

采用岛津 LCMS-8045 测定 银杏酮酯中的总银杏酸

LCMSMS-397

摘要：本文参考国家药典委员会发布的《银杏酮酯国家药品标准公示稿 - 第二次》中的总银杏酸检查相关方法，利用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪对银杏酮酯样品中的总银杏酸进行了测定。测定结果显示：白果新酸、银杏酸 C15:1 和银杏酸 C17:1 在 0~200 ng/mL 浓度范围内各组分线性关系良好，相关系数均达到 0.999 以上，准确度范围在 88.9%~102.2% 之间；在最高线性点后对空白样品进行分析，3 种成分均未发现明显残留；以 10 ng/mL 和 50 ng/mL 的对照品溶液连续进样 6 次，保留时间和峰面积 RSD 分别在 0.30%~0.43% 和 0.53%~1.53% 之间，准确度范围为 105.8%~112.5%，仪器重复性良好；对银杏酮酯未知样品进行检测，3 种银杏酸组分均被检出，总银杏酸含量为 3.488 mg/kg。采用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪能有效检测银杏酮酯中的总银杏酸。

关键词：液质谱联用仪 银杏酮酯 总银杏酸

银杏酮酯为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶经加工制成的提取物。银杏药用价值最高的部位是银杏叶，其主要的活性成分为黄酮类、内酯类化合物和银杏酸。黄酮类化合物主要以黄酮苷形式存在，可有效清除自由基；内酯类化合物为强效血小板活化因子 (PAF) 拮抗剂；而银杏酸成分具有潜在的致敏和致突变作用以及强烈的细胞毒性和免疫毒性，因此在银杏相关制剂中应严格限定其含量。

对于银杏叶提取物中银杏酸的控制，2015 年版《中国药典》采用高效液相色谱法对总银杏酸进行检测，并规定银杏叶提取物中总银杏酸含量不得过

10 mg/kg。2019 年 5 月 30 日，国家药典委员会公示了拟修订的银杏酮酯、银杏酮酯片、银杏酮酯胶囊等银杏提取物相关制剂的国家药品标准。该部分国家药品标准公示稿中均采用了高效液相色谱 - 质谱法对总银杏酸进行检测，其中银杏酮酯药品标准规定了总银杏酸含量不得过 5 mg/kg。

本文参考国家药典委员会发布的《银杏酮酯国家药品标准公示稿 - 第二次》中的方法条件，采用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪对银杏酮酯样品中的总银杏酸进行了分析。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为 LC-20AD XR 液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC MP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST 2.1 mm I.D. × 100 mm L., 2.0 μm

流动相：A 相 - 1% 冰醋酸水溶液；B 相 - 甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样体积：1 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 90%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 8.00 | Pumps | Pump B Conc. | 90 |
| 8.10 | Pumps | Pump B Conc. | 99 |
| 17.00 | Pumps | Pump B Conc. | 99 |
| 17.10 | Pumps | Pump B Conc. | 90 |
| 22.00 | Controller | Stop | |

质谱条件

离子化模式：ESI，负离子模式

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：10.0 L/min

接口温度：300°C

DL 温度：250°C

碰撞气：氩气 230 kPa

加热模块温度：400°C

干燥气流速：10.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

接口电压：3.0 KV

驻留时间：50 ms

MRM 参数：见表 2

样品前处理

2.1 对照品溶液制备

分别取白果新酸对照品、银杏酸 C15:1 对照品、银杏酸 C17:1 对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 各含 50 μg 的混合溶液，作为对照品贮备液。临用前，分别精密量取对照品贮备液适量，加甲醇制成每 1 mL 各含 0 ng、10 ng、20 ng、50 ng、100 ng、200 ng 的系列混合溶液，作为对照品溶液。

表 2 MRM 优化参数

| No. | 中文名称 | 英文名称 | CAS 号 | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bias(V) | CE(V) | Q3 Pre Bias(V) |
|-----|-----------|-----------------------|-------------|--------|---------|----------------|-------|----------------|
| 1 | 白果新酸 | Ginkgoneolic acid | 20261-38-5 | 319.25 | 275.20* | 16.0 | 23.0 | 28.0 |
| | | | | | 106.10 | 16.0 | 39.0 | 10.0 |
| 2 | 银杏酸 C15:1 | Ginkgolic acid(C15:1) | 22910-60-7 | 345.20 | 301.20* | 12.0 | 23.0 | 20.0 |
| | | | | | 119.00 | 24.0 | 47.0 | 20.0 |
| 4 | 银杏酸 C17:1 | Ginkgolic acid(C17:1) | 111047-30-4 | 373.30 | 329.30* | 19.0 | 25.0 | 22.0 |
| | | | | | 106.00 | 19.0 | 43.0 | 10.0 |

* 代表定量离子对

2.2 供试品溶液制备

取本品粉末约 0.4 g，平行两份，精密称定，分别置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 10 mL，称定重量，超声处理 20 分钟（功率 180 W，频率 42 kHz），放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，滤过，取续滤液，即得。

结果与讨论

3.1 MRM 色谱图

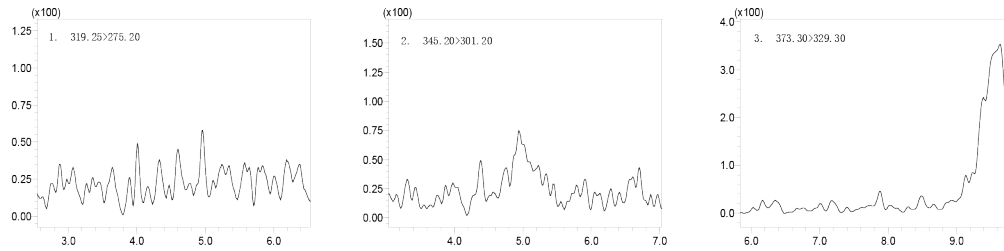


图 1 对照品溶液 MRM 图 (0 ng/mL)

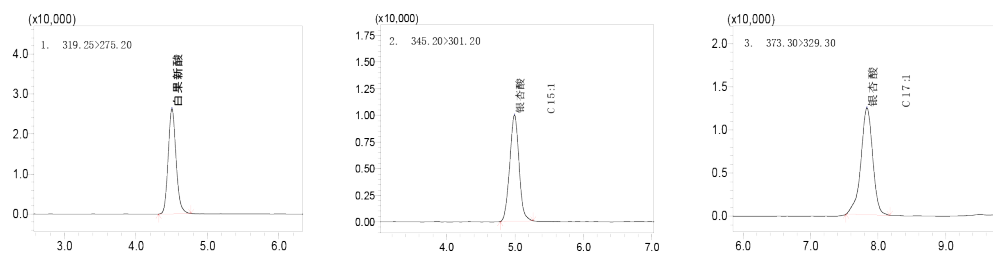


图 2 对照品溶液 MRM 图 (10 ng/mL)

3.2 标准曲线

分别取 0 ng、10 ng、20 ng、50 ng、100 ng、200 ng 的对照品溶液 1 μ L 进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标做标准曲线，标准曲线相关信息如图 3 和表 3 所示。

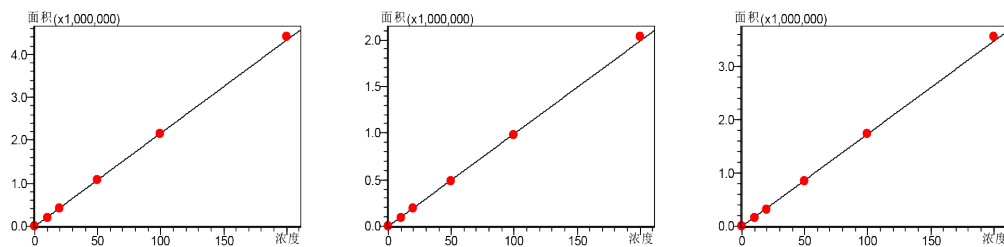


图 3 3 种银杏酸组分标准曲线

表 3 3 种银杏酸组分标准曲线结果

| 目标物 | 线性方程 | 线性范围 (ng/mL) | 相关系数 | 准确度 (%) |
|-----------|-------------------------------|--------------|--------|------------|
| 白果新酸 | $Y = (21696.1)X + (-2758.70)$ | 0~200 | 0.9997 | 93.2~101.5 |
| 银杏酸 C15:1 | $Y = (9941.56)X + (-1187.32)$ | 0~200 | 0.9997 | 94.0~102.0 |
| 银杏酸 C17:1 | $Y = (17342.1)X + (-3368.61)$ | 0~200 | 0.9994 | 88.9~102.2 |

3.3 残留考察

在 200 ng/mL 的对照品溶液分析完成后对空白样品进行分析，结果如图 4 所示。空白样品在 3 种银杏酸组分出峰位置均无明显色谱峰，不影响样品中待测组分的检测。

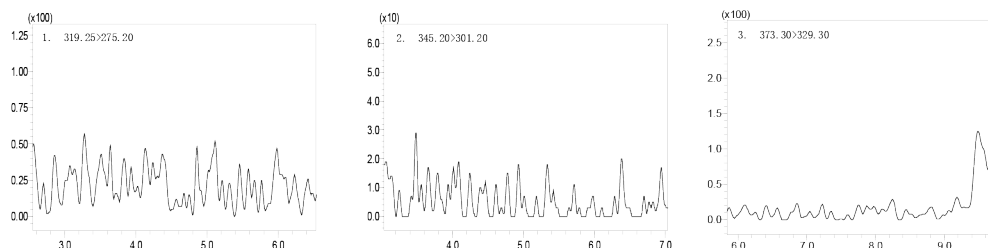


图 4 3 种银杏酸组分残留结果

3.4 重复性实验

取 10 ng/mL、50 ng/mL 对照品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 4。结果表明：3 种银杏酸组分的保留时间和峰面积 RSD 分别在 0.30%~0.43% 和 0.53%~1.53% 之间，准确度范围为 105.8%~112.5%，仪器重复性良好。

表 4 3 种银杏酸组分重复性结果

| 目标物 | 理论浓度 (ng/mL) | 保留时间 RSD(%) | 峰面积 RSD(%) | 实测浓度 (ng/mL) | 准确度 (%) |
|-----------|--------------|-------------|------------|--------------|---------|
| 白果新酸 | 10 | 0.43 | 0.95 | 10.97 | 109.7 |
| | 50 | 0.42 | 0.46 | 52.92 | 105.8 |
| 银杏酸 C15:1 | 10 | 0.41 | 1.14 | 11.17 | 111.7 |
| | 50 | 0.41 | 0.88 | 56.26 | 112.5 |
| 银杏酸 C17:1 | 10 | 0.37 | 1.53 | 10.98 | 109.8 |
| | 50 | 0.30 | 0.53 | 55.64 | 111.3 |

3.5 样品测定

取 2.2 项下的供试品溶液各 1 μL 进样，样品测定图谱及结果如图 5 和表 5 所示。结果表明：在银杏酮酯未知样品中，检出与白果新酸、银杏酸 C15:1 和银杏酸 C17:1 对照品保留时间对应的色谱峰，且监测离子对与对照品监测离子对丰度比一致，待测样品总银杏酸含量为 3.488 mg/kg。

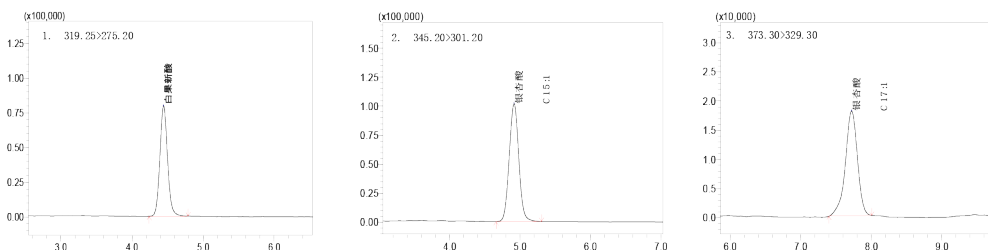


图 5 银杏酮酯样品分析图谱

表 5 银杏酸定性分析结果

| 目标物 | 白果新酸 | 银杏酸 C15:1 | 银杏酸 C17:1 |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 参比离子 | 319.25>106.10 | 345.20>119.00 | 373.30>106.00 |
| 离子丰度识别范围 | 15.75 - 26.25 | 3.50 - 10.50 | 7.00 - 13.00 |
| 10 ng/mL 对照品 | 22.03 | 7.50 | 12.20 |
| 20 ng/mL 对照品 | 21.44 | 6.92 | 9.37 |
| 50 ng/mL 对照品 | 21.25 | 7.65 | 10.10 |
| 相对离子丰度 100 ng/mL 对照品 | 21.66 | 7.77 | 9.67 |
| 200 ng/mL 对照品 | 21.19 | 7.61 | 9.93 |
| 样品 1 | 20.52 | 8.11 | 9.72 |
| 样品 2 | 21.36 | 7.98 | 9.88 |
| 定性结果 | 通过 | 通过 | 通过 |

注：相对离子丰度 >50%，允许 ±20% 的相对偏差；相对离子丰度 20%~50%，允许 ±25% 的相对偏差；相对离子丰度 10%~20%，允许 ±30% 的相对偏差；相对离子丰度 <10%，允许 ±50% 的相对偏差。

表 6 银杏酸定量分析结果

| 结果 | 样品 1 | 样品 2 | 总银杏酸平均含量 (mg/kg) |
|----------------------|-------|-------|------------------|
| 白果新酸含量 (mg/kg) | 0.700 | 0.710 | |
| 银杏酸 C15:1 含量 (mg/kg) | 2.458 | 2.472 | 3.488 |
| 银杏酸 C17:1 含量 (mg/kg) | 0.319 | 0.318 | |

结论

本文参考国家药典委员会发布的《银杏酮酯国家药品标准公示稿 - 第二次》中的液相色谱 - 质谱法检测总银杏酸的相关条件，采用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪对银杏酮酯样品中的总银杏酸进行了测定。测定结果显示：白果新酸、银杏酸 C15:1 和银杏酸 C17:1 在 0~200 ng/mL 浓度范围内各组分线性关系良好；在最高线性点后对空白样品进行分析，3 种成分均未发现明显残留；以 10 ng/mL 和 50 ng/mL 的对照品溶液连续进样 6 次，仪器重复性良好；对银杏酮酯未知样品进行检测，3 种银杏酸组分均被检出，总银杏酸含量为 3.488 mg/kg。本实验为重现国家药品标准方法，结果表明采用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪能有效检测银杏酮酯中的总银杏酸。