

银杏叶制剂中原花青素的 HPLC 鉴别方法研究

陈燕¹, 乔洪翔², 叶剑锋², 何厚洪², 王如伟^{1,2*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州, 310053

2. 浙江现代中药与天然药物研究院, 浙江 杭州, 310052

摘要: **目的** 建立银杏叶制剂中原花青素的定性检测方法, 为原花青素的质量控制提供依据。**方法** 建立 NP-HPLC 法和 HPLC-DAD-MS 法分析银杏叶原花青素提取物、葡萄籽提取物、银杏叶制剂及掺假银杏叶制剂中原花青素的组成。**结果** 原花青素在正相色谱系统中, 可以按聚合度的大小进行分离; 葡萄籽原花青素由(表)儿茶素组成, 各个聚合体在正相色谱系统中只有 1 个特征峰; 而银杏叶原花青素由(表)没食子儿茶素和(表)儿茶素组成, 有 2~3 个特征峰。**结论** 该方法可用于定性分析原花青素, 还可用于鉴别银杏叶制剂中是否掺假。

关键词: 银杏叶制剂; 原花青素; 提取物; HPLC; 聚合度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)13-1774-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.014

HPLC determination of proanthocyanidins in *Ginkgo Folium* preparation

CHEN Yan¹, QIAO Hong-xiang², YE Jian-feng², HE Hou-hong², WANG Ru-wei^{1,2}

1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Zhejiang Institute of Modern Chinese Materia Medica and Natural Medicine, Hangzhou 310052, China

Abstract: **Objective** To develop a qualitative method for the quick determination of proanthocyanidins in *Ginkgo Folium* preparation (GFP), and to provide the objective evidence for the quality control of proanthocyanidins. **Methods** NP-HPLC and HPLC-DAD-MS methods were developed to analyze the composition of proanthocyanidins in *Ginkgo Folium* proanthocyanidin extract, grape-seed extract, GFP, and adulterate GFP. **Results** The proanthocyanidins were separated in normal phase mode according to their degree of polymerization. The proanthocyanidins from grape-seed extract, which consisted of (*epi*)catechin, had only one characteristic absorption band in HPLC chromatograms for each degree of polymerization; And proanthocyanidins of GFP, which consisted of (*epi*)gallocatechin and (*epi*)catechin, had two or three characteristic absorption bands for each degree of polymerization. **Conclusion** The HPLC method is applicable for the qualitative analysis of proanthocyanidins and the identification of authentic and adulterated proanthocyanidins in GFP.

Keywords: *Ginkgo Folium* preparation; proanthocyanidins; extract; HPLC; polymerization

银杏叶提取物具有很高的药用价值, 银杏叶制剂、银杏类保健食品已经成为当今世界上最热门的天然植物产品之一。银杏叶提取物具有拮抗血小板活化因子、清除自由基、抗炎、抗焦虑、抗过敏、扩张血管、保护心脑血管及抗肿瘤等多种药理学活性^[1-2]。银杏内酯和黄酮是产生上述活性的主要成分, 也是银杏叶提取物的主要有效成分和质量控制指标^[3-5]。除了上述 2 类成分外, 银杏叶提取物中

还含有约 7% 的原花青素。原花青素具有广泛的药理学活性^[6-7], 包括抗氧化和自由基清除、抗菌和抗病毒、抗炎、抗辐射、保护心脑血管及抗肿瘤等, 是银杏叶制剂产生药效的主要有效成分之一, 但目前对于银杏来源的原花青素研究甚少。

原花青素是一种具有黄烷-3-醇结构的植物多酚类化合物。目前常用于测定原花青素的方法^[8]有 Folin-酚法、普鲁士蓝法、酒石酸亚铁法、酸性丁醇

收稿日期: 2013-01-07

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2011ZX09203-001-18); 浙江省重点实验室和中试基地计划项目 (2009E10009)

作者简介: 陈燕 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药、植物药新药研发。Tel: 18989848164 E-mail: huangbin86720@gmail.com

*通信作者 王如伟 Tel: (0571)87774766 E-mail: wangrw@conbagroup.com

网络出版时间: 2013-05-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130516.0915.001.html>

法、香草醛法和4-二甲基氨基肉桂醛法^[9]。而HPLC法应用于原花青素的研究主要包括原花青素单体化合物的测定,原花青素的分离及定性研究^[8]。Lazarus等^[10]建立了一种以硅胶为固定相,紫外为检测器的NP-HPLC的方法,可以将食物中的原花青素按聚合度的大小进行分离。Kelm等^[11]和Buendía等^[12]优化了这一方法,将二元醇柱代替硅胶柱,以荧光检测器代替紫外检测器,使所得图谱峰强度增加的同时也降低了干扰。

原花青素在自然界中,其组成单体具有多种亚型^[8],包括 propelargonidin (单体为阿夫儿茶精和表阿夫儿茶精)、procyanidin (单体为儿茶素和表儿茶素)、prodelphinidin (单体为没食子儿茶素和表没食子儿茶素)、profisetinidin (单体为非瑟酮醇和表非瑟酮醇)、prorobinetinidin (单体为洋槐儿茶精和表洋槐儿茶精)。不同植物中的原花青素,其单体组成及比例都是不同的。大部分植物是以儿茶素和表儿茶素组成的原花青素为主,研究最多的葡萄籽原花青素中,这2种单体组成的原花青素占到了9成以上。而银杏原花青素则主要由没食子儿茶素和表没食子儿茶素组成^[13],即 prodelphinidin, 其比例高达85%^[14]。因此,应用 NP-HPLC 方法联合质谱检测,可以确定各色谱峰的相对分子质量,用于不同来源原花青素的鉴别。本研究进一步优化了 NP-HPLC 法,来定性分析银杏叶制剂中原花青素,为银杏叶制剂中原花青素的质量控制,以及鉴别掺假提供了思路和方法。

1 材料与仪器

葡萄籽提取物(含原花青素为95.28%):河南中冠健业生物科技有限公司;银杏叶原花青素提取物:自制(含原花青素97.49%),批号110721;银杏叶提取物(批号110117):浙江康恩贝制药股份有限公司;银杏叶片(TBN牌、YKN牌、CP牌、HNX牌、GJ牌)。Agilent 高效液相色谱仪(美国Agilent公司);BS-210S天平(北京赛多利斯公司);离子阱质谱仪(Thermo公司)。

2 方法与结果

2.1 NP-HPLC 色谱条件

固定相为Phenomenex 二元醇柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-甲醇-水-乙酸(95:3:2, B);梯度洗脱程序:0~10 min, 0~12% B; 10~10.01 min, 12%~15% B; 10.01~30 min, 15%~45% B; 30~35 min, 45% B; 35~40 min,

45%~0 B;体积流量为1.0 mL/min;荧光激发波长276 nm;发射波长316 nm;进样量为20 μL,记录发射光谱图进行分析。

由图1可得,该色谱条件可以将银杏叶原花青素和葡萄籽原花青素按聚合度的大小分离开来。由于银杏原花青素单体组成较葡萄籽原花青素不同,因此各个聚体均出现2~3个峰。

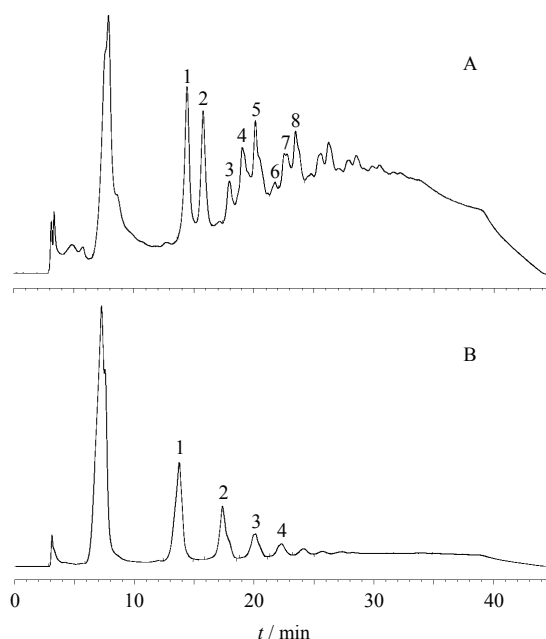


图1 银杏叶原花青素(A)和葡萄籽原花青素(B)的NP-HPLC 色谱图

Fig. 1 NP-HPLC chromatograms of proanthocyanidins from *Ginkgo Folium* (A) and from grape seeds (B)

2.2 HPLC-DAD-MS 分析原花青素

色谱条件:流动相为乙腈-乙酸(98:2, A)-甲醇-水-乙酸(69:29:2, B);洗脱梯度程序:0~35 min, 0~50% B; 35~40 min, 50%~0 B;体积流量0.6 mL/min;柱温35℃;进样量为10 μL。紫外光谱检测范围为190~400 nm;实时监控波长为254 nm。

质谱条件:ESI 负离子模式检测;碰撞气为超纯氮,鞘气和辅助气均为氮气,压力和体积流量分别为413.7 kPa和6.7 L/min;加热毛细管温度350℃;喷雾电压3 kV,毛细管电压-15 V;质量扫描范围为 m/z 100~1 500。在线动态采集丰度最高离子的二级质谱,碰撞能量30%,采用Thermo Finnigan Xcalibur 1.3工作站获取及处理数据。

由图2可知,葡萄籽原花青素1~4号峰的相对分子质量分别为577、865、1 153、1 442,根据这

些相对分子质量大小,可以推测出 1~4 号峰均由(表)儿茶素组成,见表 1。由图 3 可得,银杏叶原花青素 1 号峰(m/z 609)和 2 号峰(m/z 593)为二聚体峰,3~5 号峰(m/z 917、881、897)为三聚体峰,6~8 号峰(m/z 1 185、1 201、1 217)为四聚体峰,根据相对分子质量推测,这些聚合体是由(表)儿茶素和(表)没食子儿茶素共同组成的,或由(表)没食子儿茶素单独聚合组成的,但不存在单独的(表)儿茶素组成的聚合体,见表 1。

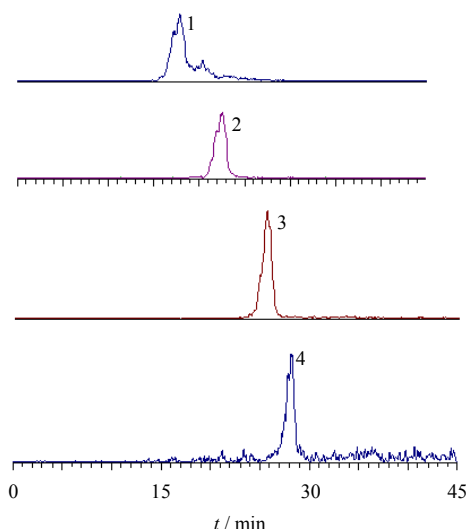


图 2 葡萄籽原花青素选择离子色谱图 (峰的编号同图 1-B)

Fig. 2 Ion chromatograms of proanthocyanidin extracted from grape seeds (peak numbers consistent with Fig. 1-B)

表 1 HPLC-DAD-MS 结果
Table 1 Results of HPLC-DAD-MS

成 分	峰号	m/z	推测组成
银杏叶原花青素	1	609	2 摩尔 B
	2	593	1 摩尔 A、1 摩尔 B
	3	917	3 摩尔 B
	4	881	2 摩尔 A、1 摩尔 B
	5	897	1 摩尔 A、2 摩尔 B
	6	1 185	3 摩尔 A、1 摩尔 B
	7	1 201	2 摩尔 A、2 摩尔 B
	8	1 217	1 摩尔 A、3 摩尔 B
葡萄籽原花青素	1	577	2 摩尔 A
	2	865	3 摩尔 A
	3	1 153	4 摩尔 A
	4	1 442	5 摩尔 A

A-(表)儿茶素, B-(表)没食子儿茶素
A-(*epi*)catechin B-(*epi*)gallocatechin

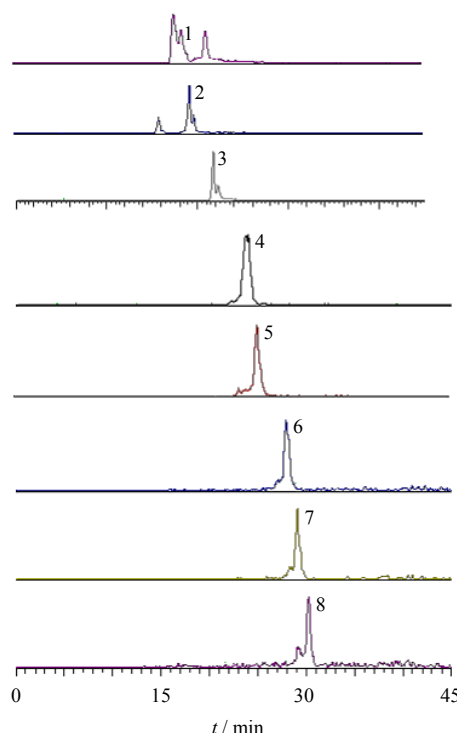


图 3 银杏叶原花青素 1~8 号峰选择离子色谱图 (峰的编号同图 1-A)

Fig. 3 Ion chromatograms of peaks 1-8 of proanthocyanidins extracted from *Ginkgo Folium* (peak numbers consistent with Fig. 1-A)

2.3 样本前处理方法

取银杏叶片各 10 片,研磨至细粉,用 20%丙酮 100 mL、超声辅助溶解,滤过,去除不溶性辅料。将滤液上样于聚酰胺树脂,上样完成后用 3~4 倍体积的 20%丙酮洗脱,弃去该部位;再用 3~4 倍体积的 80%丙酮洗脱,得 80%丙酮部位;将 80%丙酮部位回收至无丙酮味,用等体积乙酸丁酯萃取 2 次,弃去有机层,回收水层至干;残渣用甲醇溶解,即得。

2.4 样本的分析

各制剂经 HPLC 分析后,所得的特征图谱比较相似:活性最高的二聚体 2 个峰出峰明显,峰高及峰面积比例接近;三聚体峰以 TBN 银杏叶片出峰最为明显,HNX 和 GJ 银杏叶片出峰最不明显。而几种制剂的单体峰相差较多,以 YKN 和 GJ 银杏叶片单体峰出峰更为明显,CP 和 HNX 银杏叶片出峰最不明显,见图 4。

2.5 模拟掺假的样本分析

称取 4 份银杏叶提取物,分别为 1.99、1.98、1.96、1.92 g;依次加入葡萄籽提取物 0.01、0.02、

0.04、0.08 g, 即掺假量分别为 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%。上述样本经前处理后, 分析原花青素的组成。

由图 5 可知, 掺入葡萄籽原花青素的银杏提取物 HPLC 特征峰发生了明显的改变: ①二聚体 2 个

峰的特征发生改变: 14 min 左右的峰较 15.3 min 左右的峰出峰强度更加明显、峰高更高、峰面积更大; ②17.3 min 左右的峰出峰更加明显; ③上述 2 种改变的趋势与葡萄籽原花青素加入量成正比。

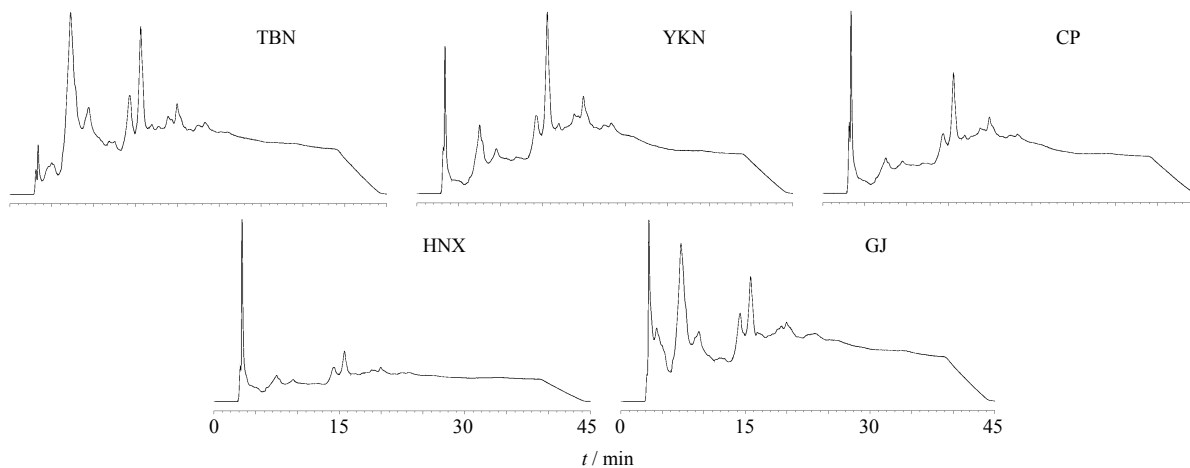


图 4 各银杏叶片的 NP-HPLC 色谱图 (峰的编号同图 1-A)

Fig. 4 NP-HPLC chromatograms of *Ginkgo Folium* preparation (peak numbers consistent with Fig. 1-A)

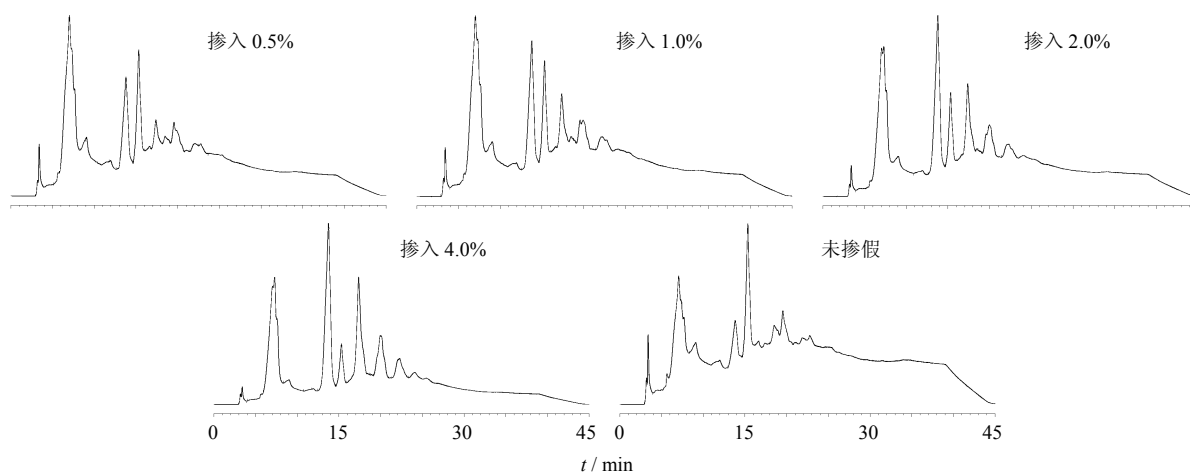


图 5 掺入葡萄籽原花青素的银杏叶提取物的 NP-HPLC 色谱图

Fig. 5 NP-HPLC chromatograms of adulterate *Ginkgo Folium* preparation with grape-seed proanthocyanidins

3 讨论

之前的研究已经证实, 通过 NP-HPLC 法可以将可可^[11]及草莓^[12]中的原花青素根据聚合度大小进行分离。本研究通过 HPLC-DAD-MS 分析, 也证实了葡萄籽原花青素是由(表)儿茶素组成的, 银杏原花青素则是由(表)儿茶素和(表)没食子儿茶素共同组成的。此外, 据已有的文献报道, prodelphinidin 仅发现存在于美国山核桃 *Carya illionensis* 的髓心及银杏叶中^[8]。而 prodelphinidin 的色谱特征峰与 procyanidin 差异较大, prodelphinidin 中不同的聚合度基本有 2~3 个峰, 而 procyanidin

每个聚合度只有 1 个峰。由此, 笔者认为通过 NP-HPLC 法可以快速的鉴别出银杏叶制剂中是否有掺假行为。

本研究中, 当向银杏叶提取物中掺入葡萄籽原花青素后, 其色谱特征发生明显的改变: ①14 min 左右出的峰强度增强、峰高增加、峰面积增大, 其原因是该时间点葡萄籽原花青素二聚体出峰, 银杏原花青素[由 2 摩尔(表)没食子儿茶素组成]二聚体也出峰, 而 15.3 min 左右仅银杏原花青素另 1 个二聚体[由 1 摩尔(表)没食子儿茶素和 1 摩尔(表)儿茶素组成]出峰, 葡萄籽原花青素在该时间点没有

特征峰。因此掺假后,前峰较后峰的出峰强度更加明显、峰高更高、峰面积更大;且该趋势与葡萄籽原花青素加入量成正比。②17.3 min左右出的峰强度增强、峰高增加、峰面积增大,其原因同二聚体特征峰改变原因是一样的。因此,本研究建立的NP-HPLC法定性分析原花青素可以用于鉴定银杏叶制剂中是否掺假。

参考文献

- [1] Chan P C, Xia Q S, Fu P P. *Ginkgo biloba* leave extract: Biological, medicinal, and toxicological effects [J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2007, 25(3): 211-244.
- [2] 金虹,黄毅,王继生,等.银杏叶提取物对辐射损伤小鼠的保护作用[J].*中草药*, 2010, 41(8): 1339-1342.
- [3] van Beek T A, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2002-2032.
- [4] 牟玲丽,陈丽,李峰,等.基于衰老大鼠模型的银杏叶提取物血清指纹图谱研究[J].*中草药*, 2012, 43(4): 690-693.
- [5] 张富赓,刘振国,刘昌孝.国产和进口银杏叶片中萜类内酯的比较[J].*药物评价研究*, 2011, 34(1): 35-38.
- [6] 谢文利,万宗明,李玲,等.原花青素-B2对体内外蛋白质非酶糖基化反应的影响[J].*中草药*, 2011, 42(4): 749-751.
- [7] 谢文利,孙静,赵艳威,等.原花青素的降血糖作用及急性毒性研究[J].*中草药*, 2009, 40(10): 1615-1616.
- [8] Hümmer W, Schreier P. Analysis of proanthocyanidins [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(12): 1381-1398.
- [9] Prior R L, Fan E, Ji H P, et al. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90(9): 1473-1478.
- [10] Lazarus S A, Hammerstone J F, Adamson G E, et al. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(9): 3693-3701.
- [11] Kelm M A, Johnson J C, Robbins R J, et al. High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(5): 1571-1576.
- [12] Buendía B, Gil M I, Tudela J A, et al. HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(7): 3916-3926.
- [13] Qa'dan F, Mansoor K, AL-Adham I, et al. Proanthocyanidins from *Ginkgo biloba* leaf extract and their radical scavenging activity [J]. *Pharm Biol*, 2011, 49(5): 471-476.
- [14] Stafford H A, Kreitlow K S, Lester H H. Comparison of proanthocyanidins and related compounds in leaves and leaf-derived cell cultures of *Ginkgo biloba* L., *Pseudotsuga menziesii* Franco, and *Ribes sanguineum* Pursh. [J]. *Plant Physiol*, 1986, 82(4): 1132-1138.