloba* leaf extracts in rat plasma and its pharmacokinetic study [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 31(1): 10
- [7] 赵一懿, 王京, 傅欣彤, 等. 银杏叶药材黄酮类成分指纹图谱研究及其中 11 种黄酮苷类成分定量分析[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(18): 1583
ZHAO YY, WANG J, FU XT, *et al.* Simultaneous determination of eleven flavonoid glycosides in *Ginkgo biloba* leaves and study on its fingerprint by ultra performance liquid chromatography method [J]. *Chin Pharm J*, 2013, 48(18): 1583
- [8] WANG FQ, JIANG KZ, LI ZG. Purification and identification of genistein in *Ginkgo biloba* leaf extract [J]. *Chin J Chromatogr*, 2007, 25(4): 509
- [9] DING XP, QI J, CHANG YX. Quality control of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves by high-performance liquid chromatography with diode array detection and on-line radical scavenging activity detection [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2204
- [10] 聂黎行, 鲁静. 银杏叶提取物中总银杏酸的 HPLC 法限量检查 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(8): 909
NIE LX, LU J. Limit test of total ginkgolic acid in the *Ginkgo biloba* extract by HPLC method [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2005, 25(8): 909
- [11] 姚建标, 金辉辉, 王如伟, 等. 银杏叶提取物中总银杏酸 HPLC 法限量检测 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(11): 2041
YAO JB, JIN HH, WANG RW, *et al.* Limit determination of ginkgolic acid in *Ginkgo biloba* extract by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(11): 2041
- [12] 姚建标, 方玲, 王如伟, 等. 中国药典和欧洲药典银杏叶提取物中银杏酸限度检测方法比较研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 2055
YAO JB, FANG L, WANG RW, *et al.* Comparison on limit detection methods for ginkgolic acid of *Ginkgo biloba* extract by ChP and EP [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(11): 2055
- [13] VICTOIRE C, HAAG-BERRURIER M, LOBSTEIN-GUTH A, *et al.* Isolation of flavonol glycosides from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Planta Med*, 1998, 54(3): 245
- [14] GRASEL I, REUTER C. Analysis of 6-hydroxykynurenic acid in *Ginkgo biloba* and *Ginkgo* preparations [J]. *Planta Med*, 1998, 64(6): 566
- [15] Van BEEKTA, MONTORO P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2002

(本文于 2016 年 6 月 23 日收到)