

超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定不同银杏叶制剂中 13 个黄酮类成分

纪世彬¹, 刘万超², 赵万隆^{1*}, 朱峰¹, 潘琴¹

1. 上海市青浦食品药品检验所 检验室, 上海 201799

2. 上海市宝山区中西医结合医院 检验科, 上海 201900

摘要: **目的** 运用超高效液相色谱串联三重四极杆质谱 (HPLC-QQQ) 建立一种能够同时测定银杏叶制剂中 13 个黄酮类成分的分析方法。**方法** 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (50 mm×3.0 mm, 2.7 μm), 以 0.1% 甲酸溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 °C。在电喷雾离子化负离子模式下离子化, 以多反应监测方式 (MRM) 检测。**结果** 13 种黄酮类成分芦丁、异槲皮苷、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基 (1→2)-α-L-鼠李糖苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷、槲皮苷、芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素、茺花素的分离度良好, 在各自的质量浓度范围内的线性关系良好 ($r=0.999\ 0$), 且精密性试验、重复性试验的 RSD 值均小于 3.5%, 供试品溶液在 12 h 内稳定性好, 各成分的平均回收率在 94.5%~100.5%。不同批次样品之间, 总黄酮含量相差不大; 各批次的银杏黄酮类成分含量均不相同, 差异较大, 其中黄酮苷类化合物所占比例相对较大, 芦丁、水仙苷含量均较单糖 (异槲皮苷、槲皮苷) 含量高, 茺花素、木犀草素等黄酮苷元含量最低。**结论** 方法分离度好、操作简便、专属性强, 能够明确反映出银杏叶提取物中 13 个黄酮类成分的分布和差异, 可用于银杏叶提取物制剂的质量控制。

关键词: 银杏叶制剂; 黄酮类化合物; 芦丁; 异槲皮苷; 茺花素; 高效液相色谱-三重四极杆质谱

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)11-2137-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.11.005

Determination of thirteen flavonoids in Ginkgo leaves preparations by HPLC-QQQ

Ji Shi-bin¹, Liu Wan-chao², Zhao Wan-long¹, Zhu Feng¹, Pan Qin¹

1. Testing Laboratory, Shanghai Qingpu Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201799, China

2. Department of Laboratory Medicine, Shanghai Baoshan District Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Shanghai 201900, China

Abstract: Objective To establish an High Performance Liquid Chromatography - Triple Quadrupole Mass Spectrometry (HPLC-QQQ) method for determination of thirteen flavonoids in Ginkgo leaves preparations. **Methods** The separation was performed on an Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) with the mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution acetonitrile for gradient elution. The column temperature was set at 30 °C, and the flow rate was 0.3 mL/min. The flavonoids were detected by electrospray ionization mass spectrometry in negative mode with multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** Thirteen flavonoids, such as rutin, isoquercetin, quercetin-3-O-β-D-glucosyl (1→2)-α-L-rhamnoside, kaempferol-3-O-rutinoside, narcissus, quercetin, apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside, luteolin, quercetin, apigenin, kaempferol, isorhamnetin, and genkwanin had good resolution, and showed good linear relationships in their respective mass concentration ranges ($r=0.999\ 0$). The values of RSD of precision test and repeatability test were all less than 3.5%. The sample solution was stable within 12 h. The recoveries of thirteen flavonoids were within 94.5% — 100.5%. The contents of total flavonoids in Ginkgo leaves preparations from different batches had little difference, and it was quite different in different batches of samples. The proportion of flavonoid glycosides was relatively large. The contents of rutin and narcissus were higher than those of monosaccharides (isoquercitrin and quercitrin), while the contents of genkwanin and luteolin were the lowest. **Conclusion** The method has good separation, simple operation, and strong specificity. It

收稿日期: 2020-09-18

基金项目: 上海市宝山区科学技术委员会科技创新专项资金项目 (18-E-14)

作者简介: 纪世彬 (1984—), 男, 上海人, 主管药师, 本科, 研究方向为药物分析。E-mail: jishibin01@126.com

*通信作者 赵万隆, 副主任药师。E-mail: somebodyjob@163.com

can clearly reflect the distribution and difference of flavonoids in Ginkgo leaves preparations, and can be used for the quality control of Ginkgo leaves preparations.

Key words: Ginkgo leaves preparations; flavonoids; rutin; isoquercetin; genkwanin; HPLC-QQQ

银杏 *Ginkgo biloba* L. 为银杏科银杏属植物, 其中银杏叶提取物由其干燥叶经加工而成, 主要活性成分是黄酮类和萜类内酯类^[1], 具有扩张血管、抑制血小板活化因子、改善脑循环作用^[2-3]。近年来, 以银杏叶为原料开发的制剂被广泛应用于临床^[4-5], 然而市面上的银杏叶提取物及其制剂质量良莠不齐, 产品中的有效成分已经与银杏叶提取物相差甚远, 疗效也偏离了正常轨道^[6-9]。针对这一现象, 制定有效的银杏叶提取物质量控制方法非常有必要。国内外制药行业对于银杏叶提取物的质量控制主要以银杏萜内酯和银杏黄酮为依据^[10]。大多数的银杏黄酮类成分测定方法采用分光光度法、比色法、气相色谱法、高效液相色谱法等^[11-14]。采用分光光度法、比色法易受银杏叶提取物中其他成分影响, 干扰大, 且仅能够粗略测定总黄酮含量, 检测结果不准确^[15]; 由于黄酮类成分不易挥发, 因此需要衍生化后再进行气相色谱的检测分析, 操作繁琐; 高效液相色谱法因其操作简单, 灵敏度高, 准确度高, 成为最有效最广泛的测定其含量的方法^[16-17]。

三重四级杆质谱技术是新型的药物分析方法, 也是目前应用极其广泛的质谱技术^[18]。利用串联质谱技术可获得化合物更多的碎片信息, 采用多反应监测模式 (MRM) 可以有效地排除杂质干扰, 增强专属性、精确度和灵敏度, 并快速准确地进行分析, 是常用的定量检测方法, 定量重现性好^[19]。高效液相色谱与三重四级杆质谱的联用技术在中药成分分析上也是一大助力, 对样品前处理要求低, 能够对复杂基质样品进行有效分离, 随后实现高灵敏度高精度的定量分析^[20]。本研究探讨了银杏叶提取物制剂中黄酮类成分的定量方法, 应用超高效液相色谱联用串联三重四级杆质谱 (UPLC-QQQ) 技术, 采用多反应监测模式检测建立一种能够同时测定银杏叶提取物制剂中 13 个黄酮类成分简便、快速、准确、高灵敏度的定性定量分析方法, 为有效监控银杏叶制剂整体质量提供技术支撑。

1 仪器与试药

Agilent 1260 液相色谱仪、Agilent 6460 三重四级杆质谱仪 (美国 Agilent 公司); 电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

芦丁 (质量分数 90.5%, 批号 100080-200707)、异槲皮苷 (质量分数 97.2%, 批号 111809-201804)、槲皮素 (质量分数 96.5%, 批号 100081-200907)、山柰酚 (质量分数 93.8%, 批号 110861-201812)、异鼠李素 (质量分数 99.8%, 批号 110860-201611)、羌花素 (质量分数 94.9%, 批号 111899-201202)、芹菜素 (质量分数 99.2%, 批号 111901-201603)、木犀草素 (质量分数 99.6%, 批号 111520-201605)、槲皮苷 (批号 111538-200504)、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-鼠李糖苷 (质量分数 92.5%, 批号 112043-201901) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。山柰酚-3-O-芸香糖苷 (质量分数 99.8%, 批号 80940010)、水仙苷 (质量分数 99.4%, 批号 62950010)、芹菜素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 (质量分数 98.0%, 批号 11700010) 对照品均购自上海安谱实验科技股份有限公司。乙腈为色谱纯, 甲酸为色谱纯, 水为超纯水。

本实验收集了 10 批不同厂家生产的不同剂型的市售银杏叶提取物制剂, 见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (50 mm $\times$ 3.0 mm, 2.7 μ m), 以 0.1% 甲酸溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~8 min, 83% A; 8~9 min, 83% $\rightarrow$ 72% A; 9~16 min, 72% A; 16~16.01 min, 72% $\rightarrow$ 40% A; 16.01~18 min, 40% A; 18~18.01 min, 40% $\rightarrow$ 83% A), 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C。

2.2 质谱条件

电喷雾离子化 (ESI) 负离子模式; 喷雾压力 310 kPa; 雾化气体流量 10 L/min, 温度 350 $^{\circ}$ C; 毛细管电压 4 000 V。采用多反应监测 (MRM) 方式检测。各对照品的优化质谱离子参数见表 2。

2.3 溶液制备

2.3.1 供试品溶液的制备 取银杏叶提取物制剂各 10 片 (粒), 精密称定, 研细, 混匀, 取约 1 片 (粒) 量, 置 100 mL 锥形瓶中, 加入甲醇 50 mL, 超声提取 10 min, 静置, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

表 1 样品来源

Table 1 Origins of 10 samples

编号	品名	厂商	规格	批号
1	银杏叶片	上海上药杏灵科技药业股份有限公司	每片含总黄酮 14.08~21.12 mg, 总黄酮醇苷 ≥ 9.6 mg, 萜类内酯 ≥ 2.4 mg	180502
2	银杏叶片	烟台荣昌制药股份有限公司	每片含总黄酮醇苷 19.2 mg, 萜类内酯 4.8 mg	180817
3	银杏叶软胶囊	石家庄市华新药业有限责任公司	每片含银杏叶提取物 40 mg, 含总黄酮醇苷 9.6 mg, 萜类内酯 2.4 mg	502180802
4	银杏叶分散片	江苏晨牌药业集团股份有限公司	每片含总黄酮醇苷 19.2 mg, 萜类内酯 4.8 mg	1903091
5	银杏叶片	扬子江药业集团有限公司	每片含总黄酮醇苷 9.6 mg, 萜类内酯 2.4 mg	19040322
6	银杏叶片	扬子江药业集团有限公司	每片含总黄酮醇苷 9.6 mg, 萜类内酯 2.4 mg	19011121
7	银杏叶片	扬子江药业集团有限公司	每片含总黄酮醇苷 9.6 mg, 萜类内酯 2.4 mg	19031921
8	银杏叶片	浙江康恩贝制药股份有限公司	每片含总黄酮醇苷 19.2 mg, 萜类内酯 4.8 mg	190105
9	银杏叶提取物片	德国威玛舒培博士药厂	每片含银杏叶提取物 40 mg, 其中银杏黄酮苷 9.6 mg, 萜类内酯 2.4 mg	4700818
10	银杏叶片	江苏晨牌药业集团股份有限公司	每片含总黄酮醇苷 19.2 mg, 萜类内酯 4.8 mg	181119

表 2 被测样品离子优化参数

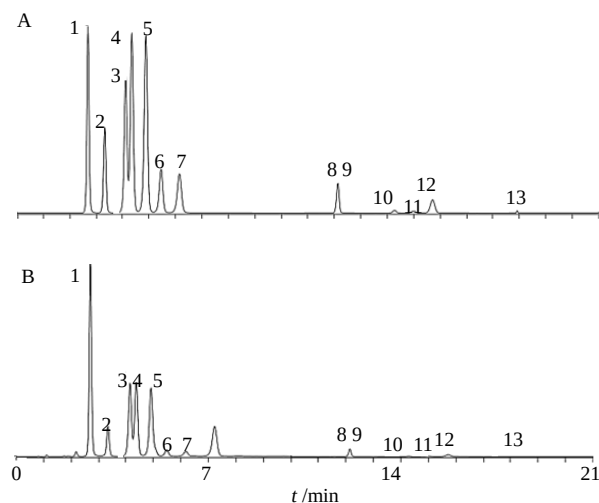
Table 2 MS parameters of samples

成分	母离子 m/z	碎裂电压/V	子离子(碰撞能量 eV)/定量离子(定性离子)
芦丁	609	220	300 (40) /271 (65)
异槲皮苷	463	170	300 (25) /271 (55)
槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基(1→2)-α-L-鼠李糖苷	609	215	300 (40) /271 (70)
山柰酚-3-O-芸香糖苷	593	220	285 (35) /255 (65)
水仙苷	623	240	315 (30) /300 (50)
槲皮苷	447	170	300 (25) /271 (45)
芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	431	180	268 (35) /239 (55)
木犀草素	285	175	133 (35) /107 (30)
槲皮素	301	125	151 (25) /179 (15)
芹菜素	269	150	117 (35) /149 (20)
山柰酚	285	175	93 (40) /117 (48)
异鼠李素	315	150	300 (20) /151 (25)
芫花素	283	150	268 (40) /117 (25)

2.3.2 对照品溶液的制备 将各对照品干燥至恒定质量,再精密称取各对照品适量,置于量瓶中,加甲醇制成混合对照品贮备液,即得。其中芦丁、异槲皮苷、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基(1→2)-α-L-鼠李糖苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷、槲皮苷、芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素、芫花素质量浓度分别为 17.92、13.72、13.21、30.50、30.38、9.80、10.31、1.02、10.65、0.98、9.53、2.08、0.40 mg/L。

2.4 系统适应性试验

精密吸取批号 19040322 银杏叶片供试品溶液和混合对照品溶液,按照以上的测定条件进样测定,总离子流图见图 1。结果显示,13 种成分的色谱峰峰形对称,相互无干扰,能达到有效分离,分离度均大于 1.5。供试品溶液、混合对照品溶液各成分离子流色谱峰保留时间相对应,能够很好地鉴定检测出供试品中各黄酮类成分,表明该方法专属性较好。



1-芦丁 2-异槲皮苷 3-槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基 (1→2)-α-L-鼠李糖苷 4-山柰酚-3-O-芸香糖苷 5-水仙苷 6-槲皮苷 7-芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 8-木犀草素 9-槲皮素 10-芹菜素 11-山柰酚 12-异鼠李素 13-芫花素
1-rutin 2-isoquercetin 3-quercetin-3-O-β-D-glucosyl (1→2)-α-L-rhamnoside 4-kaempferol-3-O-rutinoside 5-narcissus 6-quercetin 7-apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside 8-luteolin 9-quercetin 10-apigenin 11-kaempferol 12-isorhamnetin 13-genkwanin

图 1 混合对照品 (A) 和银杏叶片 (B) 的总离子流图
Fig. 1 TIC of mixed reference substances (A) and Ginkgo leaves Tablets (B)

2.5 线性关系考察

精密吸取混合对照品贮备液,用甲醇稀释 2、4、10、20、50 倍作为系列质量浓度对照品混合溶液。依次进样测定,记录峰面积,并做线性回归分析,计算各相关系数,见表 3。

2.6 检测限、定量限考察

取标准曲线浓度梯度第一点溶液,按比例稀释,连续进样测定 6 次,记录色谱图。根据峰高以信噪比 S/N 为 10 时确定定量限 (LOQ);当信噪比 S/N 为 3 时确定检测线限 (LOD)。结果见表 3。

2.7 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液适量,分别在 1 d 内重复进样 6 次和连续 3 d 重复进样 6 次,测定峰面积值,计算 RSD 值。结果芦丁、异槲皮苷、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基 (1→2)-α-L-鼠李糖苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷、槲皮苷、芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素、芫花素峰面积的日内 RSD 值分别为 0.4%、0.6%、0.7%、0.7%、0.2%、1.0%、0.5%、2.2%、1.6%、2.1%、2.2%、0.5%、2.2%,日间 RSD 值分别为 0.5%、0.6%、1.0%、0.8%、0.3%、1.0%、1.0%、2.1%、1.6%、2.2%、2.2%、0.6%、2.3%。

表 3 13 种成分的标准曲线、线性范围、检测限和定量限

Table 3 Standard curves, linear ranges of substance, LOD, and LOQ of 13 components

成分	线性方程	线性范围/(μg·L ⁻¹)	r	LQD/(μg·L ⁻¹)	LOD/(μg·L ⁻¹)
芦丁	$Y=4\,588.450\,817\,X-604.130\,517$	0.36~17.92	0.999 0	3.75	1.25
异槲皮苷	$Y=3\,120.458\,652\,X-79.601\,673$	0.27~13.72	0.999 0	4.23	1.41
槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基(1→2)-α-L-鼠李糖苷	$Y=5\,838.973\,073\,X-884.277\,790$	0.26~13.21	0.999 0	5.20	1.68
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$Y=3\,679.714\,659\,X+59.362\,533$	0.61~30.50	0.999 0	5.49	1.66
水仙苷	$Y=4\,231.449\,240\,X-3.673\,333$	0.61~30.38	0.999 0	6.49	2.03
槲皮苷	$Y=3\,173.211\,368\,X-94.148\,887$	0.20~9.80	0.999 0	9.52	3.40
芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	$Y=4\,207.139\,875\,X+560.439\,063$	0.21~10.31	0.999 0	2.92	0.97
木犀草素	$Y=2\,404.386\,938\,X+34.494\,166$	0.02~1.02	0.999 0	1.67	0.54
槲皮素	$Y=1\,267.275\,092\,X+196.962\,056$	0.21~10.65	0.999 0	5.25	1.69
芹菜素	$Y=2\,315.944\,421\,X-2.271\,157$	0.02~0.98	0.999 0	2.22	0.69
山柰酚	$Y=127.322\,586\,X+16.561\,504$	0.19~9.53	0.999 0	9.50	2.88
异鼠李素	$Y=7\,354.746\,772\,X+53.438\,738$	0.04~2.08	0.999 0	2.11	0.73
芫花素	$Y=1\,888.637\,637\,X-1.816\,729$	0.008~0.40	0.999 0	1.14	0.35

2.8 重复性试验

取批号 19040322 银杏叶片 6 份, 制备供试品溶液, 进样分析。以外标法计算得样品中芦丁、异槲皮苷、槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 2)- α -*L*-鼠李糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、水仙苷、槲皮苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素、芫花素的平均质量分数分别为 3.661、0.944、1.483、2.484、2.352、0.271、0.226、0.027、0.441、0.023、0.235、0.056、0.002 mg/g, RSD 值分别为 0.6%、0.8%、1.2%、1.0%、0.6%、1.5%、1.2%、2.2%、1.9%、2.9%、2.2%、2.6%、3.5%。

2.9 稳定性试验

取批号 19040322 银杏叶片制备的供试品溶液, 于室温下放置 0、2、4、8、12 h, 进样测定, 记录峰面积, 计算得芦丁、异槲皮苷、槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 2)- α -*L*-鼠李糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、水仙苷、槲皮苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素、芫花素峰面积的 RSD 值分别为 0.7%、1.3%、1.0%、0.3%、0.3%、0.7%、1.0%、2.2%、2.0%、

1.3%、2.5%、0.3%、2.0%, 表明在室温下供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.10 回收率试验

精密称取批号 19040322 银杏叶片样品细粉 6 份, 约相当于半片量, 分别精密吸取混合对照品贮备液 1、5、12.5 mL 加入, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积并计算各黄酮类化合物的加样回收率, 结果芦丁、异槲皮苷、槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 2)- α -*L*-鼠李糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、水仙苷、槲皮苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素、芫花素平均回收率分别为 97.73%、97.30%、96.60%、94.50%、96.77%、100.53%、95.73%、98.37%、98.53%、97.13%、96.73%、96.27%、96.67%, RSD 值分别为 3.97%、2.63%、2.87%、1.93%、2.10%、2.93%、2.13%、2.57%、3.77%、4.07%、2.97%、2.73%、3.43%。

2.11 样品测定

取 10 批不同厂家生产的不同剂型银杏叶提取物制剂, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 按外标法计算含量。结果见表 4。可以看出, 在各

表 4 不同厂家银杏提取物制剂中 13 个黄酮成分测定结果 ($n=6$)

Table 4 Determination of thirteen flavonoids in Ginkgo leaves preparations from different manufacturers ($n=6$)

成分	质量分数/(mg g ⁻¹)									
	编号 1	编号 2	编号 3	编号 4	编号 5	编号 6	编号 7	编号 8	编号 9	编号 10
芦丁	3.131	1.949	1.210	2.074	3.661	2.410	2.899	2.654	3.658	3.699
异槲皮苷	0.745	0.432	0.356	0.503	0.941	0.580	0.787	0.642	0.927	0.956
槲皮素-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- α - <i>L</i> -鼠李糖苷	1.194	0.609	0.553	0.851	1.476	0.818	0.912	1.023	1.457	1.487
山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	2.039	1.836	1.131	1.312	2.481	1.793	2.419	1.856	2.520	2.507
水仙苷	2.164	1.969	1.040	1.256	2.345	1.862	2.135	1.786	2.335	2.354
槲皮苷	0.204	0.131	0.093	0.178	0.275	0.165	0.118	0.193	0.263	0.277
芹菜素-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	0.211	0.095	0.101	0.137	0.222	0.160	0.096	0.148	0.217	0.230
木犀草素	0.015	0.017	0.007	0.009	0.020	0.009	0.015	0.019	0.020	0.020
槲皮素	0.107	0.091	0.073	0.263	0.449	0.040	0.201	0.242	0.311	0.427
芹菜素	0.018	0.015	0.008	0.012	0.020	0.007	0.016	0.016	0.020	0.019
山柰酚	0.044	0.054	0.055	0.136	0.226	0.010	0.173	0.135	0.179	0.198
异鼠李素	0.017	0.022	0.013	0.042	0.054	0.007	0.044	0.031	0.035	0.051
芫花素	0.008	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002
总黄酮	9.900	7.200	4.600	6.800	12.200	7.900	9.800	8.700	11.900	12.200

样品中均能很好地检测出 13 种黄酮类化合物、总黄酮含量；不同批次样品之间，总黄酮含量相差不大，其中质量分数最高为 12.2 mg/g；各批次的银杏黄酮类成分含量均不相同，差异较大，其中黄酮苷类化合物所占比例相对较大，芦丁、水仙苷含量均较单糖（异槲皮苷、槲皮苷）含量高，芫花素、木犀草素等黄酮苷元含量最低。这种差异也能够明确地反映出药材样品质量优劣。这也进一步说明，在以银杏黄酮作为银杏叶提取物质量控制时，直接测定银杏黄酮原型非常有必要，通过测定各黄酮类化合物的含量、分布情况能够有效监控银杏叶提取物制剂的整体质量。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法优化

在供试品溶液的制备方法上，本实验采用单因素优化法分别考察了提取方法、提取溶剂、提取时间、提取样品量。提取方法上考察了超声法、回流法，最终发现超声法提取效果较好，方便快捷，因此选择超声法提取。提取溶剂上，综合比较了 50% 甲醇、70% 甲醇、100% 甲醇，通过测定总黄酮含量比较得 100% 甲醇较 70%、50% 甲醇可获得更高的提取效率。此外还优化了超声时间，分别比较了超声 5、10、20、30 min 的银杏叶制剂提取液，发现超声 10 min 时待测成分已经完全溶出。在考察提取溶剂用量时发现供试品取 1 片（粒）加甲醇 50 mL 超声提取得到的样品浓度比较合适，而取样量过小会增加误差，取样量加大则会造成溶剂的不必要的浪费。因此本实验的最终方法优化为取样品粉末（内容物）1 片（粒）量，加 100% 甲醇 50 mL 超声 10 min 提取得到供试品溶液。

3.2 流动相的选择

本实验采用甲醇 - 0.1% 甲酸溶液、乙腈 - 0.1% 甲酸溶液按不同比例进行等度洗脱、梯度洗脱，比较后发现乙腈 - 0.1% 磷酸溶液梯度洗脱时，各色谱峰峰形保持良好，分离度均大于 1.5，并且空白样品色谱中无干扰峰的出现，因此最终选定乙腈 - 0.1% 磷酸溶液作为流动相，梯度洗脱。

本研究中选择了 13 个黄酮类成分芦丁、异槲皮苷、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基（1→2）-α-L-鼠李糖苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷、槲皮苷、芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素、芫花素作为质量控制指标来评价银杏叶提取物。建立了一种超高效液相

色谱联用三重四级杆质谱法测定不同银杏黄酮化合物中 13 种黄酮类成分的方法，该方法能够同时对银杏叶制剂中的 13 种黄酮类化合物进行检测分析，方法学考察良好，并且能够对银杏叶提取物进行有效、全面的质量评价，也避免了现行检验方法中酸水解后测定总黄酮含量的弊端，为有效监控银杏叶提取物整体质量提供技术支持。

参考文献

- [1] 刘磊, 卫昊, 陈丹丹, 等. 银杏叶提取物调控 TLR4/NF-κB 通路减轻急性脑缺血小鼠脑皮质缺血研究 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5282-5288.
- [2] Singh B, Kaur P, Singh G R D, et al. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba* [J]. *Fitoterapia*, 2008, 79(6): 401-418.
- [3] 张鹏飞, 廖丽君, 邓祯, 等. 银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(2): 426-429.
- [4] 曹俊峰. 银杏叶注射液治疗急性脑梗死的观察 [J]. 河南医学高等专科学校学报, 2020, 32(1): 19-21.
- [5] 张立虎, 吴婷婷, 赵林果, 等. 银杏叶提取物中黄酮类化合物抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(6): 444-449.
- [6] 何厚洪, 杜昕, 金辉辉, 等. 银杏叶提取物 HPLC 指纹图谱研究及共有峰的 LC-MS 鉴定 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 1107-1112.
- [7] 钟媛媛, 王京辉, 陈晶, 等. 银杏叶口服多剂型指纹图谱及黄酮成分质量评价研究 [J]. 中国医药导刊, 2016, 18(12): 1284-1286.
- [8] 李丽敏, 程益清, 孙健, 等. 银杏叶提取物及其制剂指纹图谱和掺伪检验方法的建立 [J]. 中成药, 2016, 38(7): 1551-1556.
- [9] 刘颖, 宋彬彬, 付龙, 等. 银杏叶提取物中掺伪标志物槐角苷检查方法的研究 [J]. 中国药品标准, 2016, 17(4): 257-263.
- [10] 陆莉娟, 石晶萍, 洪丽萍. 一种掺伪银杏叶提取物的初步分析鉴定 [J]. 中国合理用药探索, 2017, 14(6): 53-56.
- [11] 王亚, 杨清山, 徐猛, 等. 银杏叶及其提取物中银杏黄酮的 HPLC 测定方法研究 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(9): 135-141.
- [12] 张震, 毛艳华. 高效液相色谱法在银杏叶提取物检验中的应用 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2019, 29(14): 54-55.
- [13] 田紫平, 喻微, 何贵州, 等. HPLC 测定银杏叶中总银杏酸的含量 [J]. 微量元素与健康研究, 2015, 32(2): 36-37.
- [14] Li W, Fitzloff J. HPLC determination of flavonoids and

- terpene lactones in commercial *Ginkgo biloba* products [J]. *J Liquid Chromatogr Related Tech*, 2002, 25(16): 2501-2514.
- [15] 秦 燕, 何新英, 庄慧娣, 等. HPLC 测定银杏提取物中主要黄酮和萜内酯含量的优化方法 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2003, 23(3): 234-236.
- [16] 祝连彩, 王伯初, 刘火安, 等. 高效液相色谱法测定银杏叶提取物中黄酮含量 [J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2006, 29(1): 117-119.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 附录 1491-1494.
- [18] 柏 慧, 张仁慈, 王曦烨, 等. 三重四级杆质谱技术在中药研究中的应用进展 [J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2018, 33(3): 208-212.
- [19] Wei X, Shi X, Kim S, *et al*. Data dependent peak model based spectrum deconvolution for analysis of high resolution LC-MS data [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(4): 2156-2165.
- [20] 汪 曦, 刘海培, 孙传强, 等. 液相色谱-三重四极杆质谱定量分析算法 [J]. 天津大学学报, 2020, 53(6): 617-625.