

在 5.0 ~ 25.0 mmol/L 考察了硼砂浓度对迁移时间的影响。实验表明大黄素、芦荟大黄素在硼砂浓度为 5.0 mmol/L 时不能很好分离,而当硼砂浓度为 10.0 mmol/L 时,芦荟大黄素的峰形不对称。结合对迁移时间的影响,最终选择 15.0 mmol/L 作为最佳硼砂浓度。

3.3 SDS 浓度的影响:在缓冲溶液组成为 15.0 mmol/L 硼砂-10%乙醇 (pH 9.60) 时,在 20.0 ~ 50.0 mmol/L 考察了 SDS 浓度对分离的影响。两种有效成分的迁移时间都随着 SDS 浓度的增大而增大,迁移顺序依次为大黄素、芦荟大黄素。当 SDS 浓度为 20.0 mmol/L 时,大黄素、芦荟大黄素彼此间不能分离,而当 SDS 浓度超过 30.0 mmol/L 时,迁移时间增大。综合考虑上述影响因素,最终选择 SDS 浓度为 30.0 mmol/L。

3.4 乙醇量的影响:在缓冲液中添加有机物可改善 HPCE 的分离效率。实验表明,在乙醇体积分数为 0 ~ 5% 时分离情况不佳,出于对分离和迁移时间的综合考虑,选择 10%乙醇。

3.5 分离电压的影响:在毛细管电泳时,提高分离电压可以缩短体系分离时间,但是在高电压下会由于焦耳热的影响,使溶质产生扩散现象,从而降低毛细管电泳分离效率。本实验在 15.0 ~ 25.0 kV 考察了电压对分离的影响。综合考虑各影响因素,选择最佳分离电压为 20.0 kV。

#### References :

- [1] Hua H Q. Study and clinical application of Jueingzi (*Semen Cassiae*) [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(9): 564-567.
- [2] Li Y, Li Y. Capillary electrophoresis analysis on components in Chinese materia medica [J]. *Mod Instru* (现代仪器), 2000 (5): 1-5.

## 银杏叶提取物的毛细管电泳指纹图谱研究

马欣,孙毓庆\*

(沈阳药科大学药学院,辽宁 沈阳 110016)

**摘要:**目的 建立银杏叶提取物的毛细管电泳指纹图谱。方法 EGb 761 为对照,芦丁为内参比物,采用毛细管电泳法分析银杏黄酮苷。结果 利用指纹图谱相似度计算软件,计算出各厂家样品与 EGb761 的相似度指数,建立银杏叶提取物的指纹图谱。结论 该研究有助于银杏叶提取物的质量控制。

**关键词:**银杏叶提取物;指纹图谱;毛细管电泳

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2004)08-0876-03

### Fingerprint for extract of *Ginkgo biloba* leaves

MA Xin, SUN Yu-qing

(College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Key words:** extract of *Ginkgo biloba* leaves (EGb); fingerprint; capillary electrophoresis

银杏叶制剂临床广泛应用于治疗心脑血管疾病,目前认为其有效部位为黄酮类和萜内酯类化合物。现行分析方法多以 HPLC 法测定黄酮苷元(槲皮素、山柰酚和异鼠李素)计算总黄酮含量为主。在银杏叶大部分成分尚不清楚的情况下,间接测定总成分含量还不能真正反映提取物质量的稳定。Hasler 等<sup>[1]</sup>和游松等<sup>[2]</sup>分别采用 HPLC 法建立了银杏黄酮和银杏叶注射液的指纹图谱。由于银杏黄酮极性相差很大,均采用了复杂的梯度洗脱。毛细管

电泳 (capillary electrophoresis) 是一种高效分离技术,具有高效、快速、进样体积小、溶剂消耗少和抗污染能力强等特点,在中药有效成分分析、指纹图谱研究方面显示出显著的优势。EGb761 现为公认的银杏叶提取物标准<sup>[3]</sup>。因此本实验以 EGb761 为对照建立了银杏叶提取物的毛细管电泳指纹图谱。

#### 1 材料与方法

1.1 仪器与试剂:美国 Agilent 3D 毛细管电泳仪, DAD 检测器,Agilent 化学工作站。未涂层石英毛细

\* 收稿日期:2003-10-03

作者简介:马欣(1977—),女,广东汕头人,2000年毕业于中国药科大学英语药学专业,现为沈阳药科大学在读硕士研究生,主要从事中药分析研究。Tel: (024) 23842602 E-mail: maxine-ma@sohu.com

管柱(65 cm ×75 μm,有效长度 57 cm)(河北永年光导纤维厂)。

甲醇、乙腈和异丙醇为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。配制缓冲液和供试品溶液所用的水均为纯净水。

1.2 溶液的制备:取供试品适量,低温干燥 3 h,用 40%甲醇配制成 2 mg/mL 的供试品溶液,0.45 μm 滤膜滤过,待用;称取芦丁适量,用 40%甲醇配制 100 μg/mL 的溶液,0.45 μm 滤膜滤过,待用。

银杏叶提取物:EGb761(法国博福-益普生制药公司);深圳海王药业( );江苏扬子江药业公司( );山东鲁南制药厂( );湖北随州银杏生物制品有限公司( );香港余仁生药厂( );桂林央达植物制药厂( );江苏邳州银杏叶基地( );山东郯城银杏叶基地( )。内参比物芦丁由沈阳药科大学药厂提供,经毛细管电泳法测定含量大于 98.0%。

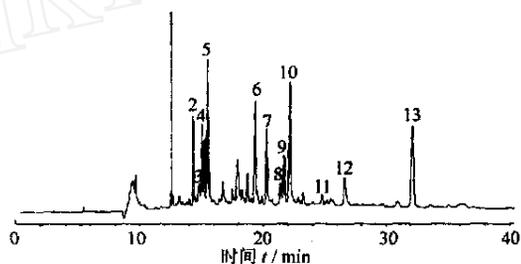
1.3 电泳条件:运行缓冲液:500 mmol/L 硼酸-40 mmol/L Tris-15%甲醇(加 1 mol/L NaOH 调节 pH 8.5);运行电压:30 kV;柱温:25 ;进样量:压力进样 50 mbar ×10 s;检测波长:254 nm。实验之间依次用 0.1 mol/L NaOH 溶液、水、运行缓冲液冲洗毛细

管 5 min。

## 2 指纹图谱及相似度结果

2.1 指纹图谱:银杏叶提取物 EGb 761 的毛细管电泳图见图 1,其中有 13 个共有峰,其峰面积均大于总峰面积的 5%。各供试品共有峰的相对保留时间和相对峰面积分别见表 1 和表 2。其他供试品的谱图见图 2。

2.2 相似度计算结果:采用沈阳药科大学计算机中心自行开发研制的指纹图谱相似度计算软件,选用欧氏距离和相关系数法分别考察各供试品与银杏叶提取物 EGb 761 的相似度,结果见表 3。



10-内参比物芦丁

10-internal reference substance rutin

图 1 银杏叶提取物 EGb 761 的毛细管电泳图

Fig. 1 Capillary electrophorogram of EGb 761

表 1 银杏叶提取物的毛细管电泳指纹图谱相对保留时间

Table 1 Relative retention time in capillary electrophorograms of EGb samples

供试品	各峰相对保留时间												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
EGb 761	0.554	0.640	0.672	0.681	0.692	0.871	0.913	0.963	0.977	1.000	1.125	1.212	1.482
	0.547	0.643	0.674	0.684	0.695	0.871	0.912	0.962	0.975	1.000	1.124	1.208	0
	0.545	0.641	0.673	0.683	0.694	0.874	0.913	0.964	0.978	1.000	1.124	1.210	1.413
	0.561	0.652	0.683	0.693	0.704	0.877	0.917	0.965	0.978	1.000	1.121	1.203	1.399
	0.545	0.636	0.666	0.677	0.688	0.869	0.908	0.961	0.975	1.000	1.125	1.209	1.411
	0.567	0.658	0.688	0.699	0.710	0.892	0	0	0	1.000	1.154	1.326	1.450
	0.549	0.642	0.672	0.683	0.694	0.876	0.913	0.964	0.978	1.000	1.130	1.212	1.415
	0.550	0.636	0.668	0.678	0.689	0.871	0.912	0.964	0.979	1.000	1.049	1.212	0
	0.552	0.641	0.670	0.681	0.691	0.871	0.909	0.961	0.977	1.000	1.136	1.221	1.446
	均值	0.554	0.644	0.674	0.684	0.696	0.875	0.913	0.963	0.977	1.000	1.120	1.221
RSD/ %	2.8	1.7	1.5	1.5	1.5	0.9	0.3	0.2	0.2	0	2.2	2.5	1.4

表 2 银杏叶提取物的毛细管电泳指纹图谱相对峰面积

Table 2 Relative peak area in capillary electrophorograms of EGb samples

供试品	各峰相对峰面积												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
EGb 761	0.140	0.434	0.332	0.376	0.937	0.806	0.518	0.126	0.347	1.000	0.091	0.341	1.005
	0.071	0.380	0.104	0.339	0.511	0.902	0.199	0.114	0.466	1.000	0.139	0.150	0
	0.093	0.620	0.132	0.525	0.885	1.545	0.199	0.191	0.696	1.000	0.175	0.325	0.179
	0.230	0.602	0.162	0.430	0.883	1.078	0.264	0.188	0.530	1.000	0.102	0.265	0.153
	0.068	0.177	0.041	0.140	0.343	0.409	0.060	0.084	0.144	1.000	0.040	0.092	0.043
	0.614	0.737	0.112	0.784	0.357	1.228	0	0	0	1.000	0.182	0.094	0.178
	0.190	1.181	0.250	0.622	0.931	2.268	0.497	0.200	0.666	1.000	0.219	0.276	0.231
	0.211	0.593	0.113	0.511	0.837	1.582	0.189	0.162	0.687	1.000	0.155	0.207	0.317
	0.160	0.446	0.119	0.341	0.608	1.176	0.468	0.152	0.676	1.000	0.197	0.316	0.128

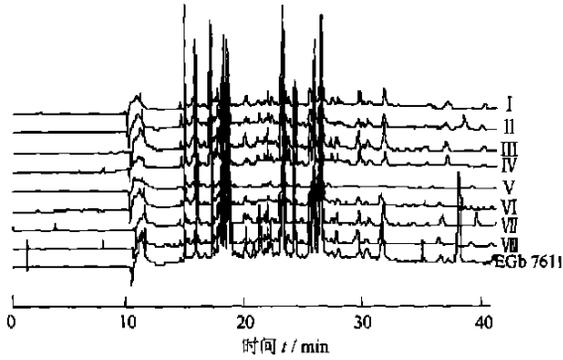


图 2 银杏叶提取物 EGb 761 与其他供试品的毛细管电泳谱图

Fig. 2 Capillary electropherograms of EGb 761 and other samples

表 3 指纹图谱相似度计算软件处理结果

Table 3 Results of fingerprint similarity by software

供试品	相似度	
	欧氏距离	相关系数
	0.789	0.765
	0.863	0.801
	0.887	0.854
	0.850	0.810
	0.749	0.732
	0.862	0.847
	0.788	0.693
	0.813	0.785

### 3 方法学考察

3.1 系统适用性试验:按电泳条件进行试验,以芦丁峰计算理论塔板数为 150 000,芦丁峰与其相邻峰的分离度大于 1.5,对称因子为 1.05。

3.2 精密度试验:取一新制备供试品溶液,连续测定 5 次,共有峰相对保留时间的 RSD < 1.9%,共有峰相对峰面积的 RSD < 2.1%。

3.3 重现性试验:取同一供试品,同法制备 5 个供试品溶液进行测定,共有峰的相对保留时间的 RSD < 2.5%,相对峰面积的 RSD < 2.3%。

3.4 稳定性试验:取一新制备供试品溶液于 0、2、4、6、8、10 h 测定峰面积,结果共有峰面积 RSD < 3.2%。

### 4 讨论

4.1 有机改性剂的影响:分别考察了甲醇、乙腈、异丙醇和四氢呋喃对分离的影响。随着有机改性剂含量的增加,缓冲液电导减小,电渗流降低,迁移时间延长。结果向缓冲液中加入 15% 甲醇,分离效果较好,迁移时间适中。

4.2 柱温影响:考察了柱温为 15、20、25、30、35 时,对分离的影响,发现随着温度的降低,缓冲液黏度增加,迁移时间延长。温度过高时,分离度降低,且易产生气泡。综合考虑,最后选择了 25 为分离温度。

4.3 参照物的确定:芦丁是银杏叶中含有的一种黄酮醇苷类化合物,其迁移时间居中,在各供试品中含量较稳定,因此被选作内参照物。

4.4 相似度计算结果:国家药典委员会推荐使用的“中药指纹图谱计算机辅助相似度计算软件”,一般相似度计算结果在 0.9 ~ 1.0 为符合要求。该软件拟合出一个共有模式,然后计算各样品与这个共有模式的相似度。本实验采用沈阳药科大学计算机中心自行开发研制的“指纹图谱相似度计算软件”,以 EGb 761 为共有模式,计算其他样品与它的相似度。发现大部分样品的相似度均低于 0.9,考虑有以下几个方面的原因:EGb 761 的指纹图谱中含有一些其他样品中没有的色谱峰;相似度计算软件不同;算法不同。综合考虑,认为相似度小于 0.8 的样品与 EGb 761 差异显著。

4.5 EGb 761 的电泳谱图中第 13 号峰明显大于其他供试品,可能为相似度计算结果偏低的原因。从此峰光谱图上看,推测此化合物为黄酮类化合物。此峰的定性需要应用 GE-MS 技术进行进一步研究。

致谢:广州市药品检验所谢培山教授提供 EGb 761 及其他部分供试品。

#### References:

[1] Hasler A, Sticher O. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1992, 605: 41-48.

[2] You S, Wang L, Jiang Y H, et al. Studies of fingerprint of *Ginkgo* injection [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2002, 33(3): 216-218.

[3] Sticher O. Quality of *Ginkgo* preparation [J]. *Planta Med*, 1993, 59: 2-9.

# 欢 迎 投 稿      欢 迎 订 阅