

UPLC-TOF-MS 快速测定不同核用银杏品种银杏叶中银杏内酯和白果内酯含量

张 峥, 叶小玉, 肖 强*, 周大寨

生物资源保护与利用湖北省重点实验室 湖北民族学院, 恩施 445000

摘要: 为比较鄂西南不同核用银杏品种叶片中银杏内酯和白果内酯含量, 采用超高压液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-TOF-MS)联用方法测定微量银杏内酯和白果内酯含量, 分析柱为 ZORBAX C₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 采用梯度洗脱, 飞行时间质谱作为检测器, 选择离子采集方式。方法测定银杏内酯和白果内酯的线性范围为 0.2 ~ 4 μg/mL, 相关系数为 0.9996 以上, 相对标准偏差小于 1.65%。测定结果表明, 在四个核用银杏品种中, 恩银 23 号具有较高的银杏内酯和白果内酯含量, 同时白果内酯和银杏内酯 A、B 及 C 总含量比例较佳, 可以作为叶用银杏发展的优选品种。

关键词: 液质联用; 银杏内酯; 白果内酯

中图分类号: Q819

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.02.019

Determination of Ginkgolides and Bibobalide in Ginkgo (*Ginkgo biloba*) Leaf from Different Species by UPLC-TOF-MS

ZHANG Zheng, YE Xiao-yu, XIAO Qiang*, ZHOU Da-zhai

Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization of Hubei Province / Hubei Institutes for Nationalities, Hubei Enshi 445000, China

Abstract: In this study, UPLC-TOF-MS was used to compare the contents of ginkgolides and bibobalide in the leaves of *Ginkgo biloba* L. from different species in the southwest of Hubei province. The separation was performed on a ZORBAX C₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.8 μm) column with acetonitrile and 0.1% formic acid in water as mobile phases at a flow-rate of 0.2 mL/min, and the column oven temperature of 25 °C. TOF mass spectrometry was used as the detector, and EIC mode was selected. The calibration curve was linear in the range of 0.2-4 μg/mL, with R^2 being larger than 0.9996 and RSD being smaller than 1.65%. The developed method was rapid, selective, accurate and suitable for the quantitative analysis of ginkgolides and bibobalide. Among the different species, the maximum contents of ginkgolides and bibobalide were found in the Eng23 species. Ratio of ginkgolides versus bibobalide in the leaves of Eng23 were better than others.

Key words: UPLC-MS; ginkgolide; bibobalide

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是我国特产的银杏科银杏属的孑遗植物^[1]。银杏叶提取物(简称 GBE)及其制剂具有扩张冠状动脉血管、增强心肌收缩力、增加脑血流量、改善脑营养、保护神经元等多种生物活性^[2,3];已被用于治疗脑损伤后遗症、老年性痴呆、衰老、神经性疾病、帕金森病及老年性心血管系统机能衰退等症。现代药理学研究表明,银杏主要有效

成分为黄酮甙和银杏内酯类化合物;目前为止发现银杏萜内酯 8 个,分别是银杏内酯(A、B、C、J、K、L、M)和白果内酯(bilobalide)^[4,5],其中以银杏内酯 A、B、C(简称 GA、GB、GC)和白果内酯(bibobalide,简称 BB)为主,它们具有特异性的抗血小板活化因子(PAF)活性^[3]。由于 GBE 产品中银杏内酯的含量通常很低,常用的高效液相色谱检测器(如紫外检测器)灵敏度不够,本底高且受其它杂质干扰不能适用^[5,6];示差折光检测器,一方面灵敏度比紫外检测器还差,另一方面则由于分离内酯时通常采用的梯度洗脱会产生基线漂移,容易造成定量不准^[4,7],蒸发激光散射检测器(ELSD)灵敏度高,选择性好,

收稿日期:2014-04-29 接受日期:2014-07-16

基金项目:国家自然科学基金(31260057,31360498);湖北民族学院林学院艺术学院大学生创新基金(LXDC1310);湖北民族学院大学生创新创业训练计划(201310517029);生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金(PKLHB1310)

* 通讯作者 Tel:86-015971698508;E-mail:275975926@qq.com

但其响应是非线性,带来定量误差^[8],难以用于质量控制中的定量分析。高效液相色谱(HPLC)与质谱(MS)联用技术结合了HPLC分离和MS定性的优势,TOF-MS可以提供相对分子质量的高精度信息,本文通过超高压液相-飞行时间质谱联用(UPLC-TOF-MS)技术对银杏内酯进行质谱分析,采用其独特的选择离子流提取方式,提高了分析灵敏度,可在极短时间内实现对银杏内酯的快速定性和定量测定,满足分析需要。

1 材料与仪器

1.1 材料

2012年6月对鄂西南各县市银杏品种母树(经恩施州林业科学研究所吴代坤高级工程师鉴定)采集银杏叶,银杏叶置烘箱及时烘干粉碎,过40目筛备用。

1.2 仪器、药品与试剂

Agilent 1290液相色谱和飞行时间质谱仪(6224型)配有电喷雾电离(ESI)源和大气压化学电离源(APCI);采用Agilent Masshunter工作站和数据处理软件对信号进行采集和数据处理。

银杏内酯样品:银杏内酯A(GA)、银杏内酯B(GB)、银杏内酯C(GC)、白果内酯(BB)对照品均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为110862-201009、110863-200508、110864-200906、110865-200605;甲酸(色谱纯)、乙腈(色谱纯):迪马科技有限公司产品;实验用水为超纯水(Milipore, Bedford, MA, USA)。

2 实验方法

2.1 色谱分析条件

Agilent ZORBAX C₁₈(2.1×50 mm, 1.8 μm)色谱柱。流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱程序如下:0~5 min, 20%~45%乙腈,柱温25℃,流速0.2 mL/min。

2.2 质谱分析条件

ESI离子源负模式,干燥气温度350℃,流速10 L/min;雾化器压力45 psig,毛细管电压3500 V,毛细管出口电压150 V,锥孔电压65 V,采集速度1.5 spectra/s,选择离子(EIC)采集模式,选定分子离子[M-H]⁻的质荷比分别为407.15(GA), 423.15(GB), 439.12(GC), 325.11(BB)。

2.3 混合标准溶液的配制

精密称取对照品GA 1.052 mg、GB 1.294 mg、GC 1.009 mg、BB 1.055 mg,分别置于10 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,振摇使溶解,得银杏内酯对照品储备液。取BB 1 mL, GA、GB、GC各200 μL,用甲醇定容至10 mL制成混合对照品溶液。实际使用时再用甲醇适当稀释。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系

将上述对照品溶液分别稀释1.0、2.5、3.3、4.0、5.0倍,按所设LC-MS条件进样10 μL,测定进样量与相应质谱峰面积的关系。以内酯的选择性离子流色谱图(见图1)中峰面积为纵坐标,相应的内酯质量浓度为横坐标,对测定结果进行直线回归,求得GA、GB、GC、BB的线性方程及相关系数,在0.2~4 μg/mL范围内,4种银杏内酯的线性关系如下:GA: $Y = 67940X - 28506, R^2 = 0.9999$; GB: $Y = 2000000X + 23738, R^2 = 0.9996$; GC: $Y = 2000000X + 67415, R^2 = 0.9996$; BB: $Y = 57562X - 9073, R^2 = 0.9999$ 。

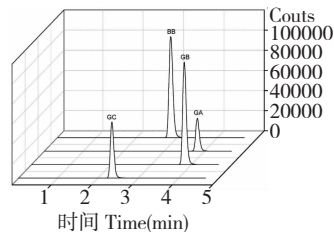


图1 GA、GB、GC、BB的选择性离子流色谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms (EIC) of GA, GB, GC and BB

2.4.2 精密度与准确性

按前述LC-MS条件对同一混合标样重复测定4次,4种内酯的相对标准偏差RSD分别为GA: 1.53%, GB: 1.65%, GC: 1.52%, BB: 1.26%,说明本方法较为准确、可靠。

2.4.3 重复性

取银杏叶样品5份,按照2.5项下方法制备供试样品溶液,连续进样5次,记录色谱图。结果表明4种内酯的相对标准偏差RSD均小于3.8%,符合定量分析要求,表明方法的重复性良好。

2.5 样品制备

精确称取银杏叶样品2.0 g,加入50%乙醇溶液置于索氏提取器中70℃提取2 h,冷却抽滤,滤渣加入50%乙醇溶液再次提取2 h;合并两次得到的

提取液旋转蒸发至干,然后加 10 mL 蒸馏水及 0.3 g 乙酸钠溶解,加入等体积乙酸乙酯萃取两次,合并有机相旋转蒸发至干,用甲醇溶解并定容至 10 mL。

3 结果与分析

用前述方法对鄂西南不同银杏品种叶片的 4 种

表 1 不同银杏品种叶片白果内酯和银杏内酯含量 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The contents of bibobalides and ginkgolides in the leaves of *G. biloba* from different species ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

品种 Species	白果内酯含量 Bibobalide (%)	银杏内酯 A 含量 Ginkgolide A (%)	银杏内酯 B 含量 Ginkgolide B (%)	银杏内酯 C 含量 Ginkgolide C (%)	总内酯含量 Total content (%)
EnG1	0.082 ± 0.0012 ^d	0.059 ± 0.0001 ^a	0.054 ± 0.0004 ^a	0.020 ± 0.0003 ^c	0.215 ± 0.002 ^{bc}
EnG2	0.118 ± 0.009 ^b	0.035 ± 0.0013 ^c	0.021 ± 0.0013 ^c	0.013 ± 0.0001 ^d	0.187 ± 0.012 ^c
EnG15	0.098 ± 0.0094 ^c	0.059 ± 0.0016 ^a	0.053 ± 0.0034 ^a	0.034 ± 0.0014 ^a	0.244 ± 0.016 ^b
EnG23	0.188 ± 0.005 ^a	0.045 ± 0.0011 ^b	0.042 ± 0.0014 ^b	0.031 ± 0.001 ^b	0.305 ± 0.008 ^a

注:同一栏内数据后不同字母者在 0.05 水平上差异显著。

Note: Values followed by a different letter were of significant difference at the 0.05 probability level.

4 讨论

由于各种银杏内酯的结构很相似,且无特征紫外吸收,虽然在 210 nm 处有紫外吸收,但此波长与洗脱溶剂甲醇或乙腈紫外吸收截止波长非常接近,容易造成紫外检测背景值偏高。另外,一般情况下所测样品中银杏内酯的含量非常低,对于灵敏度不高的检测器,如紫外、示差等,样品需反复多次提取、纯化、浓缩,以提高银杏内酯的浓度,才能进行检测,如此众多的环节往往带来较大的检测误差。基于其它检测器存在的缺陷。作者采用飞行时间质谱仪作为检测器,用液-质联用仪进行定量分析。由于它灵敏度很高,0.2 μg/mL 银杏内酯即可产生足够的质谱信号,解决了灵敏度问题,且具有较好准确性好;另一方面,紫外等检测器对于性质相近 GA、GB 出现的共流出无能为力,不能进行准确定量;从图 1 可见,在选定分离条件下,GA 和 GB 存在共流出,但质谱仪通过 EIC 功能可以准确定量共流出峰不同离子,从而做到同时准确定量 4 种主要银杏内酯。

液-质联用仪的质谱采用软电离方式,即电喷雾电离 (ESI) 和大气压化学电离 (APCI),在它的总离子流质量色谱图上能得到较强的分子离子峰 ($[M + H]^+$ 或 $[M-H]^+$, M 代表相对分子质量);根据银杏内酯的结构中含有很多氧原子及活泼羟基,故选择 ESI 负离子采集方式。用自动进样器直接进样,调节各参数,以得到最强的分子离子峰 ($[M-H]^+$),确定最佳实验条件;同时采用质谱的 EIC 选择离子流提取方式提取色谱图,即选定 407.15 (MGA-1)、

内酯进行了测定,经回归方程计算各种内酯的含量,由表 1 可见,不同品种间白果内酯含量差异具有极显著性,其中以恩银 23 号含量最高,较含量最低的恩银 1 号高出 1 倍以上;4 种内酯总含量在各品种间差异极显著,其中,恩银 23 号总内酯含量在四个品种最高;而恩银 2 号则最低。

423.15 (MGB-1)、439.12 (MGC-1)、325.11 (MBB-1) 4 个相对分子质量进行色谱提取,进一步提高了银杏内酯的检出灵敏度。

作者采用近年来迅速发展的 UPLC-MS 方法,利用超高压液相色谱实现微量样品的迅速分离,本方法在 4 分钟内即完成了四种主要银杏内酯的分离,较其它液质联用方法^[9]相比,大大节约了洗脱溶剂的消耗,节省了宝贵的时间;采用 TOF-MS 作为检测器,发挥其灵敏度高、精密性与准确性好的优点,实现了短时间内对样品中微量银杏内酯的定量检测。基于上述方法,利用自动进样器可以实现对大量样品的快速准确定量。

目前国际上一般公认的银杏叶制品质量指标为 1991 年德国 Schwabe 制药厂生产的产品 EGB761 标准,即黄酮苷 24% 以上,内酯 6% 以上,银杏酸 10 mg/kg 以下。其中,3 种苷元的大体比例是 3:2.6:1。内酯中白果内酯与萜内酯的含量大致相等,而萜内酯 A、B、C 的比例约为 2:2:1^[10]。本研究表明,在恩银 23 号叶片中,4 种内酯含量在 4 个品种中最高,同时白果内酯和萜内酯的含量之比约为 1.5:1,且萜内酯 A、B、C 的比例接近 1.5:1.5:1,适合作为叶用银杏品种开发的优选品种。

参考文献

- Shi QW (史清文), Liu SY (刘素云), Zhang WS (张文素), et al. The survey of the research and development of the leaves of *Ginkgo biloba* L. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1995, 7: 70-76. (下转第 300 页)