

物料温度。物料温度过低,山嵛酸甘油酯未能达到湿润状态,无黏性,无法成粒;物料温度过高,则完全熔化,黏壁塌床。柠檬酸作为颗粒的矫味剂,一方面提供酸味,改善口味,同时由于主药在酸中溶解度低,从而能阻滞苦味的释放。

优化后的3批氟氯西林钠掩味颗粒,批间差异小,重现性良好,按人用药品注册技术要求国际协调会稳定性指导原则进行考察,除有关物质略有增加外,外观、含量、水分、释放曲线等指标均未发生改变,表明该方法稳定性好。

REFERENCES

- [1] 陆伟根,陈亭亭. 药物制剂掩味技术研究进展[J]. 中成药, 2008, 30(1): 113-116.
- [2] CHEN M, CAO F, PING Q N. The progress of taste masking techniques in oral solid dosage forms [J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2009, 33(5): 212-217.
- [3] RAMBALI B, BAERT L, MASSART D L. Scaling up of the fluidized bed granulation process [J]. Int J Pharm, 2003, 252(1/2): 197-206.
- [4] ZHENG J R. Some mechanisms in a fluidized-bed spray granulator [J]. J East China Univ Sci Technol(Nat Sci)(华东理工大学学报: 自然科学版), 2003, 29(1): 106-110.

收稿日期: 2014-12-23

HPLC-ELSD 测定银杏叶多糖组成及单糖含量

任红¹, 乔洪翔^{2,3}, 方玲³, 王如伟^{1,4*} (1.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2.云南康恩贝植物研究院, 昆明 650217; 3.浙江省中药制药技术重点实验室, 杭州 310051; 4.浙江现代中药与天然药物研究院有限公司, 杭州 310051)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定银杏叶多糖组成及单糖含量。方法 采用 Agilent Zorbax Carbohydrate 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水(80:20)为流动相, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 30 ℃。结果 色谱峰分离良好, 鼠李糖在 4.160~20.80 μg、阿拉伯糖在 8.040~40.20 μg、果糖在 4.096~20.48 μg、甘露糖在 4.000~20.00 μg、葡萄糖在 8.152~40.76 μg、半乳糖在 3.960~19.80 μg 内呈良好的线性关系。平均加样回收率鼠李糖为 99.6%、阿拉伯糖为 100.9%、果糖为 99.7%、甘露糖为 99.1%、葡萄糖为 98.8%、半乳糖为 100.1%。结论 该方法简单快速、稳定可行, 可用于银杏叶中多糖成分质量控制。

关键词: 银杏叶; 多糖; 单糖; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)06-0711-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.06.017

Determination of Polysaccharides Composition and Monosaccharide Content in Ginkgo Folium by HPLC-ELSD

REN Hong¹, QIAO Hongxiang^{2,3}, FANG Ling³, WANG Ruwei^{1,4*} (1. Pharmacy College, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China; 2. Yunnan Institute of Botany of Conba Group, Kunming 650217, China; 3. The key Laboratory of Chinese Medicine Pharmaceutical Technology in Zhejiang Province, Hangzhou 310051, China; 4. Zhejiang Modern Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Research Institute Co., Ltd., 310051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of polysaccharides composition and the monosaccharide content from Ginkgo Folium. **METHODS** The analysis was performed on Agilent Zorbax Carbohydrate (250 mm×4.6 mm, 5 μm) chromatographic column, and the mobile phase was acetonitrile-water(80:20), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at 30 ℃. **RESULTS** The calibration curves were linear within the range of 4.160~20.80 μg for rhamnose, 8.040~40.20 μg for arabian sugar, 4.096~20.48 μg for fructose, 4.000~20.00 μg for mannose, 8.152~40.76 μg for glucose and 3.96~19.8 μg for galactose respectively. The recoveries of rhamnose, arabian sugar, fructose, mannose, glucose, galactose were 99.6%, 100.9%, 99.7%, 99.1%, 98.8%, 100.1%, respectively. **CONCLUSION** This method is simple and rapid, stability and feasible, it can be used for the quality control of polysaccharide compositions in *Ginkgo*

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09203-001-18); 浙江省科技计划项目(2009E10009)

作者简介: 任红, 女, 硕士生 Tel: 13575711633 E-mail: Renhong@conbagroup.com *通信作者: 王如伟, 男, 博士, 教授级高工 Tel: (0571)87774766 E-mail: wangrw@conbagroup.com

银杏叶是银杏的干燥叶, 具有敛肺、活血化痰、止痛等作用, 临床上主要用于治疗冠心病、哮喘病、高脂血症、心绞痛等^[1-2]。其主要化学成分有黄酮类、萜内酯类、有机酸、多糖类等^[3]。目前, 对黄酮类、内酯类成分的研究已相对成熟, 而其他成分研究较少。现代药理学研究发现, 银杏叶中糖类成分具有抗脑缺血^[4]、抗氧化^[5-6]、免疫调节^[7]、抗炎^[8]、抗肿瘤^[9]、延缓衰老等多种重要的生物活性和功能, 在医药、食品、保健等方面具有广阔的市场空间, 因此有必要对银杏叶多糖进行深入研究。目前, 针对银杏叶中糖类成分的研究主要集中在总多糖, 而对于多糖中单糖组成的种类及其含量的研究却鲜有报道。苯酚-硫酸法是测定总多糖含量最常用的方法, 但其不能反映出多糖结构中的单糖组成情况与其他植物多糖的差异。本研究首次采用 HPLC-ELSD 测定银杏叶多糖的单糖种类及其含量, 并进行方法学考察, 分析比较不同来源的银杏叶中多糖含量变化的趋势, 对于银杏叶综合开发利用具有重要的意义。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(包括泵和自动进样器等, 美国 Agilent 公司); Agilent 380-ELSD 蒸发光检测器(美国 Agilent 公司); BS210S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); HWS26 型恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

1.2 试剂

三氟乙酸(色谱纯, 德国 Merck 公司); 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); D-无水葡萄糖(中国食品药品检定研究院, 批号: 110838-200904, 纯度: 100%); 阿拉伯糖(贵州迪大科技有限公司, 批号: GZDD-0095, 纯度: 99.0%); 果糖(中国药品生物制品检定所, 批号: 100231-200904, 纯度: 99.6%); 鼠李糖(贵州迪大科技有限公司, 批号: GZDD-0056, 纯度: 98.0%); 半乳糖(中国食品药品检定研究院, 批号: 100226-201105, 纯度: 99.9%); 甘露糖(中国药品生物制品检定所, 批号 140651-200602, 纯度: 99.6%)。银杏叶药材(浙江康恩贝制药有限公司, 批号: 20130601-ZJ-1, 20130701-ZJ-2, 20130602-SD-1, 20130702-SD-2, 20130603-

YN-1, 20130703-YN-2), 由浙江中药与天然药物研究院姜迅知教授级高工鉴定为银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax Carbohydrate(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水(80:20); 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 30 °C, 进样量: 20 μL。

ELSD 参数: 雾化温度为 30 °C, 漂移管温度为 100 °C, 气体流量为 1.60 L·min⁻¹。

对照品与样品的色谱图见图 1。

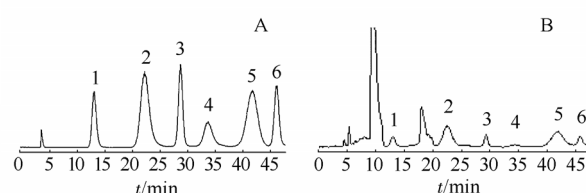


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-样品; 1-鼠李糖; 2-阿拉伯糖; 3-果糖; 4-甘露糖; 5-葡萄糖; 6-半乳糖。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-the mixed standard substances; B-sample; 1-rhamnose; 2-arabinose; 3-fructose; 4-mannose; 5-glucose; 6-galactose.

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 将鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖对照品减压干燥 24 h, 精密称定鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、果糖、葡萄糖分别为 15.65, 30.17, 15.01, 14.96, 15.37, 30.57 mg, 加蒸馏水溶解, 定容于 15 mL, 作为混合对照品。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取银杏叶粉末 5 g, 用 1 L 蒸馏水回流提取 5 h, 过滤, 滤液浓缩至 5 mL。加入适量无水乙醇, 使醇沉浓度达到 85%, 搅拌均匀后, 冷藏过夜。过滤, 取沉淀, 减压干燥, 即得粗多糖。将粗多糖置于西林瓶中, 加入 5 mL 2 mol·L⁻¹ 三氟乙酸, 封管, 100 °C 水浴中水解 3 h。除去溶剂, 调 pH 至中性。定容于 10 mL, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围考察 精密量取混合对照品溶液 1, 2, 3, 4 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 定容, 制成不同浓度的混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件

进样分析。以峰面积对数 Y 为纵坐标, 以进样质量对数 X 为横坐标, 制作标准曲线, 结果见表 1。

表 1 各单糖的线性回归曲线、相关系数及线性范围

Tab. 1 The equations of linear regression, correlation coefficients and linear range of monosaccharides

单糖	线性曲线	相关系数	线性范围/ μg
鼠李糖	$Y=1.296\ 2X+2.136\ 0$	0.999 1	4.160~20.80
阿拉伯糖	$Y=1.341\ 3X+2.091\ 4$	0.999 3	8.040~40.20
果糖	$Y=1.321\ 5X+2.269\ 8$	0.999 6	4.096~20.48
甘露糖	$Y=1.223\ 4X+2.229\ 5$	0.998 4	4.000~20.00
葡萄糖	$Y=1.279\ 8X+2.191\ 4$	0.999 5	8.152~40.76
半乳糖	$Y=1.282\ 8X+2.156\ 1$	0.997 2	3.960~19.80

2.3.2 仪器精密度试验 将混合对照品溶液重复进样 6 次, 测定各单糖的峰面积值, 计算 RSD。结果显示, 仪器精密度良好, 结果见表 2。

2.3.3 日间精密度试验 每日取 2 份银杏叶粉末, 按“2.2.2”项下方法制备样本, 测定单糖含量, 连续测定 6 d。结果显示, 日间精密度良好, 结果见表 2。

2.3.4 重复性试验 取银杏叶粉末 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。进样测定, 计算含量。结果表明, 重复性良好, 结果见表 2。

2.3.5 稳定性试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按时间 0, 1, 2, 4, 6, 24 h, 分别测定样品峰面积, 计算 RSD。结果显示样品稳定性良好, 结果见表 2。

表 2 精密度、日间精密度、重复性、稳定性 RSD 值

Tab. 2 The RSDs value of precision, repeatability and stability

单糖	精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%	重复性 RSD/%	稳定性 RSD/%
鼠李糖	0.85	2.14	2.09	2.95
阿拉伯糖	4.98	4.37	1.66	2.00
果糖	2.44	1.40	1.37	2.48
甘露糖	1.99	4.49	4.79	1.77
葡萄糖	2.54	1.84	1.51	2.11
半乳糖	4.05	3.89	2.98	1.83

2.3.6 回收率试验 取拟定分析方法供试品中所含各单糖量与加入的各单糖对照品量之比约为 1:1 的鼠李糖、果糖、甘露糖、半乳糖对照品混合溶液及阿拉伯糖、葡萄糖对照品粉末, 共 6 份。进样测定, 考察加样回收率。结果各单糖的加样回收率在 98%~101%之间, RSD 均 $<5\%$, 结果见表 3。

表 3 加样回收率试验($n=6$)

Tab. 3 The test of recoveries($n=6$)

单糖	样本量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
鼠李糖	2.76	2.04	4.70	95.09	99.6	3.85
	2.76	2.04	4.73	95.56		
	2.76	2.04	4.90	104.9		
	2.76	2.04	4.88	103.9		
	2.76	2.04	4.71	95.58		
	2.76	2.04	4.83	101.4		
阿拉伯糖	8.14	9.05	16.98	97.67	100.9	3.63
	8.14	8.91	17.06	100.1		
	8.14	8.88	16.65	95.83		
	8.14	9.61	18.12	103.8		
	8.14	9.17	17.73	104.5		
	8.14	9.18	17.67	103.8		
果糖	2.37	2.51	4.77	95.61	99.7	4.26
	2.37	2.51	4.76	95.21		
	2.37	2.51	4.77	95.61		
	2.37	2.51	4.99	104.4		
	2.37	2.51	4.98	103.9		
	2.37	2.51	4.97	103.5		
甘露糖	2.38	2.34	4.62	95.72	99.1	3.31
	2.38	2.34	4.61	95.29		
	2.38	2.34	4.64	96.58		
	2.38	2.34	4.75	101.3		
	2.38	2.34	4.75	101.2		
	2.38	2.34	4.83	104.7		
葡萄糖	6.01	6.84	13.05	102.9	98.8	2.73
	6.01	6.63	12.60	99.39		
	6.01	6.44	12.39	99.06		
	6.01	6.18	12.05	97.73		
	6.01	6.09	11.85	95.89		
	6.01	6.35	12.20	97.48		
半乳糖	4.35	4.02	8.52	103.5	100.1	2.88
	4.35	4.02	8.32	98.56		
	4.35	4.02	8.08	96.13		
	4.35	4.02	8.53	103.7		
	4.35	4.02	8.26	97.07		
	4.35	4.02	8.45	101.7		

2.4 样品测定

先用苯酚-硫酸法测定总多糖含量, 再用 HPLC 测定单糖含量及总量, 分别测定 3 个不同产地, 每个产地各 2 个批次的样品, 结果云南产的 2 批银杏叶 6 种单糖总含量与总多糖含量基本相同, 而浙江、山东产地的银杏叶多糖组成中, 这 6 种单糖仅占 60%左右, 与云南银杏叶差异较大, 结果见表 4。

表 4 不同产地、不同批次银杏叶多糖及单糖含量测定结果

Tab. 4 The polysaccharide and monosaccharides content determination results of Ginkgo Folium with different batch and different places

产地	批号	鼠李糖/%	阿拉伯糖/%	果糖/%	甘露糖/%	葡萄糖/%	半乳糖/%	单糖总量/%	总多糖量/%	比例/%
浙江	20130601-ZJ-1	0.347	0.850	0.043	0.170	0.940	0.222	2.575	4.53	56.84
浙江	20130701-ZJ-2	0.368	0.618	0.126	0.212	0.802	0.198	2.327	3.72	62.56
山东	20130602-SD-1	0.576	0.729	0.034	0.201	0.374	0.152	2.070	3.32	62.37
山东	20130702-SD-2	0.426	0.719	0.043	0.175	0.372	0.164	1.900	3.22	59.02
云南	20130603-YN-1	0.600	1.278	0.091	0.279	1.882	0.378	4.510	4.54	99.34
云南	20130703-YN-2	0.597	1.143	0.067	0.231	1.890	0.263	4.194	4.31	97.31

3 讨论

多糖及其复合物在生物体内不仅作为能量资源和构成材料，重要的是它存在于一切细胞膜结构中，参与细胞的各种活动。研究表明，许多植物多糖具有生物活性，如免疫调节、抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗辐射、抗菌抗病毒、延缓衰老、保护肝脏等作用，而且对机体几乎无不良反应。银杏多糖是银杏叶中一种重要的活性成分，其含量高达 3%~6%。传统的苯酚-硫酸法可以测定总多糖的含量，但却不能反应出多糖结构中的单糖组成情况与其他植物多糖的差异，本研究先通过水解多糖成为单糖，并建立 HPLC-ELSD 法，采用正相色谱法分离强极性的单糖，保留能力较好，分离效果佳，能测得银杏叶多糖的单糖种类及其含量，方法稳定，重复性好，准确度高。

本研究还利用苯酚-硫酸法和 HPLC-ELSD 法，比较了不同产地的银杏叶多糖情况，结果发现云南产地的银杏叶总多糖的含量最高，浙江和山东产地的较低，而且这些产地银杏叶多糖中的单糖组成及其含量也存在显著的差异。以鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖这 6 种单糖为例，云南产地的银杏叶多糖几乎全部是由这 6 种单糖组成的，而浙江和山东产地的，这 6 种单糖总和只占银杏叶多糖的 60%。因此，不同产地的银杏叶，多糖组成和含量差异明显，其中以云南产银杏叶最具特色。但不同产地银杏叶多

糖的活性是否因此而存在差异，还需进一步的研究证实。

REFERENCES

[1] 中国药典[S].一部. 2010: 296-297.

[2] SUN F, WANG L, YAN B, et al. Chemical components and pharmacological effects of *Ginkgo biloba* extracts [J]. Shandong J Tradit Chin Med(山东中医杂志),2014, 33(3): 221-223.

[3] XU Y F, ZHANG L J, SONG X B. Advances in research on extract of *Ginkgo biloba* leaves [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2010, 33(6): 452-456.

[4] YANG Y, LIU P, CHEN L, et al. Therapeutic effect of *Ginkgo biloba* polysaccharide in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury [J]. Carbohydr Polym, 2013, 98(2): 1383-1388.

[5] HU X Q, YUAN F, YAN C Y, et al. The purification and characterization of polysaccharides isolated from *Ginkgo biloba* and their *in vitro* antioxidant activities [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2011, 34(12): 1950-1953.

[6] WU Q P, QIAO H X, HE H H, et al. Extraction of polysaccharides from residue of *Ginkgo biloba* and study on anti-oxidant activity [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(1): 9-13.

[7] HÂNCIANU M, PAVELESCUZ M, MIRON A, et al. Polysaccharides fraction isolated from ginkgo biloba folium: immunopharmacological properties [J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2007, 111(4): 1070-1073.

[8] FEI R, FEI Y, ZHENG S, et al. Purified polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves inhibits P-selectin-mediated leucocyte adhesion and inflammation [J]. ActaPharmacol Sin, 2008, 29(4): 499-506.

[9] 王弘, 陈世忠, 林媚, 等. 影响银杏叶有效成分的有关因素分析[J]. 中草药, 1999, 30 (8): 631- 633.

收稿日期: 2014-12-25