

HPLC-ELSD测定银杏叶刺梨胶囊中 银杏萜类内酯的含量

周亚杰,冯鹏*,郭原,冯敏
(南京中科药业有限公司,江苏 南京 210008)

摘要:建立高效液相色谱-蒸发光散射检测器法 (high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD) 同时测定保健食品银杏叶刺梨胶囊中银杏萜类内酯含量的方法。色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温为 35 °C, 流动相为甲醇-水 = 30 : 70 (体积比), 流速 1.0 mL/min, ELSD 检测器雾化温度 100 °C, 雾化气为空气, 气流速度 2.5 L/min。白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 分别在 4.376 μg~3.128 μg, 4.176 μg~12.528 μg, 4.320 μg~12.960 μg, 4.368 μg~13.104 μg 之间线性关系良好, 平均加样回收率分别为 100.86 %、101.52 %、99.60 %、100.69 %。该方法可准确测定银杏叶刺梨胶囊中银杏萜类内酯的含量, 可用于该产品的质量分析。

关键词: 高效液相色谱法 银杏叶刺梨胶囊 萜类内酯 含量测定 质量分析

Determination of Ginkgolides in Ginkgo Leaf and *Rosa roxburghii* Capsule by HPLC-ELSD

ZHOU Ya-jie, FENG Peng*, GUO Yuan, FENG Min

(Nanjing Zhongke Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210008, Jiangsu, China)

Abstract: A HPLC-ELSD method was developed to determine the content of Ginkgo Terpene Lactones in health food ginkgo leaf and *Rosa roxburghii* capsule. The HPLC was performed on Waters Symmetry C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, mobile phase consisted methanol-H₂O (30 : 70, volume ratio), column temperature was set at 35 °C, and flow rate was 1.0 mL/min. The temperature of drift tube was 100 °C and the flow rate of gas was 2.5 L/min. A good linearity was obtained in the range of 4.376 μg-13.128 μg of bilobalide, 4.176 μg-12.528 μg of ginkgolide A, 4.320 μg-12.960 μg of ginkgolide B, 4.368 μg-13.104 μg of ginkgolide C. The average recovery rates of bilobalide, ginkgolide A, ginkgolide B, and ginkgolide C were 100.86 %, 101.52 %, 99.60 %, and 100.69 %, respectively. The established method was suitable for quality control of ginkgo leaf and *Rosa roxburghii* capsule.

作者简介: 周亚杰 (1984—), 男, 汉族, 高级工程师, 本科, 研究方向 天然活性产物的分离和分析。

* 通信作者 冯鹏, 硕士生导师, 教授, 主要从事灵芝孢子的功能研究。

北京: 中国标准出版社, 2016

- [11] Dr Otto G Piringer, Dr Albert L Baner. Community Legislation on Materials and Articles Intended to Come into Contact with Food-stuffs [EB/OL]. Plastic Packaging: Interactions with Food and Pharmaceuticals, Second Edition, 2002, L 220/18-L 220/58 [2008-02-12]. <https://doi.org/10.1002/9783527621422.ch13>
- [12] 张建莹, 肖锋, 叶刚, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测食用菌中荧光增白剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2014(9): 2682-2688
- [13] 张宪臣, 李蓉, 周艳萍, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质

谱法测定食用菌中 7 种荧光增白剂[J]. 分析化学, 2017, 45(5): 777-783

- [14] 李蓉, 何春梅, 薄艳娜, 等. 高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定面粉中 7 种荧光增白剂[J]. 色谱, 2017, 35(2): 162-168
- [15] 张云, 陈泽宇, 吕水源, 等. 高效液相色谱法测定食用油中 10 种荧光增白剂迁移量[J]. 食品工业科技, 2015, 36(24): 82-84
- [16] 张云, 陈泽宇, 吕水源, 等. 高效液相色谱法测定食品模拟物中 10 种荧光增白剂迁移量[J]. 海峡科技与产业, 2015(11): 62-65

收稿日期 2018-04-17

Key words : high performance liquid chromatography ; ginkgo leaf and *Rosa roxburghii* capsule ; ginkgolides ; determination of content ; quality analysis

引文格式:

周亚杰,冯鹏,郭原,等. HPLC-ELSD测定银杏叶刺梨胶囊中银杏萜类内酯的含量[J].食品研究与开发,2018,39 (23) : 158-163

ZHOU Yajie, FENG Peng, GUO Yuan, et al. Determination of Ginkgolides in Ginkgo Leaf and *Rosa roxburghii* Capsule by HPLC-ELSD[J]. Food Research and Development, 2018, 39 (23) : 158-163

保健食品银杏叶刺梨胶囊的配方组成为银杏叶提取物、刺梨汁粉、微晶纤维、糊精和硬脂酸镁等。前期的研究表明该配方能改善免疫性肝损伤大鼠肝功能和改善四氯化碳引起的小鼠肝损伤,并且在两种药理模型中复方作用均优于单一银杏叶提取物^[1-2]。银杏叶提取物含有黄酮类、萜类内酯、有机酸等多种成分。具有抗氧化、改善循环、抗血小板聚集、保护神经系统等主要药理作用^[3]。临床上广泛用于治疗心脑血管疾病,并具有较显著的效果^[4],广泛用于药品、保健食品中,其中以银杏叶提取物为主要功能成分的保健食品有 200 多个。银杏萜类内酯是银杏叶提取物的重要活性成分之一,其中,白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 是常用的检测指标,用来控制银杏叶提取物和银杏叶制剂的品质^[5]。银杏内酯为血小板活化因子拮抗剂,可用于治疗脑血栓、心肌梗塞等心脑血管疾病^[6]。银杏叶萜类内酯的分析检测方法包括高效液相色谱-示差折光检测器法 (high performance liquid chromatography - refractive index, HPLC-RI)^[7]、毛细管气相色谱法^[8]和超高效液相色谱串联三重四级杆质谱法 (ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole- mass spectrometry, UPLC-MS-MS)^[9]等。也有研究者建立了“一测多评”的方法,以白果内酯为内参物,计算银杏内酯 A、B、C 的校正因子,测得 4 个萜类内酯的含量^[10]。本试验采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器法 (high performance liquid chromatography - evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD) 同时测定银杏叶刺梨胶囊中银杏萜类内酯的含量,为该产品的质量提供数据。含银杏叶提取物的保健食品多以银杏黄酮或者总黄酮为指标控制产品的质量,较少以银杏萜类内酯的含量为指标控制产品质量^[11]。试验建立的方法可用于以银杏叶提取物为功能成分的保健食品的质量分析。

1 材料与设备

1.1 试剂与材料

盐酸、醋酸钠、乙酸乙酯 (分析纯) 南京市化学试

剂公司;甲醇 (色谱纯) 山东禹王实业有限公司化工分公司;纯净水:市售包装饮用纯净水;白果内酯 (批号 110865-201306)、银杏内酯 A (批号 110862-201310)、银杏内酯 B (批号 110863-201410)、银杏内酯 C (批号 110864-201307) 中国食品药品检定研究院;复方银杏刺梨胶囊 (批号分别为 170101, 170102, 170103) 南京中科药业有限公司自制。

1.2 仪器

Waters E2695 自动进样高效液相色谱仪 (配有 Alltech ELSD 2000ES 型蒸发光散射检测器) Waters 公司;AG285 型电子天平 (万分级) MS105DU 型电子天平 (十万分级) 梅特勒-托利多有限公司;KQ-250DB 型数显超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 流动相为甲醇-水 = 30 : 70 (体积比), 柱温为 35 °C, 流速为 1.0 mL/min ELSD 检测器雾化温度 100 °C, 雾化气为空气, 气流速度 2.5 L/min^[12-13]。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取白果内酯 (bilobalide, BB) 5.47 mg、银杏内酯 A (ginkgolide A, GA) 5.22 mg、银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 5.40 mg、银杏内酯 C (ginkgolide C, GC) 5.46 mg, 置于 5 mL 容量瓶中, 加甲醇使超声溶解并稀释至刻度, 混匀, 得标准储备液, 4 °C 冰箱保存备用。

2.3 供试品溶液的制备

参照《中国药典》银杏叶提取物中的方法进行供试品溶液的制备, 具体如下: 取银杏叶刺梨胶囊内容物, 研细, 精密称定 1.0 g 内容物粉末, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 20 min, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液 25 mL, 挥干甲醇, 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 (分别 15、10、10、10 mL), 合并提取液, 用 5 % 醋酸钠溶液 20 mL

洗涤,分取醋酸钠溶液,再用乙酸乙酯 10 mL 洗涤,合并乙酸乙酯提取液及洗涤液,用纯净水洗涤 2 次,每次 20 mL,分取纯净水,用乙酸乙酯 10 mL 洗涤,合并乙酸乙酯液,回收溶剂至干,残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液^[14]。

2.4 线性关系的考察

取对照品标准储备液,注入液相色谱仪,进样体积分别为 4、6、8、10、12 μL ,分别以 BB、GA、GB、GC 峰面积的自然对数为纵坐标 (y),各对照品进样浓度的自然对数为横坐标 (x) 做标准曲线。

2.5 专属性试验

按比例制备不含银杏叶提取物的阴性样品,精密称取阴性样品粉末 2.0 g,按照 2.3 方法制备阴性对照样本供试品液。

2.6 精密度试验

取 2.2 中的标准储备液,按 2.1 色谱条件连续进样 6 次。

2.7 稳定性试验

取银杏叶刺梨胶囊(批号:170101)内容物,按照 2.3 方法制备供试品溶液,分别在溶液制备后 0、2、4、6、8、10 h 进样,进样体积为 10 μL ,测定峰面积。

取对照品标准储备液,注入液相色谱仪,进样体积为 10 μL 。分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样,测定峰面积。

2.8 重复性试验

取银杏叶刺梨胶囊(批号:170101)内容物,按照 2.3 方法制备供试品溶液 6 份,按照 2.1 的色谱条件测定总萜内酯的含量。

2.9 加标回收率试验

精密称取银杏叶刺梨胶囊(批号:170101)内容物 0.5 g,共 6 份,再加对照品适量,按照 2.3 方法制备供试品溶液,按照 2.1 色谱条件测定含量,计算回收率。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的绘制

得回归方程分别为 $Y_{BB} = 1.5349X + 7.1066$, $R^2 = 0.9996$; $Y_{GA} = 1.7656X + 6.8811$, $R^2 = 0.9992$; $Y_{GB} = 1.6370X + 6.8270$, $R^2 = 0.9990$; $Y_{GC} = 1.5900X + 6.9611$, $R^2 = 0.9993$ 。结果如图 1。

3.2 专属性试验结果

阴性样品色谱图中在萜类内酯相应保留时间上没有干扰峰,说明在本条件下其他成分对萜类内酯含量测定无干扰结果见图 2。

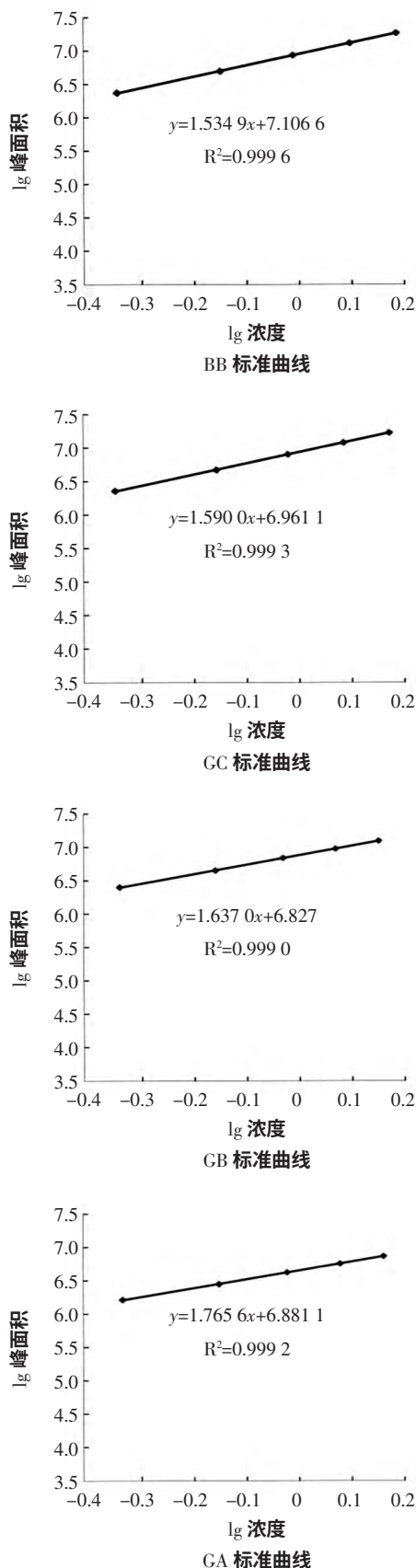


图1 白果内酯、银杏内酯A、银杏内酯B、银杏内酯C的线性回归曲线

Fig.1 Linear regression curve of BB, GA, GB, and GC

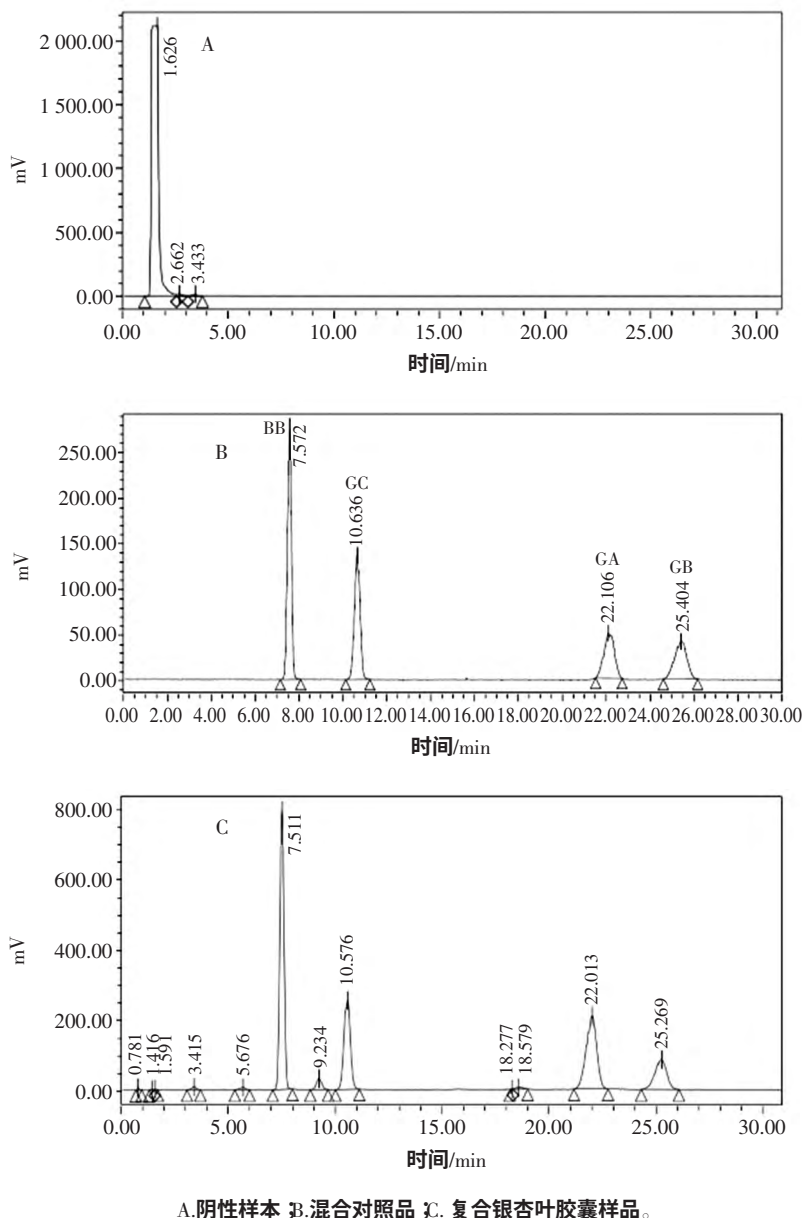


图2 阴性样本、混合对照品和样品 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of blank sample, mixed references and samples

3.3 测试方法的精密性

测定 BB、GA、GB、GC 峰面积的 RSD 分别为 2.50 %、1.83 %、2.26 % 和 1.78 %, 均小于 3.00 %, 表明仪器精密密度良好。

3.4 测试方法的稳定性

银杏叶刺梨胶囊(批号 170101) 供试品测定结果为 BB、GA、GB、GC 峰面积的 RSD 分别为 2.72 %、1.75 %、2.28 %、1.99 %, 均小于 3.00 %, 表明供试品溶液在室温(18 ℃~26 ℃) 条件下放置 10 h 稳定。

对照品标准储备液测定结果为 BB、GA、GB、GC 峰面积的 RSD 分别为 2.22 %、1.95 %、2.08 %、1.79 %, 均小于 3.00 %, 表明对照品溶液在室温(18 ℃~26 ℃)

条件下放置 10 h 稳定。

3.5 重复性试验结果

测定 6 份样本中总萜内酯的含量分别为 1.661 1、1.630 1、1.708 9、1.736 6、1.740 7、1.641 1 g/100 g, 平均值为 1.686 4 g/100 g, RSD 为 2.89 %, 小于 3.00 %, 表明该方法重复性好。

3.6 加标回收率

加样回收率数据见表 1, 平均回收率在 95 %~105 % 之间, RSD 均小于 3.00 %。表明试样方法满足加标回收。

3.7 样品的测定

取 3 批银杏叶刺梨胶囊(批号分别为 170101、

表 1 银杏叶刺梨胶囊萜类内酯加样回收率试验

Table 1 Recovery data of ginkgolides in ginkgo leaf and Rosa roxburghii capsule

成分	序号	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
白果内酯	1	0.501 1	2.746 5	2.010 0	4.703 6	97.37	100.86	2.64
	2	0.462 7	2.551 4	2.560 0	5.095 3	99.37		
	3	0.531 2	2.956 5	3.360 0	6.293 0	99.30		
	4	0.510 9	2.800 8	3.870 0	6.721 8	101.32		
	5	0.511 3	2.754 6	2.440 0	5.293 2	104.04		
	6	0.496 9	2.679 5	3.210 0	6.009 5	103.74		
银杏内酯 C	1	0.501 1	2.108 4	2.010 0	4.030 1	95.61	101.52	0.07
	2	0.462 7	1.917 5	2.190 0	4.112 1	100.21		
	3	0.531 2	2.174 9	3.110 0	5.337 7	101.70		
	4	0.510 9	2.154 3	3.250 0	5.471 9	102.08		
	5	0.511 3	2.111 8	3.470 0	5.647 1	101.88		
	6	0.496 9	1.969 8	3.210 0	5.235 7	101.74		
银杏内酯 A	1	0.501 1	3.146 0	1.880 0	4.932 7	95.04	99.60	2.86
	2	0.462 7	2.860 6	2.450 0	5.347 8	101.52		
	3	0.531 2	3.323 9	2.160 0	5.518 3	101.59		
	4	0.510 9	3.169 9	2.960 0	6.089 0	98.62		
	5	0.511 3	3.193 2	2.650 0	5.796 0	98.22		
	6	0.496 9	3.117 1	2.880 0	6.072 8	102.63		
银杏内酯 B	1	0.501 1	1.870 8	2.250 0	4.085 5	98.43	100.69	2.28
	2	0.462 7	1.785 7	2.440 0	4.202 5	99.05		
	3	0.531 2	2.009 3	2.750 0	4.716 9	98.46		
	4	0.510 9	1.939 8	3.390 0	5.397 2	101.99		
	5	0.511 3	2.013 0	2.580 0	4.682 5	103.47		
	6	0.496 9	2.022 5	2.550 0	4.642 7	102.75		

170102、170103),每批样本同时测试两份,按照 2.3 方法制备供试品溶液,依法进样测定。每份样本进样两次,取平均值。银杏叶萜类内酯含量=(白果内酯含量+银杏内酯 A 含量+银杏内酯 B 含量+银杏内酯含量),结果见表 2。

表 2 HPLC 法测定银杏总萜内酯含量

Table 2 The content of ginkgolides

批号	总萜内酯/(g/100 g)		
	1	2	平均值
170101	2.02	1.92	1.97
170102	2.31	2.39	2.35
170103	2.19	1.94	2.06

4 结论

银杏叶提取物在银杏叶刺梨胶囊中占比为 26%,根据《中国药典》对银杏叶提取物的质量要求^[12],其中萜类内酯含量需要 $\geq 6.0\%$,理论上银杏叶刺梨胶囊中银杏叶萜类内酯含量需 $\geq 1.56\%$ 。本试验测定结果表明 3 批次样品的银杏叶萜类内酯含量分别为 1.97%、

2.35%、2.07%,平均值为 2.13%,均大于理论值。考虑到大生产时,各批次间的差异,依据含量限定值为实测值 75%~80%的原则,可将银杏叶刺梨胶囊中总萜内酯含量限定值定为 $\geq 1.70\text{ g}/100\text{ g}$ 。本试验建立的方法萜类内酯附近无杂峰的干扰,能准确测定银杏叶刺梨胶囊中萜类内酯的含量。本试验建立的方法可用于含有银杏叶提取物的保健食品和功能食品中银杏叶萜类内酯的质量分析。

参考文献:

- [1] 潘苏华,吴丽,牛文明.复方银杏叶胶囊对大鼠肝损伤的防护作用[J].中西医结合肝病杂志,2008,18(6):360-361
- [2] 潘苏华,牛文明,吴丽,等.银杏叶提取物与刺梨配伍抗实验性肝损伤作用[J].药学实践杂志,2009,27(6):437-438
- [3] 徐艳芬,张丽娟,宋新波.银杏叶提取物的研究进展[J].药物评价研究,2010,33(6):452-456
- [4] 张鹏飞,廖丽君,邓祯,等.银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展[J].辽宁中医杂志,2017,44(2):426-429
- [5] 耿婷,申文雯,王佳佳,等.银杏叶中内酯类成分的研究进展[J].中

一株产广谱细菌素乳酸菌的筛选与鉴定

赵天宇¹,郭一柯¹,刘霁逸¹,庞茂达^{2,3,*}

(1. 金陵中学, 江苏 南京 210005 2. 江苏省农业科学院 农产品质量安全与营养研究所, 江苏 南京 210014 3. 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 江苏 南京 210014)

摘要:为获得产广谱细菌素的乳酸菌,采用经典的乳酸菌筛选法及 16S rRNA 基因序列测定法,从传统酸白菜中分离乳酸菌并进行菌种鉴定,从蛋白酶稳定性、热稳定性、pH 值稳定性和抑菌谱 4 个方面分析抑菌物质的生物学特性。结果表明,从传统酸白菜中分离出 1 株产抑菌活性物质的乳酸菌 SY5,经鉴定为戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*)。将发酵上清用蛋白酶 K 和胃蛋白酶处理后抑菌活性丧失,表明抑菌活性物质具有蛋白质性质,确定为细菌素。生物学特性分析表明,该细菌素在 120 ℃热处理 30 min 后仍保留 82.7 % 的抑菌活性,pH 值范围为 2~7。抑菌谱测定结果表明,该细菌素对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有较好的抑制效果,具有广谱抑菌活性。

关键词：酸白菜 乳酸菌 细菌素 抑菌活性

Screening and Identification of Broad Spectrum Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacterium

ZHAO Tian-yu¹, GUO Yi-ke¹, LIU Ji-yi¹, PANG Mao-da^{2,3,*}

(1. Jinling High School, Nanjing 210005, Jiangsu, China ;2. Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China ;3. Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province–State Key Laboratory Breeding Base, Nanjing 210014, Jiangsu, China)

Abstract : To screen out a lactic acid bacterium producing broad-spectrum bacteriocin, traditional Chinese cabbage was used as the research object to isolate the lactic acid bacteria based on classical *Lactobacillus* screening method and 16S rRNA gene sequencing. Biological properties of antibacterial substance were analyzed based on protease stability, thermal stability, pH stability and inhibition spectrum. The result showed that one strain of lactic acid bacterium named SY5 was isolated from the traditional Chinese cabbage, and identified as *Lactobacillus* pentacose. When the supernatant of SY5 culture was treated with protease K and pepsin, its antibacterial activity was lost, indicating that the antibacterial component was a kind of protein and

基金项目 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20170600) 江苏省省部共建国家重点实验室培育基地自主研究课题 (4911709) ;江苏省农业科学院
科研基金项目 (6111673)

作者简介 赵天宇(2001—),男(汉),高中生。

* 通信作者 庞茂达(1988—),男(汉),助理研究员,博士,研究方向:食品微生物学。

- 国中药杂志, 2018, 43(7): 1384-1391

[6] 王旋, 张慧灵, 顾振纶, 等. 银杏内酯药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1741-1744

[7] 袁传勋, 潘见, 胡学桥, 等. HPLC-RI 法测定银杏叶提取物中 4 种内酯的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5): 739-741

[8] 刘红梅, 周庆霞, 杨文玲, 毛细管气相色谱法测定银杏叶中萜内酯含量[J]. 河北科技大学学报, 2006, 27(3): 209-213

[9] 吴憩, 姚鑫. UPLC-MS-MS 测定不同厂家银杏叶提取物中 4 种萜内酯的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 60-63

[10] 冯海容. 基于一测多评法的银杏叶分散片的溶出度研究[J]. 中国药师, 2017, 20(3): 551-556

[11] 孙婷. HPLC 法测定银刺胶囊中总黄酮的含量[J]. 食品工业科技, 2005, 26(4): 169-17

[12] 盛志恒, 李旭红. HPLC-ELSD 法测定银杏叶提取物中四种萜类内酯的含量[J]. 浙江中医学院学报, 2004, 28(4): 82-83

[13] 朱雪妍, 罗轶, 谷立勃. HPLC-ELSD 法测定银杏洋参颗粒中萜类内酯的含量[J]. 广西中医药大学学报, 2014, 17(1): 83-85

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 416-417

收稿日期 2018-07-27

收稿日期: 2018-07-27