

UPLC 指纹图谱快速评价银杏叶提取物及制剂的质量

刘国雄¹, 李华^{1*}, 张军²

(1. 广东省食品药品检验所, 广州 510180; 2. 广州中医药大学 新药开发研究中心, 广州 510006)

[摘要] **目的:**建立银杏叶固体制剂、提取物的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱方法,为建立快速而高效的整体质量控制方法提供实验依据。**方法:**采用 Agilent UPLC 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),以乙腈-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱,流速 0.2 mL·min⁻¹,检测波长 360 nm,柱温 30 °C;利用化学计量学方法对色谱数据进行相似度分析、聚类分析和主成分分析。**结果:**在 16 min 内完成指纹图谱分析,标出 14 个共有峰,对 4 个色谱峰进行了归属;以对照药材、对照提取物生成的对照图谱为参照图谱,相似度考察结果可将样品分成两类,一类为相似度 0.312 ~ 0.585;一类为相似度 0.978 ~ 0.993;聚类分析、主成分分析的分类结果与相似度考察结果一致。**结论:**所建立的 UPLC 指纹图谱和模式识别方法为银杏叶制剂和提取物的质量控制提供更全面的参考。

[关键词] 银杏叶提取物; 银杏叶固体制剂; 超高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度分析; 聚类分析; 主成分分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0064-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010064

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0952.064.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:52

Rapid Evaluation on Quality Control of Ginkgo Leaves Extract and Preparations by UPLC Fingerprint

LIU Guo-xiong¹, LI Hua^{1*}, ZHANG Jun²

(1. Guangdong Institute for Food and Drug Control, Guangzhou 510180, China; 2. Research and Development Center for New Chinese Drug, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the ultra performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint method for effective quality control of Ginkgo leaves extract and Ginkgo leaves solid preparation. **Method:** The chromatographic fingerprint was obtained with Agilent UPLC column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), with acetonitrile-0.1% formic acid solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹, and the column temperature was maintained at 30 °C. The detection wavelength was set at 360 nm. The fingerprints of samples were further evaluated by chemometrics methods including similarity analysis (SA), hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). **Result:** The fingerprint was obtained within 16 minutes. There were 14 common peaks in the fingerprints, and 4 peaks were identified. With the fingerprint of control herb and control extract as the reference fingerprint, the samples can be divided into two types according to the similarity results; one type with similarity of 0.312-0.585, and the other type with similarity of 0.978-0.993. The results of HCA and PCA were consistent with those of SA. **Conclusion:** The method is fast and efficient. It can be used for the quality evaluation of Ginkgo leaves extract and Ginkgo leaves solid preparation.

[Key words] Ginkgo leaves extract; Ginkgo leaves solid preparation; UPLC; fingerprint; similarity analysis; hierarchical clustering analysis; principal component analysis

[收稿日期] 20151026(021)

[第一作者] 刘国雄,在读硕士,从事中药新药药理学研究,E-mail:363356726@qq.com

[通讯作者] *李华,副主任中药师,从事药品质量分析与质量管理,Tel:020-81886161,E-mail:1060870904@qq.com

银杏叶为银杏科植物银杏的干燥叶,为我国独有物种,主要活性成分包括黄酮类、萜类内酯等,现代药理研究证明其具有降血脂、抗凝血等活性^[1]。银杏叶提取物是由银杏叶粉碎后经稀乙醇回流提取、过大孔树脂精制而成,银杏叶制剂如银杏叶片、银杏叶胶囊等均由银杏叶提取物制得^[2]。关于银杏叶提取物及其固体制剂的质量控制,2015 年版《中国药典》中总黄酮醇苷含量测定项下规定,以供试品酸解后苷元槲皮素、异鼠李素和山柰素的含量为指标,通过转换系数计算得出。而实际生产过程中不投料、少投料、二次提取后直接添加含量测定的指标成分,则无法有效监控。指纹图谱分析可以使中药所含多种化学成分整体可视化,在药品质量定性监控中具有优势。目前,银杏叶制剂及提取物的 HPLC 指纹图谱方法,以样品生成的共有模式作为对照图谱进行相似度评价^[3-9],本实验以对照药材和对照提取物生成对照图谱作为参照,用于评价其质量,可对不投料、少投料、二次提取后直接添加的违法工艺样品检测方法提供参考。

本实验采用 UPLC 法建立银杏叶固体制剂和

提取物的特征指纹图谱分析方法,其色谱峰的保留时间全部在 16 min 内,极大地提高分析效率。以银杏叶对照药材和对照提取物指纹图谱生成对照指纹图谱作为参照,采用“相似度评价系统”进行相似度考察,以样品共有峰的相对峰面积数据进行聚类分析、主成分分析,优劣品分类结果与相似度考察比较,3 种化学计量学方法得到相互验证。

1 材料

ACQUITY 型 UPLC (美国 Waters 公司,包括四元高压梯度泵,真空脱气机,自动进样器,柱温箱,紫外检测器,Empower 色谱工作站); CP224S, CP225D 型电子天平 (Sartorius); 300H 型超声波清洗器 (德国 Elma 公司), Millipore 系列纯水仪。乙腈色谱纯,水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。银杏叶对照药材 (批号 121160-201304), 银杏叶对照提取物 (批号 110866-201204), 对照品芦丁 (批号 100080-201409), 槲皮素 (批号 100081-201408), 山柰素 (批号 110861-201310), 异鼠李素 (批号 110860-201410), 均购于中国食品药品检定研究院。20 批样品信息见表 1。

表 1 银杏叶制剂、提取物样品信息表

Table 1 Information of the samples

No.	剂型	厂家	批号	No.	剂型	厂家	批号
S1	片剂	厂家 1	A1503004	S11	胶囊剂	厂家 7	20140301
S2	片剂	厂家 1	A1503006	S12	胶囊剂	厂家 8	1501201
S3	片剂	厂家 2	140511	S13	胶囊剂	厂家 8	1412203
S4	片剂	厂家 2	140703	S14	胶囊剂	厂家 9	140501
S5	片剂	厂家 3	20140903	S15	提取物	厂家 10	N150110
S6	片剂	厂家 4	140502	S16	提取物	厂家 2	141205
S7	片剂	厂家 5	140709	S17	提取物	厂家 2	141204
S8	片剂	厂家 6	1410019	S18	分散片	厂家 5	140813
S9	片剂	厂家 3	20141204	S19	分散片	厂家 11	140803
S10	胶囊剂	厂家 7	20150301	S20	分散片	厂家 12	140416

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent UPLC 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 4 min, 17% A; 4 ~ 7 min, 17% ~ 23% A; 7 ~ 14 min, 23% ~ 35% A; 14 ~ 14.1 min, 35% ~ 50% A; 14.1 ~ 16 min, 50% A), 流速 0.2 mL·min⁻¹, 检测波长 360 nm, 柱温 30 °C, 进样量 2 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别取芦丁、槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成

每 1 mL 分别含芦丁 10 μg, 槲皮素 30 μg, 山柰素 30 μg, 异鼠李素 20 μg 溶液, 作为混合对照品溶液。

2.3 银杏叶对照药材溶液的制备 取银杏叶对照药材约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 称定质量, 超声处理 1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 银杏叶对照提取物溶液的制备 取银杏叶对照提取物约 0.12 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 超声处理 20 min,

放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.5 供试品溶液的制备 取银杏叶提取物约 40 mg;或取银杏叶片 10 片,糖衣片除去包衣,精密称定,研细,取约相当于总黄酮醇苷 9.6 mg 的粉末;或取银杏叶胶囊装量差异项下的内容物,混匀,研细,取约相当于总黄酮醇苷 9.6 mg 的粉末,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇溶液 20 mL,称定质量,超声处理 20 min,取出,放冷,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,测得其各共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.1%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.5%,表明仪器精密度良好。

2.6.2 重复性试验 取同一批样品 6 份,按 2.5 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下方法分别进样,测得其各共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.2%,相对峰面积 RSD 均 < 2.6%,表明重复性良好。

2.6.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下方法分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样,测得其各共有峰的相对保留时间 RSD < 0.3%,相对峰面积的 RSD < 3.0%,表明样品在 24 h 内保持稳定。

2.7 样品测定 分别取表 1 样品,按 2.5 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图,并标定出 14 个共有峰,结果见图 1。

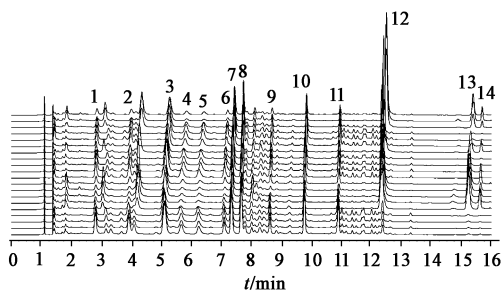
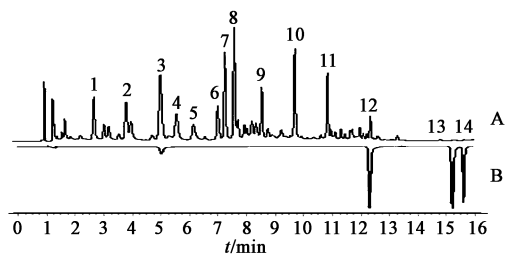


图 1 20 批银杏叶提取物、固体制剂样品 HPLC 指纹谱
Fig.1 UPLC fingerprint overlap of 20 batches of Ginkgo leaves extract and solid preparation

2.8 对照指纹图谱的建立与色谱峰指认 取银杏叶对照药材溶液、银杏叶对照提取物溶液、对照品溶液,按 2.1 项下方法分别进样测定,将对照药材、对照提取物色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2009 版),生成对照指纹图谱。与对照品溶液图谱比对,指纹图谱中峰 3,12,13,14 分别为芦丁、槲皮素、山柰素、异鼠李素,见图 2。



A. 对照指纹图谱;B. 对照品溶液图谱;3. 芦丁;12. 槲皮素;13. 山柰素;14. 异鼠李素

图 2 银杏叶固体制剂及提取物对照指纹谱
Fig.2 Referential fingerprint chromatogram of Ginkgo leaves extract and solid preparation

2.9 指纹图谱分析

2.9.1 相似度考察 以 2.8 项下生成的对照指纹图谱为参照,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2009 版),多点校正,全峰匹配,分别计算 20 批样品的相似度,结果见表 2。以样品编号为 X 轴、相似度结果为 Y 轴,绘制散点图,结果见图 3。由表 2 和图 3 可见,样品 S1,S2,S3,S4,S10,S11,S12,S13,S15,S16,S17 的相似度均 > 0.977,可归为一类。样品 S5,S6,S7,S8,S9,S14,S18,S19,S20 的相似度均 < 0.977,归为一类。将两者指纹图谱分别导入软件,生成各自的共有模式图,见图 4。本实验以对照药材与对照提取物生成对照图谱作为参照,相似度 > 0.977,提示样品与对照药材和对照提取物质量相似,定为优质品。反之,相似度 < 0.977,定为劣质品。

表 2 20 批样品相似度计算

Table 2 Results of similarity analysis

No.	相似度	质量	No.	相似度	质量
S1	0.992	优	S11	0.992	优
S2	0.993	优	S12	0.993	优
S3	0.991	优	S13	0.991	优
S4	0.991	优	S14	0.398	劣
S5	0.367	劣	S15	0.978	优
S6	0.317	劣	S16	0.989	优
S7	0.359	劣	S17	0.987	优
S8	0.318	劣	S18	0.585	劣
S9	0.477	劣	S19	0.312	劣
S10	0.993	优	S20	0.426	劣

2.9.2 聚类分析 色谱图中峰 3(芦丁)达到基线分离,选为参照峰,计算其余各共有峰的相对峰面积,结果见表 3。将数据导入 SPSS 19.0,对 20 批样品进行聚类分析,聚类方法采用 Ward 法,度量标准采用欧式距离,结果见图 5。20 批样品被清晰地

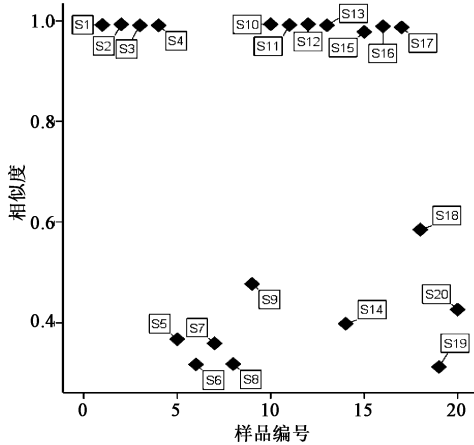


图 3 20 批样品相似度散点
Fig. 3 Scatter plot of similarity analysis

聚为两类, 样品 S1, S2, S3, S4, S10, S11, S12, S13, S15, S16, S17 聚为一类; 其余样品聚为一类, 与相似度分类结果一致。

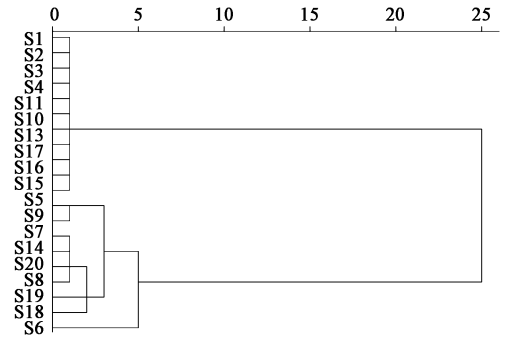
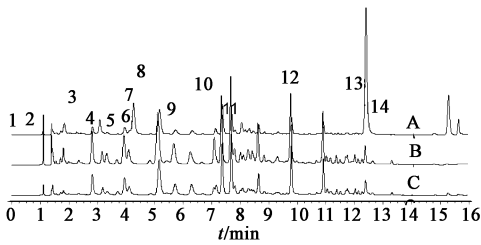


图 5 20 批样品聚类树状分析
Fig. 5 Result of clustering analysis



A. 劣质品共有模式; B. 优质品共有模式; C. 对照指纹谱
图 4 银杏叶固体剂与提取物优劣品指纹谱共有模式对比
Fig. 4 Common pattern of fingerprint from high quality and low quality

2.9.3 主成分分析 将共有峰相对峰面积数据导入 SPSS 19.0, 进行主成分分析, PC1 和 PC2 累积贡献率为 91.941%, 以 PC1, PC2 样品得分分别为 X 轴和 Y 轴, 绘制散点图, 见图 6。由图可见, 样品 S1, S2, S3, S4, S10, S11, S12, S13, S15, S16, S17 可聚成一类, 其余样品较分散归为一类, 与聚类分析、相似度考察的结果一致。

3 讨论

本实验供试品溶液不经酸水解, 而直接采用

表 3 银杏叶固体制剂及提取物 UPLC 指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 3 Relative peak areas of common peaks in fingerprint of Ginkgo leaves extract and solid preparation

No.	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
S1	0.47	0.36	0.33	0.30	0.29	0.90	1.15	0.26	0.78	0.58	0.14	0.04	0.02
S2	0.48	0.36	0.30	0.30	0.29	0.90	1.08	0.28	0.77	0.58	0.17	0.04	0.02
S3	0.34	0.27	0.29	0.35	0.32	0.83	0.84	0.31	0.67	0.46	0.17	0.04	0.01
S4	0.38	0.32	0.31	0.34	0.35	0.81	0.87	0.35	0.80	0.54	0.25	0.05	0.01
S5	0.20	0.21	0.20	0.20	0.19	0.65	0.78	0.21	0.43	0.33	4.15	2.70	0.70
S6	0.26	0.29	0.25	0.24	0.28	0.87	0.78	0.33	0.53	0.41	6.66	2.63	0.62
S7	0.12	0.13	0.13	0.15	0.07	0.60	0.47	0.08	0.21	0.16	3.60	1.01	0.16
S8	0.12	0.10	0.12	0.15	0.09	0.71	0.45	0.08	0.22	0.13	4.10	1.28	0.17
S9	0.25	0.25	0.25	0.24	0.24	0.82	0.85	0.24	0.55	0.41	3.40	1.93	0.58
S10	0.37	0.33	0.33	0.34	0.31	0.90	0.97	0.30	0.72	0.49	0.23	0.06	0.02
S11	0.40	0.31	0.33	0.31	0.30	0.88	1.05	0.28	0.73	0.49	0.28	0.10	0.02
S12	0.39	0.30	0.34	0.30	0.29	0.89	1.02	0.28	0.65	0.50	0.24	0.09	0.02
S13	0.39	0.31	0.33	0.31	0.27	0.88	1.01	0.26	0.62	0.42	0.21	0.05	0.02
S14	0.15	0.16	0.16	0.13	0.14	0.61	0.46	0.19	0.26	0.20	3.48	0.68	0.21
S15	0.44	0.38	0.35	0.34	0.27	1.08	1.39	0.29	0.80	0.58	0.41	0.14	0.03
S16	0.37	0.29	0.32	0.38	0.35	0.96	1.00	0.36	0.77	0.52	0.28	0.06	0.02
S17	0.36	0.26	0.32	0.36	0.28	0.94	1.07	0.26	0.69	0.46	0.21	0.03	0.01
S18	0.31	0.23	0.24	0.23	0.18	0.90	0.89	0.19	0.53	0.36	2.79	0.49	0.03
S19	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09	0.39	0.28	0.14	0.18	0.12	3.71	0.07	0.02
S20	0.20	0.18	0.19	0.16	0.15	0.82	0.68	0.16	0.31	0.19	3.72	0.93	0.28

注: 峰 3 相对峰面积均为 1.00。

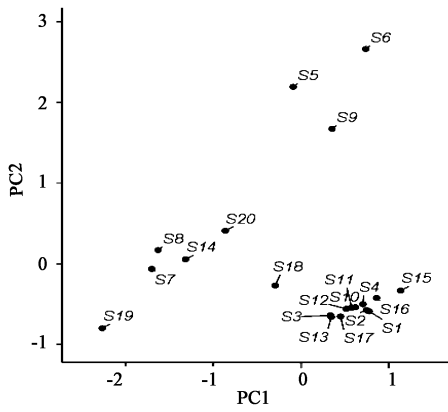


图 6 20 批样品主成分分析

Fig. 6 Result of principal component analysis

80% 甲醇超声处理,以体现药品化学成分的整体性。银杏叶对照药材和对照提取物的指纹图谱均显示,与其他色谱峰相比,槲皮素、山柰素、异鼠李素的响应相对较小,提示银杏叶中游离苷元的实际含量小。但图 4 劣质品共有模式图谱显示槲皮素、山柰素、异鼠李素的响应显著偏大。由表 3 相对峰面积计算结果可知,优质品峰 12(槲皮素),峰 13(山柰素),峰 14(异鼠李素)的相对峰面积分别为 0.14 ~ 0.41, 0.03 ~ 0.14, 0.01 ~ 0.03;劣质品分别为 2.79 ~ 6.66, 0.07 ~ 2.70, 0.02 ~ 0.70。

根据文献报道^[3-9],银杏叶制剂或提取物指纹图谱的相似度考察时,普遍采用样品共有模式作为参照图谱,该方法的局限性在于不能识别不法样品,20 批样品相似度计算结果分别为 0.765, 0.774, 0.784, 0.800, 0.843, 0.836, 0.864, 0.832, 0.904, 0.799, 0.814, 0.806, 0.795, 0.880, 0.823, 0.803, 0.788, 0.960, 0.836, 0.891;与劣质品相比,优质品的相似度反而更小。选择对照药材与对照提取物生

成对照图谱作为参照,更符合药品定性质量监控和银杏叶制剂的生产现状。并且聚类分析、主成分分析的结果,与本实验相似度考察结果一致,3 种化学计量学方法得到了相互验证。

综上所述,本文所建立的银杏叶固体制剂和提取物的 UPLC 指纹图谱以及模式识别方法,高效、准确、专属性强,为快速评价其质量提供科学方法和依据。

[参考文献]

[1] 刘颖. 银杏叶制剂的药理作用及临床研究概述[J]. 中医药信息, 2011, 28(4): 145-146.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:392,1080.
[3] 游松, 王亮, 蒋雅红, 等. 银杏叶注射剂指纹图谱的研究[J]. 中草药, 2002, 33(3): 26-28.
[4] 徐亚萍, 姚彤炜, 江君微. 银杏叶片剂指纹图谱分析方法的建立[J]. 浙江大学学报, 2004, 33(1): 27-31.
[5] 肖蓉, 袁志芳, 姚冬奇, 等. 银杏酮酯注射液 HPLC 指纹图谱研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(1): 80-87.
[6] 李奕雅, 陈凡. 银杏叶提取物的 HPLC-DAD 指纹图谱研究[J]. 海峡药学, 2010, 22(5): 38-41.
[7] 帅英丽, 于红艳, 李志强. 银杏叶提取物的 HPLC-UV 指纹图谱研究[J]. 中国医药导报, 2011, 8(15): 55-57.
[8] 李利锋, 孙国祥. 银杏叶片 HPLC 定量指纹图谱和 4 个成分含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 52-57.
[9] 梁文琳, 谢达温, 丁岗, 等. 含量测定和指纹图谱结合 LC-MS 技术整体评价银杏叶片的质量[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1738-1743.

[责任编辑 顾雪竹]