

· 药剂与工艺 ·

银杏叶中银杏萜内酯的 GC-MS定性定量分析

唐红芳¹, 郑自强², 朱晓雨², 毛丽珍^{1*}

(1. 浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013; 2. 浙江出入境检验检疫局, 浙江 杭州 310012)

摘要: 目的 建立银杏叶中银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的定性定量分析方法。方法 银杏叶以 20% 乙醇超声提取, 乙酸乙酯萃取, 再经酸性氧化铝-活性炭-硅藻土混合柱层析, 在 100℃ 以双-三甲基硅烷三氟乙酰胺硅烷化 60 min 后, 用 HP-5 MS 毛细管色谱柱, 柱温从 180℃ 程序升温至 300℃。采用选择离子监测 (SIM) 方式, 以峰值最高的碎片离子作为监视离子进行定量分析。结果 银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的保留时间分别为 13.7、14.3、15.3 和 6.8 min, 特征 (监视) 离子 (m/z) 分别为 537、625、713 及 455 (299); 平均回收率分别为 102.0%、99.4%、96.0% 和 96.3%, RSD 分别为 0.54%、2.40%、1.98% 和 2.43%。结论 本方法操作简便、重现性好、专属性强、准确可靠, 可作为银杏萜内酯的定性定量分析方法。

关键词: 银杏叶; 银杏萜内酯; 银杏内酯 A、B、C; 白果内酯; 气相色谱-质谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)03-0214-04

Quality and quantity analysis of terpene lactones from *Ginkgo biloba* leaves by GC-MS

TANG Hong-fang¹, ZHENG Zi-qiang², ZHU Xiao-yu², MAO Li-zhen¹

(1. Zhejiang Academy of Medical Science, Hangzhou 310013, China; 2. Zhejiang Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310012, China)

Abstract **Object** To develop a capillary GC-MS analytical method for identification and determination of ginkgolide A, B, C and bilobalide (GA, GB, GC and BB) in *Ginkgo biloba* L. leaves. **Methods** The leave samples were extracted in ultrasonic bath with ethanol-water (20:80). The extract was purified by liquid-liquid extraction with ethyl acetate followed by solid-phase extraction on a column mixed with acid Al_2O_3 , active carbon and celite. The terpenes were trimethylsilylated by BSTFA (with 1% TM-CS) for 60 min at 100℃ and determined by GC-MS with HP-5 MS capillary column in the selected-ion monitoring mode. The intense fragment ions were chosen as monitoring ions for quantitative analysis. Cholesterol was used as an internal standard. Column temperature gradient: initial temperature 180℃, maintained 1 min, and then increased at 20℃/min to 260℃, and finally at 2℃/min up to 300℃, maintained 2 min. **Results** The retention times of GA, GB, GC and BB were 13.7, 14.3, 15.3 and 6.8 min, the major fragmentation ions (monitoring) were at m/z 537, 625, 713 and 455 (299), the average recoveries of GA, GB, GC and BB were 102.0%, 99.4%, 96.0%, 96.3%, RSD were 0.54%, 2.40%, 1.98% and 2.43%, respectively. **Conclusion** This method is repeatable, specific, accurate and easy to operate. It is adoptable for quality and quantity analysis of terpene lactones from *G. biloba* leaves.

Key words the leaves of *Ginkgo biloba* L.; terpene lactones; ginkgolide A, B, C; bilobalide; GC-MS

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶, 其提取物及制剂是防治心脑血管系统疾病的热点品种。其所含萜内酯成分 (包括银杏内酯 A、B、C 和白果内酯, 简称为 GA、GB、GC 和 BB) 对血小板活化因子具显著的拮抗作用, 是发挥药效的主要活性成分^[1]。萜内酯因无紫外吸收, 故无法用 HPLC-UV 法测定。目前文献报道的测定方法有 HPLC-RI^[2], GC-FID^[3], GC-MS^[4] 及 SFC-ELSD^[5]

等。但这些方法大多集中在银杏叶提取物及制剂的测定上, 其中 GC-MS 法仅用于定性, 定量回收率低。而对萜内酯含量低、基体干扰大的银杏叶药材的直接测定报道甚少, 采用 GC-MS 法测定未见报道。本实验通过对样品预处理采用新的纯化方法, 萜内酯硅烷化及 GC-MS 分析条件的优化试验, 建立了回收率高、重现性好、专属性强的银杏叶的定性定量分析方法。

* 收稿日期: 2002-06-27

基金项目: 浙江省中医药管理局青年科研基金 (1999 年) 资助项目; 浙江省分析测试基金资助项目 (00021)

1 仪器与材料

HP 6890 GC-5973 M SD 色质联用仪; HP 7673 自动进样器; HP-5 MS 石英熔融毛细管色谱柱 (30 m× 0.25 mm, 0.25 μm); 玻璃色谱柱 (8 mm× 90 mm)。

GA, GC, BB 由中国药品生物制品检定所提供; GB 胆甾醇和双三甲基硅烷三氟乙酰胺 (BSTFA, 含 1% TMCS) 由 Sigma 公司提供; 酸性氧化铝 (层析用, 100~200 目); 活性炭 (化学纯); 硅藻土 (上海化学试剂公司, 进口分装); 乙酸乙酯、二甲基甲酰胺 (DMF) 等试剂均为分析纯。

银杏叶 (1) 采自浙江临安昌化 (1998 年 10 月), 银杏叶 (2) 采自浙江杭州 (2000 年 9 月) 70℃ 烘干 3 h, 粉碎后备用。

2 GC-MS 条件

载气: 氦气 (1 mL/min); 分流比: 25: 1; 进样口温度: 250℃; 柱温: 初始温度 180℃, 保持 1 min, 以 20℃/min 速率升温至 260℃, 再以 2℃/min 升温至 300℃, 保持 2 min; 气质接口温度: 280℃; 电离方式: EI 电子能量: 70 eV; 质量分析器: 四极杆; 质量扫描范围: 50~800 amu; 定量方式: 选择离子监测 (SIM)。

3 方法与结果

3.1 对照品溶液的制备: 取 GA, GB, GC 及 BB 对照品适量 (5~10 mg), 精密称定后置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 制成银杏萜内酯的混合对照品溶液。

3.2 标准曲线的制备: 精密吸取混合对照品溶液 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL 置于 5 mL 离心管中, 各加胆甾醇内标溶液 0.5 mL (100 μg/mL), 在 60℃ 水浴, N₂ 气流下将样液吹干, 用 0.2 mL DMF 溶解残渣, 加 BSTFA 0.2 mL, 混匀, 密闭, 于 100℃ 下硅烷化反应 60 min 取出, 冷却至室温后, 用 DMF 定容至 1.0 mL, 混匀。用自动进样器进样 2 μL, 以各银杏萜内酯衍生物的特征离子质量色谱峰面积与内标衍生物特征离子质量色谱峰面积比对浓度回归, GA, GB, GC 和 BB 的回归方程分别为 $Y_1 = 0.0046X_1 + 0.0774$, $Y_2 = 0.0792X_2 + 0.0477$, $Y_3 = 0.0908X_3 + 0.0205$, $Y_4 = 0.0894X_4 + 0.1$; r 值分别为 1.000, 0.9998, 0.9997, 1.000; 线性范围分别为 21.4~428, 10.0~200, 15.6~312, 10.0~200 ng。

3.3 样品的预处理: 取银杏叶粉末 2 g (准确至 0.001 g), 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加 20% 乙醇溶

液 20 mL, 在 50℃~60℃ 热水浴中超声波处理 15 min 后, 再加水 20 mL, 继续超声 5 min, 冷却后移入 100 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀。将部分样液转入 50 mL 离心管中, 2000 r/min 离心 10 min 吸取 20 mL 上清液于 125 mL 分液漏斗中, 加入 1 g 氯化钠, 振摇溶解, 然后用乙酸乙酯萃取 3 次 (30, 20, 20 mL), 合并乙酸乙酯相, 在旋转蒸发器上蒸干。残渣用少量甲醇溶解后, 移入装有 2 g 混合填料 (硅藻土-酸性氧化铝-活性炭 = 1: 0.8: 0.2) 的色谱柱中 (已用 20 mL 甲醇预淋洗), 用 25 mL 甲醇洗脱, 控制洗脱速度为 1 mL/min, 收集全部洗脱液, 蒸干, 稍冷, 准确加入胆甾醇内标溶液 2 mL 溶解残渣。取 0.5 mL 样液于 5 mL 离心管中, 按 3.2 项下方法进行硅烷化反应。冷却至室温后, 用 DMF 定容至 1.0 mL, 混匀。

3.4 GC-MS 分析: 将对照品和样品用自动进样器进样 2 μL, 记录银杏萜内酯的混合对照品、银杏叶样品的总离子流色谱图和质谱图, 见图 1~3 根据各内酯衍生物的主要特征离子质量及质量色谱峰的保留时间进行定性分析; 将各内酯衍生物与内标衍生物峰面积之比值代入各自对照品溶液的回归方程, 计算各个银杏萜内酯含量。

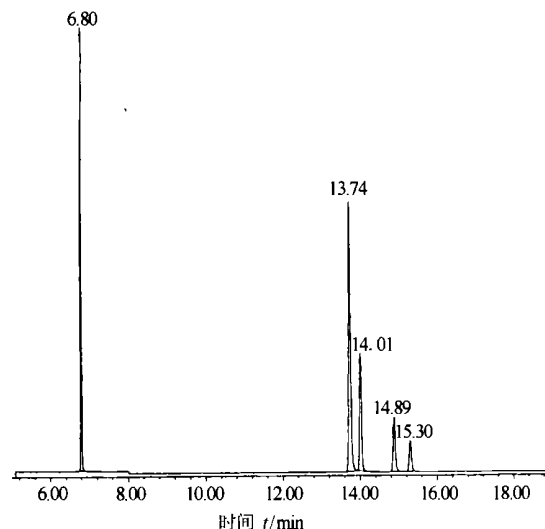


图 1 混合对照品中银杏萜内酯衍生物的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of terpene lactone derivatives in mixed reference substances

3.5 方法学考察

3.5.1 精密度测定: 取硅烷化后的混合对照品溶液, 连续自动进样 8 次, 计算各萜内酯衍生物与内标峰面积比, GA, GB, GC 和 BB 的 RSD 分别为 0.79%, 1.17%, 1.49% 和 0.94%。

3.5.2 稳定性试验: 将硅烷化后的混合对照品溶液

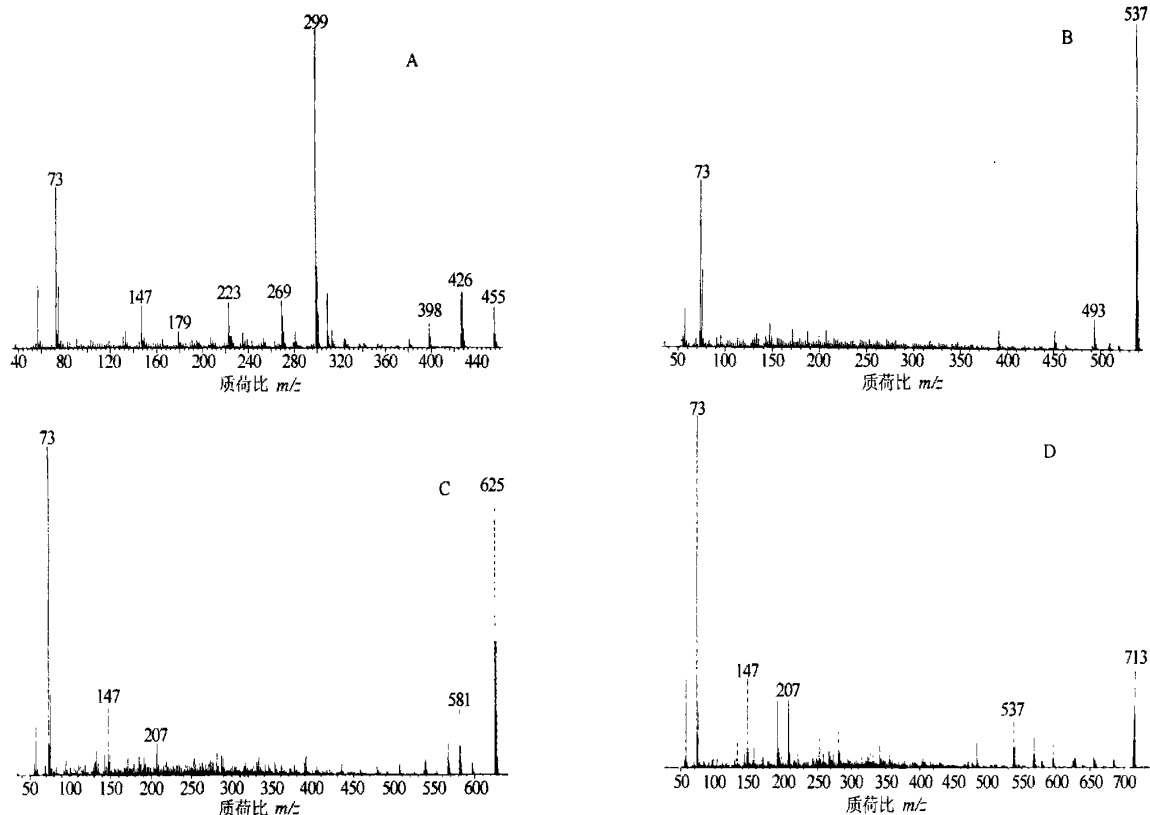


图 2 白果内酯 (A), 银杏内酯 A (B), B (C), C (D) 衍生物的质谱图

Fig. 2 Mass spectrum of bilobalide (A), ginkgolide A (B), B (C), C (D) derivatives

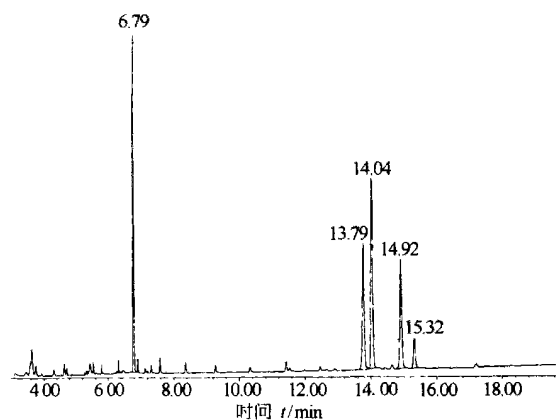


图 3 银杏叶样品中银杏萜内酯衍生物的总离子流色谱图

Fig. 3 Total ion chromatogram of terpene lactone derivatives in samples of *G. biloba* leaves

和样品溶液每隔 24 h 测定一次,连续测定 4 次,对照品溶液中 GA, GB, GC 和 BB 各衍生物与内标峰面积比值的 *RSD* 分别为 2.5%, 1.4%, 1.7%, 2.5%; 样品溶液中相应的 *RSD* 则分别为 2.6%, 0.81%, 0.66%, 4.3%。实验结果表明样品溶液与对照品溶液在 4 d 内仍然较稳定。文献报道^[4], 经硅烷化后的对照品溶液在 4 d 内较为稳定, 而样品溶液只能放置 1 d。究其原因, 可能是由于本实验所用样

品的净化程度较高, 因而反应更为彻底, 衍生化产物稳定性好。

3.5.3 回收率测定: 取银杏萜内酯的混合对照品溶液适量, 于 N_2 气流下挥去甲醇, 加入已测定含量的银杏叶粉末样品 2 g, 平行 6 份, 按实验方法操作和测定, 结果 GA, GB, GC 和 BB 的平均回收率为 102%, 99.4%, 96.0% 和 96.3%; *RSD* 分别为 0.54%, 2.40%, 1.98% 和 2.43%。

3.5.4 重现性考察: 同一银杏叶 (1) 样品按实验方法制备 6 份测定, GA, GB, GC 和 BB 含量测定结果的 *RSD* 分别为 4.2%, 1.7%, 3.0% 和 2.0%。

3.6 样品分析结果: 取样品银杏叶 (1) 和银杏叶 (2), 按上述选定的实验方法提取、纯化、测定, 结果银杏叶 (1) GA, GB, GC, BB 的含量分别为 212.1, 114.7, 114.5, 233.3 $\mu\text{g/g}$ ($n=6$); 银杏叶 (2) GA, GB, GC, BB 的含量分别为 485.8, 161.6, 110.4 和 212.6 $\mu\text{g/g}$ ($n=2$)。测定结果提示, 各银杏萜内酯的比例在不同地区所产银杏叶中有一定差异, 在原料选择和工艺制备中须引起重视。

4 讨论

4.1 GC-MS 的定性定量方式的确定: 银杏内酯 A,

B, C含 3个内酯环, 2个戊烷环, 其差异主要是在 2个戊烷环上羟基的数目和位置不同, 其相对分子质量分别为 408, 424, 440; 白果内酯除 3个内酯环外, 只含 1个带羟基的戊烷环, 相对分子质量为 326。戊烷环上的活性 - OH被硅烷化试剂中 - OSi(CH₃)₃所取代转变为易挥发的硅醚衍生物。每取代一个 - OH, 相对分子质量就增加 72。由各个萜内酯衍生物相应的质谱图可见, 峰值最高的碎片离子 m/z 537, 625, 713和 455(次高)正是 GA, GB, GC和 BB的硅醚分子离子丢失一个 - CH₃ 碎片即 [M - CH₃]⁺所产生的特征离子, 结合在总离子流色谱图相应质谱峰的保留时间, 从而进行定性分析。

为提高方法的选择性和灵敏度, 本实验采用选择离子监测 (SIM) 方式进行定量分析。由于白果内酯的 [M - CH₃]⁺ 的 m/z 455碎片离子峰值较低, 而其另一特征离子 m/z 299具有更高的峰值。因此最终选定 m/z 299, 其余皆以 [M - CH₃]⁺ 特征离子分别作白果内酯、银杏内酯 A, B, C的监视定量离子。

曾试验了结构相似的几种甾体化合物, 如孕二醇、雌二醇、睾丸素、黄体酮、炔诺酮、胆甾醇等用作内标。结果表明胆甾醇的出峰保留时间 t_R 在 14.01 min处, 位于银杏内酯 A, B之间, 并与之达到良好的基线分离。因此选择胆甾醇为内标物质, 其监视离子 m/z 为 458。

4.2 硅烷化反应条件的优化: 试验了 *N*-甲基-*N*-三甲基硅烷三氟乙酰胺、双-三甲基硅烷三氟乙酰胺 (BSTFA, 含 1% TMCS)、*N*, *O*-对双-三甲基硅烷乙酰胺 (BSA) 3种硅烷化试剂, BSTFA的衍生化效果最好, 生成的内酯衍生物最为稳定, 更适于定量分析。

对应所测试的萜内酯浓度上限, BSTFA用量以 0.1, 0.2, 0.3 mL进行了试验, 结果 0.2 mL BSTFA可保证反应完全。另外还对硅烷化反应时间在 30~120 min, 反应温度在 60℃~120℃进行了试验。结果表明, 选择硅烷化反应时间为 60 min, 硅烷化温度为 100℃, 各个萜内酯衍生物的峰面积基本不变, 说明反应已经完全。

4.3 样品的预处理方法选择: 实验发现, 单独用有机溶剂提取效果较差; 以 20%~40% 乙醇水溶液及 50% 丙酮水溶液抽提, 所得样液中银杏萜内酯的含量较高。本实验选用 20% 乙醇水溶液, 使脂溶性成分较少提出, 省略了脱脂步骤; 提取液加水稀释后,

乙醇含量仅为 4%, 不需除去有机溶剂^[6], 简化了实验步骤。另外比较了索氏抽提、热回流、热水超声及高速均质 4种提取方法, 实验表明后两种方法的提取效率较高, 但以超声波法提取的样液杂质较少, 方法简便, 且提取完全, 大于 98%。

为保证银杏萜内酯与硅烷化试剂彻底反应, 必须在硅烷化前除去提取液中存在的大量有机杂质, 如叶绿素、酚类、蛋白质、糖类及鞣质等, 这也是色谱分析的前提。文献^[6]要求在酸性条件下用乙酸乙酯提取银杏萜内酯, 但回收率仅在 30%~60%。文献报道^[2]用聚酰胺柱串联 C₁₈柱的方法处理样液, 5% 甲醇洗脱部分仍有杂质干扰, 且成本较高。另有报道采用 Extrelut 柱^[7]和酸性氧化铝柱^[8]纯化, 但仅适用于高含量的银杏叶提取物及其制剂。本实验采用的纯化是直接在中性介质下, 采用乙酸乙酯提取, 然后选用酸性氧化铝、活性炭、硅藻土的混合吸附剂, 通过调整三者的比例, 取得了良好的效果, 回收率高, 整个洗脱过程不到 30 min, 较需过夜处理的聚酰胺、硅胶双柱法^[9]更为简便、快速。

References

- [1] Braquet P. The ginkgolides: potent platelet activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L. [J]. *Drugs Future*, 1987, 12(7): 643-649.
- [2] Van B T A, Scheeren H A, Rantio T, et al. Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromatogr*, 1991, 543: 375-387.
- [3] Hasler A, Meier B. Determination of terpenes from *Ginkgo biloba* L. by capillary gas chromatography [J]. *Pharm Pharmacol Lett*, 1992, 2: 187-190.
- [4] Chauret N, Carrier J, Mancini M. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of ginkgolides produced by *Ginkgo biloba* cell culture [J]. *J Chromatogr*, 1991, 588: 281-287.
- [5] Strode III J T B, Taylor L T, Van Beek T A. Supercritical fluid chromatography of ginkgolide A, B, C and J and bilobalide [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 738: 115-122.
- [6] Huh H, Staba E J. Ontogenic aspects of ginkgolide production in *Ginkgo biloba* [J]. *Planta Med*, 1993, 59: 232-239.
- [7] Pietta P G, Mauri P L, Rava A. Analysis of terpenes from *Ginkgo biloba* L. extracts by reverse phase high performance liquid chromatography [J]. *Chromatographia*, 1990, 29(5-6): 251-253.
- [8] Yao W X, Yang C, Tian Y, et al. Rapid determination of ginkgolides and bilobalide in leaves of *Ginkgo biloba* L. and its extracts by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1999, 19(1): 38-41.
- [9] Yan Y Z, Xie P S. Assay of terpenelactones in *Ginkgo biloba* leaves by RP-HPLC-ELSD [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21(3): 173-176.

保 护 环 境 保 护 植 被