

UPLC-MS-MS 测定不同厂家银杏叶 提取物中 4 种萜内酯的含量

吴憩*, 姚鑫

(苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006)

[摘要] 目的:建立超高效液相色谱串联三重四级杆质谱法(UPLC-MS-MS),同时测定不同厂家银杏叶提取物中 4 种萜内酯的含量。方法:采用 ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相水-甲醇(70:30),流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃;Waters Xevo™ TQ 质谱仪以多反应离子监测(MRM)方式进行负离子检测。结果:所测成分在 5.0 min 内分离良好,在相应的浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系,相关系数均 > 0.992 3;加样回收率为 98.13% ~ 102.08%, RSD 均 < 3%。不同厂家生产的银杏叶提取物中总萜内酯的含量具有一定的差异,但均符合 2010 年版《中国药典》一部的要求。结论:该方法简便、快速、重复性好,专属性强,适用于银杏叶提取物中萜内酯类成分的快速定量分析。

[关键词] 超高效液相色谱串联三重四级杆质谱法;银杏叶提取物;萜内酯

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0060-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150060

Determination of Four Terpene Lactones in Ginkgo Folium Extract from Different Manufacturers by UPLC-MS-MS

WU Qi*, YAO Xin

(Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an ultra-high performance liquid chromatography- triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS-MS) method for simultaneous determination of four terpene lactones in ginkgo folium extract from different manufacturers. **Method:** Chromatographic separation was carried out on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with water-methanol (70:30) as the mobile phase, at a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. The column temperature was set at 30 ℃; Waters Xevo™ TQ worked in multiple reaction monitoring (MRM) mode for negative ion detection. **Result:** The tested constituents were separated well within 5 min, and showed good linear relationship with the peak areas within corresponding concentration range ($r > 0.992 3$). The average recoveries ranged from 98.13% to 102.08% with RSD value below 3.0%. There was difference in contents of total terpene lactones in Ginkgo Folium extract from different manufacturers, but all the contents complied with the requirements of *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. **Conclusion:** This method was simple and fast with high precision, sensitivity and repeatability, which can be used for rapid quantitative analysis of terpene lactones in Ginkgo Folium extract.

[Key words] UPLC-MS-MS; Ginkgo Folium extract; terpene lactones

银杏叶^[1-2]提取物不仅应用于医药领域中,在保健品及功能性食品中也得到广泛应用^[3-5]。研究

表明银杏叶提取物对老年性痴呆和心脑血管疾病有一定的疗效^[6-8]。银杏叶主要成分为黄酮苷、内酯

[收稿日期] 20150630(013)

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科研项目(Z201304)

[通讯作者] * 吴憩,主管药师,从事医院药学研究, Tel:0512-67780433, E-mail: wooche@sina.com

以及双黄酮,萜内酯为其主要的活性物质基础之一,倍受人们的关注^[4,9-10]。

许多分析方法已经用于银杏叶提取物中萜内酯类化学成分的分析。HPLC-ELSD 是分析萜内酯类化合物的主要方法^[11-13]。但该方法还是有一些缺陷,①银杏黄酮类成分含量较高时,对萜内酯的测定影响较大,所以一般选用乙酸乙酯多次萃取,萃取后还有一系列的纯化富集过程,样品前处理十分繁琐耗时;②ELSD 定量限较高、稳定性差,且灵敏度较低。基于三重四极杆多反应离子监测功能,利用独特的选择离子采集方式,本实验室新建 UPLC-MS-MS 方法,样品提取后不需乙酸乙酯萃取等步骤,直接测定银杏叶提取物中 4 种萜内酯类成分含量,并考察不同厂家银杏叶提取物中萜内酯类成分的含量差异,为银杏叶提取物的质量控制提供新的方法参考。

表 1 银杏叶提取物样品的生产厂家与批号

Table 1 Manufacturer and lot number of *Ginkgo biloba* extract

No.	厂家	批号	No.	厂家	批号
1	徐州恒凯银杏制品有限公司	110722	6	西安小草植物科技有限公司	XC110410
2	徐州康泰生物制品有限公司	110709	7	长沙市惠瑞生物科技有限公司	100619
3	徐州市绿源生物技术有限公司	110412	8	湖州恩贝希生物原料有限公司	110518
4	汉中天然谷生物科技有限公司	110215	9	宁波中药制药有限公司	110701
5	西安润泽生物技术有限公司	110421	10	惠州仙草植物保健科技有限公司	110801

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 水-甲醇 (70:30) 为流动相,进样量 1 μL,柱温 35 °C,流速 0.4 mL·min⁻¹。

2.2 质谱条件 扫描方式多反应监测方式,毛细管电压 3.0 kV,离子源 ESI⁻,离子源温度 150 °C,碰撞气流量 0.15 mL·min⁻¹,脱溶剂气温度 550 °C,锥孔气流量 50 L·h⁻¹,脱溶剂气流量 1 000 L·h⁻¹,取样锥孔电压及碰撞能量见表 2。在上述条件下所测各萜内酯成分典型 MRM 色谱见图 1。

2.3 对照品溶液制备 精密称取对照品适量,用 70% 甲醇溶解,制成质量浓度分别为 BB 28.00 mg·L⁻¹,GC 27.42 mg·L⁻¹,GA 23.70 mg·L⁻¹,GB 33.70 mg·L⁻¹ 的混合对照品贮备液。取上述贮备液用 70% 甲醇稀释,制成不同浓度的对照品溶液,用于考察线性关系。对照品溶液 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清进样分析。所有对照品溶液在 4 °C 条件下贮藏。

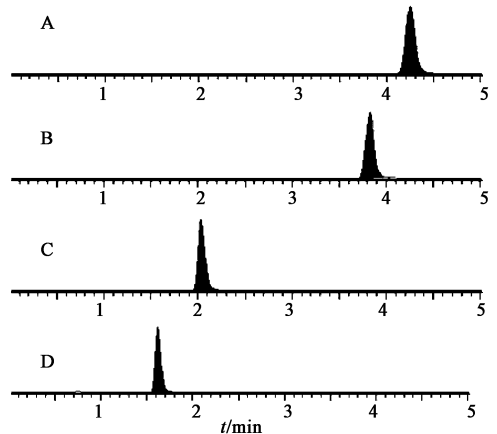
2.4 供试品溶液制备 精密称定本品 0.02 g,置于

1 材料

KQ-250E 型超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司), Anke GL-16GII 型离心机 (上海安亭科学仪器厂), EPED 型超纯水系统 (南京易普达易科技发展有限公司), ACQUITY 型 UPLC 系统 (包括自动进样器,在线脱气机和四元泵溶剂系统, Xevo TQ 检测器, MassLynx™ 质谱工作站软件, Waters 公司), BT125 型 1/10 万电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司)。

对照品银杏内酯 C (GC), 银杏内酯 B (GB), 白果内酯 (BB), 银杏内酯 A (GA) 均从银杏叶中分离得到^[14], 其化学结构经 ¹³C-NMR, ¹H-NMR, ELSD 和 MS 确定, 纯度经 HPLC 检测均 >98%。

银杏叶提取物购自市售药品市场上 10 个生产厂家, 来源信息见表 1。



A. GB; B. GA; C. GC; D. BB

图 1 银杏叶提取物中各萜内酯成分典型 MRM

Fig. 1 Representative MRM chromatograms of four terpenoid lactones in *Ginkgo biloba* extract

100 mL 具塞锥形瓶中,加入 70% 甲醇 100 mL,称重,超声提取 1 min 后,静置,称重,加 70% 甲醇以补足减失的质量,摇匀,13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,4 °C 保存,待测。

表 2 4 种所测成分的主要质谱参数

Table 2 MS parameters of 4 investigated compounds

成分	相对分子质量	MRM 监测离子	碰撞能量 /eV	锥孔电压 /V	保留时间 /min
BB	326	325. 22 > 162. 95	20	18	1. 64
GC	440	439. 28 > 383. 06	14	24	2. 04
GA	408	407. 28 > 319. 14	14	30	3. 82
GB	424	423. 28 > 367. 22	14	24	4. 24

注:采样时间均为 0.02 s。

表 3 线性回归方程及 LOQ 和 LOD 测定

Table 3 Linear regression data and validation of developed method for 4 investigated compounds in *Ginkgo biloba* extract

成分	线性方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	r	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
BB	$Y = 12\ 834.3X + 1\ 764.8$	0.02 ~ 28.00	0.995 5	0.66	0.21
GC	$Y = 11\ 486.1X + 4\ 874.2$	0.02 ~ 27.42	0.992 3	0.49	0.16
GA	$Y = 1\ 679.5X + 6\ 614.2$	0.02 ~ 23.70	0.996 4	1.33	0.41
GB	$Y = 14\ 321X + 5\ 835.3$	0.03 ~ 22.70	0.992 5	0.14	0.04

2.5.2 重复性试验 按 2.4 项下的方法,制备 6 份银杏叶提取物(厂家 1)的供试品溶液。在上述色谱与质谱条件下,进样 1 μL 进行分析。结果银杏叶提取物中 GB,GA,GC 和 BB 质量分数的平均值分别为 1.11%, 1.49%, 0.82%, 3.34%; RSD 分别为 2.1%, 0.8%, 1.5%, 1.2%, 说明该方法重复性好。

2.5.3 精密度试验 取 2.3 项下的混合对照品溶液连续进样 6 次,以峰面积计算,4 个萜内酯 GB,GA,GC 和 BB 峰面积积分值的 RSD 分别为 2.1%, 1.6%, 1.1%, 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取重复性试验中的一份供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按上述色谱与质谱条件进样测定。结果 GB,GA,GC 和 BB 峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 0.9%, 2.1%, 1.7%。说明供试品溶液室温放置 24 h 稳定。

2.5.5 加样回收率试验 取已知含量的银杏叶提取物 0.01 g 共 6 份,精密称定,分别准确加入与样品中 BB,GC,GA 和 GB 质量相当的对照品溶液,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 与 2.2 项下的色谱与质谱条件测定,计算加样回收率。结果见表 4。

2.6 样品测定 分别取不同厂家银杏叶提取物,按 2.4 项下方法制备供试溶液,按 2.1 与 2.2 项下的色谱与质谱条件依法测定,利用已建立的标准曲线,计算银杏叶提取物中 4 个萜内酯成分的含量,结果见表 5。由表 5 可知,总萜内酯的含量具有一定的差异,但均符合 2010 年版《中国药典》(一部)的要求。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系、最低定量限(LOQ)和最低检测限(LOD)试验 取混合对照品贮备液适量,用 70% 甲醇稀释成不同浓度的系列对照品溶液,按 2.1, 2.2 项下的色谱与质谱条件测定,以对照品溶液质量浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,计算相关系数;LOQ 和 LOD 分别在信噪比(S/N)为 10 和 3 时测定,结果见表 3。

表 4 银杏叶提取物中 4 个萜内酯成分回收率试验($n=6$)

Table 4 Recoveries of four terpene lactones of *Ginkgo biloba* extract ($n=6$)

成分	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	RSD /%
BB	334.78	335.10	664.56	98.41	2.1
GC	82.30	80.55	161.35	98.13	1.6
GA	149.90	150.15	303.17	102.08	1.8
GB	111.74	110.52	224.35	101.89	2.7

表 5 不同厂家银杏叶提取物中 4 个萜内酯成分质量分数测定($n=3$)

Table 5 Results of four terpene lactones in *Ginkgo biloba* extract of different manufacturers ($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	白果内酯	银杏内酯 C	银杏内酯 A	银杏内酯 B	总内酯
1	33.47	8.23	14.98	11.17	67.85
2	28.54	16.82	15.72	21.18	82.25
3	38.80	22.69	21.38	24.02	106.89
4	19.84	15.36	26.46	9.95	71.61
5	18.48	10.84	24.81	15.33	69.46
6	20.47	14.78	20.89	11.87	68.01
7	33.62	23.91	17.69	21.37	96.58
8	37.85	17.49	16.59	19.31	91.25
9	15.90	17.56	25.77	10.86	70.09
10	20.44	13.17	21.23	13.54	68.38

3 讨论

3.1 提取方法优化 采用单变量法,分别对提取时间(1, 2, 5 min),提取溶剂(50%, 70%, 100% 甲醇)和提取溶剂用量(50, 100, 150 mL)等因素进行了考察,以获得最佳的提取效率。提取时间考察结果显示,在设置的提取时间上,提取得率无显著差异;

70% 甲醇较其他提取溶剂可获得较高的提取效率; 提取溶剂用量考察结果显示, 以固液比为 1: 5 000 时提取效率可达最大, 且提取液浓度适宜于 UPLC-MS-MS 分析。综上所述, 提取条件为 70% 甲醇 100 mL 超声提取 1 min。

3.2 色谱分析条件的优化 参考文献[15]首先对不同型号的色谱柱进行了比较, 结果显示, 与 ACQUITY™ HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)相比, ACQUITY™ BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)具有更好的保留及分离效能。考察了不同流动相体系, 如甲醇-乙腈-0.05% 甲酸水溶液、甲醇-乙腈-0.1% 甲酸水溶液、甲醇-乙腈-水。结果发现所选的流动相均可获得较好的色谱峰形, 考虑甲醇-水作为流动相, 柱平衡时间缩短, 组成简单, 试验后色谱柱易清洗, 且经济环保, 最终选择甲醇-水溶液作为流动相。

3.3 质谱分析条件的优化 参考文献[15]首先比较不同离子模式下各分析化合物的响应强度, 结果发现在 ESI⁻ 模式下所测定成分均呈现稳定的准分子离子[M - H]⁺, 且响应强度大于 ESI⁺ 模式。因此选择在 ESI⁻ 模式下, 应用 IntelliStart 功能自动采集用于 MRM 测试的离子碎片及最佳锥孔电压和碰撞能量。经优化后的质谱检测参数见表 2。

3.4 小结 随着 LC-MS-MS 普及化程度的日益提高, 联用技术能够更加完整细致地表征待测物的内在质量, 以把控药物品质。本文所建立的分析方法, 选择 4 个萜内酯作为检测指标, 超声提取样品, 离心过膜后即可进样分析, 避免了常用方法乙酸乙酯萃取等步骤, 有机溶剂用量少, 样品处理简单易行, 重复性好且分析时间短, 可考虑用作银杏叶提取物的质量控制方法。

[参考文献]

[1] Major R T. The ginkgo, the most ancient living tree, the resistance of *Ginkgo biloba* L. to pests accounts in part for the longevity of this species[J]. Science, 1967, 157 (3794): 1270-1273.
[2] Van B T A, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals[J]. J Chromatography A, 2009, 1216 (11): 2002-2032.
[3] Van B T A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts[J]. J Chromatography A, 2002, 967 (1): 21-55.
[4] Lin L Z, Chen P, Ozcan M, et al. Chromatographic

profiles and identification of new phenolic components of *Ginkgo biloba* leaves and selected products[J]. J Agr Food Chem, 2008, 56 (15): 6671-6679.
[5] Mahadevan S, Park Y. Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L.: chemistry, efficacy, safety, and uses[J]. J Food Sci, 2008, 73 (1): 14-19.
[6] Luo Y. Alzheimer's disease, the nematode *caenorhabditis elegans*, and *Ginkgo biloba* leaf extract [J]. Life Sci, 2006, 78 (18): 2066-2072.
[7] Hogan D B. Progress update: pharmacological treatment of Alzheimer's disease [J]. J Neuropsychiatr Dis Tr, 2007, 3 (5): 569-578.
[8] Shi C, Liu J, Wu F, et al. *Ginkgo biloba* extract in Alzheimer's disease: from action mechanisms to medical practice[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11 (1): 107-123.
[9] Hasler A, Sticher O, Meier B. High-performance liquid chromatographic determination of five widespread flavonoid aglycones [J]. J Chromatography A, 1990, 508 (1): 236-240.
[10] Yao X, Zhou G S, Tang Y P, et al. Comparative characterization of flavonol glycosides, terpene lactones, biflavones, proanthocyanidins, and ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* leaves from different fruit cultivars by ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry[J]. Bio Med Res Int, 2013, Article ID 582591-582601.
[11] Yao X, Shang E X, Zhou G S, et al. Comparative characterization of total flavonol glycosides and terpene lactones in different ages, cultivation sources and gender of *Ginkgo biloba* leaves [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13 (8): 10305-10315.
[12] Dubber M J, Kanfer I. Determination of terpene trilactones in *Ginkgo biloba* solid oral dosage forms using HPLC with evaporative light scattering detection [J]. J Pharmaceut Biomed, 2006, 41 (1): 135-140.
[13] Kaur P, Chaudhary A, Singh B, et al. Optimization of extraction technique and validation of developed RP-HPLC-ELSD method for determination of terpene trilactones in *Ginkgo biloba* leaves [J]. J Pharmaceut Biomed, 2009, 50 (5): 1060-1064.
[14] 姚鑫, 周桂生, 唐于平, 等. 银杏落叶化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24 (10): 1377-1381.
[15] 姚鑫, 周桂生, 唐于平, 等. 基于 UPLC-TQ-MS 考察不同树龄果用银杏叶萜内酯含量变化规律 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (3): 376-380.

[责任编辑 顾雪竹]