

文章编号:1000-582X(2005)10-0115-04

银杏叶黄酮的微乳高效薄层色谱指纹图谱*

刘德芳,王伯初

(重庆大学生物工程学院 生物力学与组织工程教育部重点实验室,重庆 400030)

摘要:以十二烷基硫酸钠(SDS)-正丁醇-正庚烷-水微乳系统为流动相,预制聚酰胺薄层板为固定相,通过调节微乳系统的极性,较好地分离出十几种银杏叶黄酮.与传统的流动相系统——有机溶液系统相比,微乳系统显示出较强的分离优势.对银杏叶黄酮作薄层色谱指纹图谱分析,以寻求简便、合理的标准质量控制方法.

关键词:银杏叶;黄酮;微乳液;薄层色谱;指纹图谱

中图分类号:Q503

文献标识码:A

银杏叶提取物(GBE)具有独特的药理活性及巨大的临床应用价值.它的化学成分较为复杂,迄今为止已从银杏叶中分离出大量的极性和非极性化合物.作为中药,如何评定其稳定性,建立客观的质量控制方法,成为亟待解决的课题之一.

国家药品监督管理局在中药注射剂质量标准中引入指纹图谱技术要求,指南中的“色谱指纹图谱”指采用柱色谱及薄层色谱等各种色谱技术实验研究的指纹图谱^[1].对于银杏叶中药制剂的指纹图谱研究较少.游松等曾用HPLC方法建立了银杏叶药材、中间体及其注射剂的指纹图谱^[2].但建立这种方法须使用昂贵的高效液相色谱仪,且对银杏叶提取物(GBE)的纯度要求高,不易制得.而薄层色谱作为中药的鉴别方法,由于其具有快速、分析成本低、尤其可以提供形象直观的彩色的图像,为其它色谱技术所不能的特点而为中药分析工作者广泛使用.用于中药指纹图谱分析,它的这一优势得到更充分发挥.指纹图谱强调的是图谱的整体性和模糊性,它既可以表达有良好重现性的指纹特征,又能包容样品之间的差异.用于GBE薄层色谱指纹图谱的文献尚未见报道.

微乳液的研究是建立在胶束色谱理论^[3]之上的.微乳液通常是由表面活性剂、助表面活性剂、油、水等组分在适当配比下自发生成的、无色透明低粘度的热力学稳定体系.在微乳色谱中,溶质在固定相、油或水

连续相及内核和介面膜等数相之间进行分配.层附过程中,由于吸附、分配、静电、疏水、立体、萃取与反萃取等可能的效应,导致各种物质迁移速率不同而使Rf值有差异.

笔者以含水量不同的十二烷基硫酸钠-正丁醇-正庚烷-水微乳液^[4-7]为展开剂进行薄层色谱分析方法,通过调节微乳系统的极性,较好地分离出十几种银杏黄酮得到了较好的指纹图谱.这将有助于银杏叶药材的标准化种植,银杏叶提取物及其制剂的质量控制.

1 仪器与材料

1) 仪器与药品

薄层色谱紫外分析仪(天津市琛航科技仪器有限公司)、自动点样仪(天津市琛航科技仪器有限公司)、定量毛细管(天津市琛航科技仪器有限公司)、双槽展开缸(重庆玻璃仪器厂)、电吹风、聚酰胺预制板(台州四青生化材料厂)、新型喷雾瓶(华西医科大学仪器厂)、十二烷基硫酸钠(SDS),正丁醇,正庚烷,三氯化铝,乙醇均为分析纯.

对照品:芦丁、槲皮素、GBE样品(均为中国药品生物制品检定所出品).

2) 实验材料

银杏叶,2002年购于贵州大学.

* 收稿日期:2005-05-14

作者简介:刘德芳(1975-),女,四川广安人,重庆大学硕士研究生,主要从事天然药物的分离提取及质量控制标准化研究.

2 实验方法

2.1 展开剂系统的筛选

1) 传统展开剂系统

传统展开剂系统一般为油液系统,极性较小.本实验用甲苯、醋酸乙酯和吡啶以不同比例作为展开剂,都仅能展开两三个点.不能较好分离银杏黄酮.

2) 微乳液系统的配制

按照十二烷基硫酸钠(SDS):正丁醇:正庚烷=13.77:15.6:2.7(重量比)称取各试剂,加少量水制成微乳液.再依据微乳液的比例,加适量水,静置24 h备用.

2.2 配制供试品 GBE 液

取不同批次的银杏叶,剪碎后用甲醇提取,收集甲醇提取液、干燥后为棕黄色粉末.分别称取各批粉末适量配制甲醇溶液.

2.3 配制对照标液

称取芦丁、槲皮素标准样品配制成1 mg/mL 甲醇溶液,作为对照标准溶液.

2.4 配制指纹图谱对照液

称取中国药品生物制品检定所提供的银杏叶黄酮样品配制成2 mg/mL 甲醇溶液,作为对照品.

2.5 高效薄层色谱方法

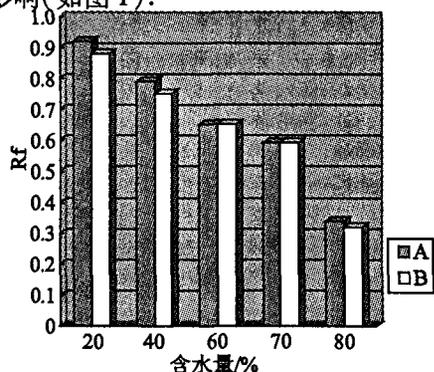
用定量毛细管吸取对照品溶液、对照标液、GBE样品液于聚酰胺膜上点样,直径约1 mm,吹干.以不同含水量的微乳液为展开剂,于已饱和的双槽展开缸中展开10 cm,取出烘干.均匀喷洒1%氯化铝乙醇溶液,烘干,于365 nm紫外灯下观察.

3 指纹图谱结果

3.1 影响展开效果的因素

1) 展开剂含水量对展开效果的影响

不同含水量的微乳液对银杏黄酮A和B某一成分移动影响(如图1).



A. 实验室 GBE 样品; B. 中国药品生物制品检定所 GBE 样品

图1 银杏黄酮 Rf 值与微乳液含水量的关系

从图1可以看出,银杏黄酮的Rf值随着微乳液含水量增加而下降.实验室样品GBE在微乳液含水量较高时的Rf值比对照品中国药品生物制品检定所的高.随着微乳液含水量的降低,两者的Rf值相差不大,当含水量为65%~75%时,两者Rf值相同.

微乳液含水量与斑点形态的关系如表1所示.

表1 微乳液含水量与斑点形态的关系

微乳液含水量/%	斑点个数	清晰度	ΔR_f	展开时间/h
20	2~3	模糊	小	1.0
40	3~4	模糊	小	2.0
60	8	拖尾严重	小	3.5
67	12	清晰	较大	4.5
70	12	少量拖尾	小	6.0
80	8	拖尾严重	小	15.0

可以看出,在微乳液含水量67%左右时,Rf值约为0.6,其余成分的斑点较均匀清晰的分布上下,颜色亮黄,无拖尾,斑点间隔较大.在含水量为70%时,虽然斑点较多,但有少量拖尾,不能有效分离.综合考虑,宜选择含水量67%微乳液作为银杏黄酮分离的展开剂.

2) 酸度对展开效果的影响

由于黄酮中酚羟基的存在,使其略显酸性.中性展开剂对其附着能力差,斑点均有拖尾.而强酸易造成黄酮苷类分解,因此选择弱酸:甲酸调节酸度.实验证明,选择含展开剂体积8%的甲酸对银杏黄酮展开效果最好.

3) 饱和度对展开效果的影响

展开剂置入展开缸中,实验必须封闭饱和.未经饱和和就展开的薄层板上,展开剂上行速度不一致,导致上线呈曲线,使实验无效,选择饱和时间为25 min为宜.

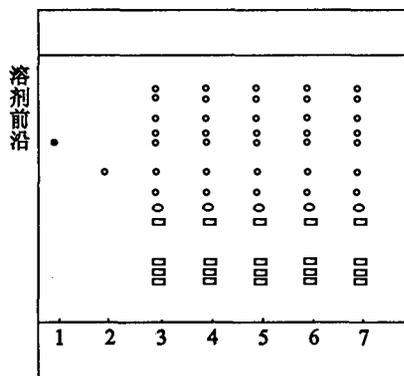
此外,展开板的种类、湿度、温度等均对银杏黄酮的分离有影响.硅胶类展开板对银杏黄酮吸附能力差,只能分离2~3个斑点;选择聚酰胺薄层板分离效果最好;展开通风橱内湿度以相对湿度为68%为最好;温度为室温.

3.2 薄层色谱指纹图谱结果

银杏叶黄酮的分离,以含水量67%的微乳体系-甲酸(92:8)为展开剂,聚酰胺薄层板为固定相.分离结果如图2所示.

由色谱指纹图谱可见,银杏黄酮能被此微乳系统完全分离.样品3即中国药品生物制品检定所提供的银杏黄酮和其它样品一样,分离出12个点.

从色谱图可见,银杏叶中均含有芦丁和槲皮素,虽然两者的极性相差不大(黄酮苷的结构类似),但芦丁的分子量比槲皮素大,因此芦丁的Rf(0.528)比槲皮



1.槲皮素对照品; 2.芦丁对照品;
3.中国药品生物制品检定所提供GBE样品;
4.GBE样品A; 5.GBE样品B;
6.GBE样品C; 7.GBE样品D

图2 各批银杏叶薄层色谱指纹图谱

素的 $R_f(0.642)$ 较小.各批次银杏叶的黄酮成分相差不大.紫外灯下各批次的黄酮斑点颜色为亮黄色.但由于随着季节和采摘时间的不同,银杏叶黄酮的成分有差别^[8],所以斑点颜色有深浅.据此也可作为制订GBE的质量标准的依据.

3.3 银杏黄酮分子结构对 R_f 的影响

样品的极性越大,则被吸附剂吸附得越牢固,在相同条件下,迁移速率就越小,在色谱图上的 R_f 值就越小.色谱图的下部,是黄酮极性大的成分,如黄酮的盐酸盐等.中部为槲皮素和芦丁,槲皮素是芦丁的一种分解产物.推测有可能是在提取或分析过程中,使芦丁有所分解.上部是比槲皮素极性更小的黄酮,如二氢黄酮及其化合物等.可以剪开斑点,溶于甲醇过滤后在HPLC上精确分析.

4 讨论

由十二烷基硫酸钠-正庚烷-正丁醇以13.77:15.6:2.7的比例溶于67%的水中组成的微乳体系,适合于分离银杏叶黄酮.该微乳液加入8%体积的水,可以有效防止黄酮斑点的拖尾.梁淑芳等用微乳体系分离沙棘黄酮得8个斑点^[6],马柏林等也用此方法分离杜仲黄酮得9个斑点^[4].笔者在他们的微乳液基础上,结合黄酮的结构特点,调节微乳系统的极性,温度和湿度,分离出银杏叶提取物黄酮斑点12个.改善了GBE的薄层色谱分离技术,为平面色谱在中药鉴定和色谱分析中的应用展示了良好的前景.

薄层色谱法在中药分析中有以下特点:对被分离物质的性质没有限制,使用范围广;固定相使用一次,样品预处理较简单;薄层具有多路柱效应,可同时进行每个样品的分离,所以样品的分析时间短;不受一种监测器的限制,在同一色谱柱上可根据被分离化合物的

性质选择多种检测方法进行定性或定量,并且可以重复测定;当吸附剂高效化、定量分析仪器化、自动化后,提高了薄层色谱的分辨率及重现性.因此气相色谱法和高效色谱法不能代替薄层色谱法.

笔者用薄层色谱指纹图谱方法分析了几批银杏叶提取物,符合中药指纹图谱对薄层色谱技术的要求,且操作简单、设备易得,非常适合我国的国情.为银杏叶药材的标准化种植,银杏叶提取物及其制剂的质量控制提供了简便、经济可靠的方法.

5 构建中药指纹图谱技术展望

近年来,用于中药指纹图谱的技术,除薄层色谱技术和高效液相色谱技术外,更为先进的色谱技术正在逐步推广.其中最引人注目的是裂解气相色谱和三维高效液相色谱.裂解气相色谱操作简单、样品无需化学前处理、提供信息量大.该方法是将样品放入裂解器内,在一定条件下将样品加热使之瞬间裂解,生成可挥发的小分子物质,立即被载气带人气相色谱分析柱上,分离后在记录仪上获得重复特征的裂解气相色谱图.而高效液相色谱具有重现性好、流动相选择性广,色谱柱可反复使用等特点,特别是三维高效液相色谱,近年来发展更快,非常适合构建中药指纹图谱.另外以超临界 CO_2 流体萃取作为前处理手段的气相色谱-质谱分析法,也将会大大丰富中药指纹图谱构建的内涵.

构建中药指纹图谱相当复杂,人工比较难免影响结果的准确性,势必将其与计算机图谱解析和识别技术结合起来^[9].目前最先进的计算机图谱解析技术有如下几种:

1) 模糊信息分析法

该方法是对模糊事物进行划分、判断或推理的方法.中药指纹图谱特征具有一定的模糊性,通常采用“隶属度”来反映这种模糊性,即用隶属度来判别中药的真伪.就中药的真伪甄别而言,计算机模糊识别的基本步骤是:①特征提取,即从中药的指纹图谱中获取能够反映其本质的数量化特征.②依照某种方式确定该中药指纹图谱特征对“真模式”、“假模式”的隶属度.③用最大从属原则或阈值原则确定该中药样品的真伪.

2) 人工神经网络法

该方法是模拟人脑功能的全新信息处理方法,其理论基础是神经网络的数学模型^[9].神经网络对于处理那些关系不明确、背景不清楚、推理规则不确定的问题具有独到之处,非常适于处理中药指纹图谱信息.反向传播(Back Propagation, BP)模型是目前应用最广泛

的人工神经网络模型. BP网络的运行分两步:首先利用一组已知结果的样本构成训练集,对于每一个样本的输入,根据前向传播得到与期望输出结果之间的误差,这些误差由输出层反馈到输入层,以此修正各个节点之间的连接权值.反之这一过程,直到整个训练样本集的每一个模式和每一个输出单元的误差都小于某个特定值,训练才结束.经过训练的网络,把系统规则、预测能力、变量转化都以权值的形式隐含在网络中,然后向输出层输入信息,即可给出处理结果.

3) 灰色关联聚类法

灰色系统是既包含已知信息,又包含未知信息的系统.该方法以定义的相对关联度为测度,构建一种全新的模式识别模型^[10].

此外,要实现中药的现代化,应当建立“谱效”学,即将中药指纹图谱与药效结果相对应起来,再采用可进行多变量解析的化学计量学方法,将中药色谱指纹图谱中化学成分的变化和中药药效结果从数量上联系起来.必要时建立中药的体内血清药化学成分的指纹图谱,从而最终解决中药质量评价的科学性等中药质量关键性的科学问题,建立完善的中药质量评价体系.使中药产业建立起有自主知识产权的中药高水平全面质控标准,早日实现中药现代化.

参考文献:

- [1] 中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南. http://www.ivdc.gov.cn/yy/t_20041108_15787.htm [EB/OL]. 2002-04-27.
- [2] 游松,王亮. 银杏叶注射剂指纹图谱的研究[J]. 中成药, 2002,33(2):216-218.
- [3] PRIME L. M. Microemulsion Theory and Practice[M]. New York: Academic Press, 1997.
- [4] 马柏林,梁淑芳. 杜仲黄酮的微乳薄层色谱分离鉴定研究[J]. 西北林学院学报, 2001,16(2):72-74.
- [5] 谭志斗,田大昕. 微乳液在氨基酸色谱中的应用[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2001,(1):78.
- [6] 梁淑芳,马柏林. 沙棘黄酮的微乳薄层色谱分离鉴定研究[J]. 沙棘, 2001,(1):19.
- [7] 李彩君,林巧玲. 高良姜中黄酮类成分薄层色谱指纹图谱鉴别[J]. 2001,12(3):183-187.
- [8] 汤国红. 银杏树24小时内总黄酮的含量变化[J]. 时珍国医国药, 2002,13(6):91-95.
- [9] 施鸿宝. 神经网络及其应用[M]. 西安:西安交通大学出版社, 1999.
- [10] 苏薇薇. 药指纹图谱及计算机信息处理[J]. 世界科学技术及中药现代化, 2001,3(2):30-34.

Fingerprint of GBE by Microemulsion High Performance Thin-layer Chromatography

LIU De-fang, WANG Bo-chu

(Key Laboratory of Biomechanics & Tissue Engineering, Ministry of Education Under the State College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Twelve types of ginkgo flavonoids were separated with SDS/n - C₄H₉OH/n - C₇H₁₅/H₂O microemulsion as developer on polyamide film. The polarity of the microemulsion was regulated through adding or reducing water. Compared with general mobile phase, the sensitivity of detection was improved markedly and the test results were satisfied. By means of HPTLC, fingerprint was argued on ginkgo flavonoids. It can meet the needs of simple and convenient, reasonable standard quality control methods.

Key words: ginkgo flavonoids; microemulsion; HPTLC; fingerprint

(编辑 陈移峰)