

注射用银杏叶提取物及其制剂中 总银杏酸含量的测定

孙 健 李丽敏 胡 青 诸艳蓉 毛秀红 季 申

(上海市食品药品检验所, 上海, 201203)

摘要 目的:建立超高效液相色谱串联三重四极杆质谱测定注射用银杏叶提取物及其制剂中总银杏酸的方法。方法:采用 HLB 固相萃取净化制剂, Waters Cortecs T3 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 2.7 μm), 以甲醇-1% 冰醋酸溶液(90:10)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。结果:银杏酸 C13:0、C15:1、C17:1 在 0~50 ng/mL 范围内成良好线性关系, 相关系数均大于 0.999; 平均加样回收率为 97.3%~115.2%, 相对标准偏差(RSD)为 0.3%~3.4%; 检出限分别为 0.03、0.06、0.04 mg/kg。结论:本方法可应用于实际样品的测定。

关键词 银杏叶提取物; 注射剂; 银杏酸 C13:0; 银杏酸 C15:1; 银杏酸 C17:1; 超高效液相色谱-三重四极杆质谱; 多重反应监测; 固相萃取

Determination of Ginkgolic Acids in the Ginkgo Biloba Extract for Injection and its Preparation

Sun Jian, Li Limin, Hu Qing, Zhu Yanrong, Mao Xiuhong, Ji Shen

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To develop an analytical method for determination of ginkgolic acids in the ginkgo biloba extract for injection and its preparation by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Methods:** The preparations were purified by HLB SPE. A chromatographic column, Waters Cortecs T3 (50 mm × 2.1 mm, 2.7 μm), was used with methanol-1% acetic acid (90:10) as the mobile phase. The ginkgo acids were detected by electrospray ionization mass spectrometry in negative mode with multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results:** Ginkgo Acid C13:0, C15:1 and C17:1 possessed good linear correlation in the mass concentration range from 0 to 50 ng/mL, with the correlation coefficients more than 0.999. The mean recoveries were in the range of 97.3%-115.2%, and the RSDs were 0.3%-3.4%. The limits of quantification were 0.03, 0.06, 0.04 mg/kg, respectively. **Conclusion:** The method could be applied to the analysis of ginkgolic acids in actual samples.

Key Words Ginkgo biloba extract; Injection; Ginkgolic acid C13:0; Ginkgolic acid C15:1; Ginkgolic acid C17:1; Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Multiple reaction monitor; Solid-phase extraction

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.04.006

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。其注射剂多用于改善微血管循环、治疗缺血性心脑血管疾病等。

银杏酸是银杏叶提取物中最主要的毒性物质, 具有潜在的致敏、致突变作用和强烈的细胞毒性作用^[1-2]。银杏酸是 6-烷基或 6-烯基水杨酸的衍生物, 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^[3]。《中华人民共和国药典》2015 年版^[4] 规定银杏叶提取物中总银杏酸含量不得过百万分之十。美国药典和欧洲药典以 3 种银杏酸含量之和作为总银杏酸含量^[5], 规定总银杏酸含量不得过百万分之五。而注射剂作为高风险剂型,

应当更加严格控制其含量。

目前, 文献^[6-10] 多采用 HPLC 法测定银杏叶提取物中总银杏酸含量, 但受限于该方法的灵敏度, 检出限已接近百万分之十的限度, 不能满足更加严格的限量控制要求。为提高灵敏度和专属性, 亦有文献采用 LC/MS 法^[11]、GC/MS 法^[12]、二维液相色谱法^[13] 等。

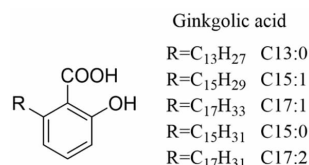


图 1 银杏酸化学结构

作者团队近年来已针对多种基质开发了 UH-PLC/MS/MS 法测定其中总银杏酸含量(3 种主要银

基金项目: 上海市科学技术委员会基金项目(18DZ2292200)

作者简介: 孙健(1985.12—), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药检验和安全性检测, E-mail: sunjian_0000@163.com

通信作者: 季申(1963.08—), 女, 博士, 主任药师, 研究方向: 中药质量控制和安全性检测技术研究, E-mail: jishen2013@163.com

表 1 监测离子对、碰撞能量等质谱条件

名称	母离子	定量离子对	碰撞电压(V)	定性离子对	碰撞电压(V)
银杏酸 C13:0	319. 2	319. 2→275. 2	25	319. 2→106. 1	49
银杏酸 C15:1	345. 2	345. 2→301. 2	21	345. 2→119. 0	49
银杏酸 C17:1	373. 3	373. 3→329. 3	29	373. 3→106. 0	49

杏酸 C13:0、C15:1、C17:1 总量)^[14-15]。因注射用银杏叶提取物更加严格的限量控制(不得过百万分之二),且其制剂杏苧氯化钠注射液中银杏叶提取物含量极低(约 110 μg/mL)、基质复杂(磷酸川芎嗪、氯化钠等辅料),目前缺乏相关研究。本文建立了 UHPLC-MS/MS 法解决灵敏度问题,采用的固相萃取前处理技术解决制剂纯化富集的问题。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 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 HLB 固相萃取柱(规格:1 g/20 mL)。

1.2 试剂 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。

1.3 分析样品 10 批注射用银杏叶提取物和 3 批杏苧氯化钠注射液均为生产企业弘和制药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱质谱条件 采用 Waters Cortecs T3 色谱柱(50 mm×2.1 mm,2.7 μm),以甲醇-1%冰醋酸溶液(90:10)为流动相,待测成分全部出峰后以甲醇-1%冰醋酸溶液(99:1)充分清洗至少 10 倍柱体积;对照品溶液及提取物供试品溶液进样量 1 μL,注射液进样量 5 μL。

电喷雾离子化(ESI)负离子模式;干燥气(N₂)流速 15 L/min,温度 225℃;雾化气(N₂)0.21 MPa;鞘气(N₂)流速 11 L/min,温度 300℃;毛细管电压 3 000 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。

2.2 对照品溶液的制备 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,加甲醇制成各含 50 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、1 ng/mL、0 ng/mL 的系列混合溶液,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 1)注射用银杏叶提取

物:取本品粉末约 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,超声(功率 180 W,频率 42 kHz)20 min,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。2)杏苧氯化钠注射液:精密量取样品 1 000 mL,上 Waters oasis HLB 固相萃取柱(规格:1 g/20 cc,预先依次用 10 mL 甲醇和 10 mL 水活化)上,用 80% 甲醇 10 mL 清洗,弃去洗液,再用甲醇 20 mL 洗脱,收集洗脱液并定容至 25 mL,滤过,取续滤液,即得。

2.4 专属性试验 取注射液空白样品(缺银杏叶提取物),同 2.3 2)制备空白溶液,进样测定,结果空白无干扰。

2.5 线性关系考察 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,加甲醇制成 50 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、1 ng/mL、0 ng/mL 的系列混合溶液,作为对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 1 μL,注入液相质谱仪,记录峰面积,以峰面积为纵坐标,以浓度为横坐标,绘制标准曲线,结果表明,各银杏酸线性关系良好。见表 2。

表 2 3 种银杏酸的线性关系考察

银杏酸	线性范围	线性方程	相关系数 r
C13:0	0~50 ng/mL	y=2 049.79x+190.82	0.999 82
C15:1	0~50 ng/mL	y=1 383.97x-84.63	0.999 75
C17:1	0~50 ng/mL	y=1 445.27x-45.13	0.999 67

2.6 中间精密度试验 为考察随机变动因素对精密度的影响,按照拟订的方法,由不同的分析人员在不同的日期、不同仪器设备对 3 批样品进行了含量测定。结果表明,由不同的分析人员在不同的日期、不同仪器设备上测得的结果基本一致,方法的中间精密度良好。见表 3。

表 3 中间精密度(mg/kg)

编号	分析员 A	分析员 B
1	0.7	0.7
2	0.2	0.2
3	0.3	0.2

2.7 供试品溶液稳定性试验 取供试品溶液,分别于制备好后放置 0 h、12 h、21 h 时进样测定。结果

表明,银杏酸 C13:0、C15:1 和 C17:1 的峰面积 RSD 分别为 8.2%、5.2% 和 6.2%,基本稳定。

2.8 重复性试验 取注射用银杏叶提取物,一式 6 份,制备 6 份供试品溶液,进样测定,记录峰面积,计算峰面积/称样量,结果表明,方法的重复性良好。见表 4。

表 4 重复性试验		
银杏酸	峰面积/称样量	RSD(%)
C13:0	14 298.9	1.4
	14 277.6	
	14 569.4	
	14 182.1	
	13 966.9	
	14 106.9	
	15 381.6	
	14 737.0	
C15:1	15 430.7	2.4
	15 789.2	
	15 744.0	
	15 423.5	
	12 829.1	
	13 459.7	
	12 598.9	
	13 373.3	
C17:1	13 269.7	3.8
	12 226.7	

2.9 回收率试验 取注射用银杏叶提取物(经检测银杏酸 C13:0 含量 0.058 mg/kg,银杏酸 C15:1 含量 0.076 mg/kg,银杏酸 C17:1 含量 0.083 mg/kg),研细,取约 0.4 g,一式九份,精密称定,以三份为一组,分别添加低(0.125 mg/kg)、中(0.625 mg/kg)、高(1.25 mg/kg)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 2.3 供试品溶液的制备方法 1)和 2.1 色谱质谱条件进行分析。

精密量取杏芍氯化钠注射液(经检测银杏酸 C13:0 含量 4 ng/L,银杏酸 C15:1 含量 5 ng/L,银杏酸 C17:1 含量 8 ng/L)1 000 mL,一式 6 份,添加 0.1 μg/L 水平的对照品溶液,按上述 2.3 供试品溶液的制备方法 2)和 2.1 色谱质谱条件进行分析。

结果表明,加样回收率良好,方法准确度高。见表 5。

2.10 检出限 三重四极杆质谱因其高度专属性,噪声较低,以信噪比计算检出限结果易失真。因此本文以供试品溶液多级稀释,以实际检出浓度作为检出限。结果银杏酸 C13:0、C15:1 和 C17:1 的检出限分别为 0.03 mg/kg、0.06 mg/kg 和 0.04 mg/kg,满足总银杏酸百分之二的限度检查要求。

2.11 样品测定结果 对企业提供的 10 批注射用银杏叶提取物和 3 批杏芍氯化钠注射液进行测定,银杏酸 MRM 色谱图见图 2,结果见表 6 和表 7,均符合原料百万分之二的限度要求。

表 5 回收率和精密度试验						
银杏酸	提取物			注射液		
	加样水平 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)	加样水平 (μg/L)	回收率 (%)	RSD (%)
C13:0	0.125	98.2	0.8	0.1	115.2	3.4
	0.625	99.1	1.1			
	1.25	99.0	1.8			
C15:1	0.125	99.7	1.4	0.1	111.3	2.8
	0.625	98.3	0.6			
	1.25	97.3	3.1			
C17:1	0.125	99.5	0.5	0.1	98.7	2.9
	0.625	100.4	1.7			
	1.25	101.5	0.3			

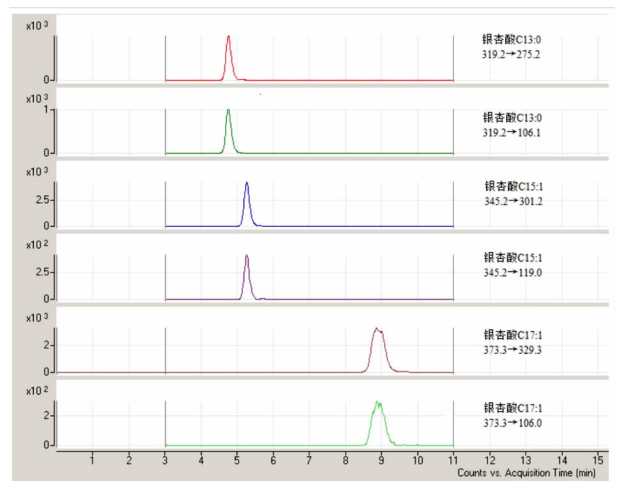


图 2 银杏酸 MRM 色谱图

表 6 注射用银杏叶提取物测定结果(mg/kg)			
编号	含量	编号	含量
1	0.7	6	0.3
2	0.2	7	0.4
3	0.3	8	0.4
4	0.3	9	0.4
5	0.8	10	0.5

表 7 杏芍氯化钠注射液测定结果		
编号	含量(μg/L)	折算至提取物中含量(mg/kg)
1	0.08	0.7
2	0.02	0.2
3	0.02	0.2

3 讨论

3.1 检测指标 银杏酸主要包括 5 个成分,中华人民共和国药典 2015 年版一部银杏叶提取物总银杏酸检查项即以银杏酸 C13:0(白果新酸)的校正因子

一测多评 5 种银杏酸含量。但以 LC-MS/MS 法测定总银杏酸含量,无法使用一测多评法,需使用标准品外标法定量。目前银杏酸 C15:0、C17:2 对照品不易获得,样品中含量很低,且银杏酸 C17:2 结构中含 2 个双键,顺反异构体较多,目前尚未研究透彻。且 3 种银杏酸已占银杏酸总量的 94% 以上,美国药典即以该 3 种银杏酸含量之和作为总银杏酸含量,欧洲药典以银杏酸 C17:1 的校正因子一测多评 3 种银杏酸含量。故本方法以外标法测定 3 种含量较高的银杏酸(C13:0、C15:1、C17:1),足以表征银杏酸总量。

3.2 流动相的选择 比较 1% 冰醋酸溶液、0.1% 冰醋酸溶液、5 mmol/L 乙酸铵溶液和 5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 氨水)4 种水相流动相对于银杏酸质谱响应的影响,发现 5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 氨水)为水相时,响应最高,但色谱保留和峰形均较差,易导致定量准确性差。1% 冰醋酸溶液为水相时,色谱分离度、峰形均较好,且响应能够满足灵敏度需要。

银杏酸 C17:1 结构中有一个双键,存在 2 种顺反异构体,未完全分离,峰形稍差。因本方法为测定银杏酸总量,且中华人民共和国药典 HPLC 法同样未将该顺反异构体完全分离,故参照中华人民共和国药典 2010 年版确定甲醇-1% 冰醋酸溶液(90:10)为流动相。

3.3 基质效应 色谱中共馏出组分未对待测银杏酸产生基质效应;但样品中存在部分保留极强残留于色谱柱中的成分,与后续样品共馏出产生基质增强效应,可使银杏酸 C17:1 增强 3 倍以上。因此待银杏酸全部出峰后以甲醇-1% 冰醋酸溶液(99:1)充分清洗色谱峰至少 10 倍柱体积,避免基质效应。

3.4 制剂采用固相萃取前处理的必要性 杏苧氯化钠注射液处方中包括磷酸川芎嗪、银杏叶提取物、氯化钠。如直接进样,磷酸川芎嗪含量过高,可能污染仪器,并产生基质效应,而氯化钠为非挥发性盐,对仪器产生永久性伤害。另按处方量折算,需取样 1 000 mL,方可满足检测灵敏度要求。因此样品必须经富集纯化后方能进样测定。因银杏酸在反相色谱中保留较强,故采用 HLB 固相萃取柱分离基质与银杏酸。

3.5 制剂与原料银杏酸含量比较 通过测定 3 批银杏叶提取物及对应批次的注射液,测定结果表明,制剂中总银杏酸含量与对应批次的提取物含量基本一致,制剂工艺未影响总银杏酸含量。见表 8。因

此,控制好原料中的银杏酸含量对于本品安全性尤为重要,而银杏叶提取物制法中的大孔吸附树脂净化是其中的关键步骤,必须加以严格控制。

表 8 制剂与原料总银杏酸含量比较

注射液 编号	批号	含量 ($\mu\text{g/L}$)	折算至提取物中 含量(mg/kg)	对应提取物 批号	含量 (mg/kg)
1	20170501	0.08	0.7	1	0.7
2	20170610	0.02	0.2	2	0.2
3	20170705	0.02	0.2	3	0.3

参考文献

- [1] 刘平平,潘苏华.银杏叶制剂中银杏酚酸研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(3):274-277.
- [2] 杨扬,周斌,赵文杰.银杏叶史话:中药/植物药研究开发的典范[J].2016,47(15):2579-2591.
- [3] 吴向阳,仰榴青,陈钧.高效液相色谱法测定银杏叶提取物及其制剂中银杏酸的含量[J].药学报,2003,38(11):846-849.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].1部.北京:中国医药科技出版社,2015:416-417.
- [5] United States Pharmacopoeial Convention. United States Pharmacopoeia, 41 Revision, Volume 3[S]. Baltimore: United Book Press, 2018: 4460-4663.
- [6] Ruwei W, Yuta K, Yu L, et al. HPLC quantification of all five ginkgolic acid derivatives in Ginkgo biloba Extracts using 13: 0 ginkgolic acid as a single marker compound[J]. Planta Med, 2015, 81:71-78.
- [7] 郑云枫,阚宏飞,杨阳,等.复方银杏叶制剂中总银杏酸含量测定方法的优化[J].中国现代中药,2018,20(10):1282-1287.
- [8] 马海霞,杨广安,谭琪明,等.银杏达莫注射液中总银杏酸 HPLC 检测法的建立及其含量分析[J].辽宁化工,2017,46(12):1229-1232.
- [9] 李兰崇,尹志芳,杨宇强,等.几种银杏类制剂中银杏酸的高效液相色谱法测定[J].中国实用医药,2015,10(1):233-235.
- [10] 姚建标,方玲,王如伟,等.中国药典和欧洲药典银杏叶提取物中银杏酸限度检测方法比较研究[J].药物分析杂志,2012,32(11):2055-2059.
- [11] Yao X, Xue P, Yu DH, et al. Determination of ginkgolic acids in ginkgo leaves extract from different manufacturers by UPLC-MS/MS[J]. ChinJExpTraditMedFormulae, 2017, 23(6): 174-179.
- [12] Mei W, Jianping Z, Bharathi A, et al. High-resolution gas chromatography/mass spectrometry method for characterization and quantitative analysis of ginkgolic acids in Ginkgo biloba plants, extracts, and dietary supplements[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62: 12103-12111.
- [13] 杜小弟,李俊升,郭丽萍,等.二维液相色谱法在线富集测定银杏叶提取物中银杏酸含量[J].分析测试学报,2018,37(6):682-688.
- [14] 孙健,李丽敏,胡青,等.超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定银杏叶提取物及其制剂中银杏酸[J].色谱,2016,34(2):184-188.
- [15] 孙健,张雪怡,李丽敏,等.混合型固相萃取-UHPLC/MS/MS 法测定银杏酯滴丸中银杏酸含量[J].药学报,2018,53(9): 1532-1535.