

## 混合型固相萃取-UHPLC/MS/MS 法测定银杏酮酯 滴丸中银杏酸含量

孙 健<sup>1</sup>, 张雪怡<sup>2</sup>, 李丽敏<sup>1</sup>, 胡 青<sup>1</sup>, 诸艳蓉<sup>1</sup>, 毛秀红<sup>1</sup>, 季 申<sup>1\*</sup>

(1. 上海市食品药品检验所, 上海 201203; 2. 上海上药杏灵科技药业股份有限公司, 上海 201703)

**摘要:** 建立了超高效液相色谱串联三重四极杆质谱测定银杏酮酯滴丸中银杏酸的方法。采用混合型强阴离子反相吸附固相萃取净化样品, Waters Cortecs T3 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 2.7 μm), 以乙腈-甲醇-1%冰醋酸溶液 (44:44:12) 为流动相, 在电喷雾离子化负离子模式下, 以多反应监测方式 (MRM) 检测。银杏酸 C13:0、C15:1、C17:1 分别在 0.2~200、2~200 和 4~200 μg·L<sup>-1</sup> 范围内成良好线性关系, 相关系数均大于 0.999; 在 50、250 和 600 μg·kg<sup>-1</sup> 加标水平下的平均加样回收率为 70.8%~95.1%, 相对标准偏差 (RSD) 为 0.7%~8.6%; 定量限分别为 1、10、20 μg·kg<sup>-1</sup>。本方法可应用于复杂基质样品的银杏酸测定。

**关键词:** 超高效液相色谱-三重四极杆质谱; 混合型固相萃取; 银杏酸; 银杏酮酯滴丸

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 09-1532-04

## Determination of ginkgolic acids in Yinxing Tongzhi Dropping Pills by mix-mode SPE-UHPLC/MS/MS

SUN Jian<sup>1</sup>, ZHANG Xue-yi<sup>2</sup>, LI Li-min<sup>1</sup>, HU Qing<sup>1</sup>, ZHU Yan-rong<sup>1</sup>, MAO Xiu-hong<sup>1</sup>, JI Shen<sup>1\*</sup>

(1. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Shangyao Xingling Technology Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201703, China )

**Abstract:** An analytical method was developed for determination of ginkgolic acids in Yinxing Tongzhi Dropping Pills by ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. The samples were purified by mix-mode anion exchange and reversed-phase SPE. A chromatographic column, Waters Cortecs T3 (50 mm×2.1 mm, 2.7 μm), was used with acetonitrile-methanol-1% acetic acid (44:44:12) as the mobile phase. The ginkgolic acids were detected by electrospray ionization mass spectrometry in negative mode with multiple reaction monitoring (MRM) mode. Ginkgolic acid C13:0, C15:1 and C17:1 possessed good linear correlation in the mass concentration range from 0.2 to 200 μg·L<sup>-1</sup>, 2 to 200 μg·L<sup>-1</sup>, 4 to 200 μg·L<sup>-1</sup>, respectively, with the correlation coefficients more than 0.999. The mean recoveries at spiked levels of 50, 250 and 600 μg·kg<sup>-1</sup> were in the range of 70.8%–95.1%, and the RSDs were 0.7%–8.6%. The limits of quantification were 1, 10, 20 μg·kg<sup>-1</sup>, respectively. The method could be applied to the analysis of ginkgolic acids in complex matrix samples.

**Key words:** ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mix-mode solid-phase extraction; ginkgolic acid; Yinxing Tongzhi Dropping Pills

收稿日期: 2018-03-21; 修回日期: 2018-05-04.

基金项目: 上海市科委技术平台专项 (14DZ2294000).

\*通讯作者 Tel: 86-21-50798195, E-mail: jishen2013@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0248

银杏叶提取物为银杏科植物银杏的干燥叶经加工制成的提取物, 其主要功效为活血化瘀通络, 临床广泛用于冠心病、心绞痛等疾病。银杏酮酯是我国自主研发的新一代银杏叶提取物, 有效成分总黄酮和

萜类内酯含量达到 50% 以上<sup>[1]</sup>。

银杏酸是银杏叶提取物中主要的毒性物质, 具有致敏性、胚胎毒性、细胞毒性及免疫毒性<sup>[2]</sup>, 应当在提取生产工艺中有效去除。银杏酸主要包括银杏酸 C13:0、C15:0、C15:1、C17:1、C17:2, 化学结构见图 1, 其中 C13:0、C15:1、C17:1 占总银杏酸的 94% 以上<sup>[3]</sup>。美国药典以该 3 种银杏酸含量之和作为总银杏酸含量<sup>[4]</sup>。作者研究组已针对银杏叶提取物及其片剂和胶囊剂开发了 UHPLC/MS/MS 法测定其中总银杏酸含量<sup>[5]</sup>。

银杏酮酯滴丸是指银杏酮酯原料与适宜的基质加热熔融混匀, 滴入冷凝介质中制成的球形制剂。所使用的基质主要为聚乙二醇 6000、泊洛沙姆等高分子聚合物, 因其基质复杂, 无法使用银杏叶提取物测定方法<sup>[5]</sup>进行测定。文献<sup>[6, 7]</sup>同样多用甲醇直接超声提取后测定, 亦无法应用于复杂基质中。

因此, 复杂基质中银杏酸的测定存在方法空白, 必须采用专属性的前处理方法对复杂样品进行纯化后, 以三重四极杆质谱法测定其中银杏酸含量, 保障用药安全。

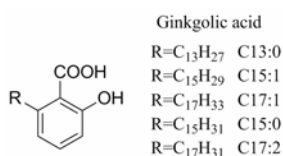


Figure 1 Chemical structures of ginkgolic acids

## 材料与方法

**仪器与试剂** Agilent 1290 超高效液相色谱仪; Agilent 6495 三重四极杆质谱; Waters Cortecs T3 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 2.7 μm); Waters Oasis MAX 固相萃取柱 (规格 60 mg/3 mL); 银杏酸 C13:0 对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 111690-200501)、银杏酸 C15:1 对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 111762-200601), 银杏酸 C17:1 对照品 (同田生化公司, 纯度 98.0%, 批号: 16040916); 甲醇、乙腈、醋酸、甲酸均为色谱纯; 银杏酮酯滴丸 (规格: 每丸含银杏酮酯 10 mg; 各生产企业提供)。

**色谱和质谱条件** Waters Cortecs T3 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 2.7 μm); 柱温为 30 °C, 流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 对照品溶液进样量 1 μL, 供试品溶液进样量 5 μL。流动相为乙腈-甲醇-1% 冰醋酸溶液 (44:44:12), 待测成分全部出峰后以乙腈-甲醇-1% 冰醋酸溶液 (49.5:49.5:1) 充分清洗至少 10 倍柱体积。

电喷雾离子化 (ESI) 负离子模式; 干燥气 (N<sub>2</sub>) 流速 15 L·min<sup>-1</sup>, 温度 225 °C; 雾化气 (N<sub>2</sub>) 0.21 MPa; 鞘气 (N<sub>2</sub>) 流速 11 L·min<sup>-1</sup>, 温度 300 °C; 毛细管电压 3000 V。采用多反应监测方式 (MRM) 检测, 监测离子、碰撞能量等参数见表 1。

Table 1 Monitoring ion pairs and CEs of ginkgolic acids. \*Quantitative ion

Ginkgolic acid	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	CE/V
C13:0	319.2	275.2*	25
		106.1	49
C15:1	345.2	301.2*	21
		119.0	49
C17:1	373.3	329.3*	29
		106.0	49

**对照品溶液制备方法** 分别取银杏酸 C13:0 对照品、银杏酸 C15:1 对照品、银杏酸 C17:1 对照品适量, 精密称定, 加 2% 甲酸的乙腈溶液制成 0.2~200、2~200、4~200 μg·L<sup>-1</sup> 的系列混合溶液, 作为对照品溶液。

**供试品溶液制备方法** 取本品 200 丸, 精密称定, 研细, 混匀, 取约 2 g (约相当于银杏酮酯 0.4 g), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 称定重量, 于 40 °C 超声 (功率 180 W, 频率 42 kHz) 30 min, 随时摇散, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 滤过, 精密取续滤液 1 mL, 再精密加入水 1 mL (可适当增加水量, 使单个银杏酸上样浓度低于 60 μg·L<sup>-1</sup>), 混匀, 作为上样液。精密量取上样液 1 mL, 加于 Waters Oasis MAX 固相萃取柱 (规格 60 mg/3 mL, 预先依次用甲醇 1 mL 和水 1 mL 活化) 上, 依次用 5% 氨水和甲醇各 2 mL 清洗, 弃去洗液, 再用 2% 甲酸的乙腈溶液 4 mL 洗脱, 收集洗脱液并定容至 5 mL, 滤过, 取续滤液, 即得。

## 方法学验证

**线性** 取系列对照品溶液进样测定, 以各组分峰面积对质量浓度绘制曲线。

**准确度** 取银杏酮酯滴丸, 经检测银杏酸 C13:0 含量 61.0 μg·kg<sup>-1</sup>、银杏酸 C15:1 含量 195.5 μg·kg<sup>-1</sup>、银杏酸 C17:1 含量 92.7 μg·kg<sup>-1</sup>, 分别添加低 (50 μg·kg<sup>-1</sup>)、中 (250 μg·kg<sup>-1</sup>)、高 (600 μg·kg<sup>-1</sup>) 3 个水平的对照品溶液, 每个水平做 3 个平行样, 共 9 份, 按上述供试品溶液制备方法和色谱质谱条件进行分析, 计算回收率和精密度。

**稳定性** 取供试品溶液, 分别于放置 0、8、15 h

时进样测定, 比较峰面积。

定量限 分析低水平添加溶液的信噪比, 以定量离子对计算定量限 (信噪比为 10)。

## 结果

### 1 方法学验证

**1.1 线性** 银杏酸 C13:0、C15:1 和 C17:1 分别在 0.2~200、2~200 和 4~200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  内成良好线性关系, 相关系数均在 0.999 以上, 结果见表 2。

**Table 2** Recoveries, precisions, correlation coefficients and LOQs of the three ginkgolic acids

Ginkgolic acid	Spiked / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Recovery /%	RSD /%	Correlation coefficient	LOQ / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
C13:0	50	95.1	4.7	0.999 5	1
	250	89.3	2.8		
	600	85.1	1.0		
C15:1	50	83.9	7.6	0.999 6	10
	250	82.1	8.6		
	600	78.7	3.8		
C17:1	50	79.1	3.8	0.999 9	20
	250	75.3	3.9		
	600	70.8	0.7		

**1.2 准确度** 在 50、250 和 600  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的加样水平下, 银杏酸 C13:0 的平均加样回收率为 85.1%~95.1%, RSD 为 1.0%~4.7%; 银杏酸 C15:1 的平均加样回收率为 78.7%~83.9%, RSD 为 3.8%~8.6%; 银杏酸 C17:1 的平均加样回收率为 70.8%~79.1%, RSD 为 0.7%~3.9%。具体结果见表 2。

因银杏酸 C17:1 极性最小, 强保留于固相萃取柱上, 无法完全洗脱, 造成损失, 回收率较另 2 种银杏酸稍低。根据中国药典 2015 年版四部通则<9101>, 样品中待测定成分含量为  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  级别时, 回收率要求为 75%~120%, 重复性要求为不超过 8%, 在基质复杂、组分含量低于 0.01% 及多成分等分析中, 回收率和精密度范围可适当放宽<sup>[8]</sup>。因此, 本次实验回收率和精密度符合要求。

**1.3 稳定性** 银杏酸 C13:0、C15:1、C17:1 峰面积 RSD 分别为 4.2%、3.3%、3.5%, 在 15 h 内基本稳定。

**1.4 定量限** 银杏酸 C13:0、C15:1、C17:1 定量限分别为 1、10、20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (表 2)。银杏酸 C15:1、C17:1 化学结构中脂肪碳链较 C13:0 更长, 且具双键, 基质中含有的同分异构体更多, 导致基线噪音较大, 因此定量限较银杏酸 C13:0 高。

原料银杏酮酯中总银杏酸限度为 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 制

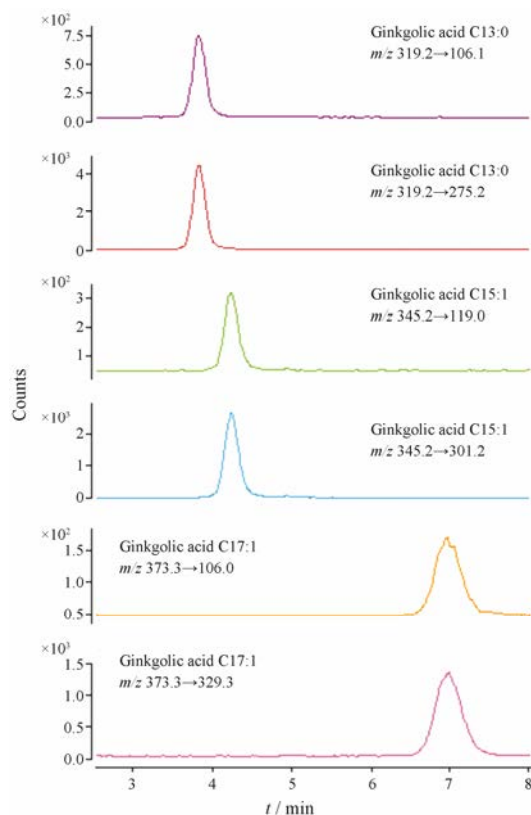
剂按处方量折算, 限度不得过 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (即每丸 0.05  $\mu\text{g}$ )。本方法的定量限可满足检测需求。

### 2 样品测定

本次研究测定了 3 家企业的共 30 批银杏酮酯滴丸的总银杏酸测定结果, 结果见表 3, 色谱图见图 2。限度按每丸 0.05  $\mu\text{g}$  计, 企业 A 的部分产品中总银杏酸含量超过限度。

**Table 3** Detection results of the 30 Yinxing Tongzhi Dropping Pills. No. 1–10, 11–20 and 21–30 supplied by Manufacturer A, B and C, respectively

No.	Content / $\mu\text{g}$ per pill	No.	Content / $\mu\text{g}$ per pill	No.	Content / $\mu\text{g}$ per pill
1	0.06	11	0.02	21	0.02
2	0.10	12	0.03	22	0.02
3	0.07	13	0.03	23	0.02
4	0.04	14	0.04	24	0.02
5	0.03	15	0.04	25	0.02
6	0.02	16	0.04	26	0.02
7	0.06	17	0.03	27	0.02
8	0.03	18	0.03	28	0.02
9	0.03	19	0.03	29	0.02
10	0.02	20	0.03	30	0.02



**Figure 2** MRM chromatograms of ginkgolic acids

现行银杏酮酯 (原料) 质量标准中总银杏酸测定方法为薄层扫描法, 前处理为正己烷索氏提取, 该

方法提取效率低, 灵敏度低, 准确度差。企业 A 的部分制剂产品超过限度, 可能与原料质量未得到有效控制有关, 也可能与其工艺不稳定有关。因此, 有必要建立专属准确的原料及其制剂的总银杏酸测定方法, 从而有效控制产品质量, 保障用药安全。

## 讨论

参照银杏叶提取物测定方法<sup>[5]</sup>, 采用甲醇超声提取银杏酸。实验发现, 滴丸辅料特殊, 室温超声 20 min 时, 仍有部分样品结块。当采用 40 ℃、超声 30 min 提取时, 样品能够全部溶解。

样品提取后采用: ① 提取液直接进样测定; ② 减缓流动相梯度以尽可能分离基质与待测物; ③ 反相固相萃取 (Waters oasis HLB) 净化等 3 种方式处理并进样测定, 但回收率均较差, 基质抑制或增强严重。因此, 使用混合型强阴离子交换反相吸附填料固相萃取 (Waters oasis MAX) 净化, 该固相萃取方法对弱酸性化合物具高度专属性, 回收率得到较大改善。但精密度较差, 具体分析数据为高浓度加样水平回收率较差, 原因为固相萃取柱规格较小, 高浓度样品过载所致, 故若含量过高时, 上样前需稀释。因各品牌的柱填料有细微差别, 使用其他品牌时清洗及洗脱溶剂的类别和酸度均应作相应调整。

流动相条件参照银杏叶提取物测定方法<sup>[5]</sup>, 以甲醇-1% 冰醋酸溶液 (90:10) 为流动相。但在大批次进样时, 发现部分样品重复性较差, 推测个别企业样品中存在部分保留极强残留于色谱柱中的成分, 与后续进样的供试品溶液共馏出产生基质增强效应, 以甲醇-1% 冰醋酸溶液 (99:1) 也无法彻底洗脱。尝试将有机相换为洗脱能力更强的乙腈, 但峰形太差, 拖尾严重。故有机相采用甲醇+乙腈 (1:1), 方能兼顾洗脱能力和峰形。因乙腈洗脱能力更强, 比例微调, 最终定为以乙腈-甲醇-1% 冰醋酸溶液 (44:44:12) 为流动相, 待测成分全部出峰后以乙腈-甲醇-1% 冰醋酸溶液 (49.5:49.5:1) 充分清洗至少 10 倍柱体积。

质谱条件同银杏叶提取物测定方法<sup>[5]</sup>。

综上, 本研究建立了混合型固相萃取-UHPLC/MS/MS 法测定银杏酮酯滴丸中银杏酸, 方法专属, 解决了复杂基质中银杏酸测定的难题, 灵敏准确, 能够满足痕量银杏酸检测的需求。本方法可为银杏叶相关药品或保健食品中总银杏酸测定提供借鉴意义。

## References

- [1] Wang XY, Zhang ZX, Liu AH. Effect of GBE50 on experimental arrhythmias [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2010, 35: 199-203.
- [2] Liu PP, Pan SH. Advance in study of ginkgolic acid contained in *Ginkgo biloba* preparations [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2012, 37: 274-277.
- [3] Wu XY, Yang LQ, Chen J. Determination of ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* extract and its preparations by high performance liquid chromatography [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38: 846-849.
- [4] United States Pharmacopoeial Convention. United States Pharmacopoeia, 41 Revision, Volume 3 [S]. Baltimore: United Book Press, 2018: 4460-4663.
- [5] Sun J, Li LM, Hu Q, et al. Determination of ginkgolic acids in the *Ginkgo biloba* extract and its preparations by ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2016, 34: 184-188.
- [6] Chen J, Chen C, Ren H, et al. Determination of ginkgolic acids in the ginkgo leaf [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2018, 35: 72-75.
- [7] Yao X, Xue P, Yu DH, et al. Determination of ginkgolic acids in ginkgo leaves extract from different manufacturers by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 174-179.
- [8] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Volume IV (中华人民共和国药典 [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 374-377.