

HPLC-ELSD 结合化学计量学研究银杏叶片中 萜类内酯指纹图谱*

吴雨龙^{1,2,4}, 李艳静^{1,4}, 王佩香^{1,4}, 丁 岗^{1,4}, 李 萍²,
段金廛^{3,4}, 萧 伟^{1,4**}

- (1. 江苏康缘药业股份有限公司 连云港 222001;
2. 中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室 南京 210009;
3. 南京中医药大学/江苏省方剂研究重点实验室 南京 210046;
4. 中药制药过程新技术国家重点实验室 连云港 222001)

摘 要:目的:建立不同厂家银杏叶片中萜类内酯成分 HPLC-ELSD 指纹图谱。方法:色谱柱为 Agilent Extend-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为正丙醇-四氢呋喃-水 (1:15:84), 柱温为 30℃, 流速为 1 mL·min⁻¹, 蒸发光散射检测器检测;采用 LC/Q-TOF MS 对指纹图谱中的共有峰进行指认。并利用化学计量学方法,包括主成分分析 (PCA)、相似度分析 (SA)、聚类分析 (HCA), 对色谱数据进行分析。结果:该方法精密度、稳定性、重复性良好。同时采用 LC/Q-TOF MS 方法指认了 5 个共有峰,分别为银杏内酯 J (M)、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B 及白果内酯。并采用该方法测定了市售 14 批银杏叶片,结合 PCA、SA 及 HCA 生成了银杏叶片中萜类内酯对照指纹图谱,并根据质量差异将样品分为 4 大类。结论:本方法可用于银杏叶片中萜类内酯成分的质量评价。

关键词:银杏叶片 萜类内酯 HPLC-ELSD 指纹图谱 化学计量学 质量评价

doi: 10.11842/wst.2013.09.017 中图分类号:R284 文献标识码:A

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 又名白果树,其叶是一种古老的传统中药。研究表明,银杏叶中主要含有黄酮、萜类内酯、酚酸、聚戊烯醇、氨基酸、微量元素等成分^[1]。其中,萜类内酯为银杏叶主要活性成分之一,对血小板活化因子 (Platelet Activating Factor, PAF) 具有特异性的拮抗作用^[2]。已从银杏叶中发现的萜类内酯有银杏内酯 A、B、C、J、M、K、L、Q、P 及白果内酯,结构见图 1^[3~5]。

银杏叶片是采用银杏叶提取物 (Extract of *Ginkgo*

biloba, EGb) 制成的口服制剂,其有效成分为黄酮和萜类内酯,临床上主要用于治疗心脑血管疾病。由于国内外银杏叶片的生产厂家众多,产品质量参差不齐,其质量得不到有效控制。目前 2010 版《中国药典》及 USP-NF32 均采用测定总萜类内酯 (银杏内酯 A、B、C 及白果内酯) 含量的方法控制银杏叶片中萜类内酯的质量^[6,7]。虽然这种方法在国际上已经被广泛采用,但是仍然存在着一定的不足,如不能反映各主要成分的含量。

本文以中药注射剂指纹图谱研究技术要求为指导,采用 HPLC-ELSD 结合化学计量学方法,包括相似

收稿日期:2013-07-18

修回日期:2013-12-18

* 江苏省科技厅科技成果转化项目 (BA2010109) 缺血性中风治疗药物银杏内酯注射液的研发及产业化,负责人:萧伟;科学技术部国家科技支撑计划 (2011BAI04B03) 华东区中药材规范化种植及大宗中药材综合开发技术研究——银杏叶系列产品质量标准提升及银杏资源综合利用,总课题负责人:段金廛,子课题负责人:萧伟。

** 通讯作者:萧伟,本刊编委,研究员级高级工程师,博士,主要研究方向:中药制剂的研究与开发。

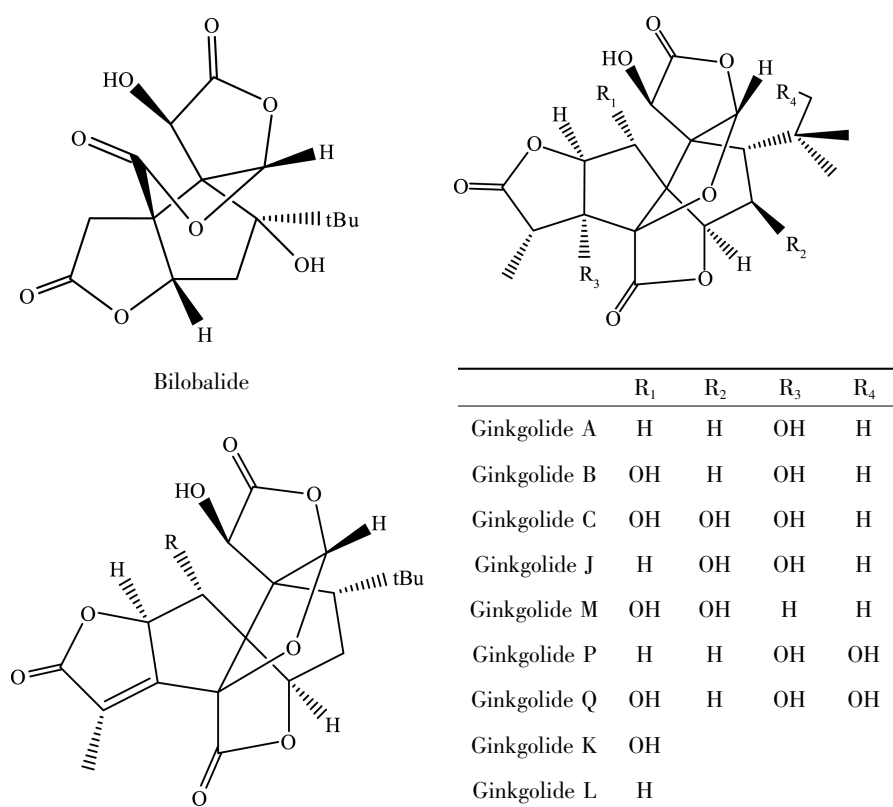


图1 银杏叶中萜类内酯成分的结构式

度分析(SA)、主成分分析(PCA)及聚类分析(HCA),建立了一种简单、可靠的指纹图谱方法,用于表征银杏叶片中萜类内酯成分及评价银杏叶片的质量。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪 Agilent LC1260 infinity 液相系统包括四元泵,在线脱气机,自动进样器,柱温箱, G4318 蒸发光散射检测器(ELSD);质谱检测器为 Agilent 6538 Q-TOF/MS (Agilent Corp, USA),电喷雾(ESI)离子源。GA-2000A 低噪音空气泵(北京中兴汇利科技发展有限公司),十万分之一电子天平(梅特勒-托利多上海有限公司),超声清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯, Tedia, USA), 正丙醇(色谱纯, Tedia, USA), 四氢呋喃(色谱纯, Merck, Germany), 超纯水由 Mill-Q 系统制得(Millipore, USA), 其它试剂均为分析纯, 购于南京化学试剂有限公司。

银杏内酯 A (批号:110862-201009)、银杏内酯 B (批号:110863-201209)、银杏内酯 C (批号:110864-200906)、白果内酯(批号:110865-200605)

对照品, 均购于中国食品药品检定研究院。银杏叶片样品均为市售, 购于南京市各药店。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Extend-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相:正丙醇-四氢呋喃-水(1:15:84), 柱温:30℃, 流速:1.0 mL·min⁻¹, 进样量:10 μL;ELSD 条件:漂移管温度为 55℃, 载气压力 3.5 bar, Gain 值 6。

2.2 质谱条件

ESI 离子源, 干燥气流速 8.0 L·min⁻¹, 干燥气温度 350℃, 雾化压力 40 psig, 正离子模式, 毛细管电压 3 500 V, 裂解电压 135 V, 离子扫描范围设置为 m/z 100~1 700。

2.3 供试溶液制备

取银杏叶片 20 片, 除去包衣, 精密称重, 研细。取相当于萜类内酯标示量 19.2 mg 的粉末, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入无水乙醇 50 mL, 密塞, 超声处理(功率 250 kW, 频率 33 kHz) 20 min, 放冷, 再称定重量, 用无水乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 20 mL, 水浴回收无水乙醇。残渣加水 10 mL, 置水浴中温热使溶散, 加 2% 盐酸溶液 2 滴, 用乙酸乙酯振摇提取 4 次(15、10、10、10 mL), 合并乙酸乙酯提取液, 用 5% 醋酸钠溶液 20 mL 洗涤, 分取醋酸钠液, 再用乙酸乙酯 10 mL 洗涤。合并乙酸乙酯提取液及洗液, 用水洗涤 2 次, 每次 20 mL, 合并水液, 用乙酸乙酯 10 mL 洗涤, 合并乙酸乙酯液, 回收至干, 残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 对照品溶液制备

分别取银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 及白果内酯对照品适量, 精密称定, 加甲醇配制成浓度均为 0.5 mg·L⁻¹ 的单标溶液, 作为对照品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度考察

取同一供试品溶液, 按“2.1”项下条件连续测定

6次,考察各共有峰相对保留时间及相对峰面积的RSD。结果表明各共有峰相对保留时间的RSD<0.3%,相对峰面积的RSD<5.0%,色谱图相似度>0.99,说明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性考察

取同一供试品溶液按“2.1”项下条件,分别在0、2、4、8、12、16、24 h测定,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果表明各共有峰相对保留时间RSD<0.4%,相对峰面积的RSD<4.5%,色谱图相似度>0.98,说明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5.3 重复性考察

按照“2.3”项下供试品溶液制备方法平行处理同一批次样品6份,按“2.1”项下条件分别测定,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果表明各共有峰相对保留时间RSD<0.2%,相对峰面积的RSD<4.5%,色谱图相似度>0.99,说明该方法重复性良好。

2.6 色谱图采集

分别取14批银杏叶片样品,按“2.3”项供试品溶液的制备方法制备,按“2.1”项下色谱条件分别测定,记录其HPLC-ELSD图,见图2。

2.7 共有峰的鉴定

根据14批样品色谱图中各色谱峰的相对保留

时间,确定共有峰,并选取其中5个共有峰作为特征指纹峰(标记为1~5)。采用HPLC/Q-TOF MS技术对HPLC图中的共有峰进行鉴定。通过与对照品银杏内酯A、银杏内酯B、银杏内酯C和白果内酯的质谱信息和保留时间等比对,可确定峰2、3、4和5分别为银杏内酯C、白果内酯、银杏内酯A和银杏内酯B。对未知化合物1进行二级质谱分析。由于化合物1含量极低,未能获得其二级质谱信息,由一级质谱信息可知化合物1为银杏内酯B的同分异构体(MW 424, $C_{20}H_{24}O_{10}$),推断可能为银杏内酯J或银杏内酯M^[8-10]。

2.8 数据分析

采用IBM开发的SPSS Statistics 19.0软件对14批样品的色谱数据进行PCA及HCA分析。相似度分析及共有模式的生成采用由国家药典委员会主持开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004B)》。

2.8.1 主成分分析

在进行相似度分析及建立对照指纹图谱时,不合格样本的存在会降低整体相似度分析结果,使其达不到相似度须在0.9~1.0的要求。此外,这种情况会使建立的对照指纹图谱失去真实性及可靠性。因此,进行相似度分析及建立对照指纹图谱之前,有

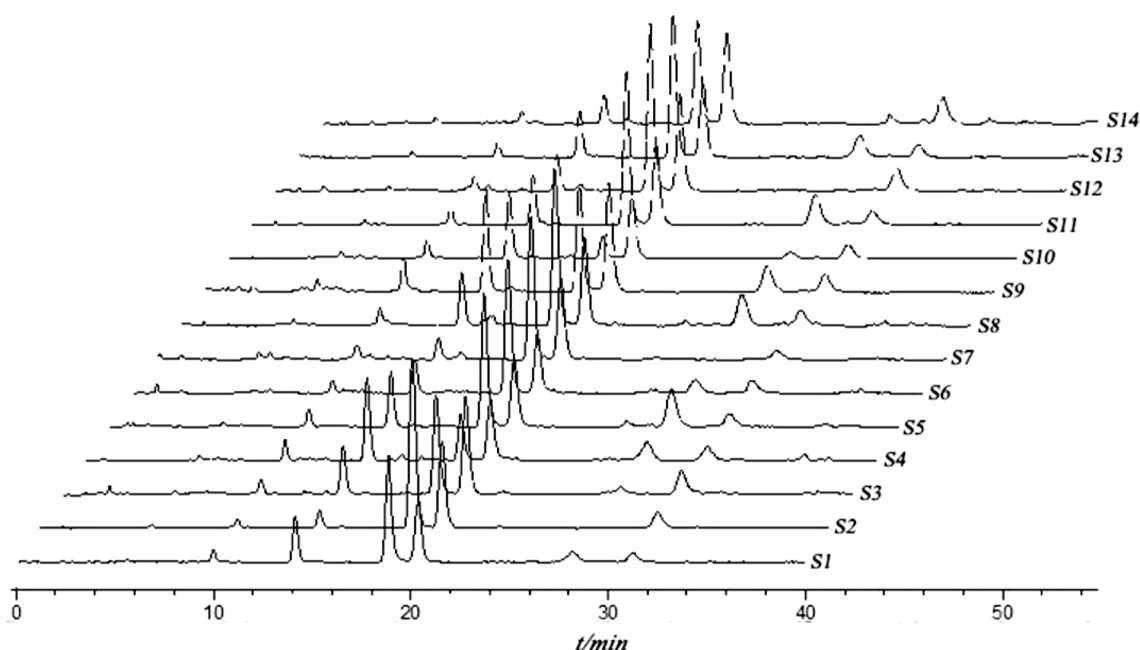


图2 14批银杏叶片样品萜类内酯成分指纹图谱

表 1 萜类内酯指纹图谱共有峰 LC-MS 鉴别

编号	t _R /min	准分子离子峰	Measured (m/z)	Ion Formula	分子式	归属
1	10.094	[M-H] ⁻	423.130 0	C ₂₀ H ₂₃ O ₁₀	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀	银杏内酯 J 或银杏内酯 M
		[M+NH ₄] ⁺	442.173 4	C ₂₀ H ₂₈ NO ₁₀		
2	14.260	[M-H] ⁻	439.126 4	C ₂₀ H ₂₃ O ₁₁	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₁	银杏内酯 C
		[2M-H] ⁻	879.259 6	C ₄₀ H ₄₇ O ₂₂		
		[M+NH ₄] ⁺	458.166 6	C ₂₀ H ₂₈ NO ₁₁		
3	18.973	[M-H] ⁻	325.321 0	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	白果内酯
		[M+NH ₄] ⁺	344.135 0	C ₁₅ H ₂₂ NO ₈		
		[2M+Na] ⁺	675.191 5	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₆ Na		
4	20.513	[M-H+HCOOH] ⁻	453.143 5	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₁	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	银杏内酯 A
		[2M-H] ⁻	815.282 0	C ₄₀ H ₄₇ O ₁₈		
		[M+NH ₄] ⁺	426.178 0	C ₂₀ H ₂₈ NO ₉		
		[2M+Na] ⁺	839.275 6	C ₄₀ H ₄₈ O ₁₈ Na		
5	31.393	[M-H] ⁻	423.132 8	C ₂₀ H ₂₃ O ₁₀	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀	银杏内酯 B
		[2M-H] ⁻	847.242 0	C ₄₀ H ₄₇ O ₂₀		
		[M+NH ₄] ⁺	442.172 7	C ₂₀ H ₂₈ NO ₁₀		

必要找出不合格样本并将其剔除。

本文采用 PCA 建立了一种快速、直观的方法用于查找离异样本。将 5 个共有峰峰面积数据标准化并导入 SPSS 19.0 软件进行 PCA 分析,结果见图 3。在 PC1-PC2 分布图中,14 批银杏叶片样本非常清楚地被图中的虚线划分为 2 组 :Group1 和 Group2。其中,Group1 包含了 11 个样本,而 Group2 包含了 3 样本。因此,根据 PCA 结果可以判断样品 S4、S9、S10 为离异样本,应予以剔除。

2.8.2 相似度分析

根据 PCA 分析结果,以 Group1 样本的色谱图建立共有模式,并计算每一个样本的相似度。Group1 中样本的相似度均大于 0.9,而 Group2 中样本 S4、S9、S10 的相似度分别为 0.794、0.919、0.599。其中样本 S9 的相似度大于 0.9,符合相似度要求,不应该将其剔除。重新以 Group1 样本及 S9 样本的色谱图建立共有模式,计算每一个样本的相似度。Group1 样本及 S9 样本的相似度均大于 0.9,而 Group2 中样品 S4、S10 的相似度分别为 0.796、0.615,结果见图 4。

2.8.3 聚类分析

采用 HCA 对 14 批样品的色谱数据进行分析,以反映不同厂家及批次样品之间的质量差异。将 5 个共有峰峰面积数据导入 SPSS 19.0 软件,聚类方法采用组间平均距离连接法及平方欧式距离,结果

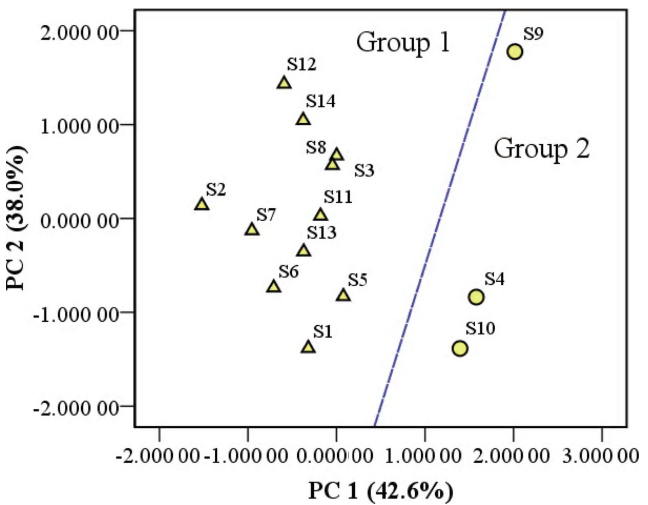


图 3 PC1-PC2 得分分布 (基于 14 批样品的指纹图谱)

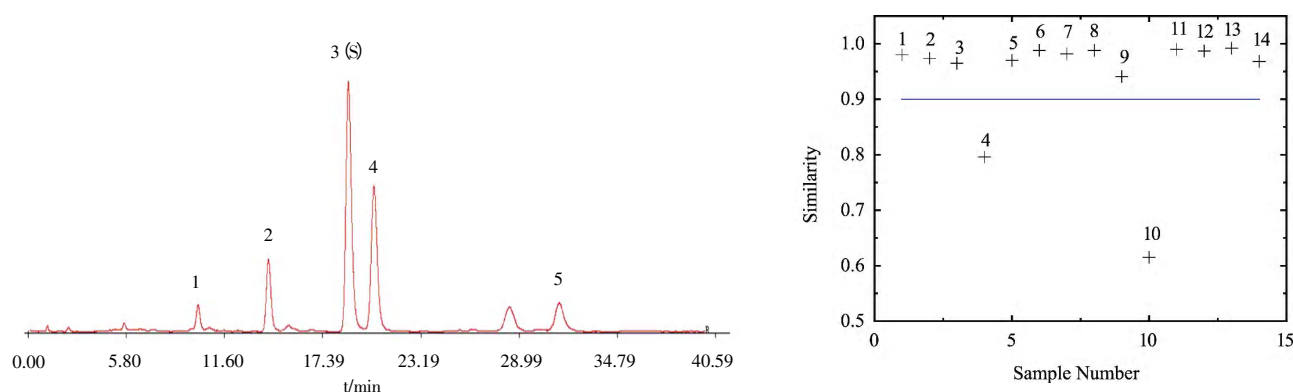


图4 Group1 及 S9 样本的共有模式及各样本的相似度

注 1.银杏内酯 J 或银杏内酯 M, 2.银杏内酯 C, 3.白果内酯, 4.银杏内酯 A, 5.银杏内酯 B。

见图 5。14 批样品被划分为 4 大类, S1、S3、S5、S6、S11、S13、S14 为第 1 类, S2、S7、S8、S12 为第 2 类, S9 为第 3 类, S4、S10 为第 4 类。结果表明, 不同厂家银杏叶片中萜类内酯的含量存在较大的差异, 同一厂家银杏叶片中萜类内酯的含量也存在一定的差异。例如, S5、S7 样品分别归为第 1 类和第 2 类, S12、S14 样品分别归为第 1 类和第 2 类, 而 S8、S9、S11、S13 样品分别归为第 2 类、第 3 类、第 1 类和第 1 类。S4、S10 样品质量最差, 与其它样品有较大差异, 这一结果与 PCA 及相似度分析结果一致。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

银杏萜类内酯成分最大吸收波长为 220 nm, 紫外吸收能力弱, 在 UV 检测器下灵敏度低^[11], 因此本文采用 ELSD 对萜类内酯成分进行检测。

比较了甲醇-水 (33:67)^[12]、四氢呋喃-甲醇-水 (10:25:65)、正丙醇-四氢呋喃-水 (1:15:84)^[6] 3 种流动相条件对萜类内酯成分的分离度, 其中正丙醇-四氢呋喃-水条件下色谱峰分离度最好。考察了相同规格的 Agilent Extend-C₁₈、Thermo BDS Hypersil C₁₈、Phenomenex Luna C₁₈ 3 种色谱柱, 其中 Agilent Extend-C₁₈ 条件下色谱峰分离度、峰型最好。比较了 35℃、40℃、45℃、55℃、60℃、65℃ 漂移管温度, 漂移管温度为 55℃ 时银杏萜类内

酯的信噪比最大。

3.2 供试品溶液制备方法优化

考察了甲醇、无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯等溶剂对萜类内酯的提取效率, 其中无水乙醇的提取效率最高。进一步以无水乙醇为提取溶剂考察超声和回流两种提取方式对萜类内酯的提取效率, 结果发现超声提取法简便且提取效率高, 因此选用超声法对萜类内酯进行提取。以无水乙醇为提取溶剂分别超声提取 10、20、30、40 min, 结果表明 20 min 的提取率达到最高。考察了乙酸乙酯萃取法^[6]、硅藻土层析法^[7]、中性氧化铝层析法^[12] 3 种样品前处理方法, 结

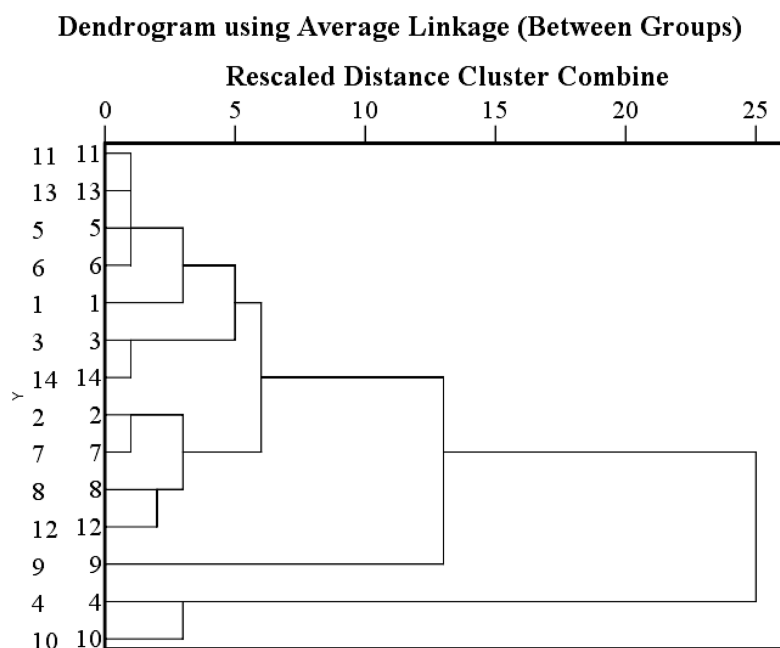


图5 14 批样品指纹图谱的 HCA 系统树图

果表明乙酸乙酯萃取法对萜类内酯成分富集效果最好。故确定以无水乙醇为提取溶剂,超声提取 20 min,乙酸乙酯萃取来制备供试品溶液。

3.3 数据分析

在 PCA 中 S9 样本为离异样本,但其相似度结果却符合要求,表明 PCA 与相似度分析结果存在着一定程度上的不一致。这种不一致源于 PCA 与相似度分析在计算方式上的差异。本文中相似度的计算方法是计算样品指纹向量和对照指纹向量间夹角余弦值,这种方法只能揭示供试品化学成分与对照指纹图谱化学成分在分布比例上的相似度,不具有定量的性质^[13]。而 PCA 计算方法是计算变量协方差阵的特征向量,引入计算的数据具有定量的性质,其更加能够反映出样品之间存在的微小差异。因此,在建立指纹图谱共有模式之前,需要同时结合 PCA 及相似度的结果对潜在的离异样本进行取舍。

目前国内银杏叶片的生产厂家众多,质量差异较大,质量控制方法不够完善。本文采用 HPLC-ELSD-MS 结合化学计量学方法(包括 PCA、SA、HCA)建立了一种简单、可靠的指纹图谱测定方法,可用于表征银杏叶片中萜类内酯成分及评价银杏叶片的质量。

参考文献

- 1 van Beek T A, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11):2002~2032.
- 2 Braquet P. The Ginkgolides: potent platelet-activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L.: chemistry, pharmacology and clinical applications. *Drugs Future*, 1987, 12(7): 643~699.
- 3 van Beek T A. Ginkgolides and bilobalide: Their physical, chromatographic and spectroscopic properties. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(17):5001~5012.
- 4 王颖,盛龙生,楼凤昌.银杏内酯提取物中微量成分的 LC/DAD/ESI/MS 分析及结构鉴定. *药学学报*, 2001, 36(8):606~608.
- 5 Liao H J, Zheng Y F, Li H Y, et al. Two New Ginkgolides from the leaves of *Ginkgo biloba*. *Planta Med*, 2011, 77(16):1818~1821.
- 6 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部).北京:中国医药科技出版社, 2010:296~297,1079.
- 7 The United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopoeia 32-National Formulary 27. 2009:1019~1021.
- 8 Avula B, Wang Y H, Smillie T J, et al. Column Liquid Chromatography /Electrospray Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry and Ultraperformance Column Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Methods for the Determination of Ginkgolides and Bilobalide in the Leaves of *Ginkgo biloba* and Dietary Supplements. *J AOAC Int*, 2009, 92(2):645~652.
- 9 Li X F, Ma M S, Scherban K, et al. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric studies of ginkgolides and bilobalide using simultaneous monitoring of proton, ammonium and sodium adducts. *Analyst*, 2002, 127(5):641~646.
- 10 Xie J S, Ding C G, Ge Q H, et al. Simultaneous determination of ginkgolides A, B, C and bilobalide in plasma by LC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic study of *Ginkgo biloba* extract in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 864(1-2):87~94.
- 11 Jensen A G, Ndjoko K, Wolfender J L, et al. Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionisation/Mass Spectrometry: A Rapid and Selective Method for the Quantitative Determination of Ginkgolides and Bilobalide in *Ginkgo* Leaf Extracts and Phytopharmaceuticals. *Phytochem Anal*, 2002, 13(1):31~38.
- 12 Tang C, Wei X L, Yin C H. Analysis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* L. extract injection by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33(4):811~817.
- 13 孙国祥,侯志飞,张春玲,等.色谱指纹图谱定性相似度和定量相似度的比较研究. *药学学报*, 2007, 42(1):75~80.

Fingerprint Analysis of Terpene Lactones in *Ginkgo Biloba* Tablets by HPLC-ELSD Coupled with Chemometrics

Wu Yulong^{1, 2, 4}, Li Yanjing^{1, 4}, Wang Peixiang^{1, 4}, Ding Gang^{1, 4}, Li Ping², Duan Jin'ao^{3, 4}, Xiao Wei^{1, 4}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of Natural Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

3. Nanjing University of Chinese Medicine / Jiangsu Key Laboratory for TCM Formula Research, Nanjing 210046, China;

4. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

Abstract: This study was aimed to establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method coupled with Evaporative Light-scattering Detector (ELSD) in order to develop the determination of fingerprint of terpene lactones in *Ginkgo biloba* tablets. An Agilent Extend-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was employed as the analysis column and the normal propyl alcohol-tetrahydrofuran-water (1:15:84) as mobile phase. The column temperature was 30°C. And the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. HPLC coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (Q-TOF MS) was used to identify the common peaks. The fingerprint was further evaluated by chemometrics methods including principal component analysis (PCA), similarity analysis (SA) and hierarchical clustering analysis (HCA). The results showed that the precision, stability and repeatability of this method were favorable. Five common peaks were identified by LC/Q-TOF MS as ginkgolide J (M), C, A, B and bilobalide, respectively. Fourteen batches of *Ginkgo biloba* tablets were determined. With the aid of PCA, SA and HCA, the common pattern of the fingerprint of terpene lactones was established. Samples were divided into 4 clusters by their quality difference. It was concluded that the method established in this paper can be used for quality evaluation of terpene lactones in *Ginkgo biloba* tablets.

Keywords: *Ginkgo biloba* tablets, terpene lactones, HPLC-ELSD, fingerprint, chemometrics, quality evaluation

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 王 晶)