

文章编号 :1009-038X(2003)04-0080-03

液质联用方法测定微量银杏内酯

秦 昉 , 陶冠军 , 王林祥

(江南大学 分析测试中心,江苏 无锡 214036)

摘 要 :用液质联用方法测定了微量银杏内酯的含量,分析柱为 Lichrospher C-18 柱,流动相为甲醇-水,采用梯度洗脱,质谱作为检测器,选择离子采集方式.本方法测定银杏内酯的线性范围为 0.12~68.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相关系数为 0.998 4~0.999 4,相对标准偏差为 0.38%~0.44%.

关键词 :液质联用方法;银杏内酯;白果内酯

中图分类号 :O 657.63

文献标识码 :A

Determination of Low-Level Ginkgolides by LC-MS

QIN Fang , TAO Guan-jun , WANG Ling-xiang

(Analysis Center , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : In this paper , the analysis of bibobalide and ginkgolides by LC/MS was studied. The separation was performed on a Lichrospher mm C-18 column with methanol-water (with gradient) as mobile phase at a flow-rate of 0.3 mL/min , and the column temperature of 30 $^{\circ}\text{C}$. Mass spectrometry was used as the detector , and SIR mode was selected. The calibration curve was linear in the range of 0.12~68.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with r^2 and RSD being 0.998 4~0.999 4 and 0.38~0.44% . This method is easy , rapid , and accurate.

Key words : LC-MS ; ginkgolide ; bibobalide

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科银杏属,是侏罗纪的子遗植物^[1],基本保持了 1.5 亿年前的生态特征,是我国的特产植物.银杏叶提取物(简称 GBE,主要有效成分为黄酮甙和银杏内酯类化合物)已被用于治疗脑损伤后遗症及老年性大脑、心血管系统机能衰退等症^[2].银杏内酯(ginkgolide)现已发现多种,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,它们具有专属性的抗血小板活化因子(PAF)活性,有望成为治疗过敏性休克等病症的一类新药^[3].

为适应人们不断提高的自我保健意识,许多食品和保健品中也添加了 GBE,这就需要对添加量进

行监控,而由于最后产品中银杏内酯的含量很低,常用的高效液相色谱检测器或灵敏度不够(如紫外^[4,5]、折光^[6,7]),或稳定性不好(如 ELSD^[8]),难以用于质量控制中的定量分析.作者采用质谱作为检测器,采用其独特的选择离子采集方式,提高了分析灵敏度,可在较大范围内保持较好的线性关系,满足分析需要.

1 材料与方法

1.1 试剂

银杏内酯样品 A、B(GA、GB,质量分数为 90%)、白果内酯样品(BB,质量分数为 90%);美国

收稿日期 2003-03-17; 修回日期 2003-05-17.

作者简介:秦昉(1964-)女,江苏无锡人,高级工程师,理学学士.

万方数据

Sigma 公司产品 ;甲酞(色谱纯);汉邦科技有限公司产品 ;超纯水.

1.2 仪器

美国 Waters Platform ZMD4000 液-质联用仪,配置 2690 泵,996 二极管阵列(PDA)紫外检测器,自动进样器,micromass 四极杆质谱仪,MassLynx

3.1 工作平台.

1.3 实验方法

1.3.1 色谱分析条件 色谱柱为 Lichrospher C-18 柱,流动相为甲醇-水,梯度洗脱,在 40 min 内甲醇体积分数从 30% 线性上升到 80%,柱温 30 °C,体积流量 0.3 mL/min.

1.3.2 质谱分析条件 离子源温度 120 °C,脱溶剂温度 250 °C,毛细管电压 3.7 kV,锥孔电压 30 V,选择离子(SIR)采集方式,选定的分子离子[M-H]⁺的质荷比分别为 GA:407.4,GB:423.4,BB:325.3.

1.3.3 混合标准溶液的配制 精确称取对照品 GA、GB、BB 各 2~4 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,实际使用时再用甲醇适当稀释,最终工作液质量浓度 BB:58.3 μg/mL,GA:85.0 μg/mL,GB:61.7 μg/mL,待用.

1.3.4 线性关系测定 将上述工作液分别稀释 1.25、2.50、10.0、50.0、500 倍,按所设 LC-MS 条件进样 5 μL,测定进样量与相应质谱峰面积的关系.

2 结果与讨论

2.1 回归曲线与线性范围

以内酯的质量色谱图中峰面积为纵坐标,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、BB 的线性方程及相关系数,在 0.12~68.0 μg/mL 范围内,3 种银杏内酯的线性关系如下:

$$\text{GA} \quad Y = 666\,296X \quad r^2 = 0.999\,4$$

$$\text{GB} \quad Y = 936\,301X \quad r^2 = 0.999\,2$$

$$\text{BB} \quad Y = 555\,063X \quad r^2 = 0.998\,4$$

回归曲线见图 1,选择离子质量色谱图(质谱图)见图 2.

2.2 方法的精密度与准确性

按 1.3 的实验条件对同一混合标样重复测定 5 次,3 种内酯的相对标准偏差 RSD 分别为 GA:0.38%,GB:0.43%,BB:0.44%,说明本方法较为准确、可靠.

2.3 样品的检测

用本方法对某银杏产品的银杏内酯提取液进

行了测定,质量色谱图见图 3,其中 13.8 min 处的峰由分子离子的质荷比(m/z 439)判断为 GC,经回归方程计算各种内酯的含量,由表 1 所示.GC 由于缺乏标样,无法计算其含量.

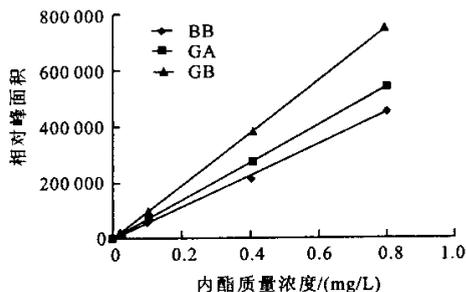


图 1 3 种内酯的回归直线

Fig. 1 The regression line of GA, GB, BB

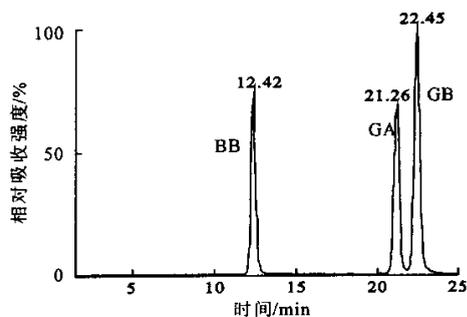


图 2 GA、GB、BB 的选择离子质量色谱图

Fig. 2 The SIR mass chromatogram of GA, GB, BB

表 1 某银杏产品的银杏内酯测定结果

Tab. 1 The analysis results of 3 samples

样品号	质量分数/(μg/g)		
	GA	GB	BB
1	0.12	0.120	0.25
2	0.11	0.094	0.26
3	0.08	0.066	0.16

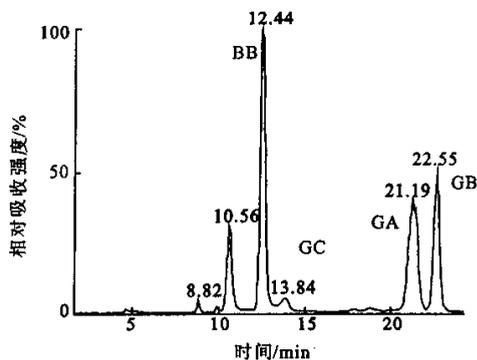


图 3 样品的选择离子质量色谱图

Fig. 3 The mass chromatogram of sample

2.4 检测器的选择

由于各种银杏内酯的结构很相似(见图4),且无特征紫外吸收,即使在210 nm吸收强度也很弱.另外,一般情况下所测样品中仅含有少量银杏叶提取物(GBE),银杏内酯的含量非常低,需经过多次提取、纯化、浓缩,以减少杂质的干扰,提高银杏内酯的浓度.因此样品预处理非常繁琐,给检测工作带来了以下困难,即(1)紫外检测器灵敏度不够,且受其它杂质干扰,本底高,不能适用(2)由于用等度洗脱难以将GA、GB在普通C-18柱上完全分离,所以必须采用梯度洗脱,如果用示差折光检测器,将会产生基线漂移,定量不准,且灵敏度比紫外检测器还差,所以也不适用(3)蒸发激光散射检测器灵敏度高,选择性好,但其响应是非线性应答,定量不准且价格昂贵.考虑到以上各种原因,作者采用质谱仪作为检测器,用液-质联用仪进行定量分析.由于它灵敏度很高,0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 银杏内酯即可产生足够的质谱信号,且精密度与准确性好,解决了灵敏度问题,而且质谱仪可以做到只对选定的质量产生信号,受其它杂质干扰少,对纯化、浓缩的要求大大降低,简化了预处理步骤.

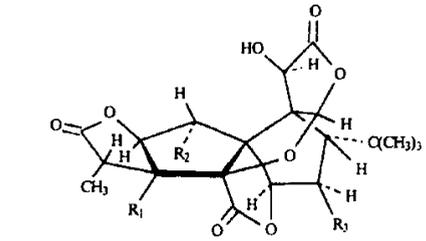
2.5 质谱条件的选择

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($M+1$ 或 $M-1$, 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.用注射泵直接进样,调节各参数,以得到最强的分子离子峰($M-1$),确定最佳实验条件,同时采用质谱的选择离子(SIR)采集方式,即选定325.3($M_{\text{BB}}-1$),407.4($M_{\text{GA}}-1$),423.4($M_{\text{GB}}-1$) β 个相对分子质量进行质谱扫描,可使灵敏度再提高2~3个数量级,有利于微量银杏内酯的检出.

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 724-725.
- [2] 梁立新. 银杏叶的开发利用及研究进展[J]. 世界林业研究, 1996(3): 44-55.
- [3] Braquer P. The ginkgolides potent platelet-activating factor antagonists isolated from ginkgo biloba L.: chemistry, pharmacology and clinical application[J]. *Drug of Future*, 1987, 12(7): 663.
- [4] 吴红菱. 银杏外种皮提取物中的内酯含量测定[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(5): 226.
- [5] 张健, 刘明登. 半制备高效液相色谱分离测定银杏内酯[J]. 化学研究与应用, 1997, 9(6): 622.
- [6] 张鉴. 反相高效液相色谱法测定银杏叶提取物中5种银杏内酯的含量[J]. 分析化学, 2000, 28: 53.
- [7] 管玉民, 尤慧莲. 不同类型银杏叶中银杏内酯的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(2): 107.
- [8] 吕伏生, 陈伟. ELSD检测法测定银杏酮酯注射液中银杏内酯A、B的含量[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(1): 34.

万方数据



ginkgolide A $R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = \text{H}$
ginkgolide B $R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$

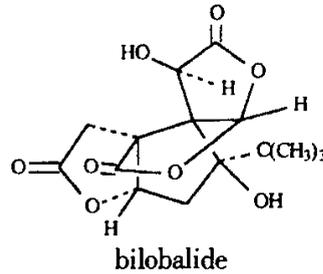


图4 内酯的结构

Fig.4 Molecular structure of GA GB BB

3 结论

作者采用近年来迅速发展的LC-MS方法,即将MS作为检测器,发挥其灵敏度高、精密度与准确性好的优点,不仅克服了前述检测上的困难,而SIR采集方式又使灵敏度提高了2~3个数量级,对于样品中微量银杏内酯的分析不失为一种好方法.

银杏内酯种类很多,由于作者只有3种内酯标样,故仅涉及该3种内酯的测定,在今后的工作中,将继续关注其它内酯的检测.作者主要研究仪器分析方法,且主要用标准银杏内酯作实验对象,有关样品中银杏内酯的提取、纯化等过程及其测定效果,作者将另行报道.

(责任编辑 朱明)