

HPLC-MS 法测定银杏叶片中银杏内酯 A、B、C 和白果内酯

佟若菲, 林 宏*, 李维超, 张 因

天津市儿童医院 药剂科, 天津 300074

摘 要: 目的 建立测定银杏叶片中银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的 HPLC-MS 法。方法 采用 HPLC-MS 法, Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-10 mmol 乙酸铵水溶液, 梯度洗脱; 柱温: 30 ℃; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 10 μL。采用离子阱 (ESI) 负离子模式进行检测, 检测模式为母离子全扫描方式 (Scan), 并进行二次离子化扫描。雾化器压力 310.28 kPa, 毛细管电压 3.5 kV, 碰撞诱导解离电压 150 V, 干燥气为 N₂, 干燥器温度 350 ℃, 干燥气流量 8.0 L/min。结果 银杏内酯 A、B、C 和白果内酯在 0.100 6~2.012 0、0.102 0~2.040 0、0.050 0~1.000 0、0.101 6~2.032 0 mg/mL 显示良好的线性关系; 平均加样回收率分别为 97.1%、97.0%、98.2%、97.8%, RSD 值分别为 1.73%、1.68%、1.76%、1.83% (n=6)。结论 该法灵敏度高、选择性高、检测限低, 为银杏叶片的质量控制提供依据。

关键词: 银杏叶片; 银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 银杏内酯 C; 白果内酯; HPLC-MS

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2017)03-0386-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.03.006

Determination of ginkgolide A, B, and C, and bilobalide from Yinxingye Tablets by HPLC-MS method

TONG Ruo-fei, LIN Hong, LI Wei-chao, ZHANG Nan

Department of Pharmacy, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China

Abstract: Objective To establish determination of ginkgolide A, ginkgolide B, ginkgolide C, and bilobalide in Yinxingye Tablets by HPLC-MS. **Methods** HPLC-MS method was adopted. The determination was carried out on Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), consisted of methanol-10 mmol ammonium acetate aqueous solution with gradient elution. The column temperature was set at 30 ℃ at a flow rate of 1.0 mL/min. Injection volume was 5 μL. The ion trap (ESI) negative ion mode was used as detection mode, the detection mode was the full scan mode (Scan) of the parent ion, and the two ionization scan was performed. Atomizer pressure was set at 310.28 kPa with capillary voltage of 3.5 kV. Fragmentor voltage was selected at 150 V, and dry gas was N₂. The dryer temperature and dry gas flow were 350 ℃ and 8 L/min. **Results** There were good linear relationships of ginkgolide A, ginkgolide B, ginkgolide C, and bilobalide in the concentration ranges of 0.100 6—2.012 0, 0.102 0—2.040 0, 0.050 0—1.000 0, and 0.101 6—2.032 0 mg/mL, respectively. The average recoveries were 97.1%, 97.0%, 98.2%, and 97.8% with RSD 1.73%, 1.68%, 1.76%, and 1.83%, respectively. **Conclusion** The method has high sensitivity, high selectivity, and low detection limit which can be used in quantity control for Yinxingye Tablets.

Key words: Yinxingye Tablets; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgolide C; bilobalide; HPLC-MS

银杏叶片是以银杏叶为原料, 采用水煮、提取浓缩浸膏制成的薄膜衣片, 具有活血化瘀通络之功效, 临床上主要用于心脑血管疾病的预防和治疗^[1]。银杏叶片中有效成分主要为黄酮类物质和萜内酯类。萜内酯类主要为银杏内酯 A、B、C 等和白果内酯, 已知该类化合物是主要的药效活性物质, 具

有清除自由基及抑制细胞膜脂质过氧化, 防止血管内皮细胞和脑细胞受损; 扩张血管, 增加血流量, 降低心脑血管的阻力; 抗血小板聚集, 降低血液黏度, 降血脂、抗动脉粥样硬化, 改善心脑血管循环和代谢等药理作用, 因此该成分的含量控制对于保证临床疗效至关重要^[2-4]。本实验采用 HPLC-MS 法对银

收稿日期: 2016-11-01

作者简介: 佟若菲 (1977—), 女, 副主任药师, 研究方向: 临床药学。Tel: 13512413802 E-mail: coco_trf@sina.com

*通信作者 林 宏, 工作于儿童医院。

杏叶片中银杏内酯 A、B、C 及白果内酯进行测定。结果表明该法灵敏度高、选择性高、检测限低，为银杏叶片的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型 HPLC 系统、Agilent 6310 Ion Trap MS 仪（美国安捷伦公司）；Chemstation B.01.03-SR2 色谱工作站（美国安捷伦公司）及 6300 Series Ion Trap LC/MS Software 6.1 质谱工作站（美国安捷伦公司）；Milli-Q Academic 水纯化系统（美国 Millipore 公司）；AL104 Mettler 电子分析天平（瑞士 Mettler 公司）；RE-3000 型旋转蒸发仪、SHZ-III 型循环水真空泵（上海亚荣生化仪器厂）；DZKW-D-2 电热恒温水浴锅（北京市永光明医疗仪器厂）。

甲醇（色谱纯，天津康科德科技有限公司）；乙酸铵、盐酸、醋酸乙酯、醋酸钠（分析纯）均购自天津化学试剂厂；银杏内酯 A（批号 110862-201508）、银杏内酯 B（批号 110863-201508）、银杏内酯 C（批号 110864-201504）、白果内酯（批号 110865-201504）对照品均购自中国食品药品检定研究院；银杏叶片（扬子江药业集团有限公司，规格 40 mg/片，批号分别为 15091301、15091306、15070801），水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇（A）-10 mmol 乙酸铵水溶液（B），梯度洗脱：0~20 min，30%~50% A，70%~50% B；柱温：30℃；体积流量：1 mL/min；进样量：10 μL。

2.2 质谱条件

采用离子阱（ESI）负离子模式进行检测，检测模式为母离子全扫描方式（Scan），并进行二次离子化扫描。雾化器压力 310.28 kPa，毛细管电压 3.5 kV，碰撞诱导解离电压 150 V，干燥气为 N₂，干燥器温度 350℃，干燥气流量 8.0 L/min。

2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取银杏内酯 A、B、C 和白果内酯对照品 10.06、10.02、5.00、10.16 mg，置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解，并稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度分别为 1.006、1.020、0.500、1.016 mg/mL 的混合对照品溶液，即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 取银杏叶片 20 片，除去包衣，精密称定后研细，取相当于银杏叶片 8 片的量，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，密塞，称定质量，超声处理 30 min，放冷，再称定质量，以甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过。精密量取续滤液 20 mL，回收甲醇，残渣加水 10 mL，置水浴中温热使溶散，加 2% 盐酸溶液 2 滴，用醋酸乙酯振摇提取 4 次（15、10、10、10 mL），合并提取液，用 5% 醋酸钠溶液 20 mL 洗涤，分取醋酸钠溶液，用醋酸乙酯 10 mL 洗涤。合并醋酸乙酯提取液，用水洗涤 2 次，每次 20 mL，合并水液，用醋酸乙酯 10 mL 洗涤，合并醋酸乙酯液，回收至干，残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，即得。

2.4 系统适应性试验

分别取混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μL，在上述色谱条件下进行分析，记录色谱图，见图 1。各组分均能分离完全，峰形良好，内源性物质无干扰。混合对照品溶液色谱图显示，白果内酯和银杏内酯 C、A、B 的保留时间分别 9.2、10.4、15.7、16.7 min。以保留时间和各离子的响应强度作为分析标准，该方法具有较强的专属性，有效避免了结构相似的内酯成分对检测指标测定的干扰。

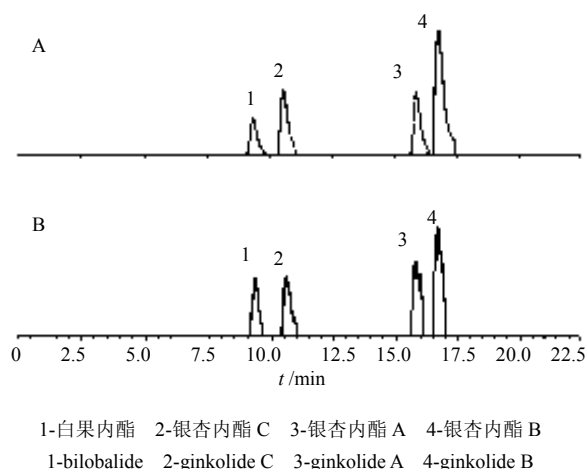


图 1 混合对照品 (A) 和银杏叶片 (B) 的 EIC 图谱
Fig. 1 EIC chromatograms of mixed reference substances (A) and Yinxingye Tablets (B)

2.5 线性关系考察

精密量取混合对照品溶液 5、10、15、20、25 μL 注入色谱仪中，按照上述色谱分离条件以及质谱特征记录色谱图，以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标绘制标准曲线。银杏内酯 A、B、C 和白果内

酯的回归方程分别为 $Y=3.2 \times 10^7 X-218\ 296$ ($r=0.999\ 0$)、 $Y=6.7 \times 10^7 X+4\ 367\ 617$ ($r=0.999\ 4$)、 $Y=5.7 \times 10^7 X+1\ 534\ 025$ ($r=0.999\ 7$)、 $Y=1.5 \times 10^7 X+818\ 841$ ($r=0.998\ 1$)。结果银杏内酯 A、B、C 和白果内酯在 0.100 6~2.012 0、0.102 0~2.040 0、0.050 0~1.000 0、0.101 6~2.032 0 mg/mL 显示良好的线性关系。

2.6 精密度实验

精密吸取含银杏内酯 A、B、C 和白果内酯分别为 0.100 6、0.102 0、0.050 0、0.101 6 mg/mL 混合对照品溶液，连续进样 5 次，记录峰面积，计算峰面积，结果 RSD 值分别为 1.79%、1.60%、1.71%、1.81%。

2.7 稳定性试验

取批号为 15070801 银杏叶片供试品溶液，分别在配制后 0、2、4、6、12、24 h 连续进样 5 次，测定峰面积。计算得银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的峰面积，RSD 值分别为 1.79%、1.81%、1.49%、2.13%，结果表明供试品溶液放置 24 h 稳定。

2.8 重复性试验

取批号为 15070801 银杏叶片 6 份，制备供试品溶液，进样 10 μ L，测定银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的峰面积，计算质量分数，结果其 RSD 值分别为 3.27%、2.39%、2.13%、2.33%。

2.9 回收率试验

精密量取批号 15070801 银杏叶片 6 份，精密加入含银杏内酯 A、B、C 和白果内酯 0.101 2、0.102 6、0.050 6、0.102 2 mg/mL 对照品溶液各 1ml，制备供试品溶液，进样测定，计算得银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的平均加样回收率分别为 97.1%、97.0%、98.2%、97.8%，RSD 值分别为 1.73%、1.68%、1.76%、1.83%。

2.10 样品测定

取批号分别为 15070801、15091301、15091306 银杏叶片样品，每批各两份，制备供试品溶液，按上述色谱条件进行操作，进样测定，采用标准曲线计算银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的质量分数，结果见表 1。

表 1 银杏叶片中银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的测定结果

Fig. 1 Determination of ginkgolide A, B, and C, and bilobalide from Yinxingye Tablets

批 号	质量分数/(mg·片 ⁻¹)				
	银杏内酯A	银杏内酯B	银杏内酯C	白果内酯	内酯总量
15070801	1.486	1.288	0.793	1.258	4.825
15091301	1.507	1.312	0.723	1.141	4.683
15091306	1.492	1.286	0.754	1.223	4.755

3 讨论

3.1 制备方法的选择

银杏叶提取物的制备方法有醇提法、水提-树脂法、醇提-树脂法。实验室中有采用其他有机溶剂或使用硫酸铵、醋酸铅等试剂的提取方法^[5]。查询相关文献报道^[6-7]，总结得到上述实验方法中的提取方法，并收到满意结果。

3.2 流动相的选择

文献中有许多关于利用高效液相色谱仪测定银杏叶提取物的实验，但是这些色谱条件基本都不适用于利用 LC-MS 测定银杏叶提取物中内酯类成分。本实验用乙腈-水作为流动相，但是乙腈对几个内酯的分离并不能得到很好的效果，故改为甲醇-水作为流动相。参考文献报道的色谱条件^[8-9]，加入少量缓冲盐乙酸铵，根据出峰时间的早晚以及各个内

酯间的相互分离效果，经过反复调整得到实验中的色谱条件。

3.3 检测器的选择

我国药典对于银杏叶片中萜类内酯含量采用多组分加和控制的方法，测定的方法主要为高效液相色谱结合蒸发光散射检测器检测银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的量，但是上述检测方法灵敏度不高、稳定性不佳，且银杏中萜类内酯的分子结构中没有强的生色团，紫外吸收很弱，容易受到其他成分的干扰从而增加测定难度，为此根据现有的仪器设备条件，本实验采用液相-质谱联用^[10-11]的方法、以离子阱 Scan 模式进行检测，且检测到的银杏内酯 A 的相对分子质量与实际计算得出和文献记载的相对分子质量有差别，为此实验对测定的样品进行了多级电离，结果相对分子质量参数分别为银杏内酯 A

467.4→407.0→351.5; 银杏内酯 B 423.3→367.0; 银杏内酯 C 439.3→383.0; 白果内酯 325.1→163.7, 与文献报道一致^[12]。

参考文献

- [1] 曹京梅. 银杏叶片的药理及临床应用研究概况 [J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(23): 3171-3172.
- [2] Dubber M J, Sewram V, Mshicileli N, *et al*. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization- mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37(4): 723-731.
- [3] 商 丹, 彭 飞, 赵艳芳. 银杏叶片临床应用研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(14): 1584-1585.
- [4] Mauri P, Palma A D, Pozzi F, *et al*. LC-MS characterization of terpene lactones in plasma of experimental animals treated with *Ginkgo biloba* extracts correlation with pharmacological activity [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(3): 763-768.
- [5] 张国芬, 凌立新. 银杏叶提取精制工艺研究 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(12): 41-44.
- [6] 秦 昉, 陶冠军, 王林祥. 液质联用方法测定微量银杏内酯 [J]. 无锡轻工业大学学报, 2003, 22(4): 80-82.
- [7] 昊 凯, 李 璐, 张庆伟. 银杏叶提取物注射液总黄酮苷含量测定方法的研究 [J]. 药品评价, 2010, 7(24): 11-16.
- [8] 马敬仪, 董金香. 银杏叶软胶囊中银杏黄酮醇苷和总萜类内酯含量测定 [J]. 医药导报, 2015, 34(10): 1370-1372.
- [9] 伍清龙, 孙永成, 万 琴, 等. HPLC-ELSD法测定注射用银杏二萜内酯 A、B、C、K [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 255-258.
- [10] 张 莉, 张丽萍, 孙成春. 液-质联用技术在重要研究中的应用 [J]. 解放军药科学学报, 2010, 26(6): 558-561.
- [11] 耿艳辉, 刘素彦, 贺广锋. 液相色谱与质谱联用技术在药物分析中的应用 [J]. 河北化工, 2012, 35(5): 27-29.
- [12] Xie J, Ding C, Ge Q, *et al*. Simultaneous determination of ginkgolides A, B, C and bilobalide in plasma by LC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic study of *Ginkgo biloba* extract in rats [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 864(1-2): 87-94.