

HPLC 方法开发系统在银杏中黄酮提取物分析方法开发上的应用

LC-125

摘要：本文中使用了岛津 HPLC 方法开发系统，建立银杏黄酮提取物高效液相色谱快速分析条件探索的方法。在该分析方法开发中，在 Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d. × 150 mm L., 2.2 μm 色谱柱上进行 4 种流动相和 6 种梯度条件的自动化方法探索，根据所得色谱图结果使用自动评测软件对各峰进行综合评价，以峰检出数和分离度综合评价最优者为该样品分析方法。

关键词：超高效液相色谱 方法开发系统 银杏黄酮提取物

银杏 (Ginkgobiloba)，又名白果，是世界上十分珍贵的树种之一，具有较高的食用和药用价值，银杏叶提取物 (GBE) 含有丰富的黄酮类化合物，能够增加脑血流量，改善脑血管循环功能，保护脑细胞，扩张冠状动脉，防止心绞痛、心肌梗塞和血栓形成，提高机体免疫能力。对冠心病、心绞痛、脑动脉硬化、老年性痴呆、高血压病人均十分有益。

银杏黄酮提取物中各化合物的种类和含量是甄别其品质的关键，也是保证中药生成质量管理和临床用药安全规范的关键，因此利用 HPLC 综合全面的特点将 HPLC 指纹图谱技术引入到银杏黄酮研究中用于质量控制。由于成分复杂，传统 HPLC 方法耗时长，分离效果不佳，随着现代液相色谱技术的高速发展，UHPLC 和对应的超快速分析色谱柱在以其超快速高分离的特点，越来越多的用于中药指纹图谱的研究中，为此开发超快速液相分析方法进行此类样品的分析显得尤为重要。

岛津 HPLC 方法开发系统是基于 UHPLC LC-30A 建立的一套用于液相分析条件探索的自动化装置。它利用工作站控制自动进行色谱柱切换和流动相选择而实现了原本需要人力干预才能完成的分析方法开发过程。专用 Method Scouting Solution 工作站将繁琐的条件变化设置过程大为简化，图形界面易于操作和理解。

本实验使用该套系统对银杏黄酮样品进行分析，筛选优化获得最优的 UHPLC 分析方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 系统。具体配置为 LC-30AD × 2 (输液泵，配四元低压梯度比例阀)，DGU-20A5R × 2 (在线脱气机)，SIL-30ACMP (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱，含

FCV-34AH (高压流路切换阀)，SPD-M30A (二极管阵列检测器)，CBM-20A (系统控制器)，Method Scouting Solution Ver. 1.00 (方法开发系统工作站)，LabSolutions Ver. 5.54SP1 (色谱工作站)。具体配置为 LC-30AD × 2 (输液泵，配四元低压梯度比例阀)，DGU-20A5R × 2 (在线脱气机)，SIL-30ACMP (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱，含 FCV-34AH (高压流路切换阀)，SPD-M20A (二极管阵列检测器)，CBM-20A (系统控制器)，Method Scouting Solution Ver. 1.00 (方法开发系统工作站)，LabSolutions Ver. 5.54SP1 (色谱工作站)。20A (系统控制器) 和 LabSolutions Ver.5.54 SP3 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d. × 150 mm L., 2.2 μm

流动相：A1 相 - 水

A2 相 - 0.1% 三氟醋酸水溶液

A3 相 - 0.2% 磷酸水溶液

B 相 - 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

检测波长：360 nm

1.3 样品制备

以甲醇 - 水 (1/1, V/V) 溶解，浓度为 40 mg/mL；以 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

■ 结果与讨论

2.1 通用梯度时间程序分析

以表 1 所示的通用梯度时间程序对色谱柱和流动相体系进行测试。

表1 通用梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	10
2.50	Pumps	Pump B Conc.	10
24.00	Pumps	Pump B Conc.	50
27.00	Pumps	Pump B Conc.	50
27.10	Pumps	Pump B Conc.	10
30.00	Controller	Stop	

表2 通用分析条件分析结果及评价

#	流动相类型	峰检出数	综合得分 *
1	A1-B	35	2168
2	A2-B	36	2255
3	A3-B	35	2195

* 综合得分：以峰检出数乘以各峰分离度之和记，分离度值大于3者均以3记。

根据评价结果，确定流动相A2-B类型为该样品分析用流动相体系，即为A相-0.1%三氟乙酸水溶液，B相-乙腈。本实验使用岛津超高效液相色谱仪

2.2 梯度条件筛选及结果

在上步确定的流动相体系下进行梯度条件的筛选。筛选方案和结果如表3所示。

表3 梯度筛选方案和结果

起始浓度 (B%)	终止浓度 (30 min)	峰检出数	综合得分
10	50	33	2329
	40	36	2714
	30	36	3031

通过梯度条件筛选，确定合理的梯度条件为10-30%B。。

2.3 梯度条件优化及结果

为进一步提高各峰分离度，对梯度条件筛选结果为依据，以表4方案进行梯度优化。

表4 梯度优化方案

起始浓度 (B%)	终止浓度 (30 min)
10	30
11	25
12	

共进行3×2=6次优化分析，结果如下所示。

表5 梯度条件优化结果

#	分析方法	峰检出数	综合得分
1	ODSIII_0.1%TFA_ACN_12_30	35	2692
2	ODSIII_0.1%TFA_ACN_12_25	24	1298
3	ODSIII_0.1%TFA_ACN_11_30	35	2804
4	ODSIII_0.1%TFA_ACN_11_25	26	1627
5	ODSIII_0.1%TFA_ACN_10_30	35	2678
6	ODSIII_0.1%TFA_ACN_10_25	28	1653

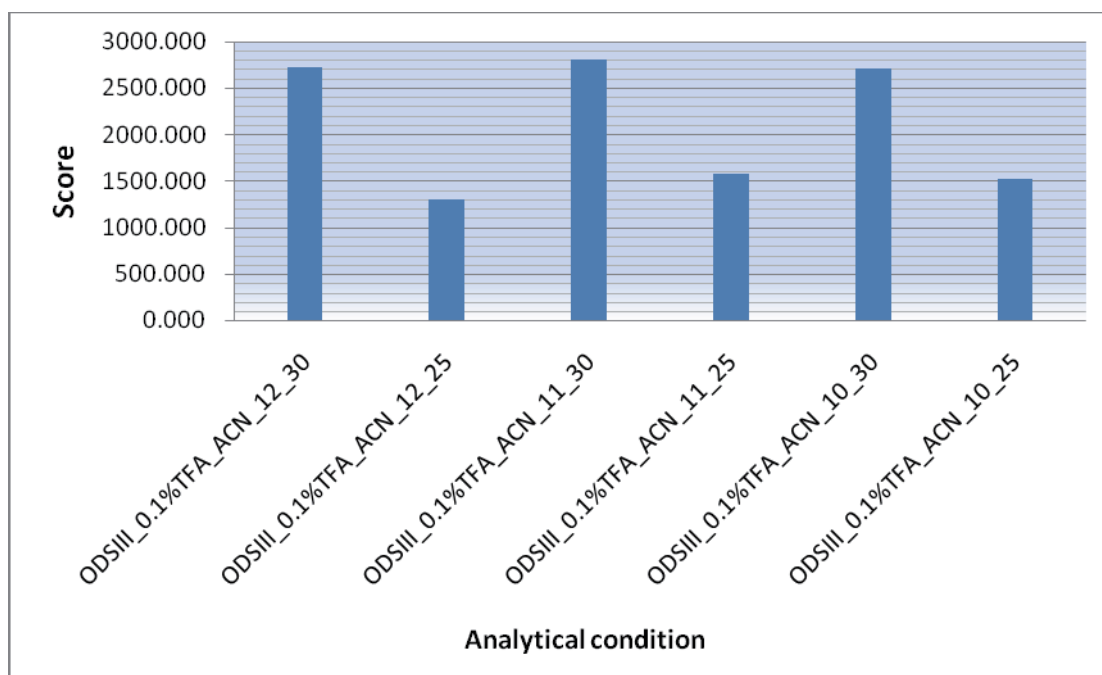


图1 梯度条件优化分析结果评价

根据上述评价结果，确定该样品的最佳分析条件为：

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d. × 150 mm L., 2.2 μm

流动相：A-0.1% 三氟醋酸水溶液 B- 乙腈

流速：0.4 mL/min

梯度条件：详见表 6

柱温：40℃

样品浓度：40 mg/mL

进样量：1 μL

表 6 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Action	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	11
30.00	Pumps	Pump B Conc.	30
33.00	Pumps	Pump B Conc.	30
33.01	Pumps	Pump B Conc.	11
36.00	Controller	Stop	

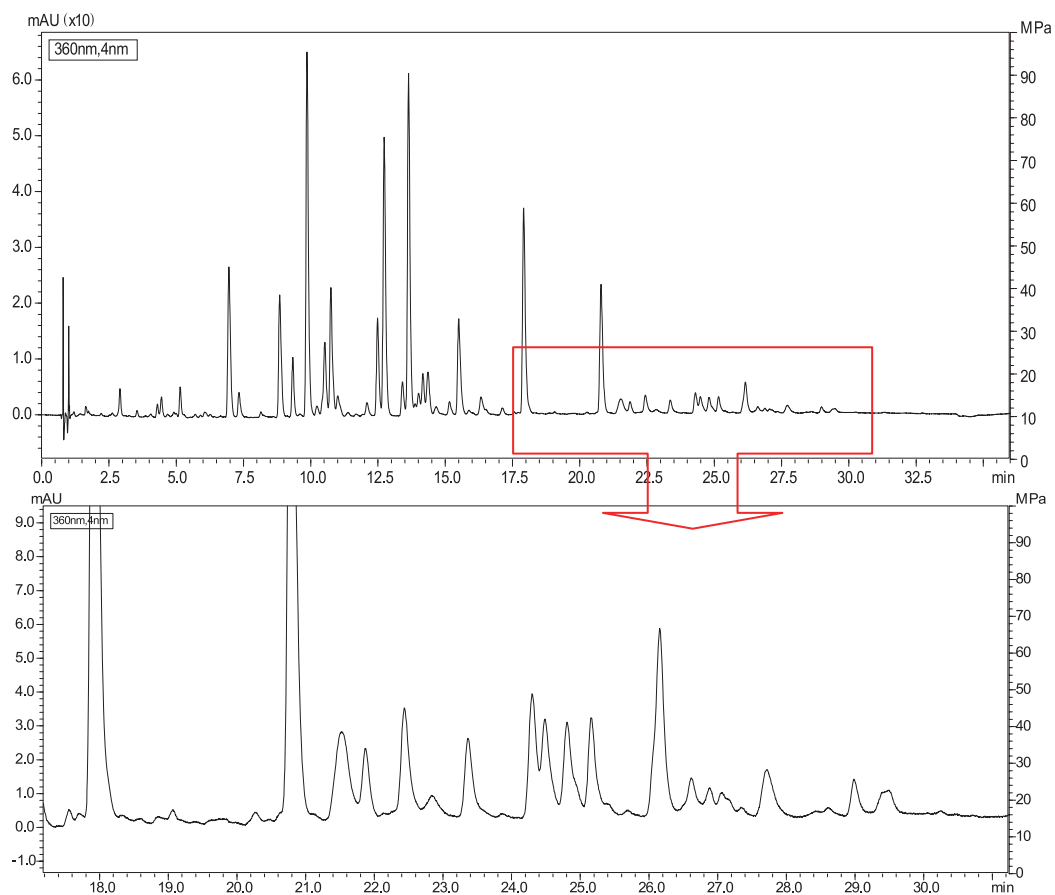


图2 优化UHPLC条件样品分析色谱图

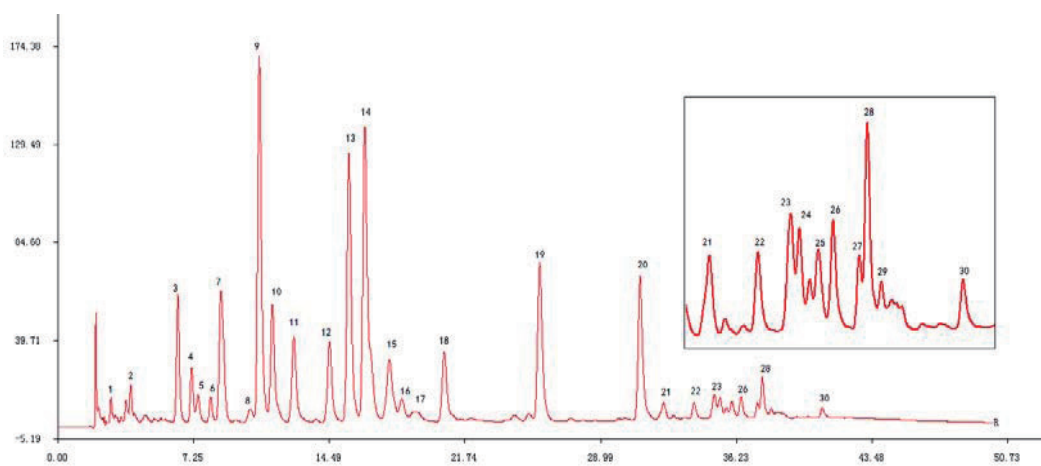


图3 原常规液相方法样品分析色谱图

结论

使用岛津 HPLC 方法开发系统对银杏中黄酮提取物的 HPLC 分析方法进行开发，经过通用条件分析、梯度条件筛选和梯度条件优化三个步骤进样分析，对所得数据使用 Class-agent report 软件处理，根据峰检出数和分离度综合得分，以获得评价最高的分析条件建立该样品的分析方法。本例为中药或天然产物等此类待测组分或化合物数量未知的样品分离条件的探索提供可行的方法。