

银杏蜜环口服溶液中单糖 HPLC 特征图谱及其质量评价

刘翠翠¹, 杨晨¹, 杨涛², 梁立¹, 叶霜¹, 杨田田¹, 颜军^{1*} (1.成都大学药学院四川抗菌素工业研究所, 药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室, 成都 610106; 2.成都农业科技职业学院, 成都 611130)

摘要: 目的 利用 HPLC 建立银杏蜜环口服溶液中糖的特征图谱, 并对不同来源的银杏蜜环口服溶液质量进行评价。方法 采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)柱前衍生 HPLC, 结合中药指纹图谱相似度分析软件对 4 批次市售银杏蜜环口服溶液和 6 批次自制口服溶液中单糖进行相似度分析, 同时通过对组方中成分单糖组成进行测定, 对共有峰进行了归属和确认。**结果** 通过对自制口服溶液与市售口服溶液的 HPLC 特征图谱进行研究, 确定了 5 个共有峰, 经过归属验证, 分别为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖, 相似度介于 0.998~1.000 之间; 同时对口服溶液及其组方中原药材进行了单糖组成测定, 发现水解口服液中单糖来源于蜜环菌粉、银杏叶提取物及矫味剂甜菊糖; 进一步对不同厂家的银杏叶提取物和蜜环菌粉进行单糖组成测定, 结果显示不同厂家的银杏叶提取物和蜜环菌粉单糖组成有明显差异。最后通过对口服液及其原辅料中多糖进行提取、测定, 发现口服液中多糖主要来源于蜜环菌粉。**结论** 本研究建立的方法能较全面地体现银杏蜜环口服溶液组方中单糖的特征, 将市售口服溶液、自制口服溶液及其原药材的水解单糖进行归属及溯源, 可用于口服液及其原料药材、辅料的质量评价。

关键词: 银杏蜜环口服液; 多糖; 单糖; 特征图谱; 质量评价

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)03-0316-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.03.005

引用本文: 刘翠翠, 杨晨, 杨涛, 等. 银杏蜜环口服溶液中单糖 HPLC 特征图谱及其质量评价[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 316-323.

HPLC Characteristic Chromatogram of Monosaccharides in Ginkgo Armillaria Oral Solution and Its Quality Evaluation

LIU Cuicui¹, YANG Chen¹, YANG Tao², LIANG Li¹, YE Shuang¹, YANG Tiantian¹, YAN Jun^{1*} (1.Key Laboratory of Medicinal and Edible Plants Resources Development of Sichuan Education Department, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, School of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 2.Chengdu Agriculture College, Chengdu 611130, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the characteristic chromatogram of monosaccharides in Ginkgo Armillaria oral solution by using HPLC and to evaluate the quality control methods of Ginkgo Armillaria oral solution from different sources, **METHODS** The monosaccharides in 4 batches of commercial Ginkgo Armillaria oral solution and 6 batches of self-made oral solution were analyzed by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP) precolumn derivatization HPLC combined with traditional Chinese medicine fingerprint similarity analysis software. At the same time, the common peaks were assigned and confirmed by measuring the composition of monosaccharides in the formula. **RESULTS** By studying the HPLC characteristic chromatography of the self-made oral solution and the commercially available oral solution, five common peaks were identified. After attribution verification, they were mannose, rhamnose, glucose, galactose, and arabinose. The similarity was between 0.998 and 1.000; at the same time, the monosaccharide composition of the oral solution and its ingredients was determined, and it was found that the monosaccharide in the hydrolyzed oral solution was derived from *Armillaria mellea* powder, *Ginkgo biloba* extract and the flavoring agent stevioside; The monosaccharide composition of *Ginkgo biloba* extract and *Armillaria mellea* powder from different manufacturers was determined, and the results showed that the monosaccharide composition of *Ginkgo biloba* extract and *Armillaria mellea* powder from different manufacturers was significantly different. Finally, through the extraction and determination of the polysaccharides in the oral liquid and its raw and auxiliary materials, it was found that the polysaccharides in the oral liquid were mainly derived from *Armillaria mellea* powder. **CONCLUSION** The method established in this study can comprehensively reflect the characteristics of monosaccharides in components of Ginkgo Armillaria oral solution. The hydrolyzed monosaccharides of the commercially available oral solution, self-made oral solution and its original medicinal materials can be attributed and traced, which can be used for the quality evaluation of oral solution, raw medicinal materials and recipes.

KEYWORDS: Ginkgo Armillaria oral liquid; polysaccharide; monosaccharide; characteristic chromatogram; quality evaluation

基金项目: 四川省科技创新合作项目(2020YFH0205); 四川省中医药管理局研发专项项目(2018HJZX024)

作者简介: 刘翠翠, 女, 硕士 E-mail: 1172331554@qq.com *通信作者: 颜军, 男, 硕士, 教授 E-mail: yj7162@cd.edu.cn

银杏蜜环口服溶液临床上广泛用于心脑血管疾病,其配方中主要包含银杏叶提取物和蜜环菌粉。银杏叶提取物是用乙醇从干燥的银杏叶提取纯化而来的物质,其主要活性成分有银杏黄酮、萜类内酯^[1-2],具有降血脂、护肝、抗炎、抗氧化、抗衰老等作用,有效增加血脑屏障通透性和提高机体免疫能力^[3-6];蜜环菌 *Armillaria mellea* (Vahl. ex Fr.)Quel. 是一种与传统名贵中药天麻(tuber of *Gastrodia elata*)和猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.)Fries 共生的药食两用真菌^[7],含有萜类、多糖和有机酸类等多种化合物,多糖是其重要的活性成分^[8],主要具有镇静催眠、抗惊厥、保护心脑血管、改善眩晕综合征、增强免疫等作用^[9-11]。

中药制剂是指在中医药传统理论指导下,以中药材及中药饮片为原材料,根据处方将其制成安全有效、均一稳定的制剂,其中中药材及中药饮片的质量好坏直接影响中药制剂的安全性与有效性^[12]。银杏蜜环口服溶液现行标准中只对银杏叶提取物中黄酮醇苷进行了测定,并未对蜜环菌粉中的成分进行检测,所以未对蜜环菌粉进行质量控制。而中药制剂具有多组分、多靶点、多途径相互作用的特点,仅仅测定单一组分难以准确评价中药制剂质量^[13]。对于银杏蜜环口服溶液中的银杏叶提取物,其所含黄酮类化合物主要以黄酮糖苷形式存在,国内已开展诸多研究^[14-15],而蜜环菌粉作为银杏蜜环口服溶液中不可缺少的组分,其主要活性成分为多糖,其现行标准中含量测定项下通过 3,5-二硝基水杨酸比色法显色,以无水葡萄糖作为参比溶液,再采用紫外分光光度计法计算,但该方法缺乏专属性,无法有效表征蜜环菌粉中多糖类成分的组成,误差较大。中药指纹图谱作为一种可量化的综合分析手段,将中药材及其制剂经过适当的前处理后,提取其关键信息生成特征谱图,从而评价中药材及其制剂的质量^[16-17]。

本研究以银杏蜜环口服溶液为研究对象,结合其制备工艺,对其组方中关键组分银杏叶提取物和蜜环菌粉按相关工艺进行制备,通过水解后单糖衍生化处理,建立银杏蜜环口服溶液 HPLC 特征图谱,并结合相似度分析、主成分分析(principal component analysis, PCA)和聚类分析研究其单糖组成特征。同时,揭示水解口服液中单糖的来源,以共有峰特征来区分银杏叶提取物、蜜环菌粉、矫味剂甜菊糖的差异,并将其作为银杏蜜环口服溶液的质量检查项,以期银杏蜜环口服溶液的质量控制

提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

1260 HPLC 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);DAD-二极管阵列检测器(Agilent 科技有限公司);serial NO.DEAAX06278 旋转蒸发仪(上海天美科技有限公司);GL-21M 型高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);XS205 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);UPT-II-20T 纯水仪(四川优普超纯科技有限公司)。

1.2 试剂与药物

银杏蜜环口服溶液(邛崃天银制药有限公司,批号分别为 181202, 191140, 200728, 200763);银杏叶提取物(A 厂家,批号: BH191010; B 厂家,批号: 180805; C 厂家,批号: N190911; D 厂家,批号: GL-190925; E 厂家,批号: SNT191021);蜜环菌粉(F 厂家,批号: 20190869; G 厂家,批号: 20190919);甘露糖(批号: 20190523;纯度 $\geq 99.0\%$);鼠李糖(批号: 2013110501;纯度 $\geq 99.0\%$);D-葡萄糖(批号: 190620;纯度 $\geq 99.5\%$);半乳糖(批号: 2017060101;纯度 $\geq 99.0\%$);阿拉伯糖(批号: 2014101701;纯度 $\geq 99.0\%$);苯甲酸钠、十二烷基硫酸钠(粒装)、三氯甲烷、氢氧化钠、乙醇、磷酸二氢钾均为分析纯,甲醇、乙腈均为色谱纯,均购自成都市科龙化工试剂厂;甜菊糖(药用辅料,曲阜圣仁制药有限公司,批号: 20200808);浓硫酸(分析纯,广州万从化工有限公司);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮[1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP, 阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号: H2027109];水为超纯水(优普 UPT-II-20T 纯水仪制备)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Hypersil ODS2 色谱柱(25 cm \times 4.6 mm, 5 μ m),以乙腈(B)-0.05 mol \cdot L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(A)为流动相,梯度洗脱(0~14 min, 19%B; 14~15 min, 19% \rightarrow 24%B; 15~18 min, 24% \rightarrow 20%B; 18~50 min, 20%B),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长 250 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 自制口服溶液 根据银杏蜜环口服溶液制作工艺进行制备^[18]。称取 100 g 蜜环菌粉置于包煎袋内,加入 1 000 mL 水浸泡一定时间后进行提取,保持微沸 40 min,离心后过滤,滤渣加入 1 000 mL

水继续提取 2 次, 合并 3 次提取滤液, 浓缩至相对密度 1.14~1.15 后加入 95%乙醇, 使药液含醇量达 75%, 冷藏, 静置过夜。抽滤醇沉上清液减压浓缩至相对密度 1.15~1.17 的蜜环菌粉浸膏, 并回收乙醇。

称取 3 g 银杏叶提取物缓慢加入适量含 5 g 十二烷基硫酸钠的 80 °C 热水中, 保温溶解, 制成银杏叶提取物溶液。

将蜜环菌粉浸膏溶于适量热水中, 加入含有 3 g 银杏叶提取物的溶液、矫味剂 3 g, 边加边搅拌, 最终补液至 1 000 mL。

所得的银杏蜜环口服溶液中含有以下浓度的物质: 3 g·L⁻¹ 的银杏叶提取物、100 g·L⁻¹ 的蜜环菌粉、5 g·L⁻¹ 的助溶剂十二烷基硫酸钠和 3 g·L⁻¹ 的矫味剂甜菊糖。

2.2.2 供试品溶液制备 精密量取市售银杏蜜环口服溶液 2 mL 于量瓶内, 加水稀释定容至 10 mL, 加入 300 μL 浓硫酸, 120 °C 下水解 4 h, 取出, 加入适量 6 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调节 pH 至中性。后取 500 μL 上清液, 加入 500 μL 0.25 mol·L⁻¹ NaOH 溶液、500 μL 0.5 mol·L⁻¹ PMP 甲醇溶液, 70 °C 下水浴 90 min, 取出, 冷却至室温, 加入 500 μL 0.3 mol·L⁻¹ 盐酸中和, 加入 2 mL 氯仿萃取 3 次后, 过滤, 即得。

2.2.3 对照品溶液制备 精密称取甘露糖、葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖对照品 10 mg, 加水溶解并定容至 10 mL, 制成 1 mg·mL⁻¹ 的标准单糖溶液, 各取 500 μL, 按“2.2.2”项下方法, 衍生即得。色谱图见图 1。

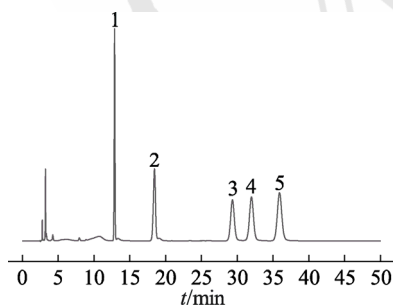


图 1 标准加样单糖色谱图
1-甘露糖; 2-鼠李糖; 3-葡萄糖; 4-半乳糖; 5-阿拉伯糖。
Fig. 1 Standard monosaccharide chromatogram
1-mannose; 2-rhamnose; 3-glucose; 4-galactose; 5-arabinose.

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系及检出限考察 量取甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖 5 种单糖衍生

物适量, 加水稀释成不同浓度的标准溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得到标准曲线, 各单糖线性良好, 结果见表 1。

表 1 各单糖衍生物的标准曲线

Tab. 1 Standard curve of each monosaccharide derivative

| 单糖 | 检出限/ mg·mL ⁻¹ | 范围/mg·mL ⁻¹ | 回归方程 | 相关系数 <i>r</i> |
|------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|---------------|
| 甘露糖 | 0.000 2 | 0.003 0~0.020 0 | $y=17\ 489x-6.785\ 1$ | 0.999 7 |
| 鼠李糖 | 0.000 3 | 0.002 5~0.050 0 | $y=18\ 098x-15.992$ | 0.999 5 |
| 葡萄糖 | 0.000 7 | 0.030 0~0.600 0 | $y=19\ 133x-116.26$ | 0.999 5 |
| 半乳糖 | 0.000 5 | 0.005 0~0.100 0 | $y=21\ 419x-29.448$ | 0.999 6 |
| 阿拉伯糖 | 0.000 5 | 0.002 5~0.050 0 | $y=28\ 116x-15.344$ | 0.999 6 |

2.3.2 仪器精密度试验 取同一供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得样品中甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖相对保留时间 RSD 值分别为 0.34%, 0.15%, 0.23%, 0.29%, 0.23%, 相对峰面积 RSD 分别为 0.46%, 0.68%, 0.23%, 0.11%, 0.29%, 表明该方法仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 32 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 测得银杏蜜环口服溶液中甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积 RSD 分别为 1.24%, 1.34%, 0.37%, 0.62%, 0.88%, 表明供试品溶液在 32 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批样品, 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 测得银杏蜜环口服溶液中甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖含量 RSD 分别为 1.46%, 1.49%, 1.37%, 1.50%, 1.59%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 移取 6 份各单糖含量已知的银杏蜜环口服溶液水解样品, 分别加入等量混标溶液, 混合均匀后, 取 500 μL, 按“2.2.2”项下方法进行制备后进样分析, 记录混合溶液中各单糖的峰面积, 计算回收率, 结果见表 2。结果显示, 银杏蜜环口服溶液中甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖回收率分别为 103.27%, 106.62%, 102.67%, 101.65%, 100.14%, RSD 值均 < 6.00%, 表明本方法加样回收率较好。

2.4 口服溶液单糖组成特征图谱结果分析

2.4.1 口服液特征图谱 精密量取“2.2.2”项下的自制口服溶液及 4 批次市售银杏蜜环口服溶液

2 mL 于量瓶内,加水稀释定容至 10 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样分析,记录各样品色谱图,所得 HPLC 图谱导入中药指纹图谱相似度分析软件(2012 年版),见图 2,相似度见表 3,单糖组成摩尔比见表 4。

表 2 样品加样回收率试验

Tab. 2 Sample recovery test

| 化合物 | 原有量/ mg | 加入量/ mg | 测得量/ mg | 回收率/ % | 平均回 收率/% | RSD/ % |
|------|------------|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 甘露糖 | 0.004 1 | 0.005 1 | 0.009 6 | 107.84 | 103.27 | 3.54 |
| | | | 0.009 6 | 107.84 | | |
| | | | 0.009 2 | 100.00 | | |
| | | | 0.009 3 | 101.96 | | |
| | | | 0.009 3 | 101.96 | | |
| | | | 0.009 2 | 100.00 | | |
| 鼠李糖 | 0.012 8 | 0.013 6 | 0.027 8 | 110.29 | 106.62 | 2.39 |
| | | | 0.027 3 | 106.62 | | |
| | | | 0.027 0 | 104.41 | | |
| | | | 0.027 2 | 105.88 | | |
| | | | 0.026 9 | 103.68 | | |
| | | | 0.027 6 | 108.82 | | |
| 葡萄糖 | 0.148 5 | 0.150 3 | 0.300 2 | 100.93 | 102.67 | 2.25 |
| | | | 0.298 5 | 99.80 | | |
| | | | 0.303 8 | 103.33 | | |
| | | | 0.301 0 | 101.46 | | |
| | | | 0.307 0 | 105.46 | | |
| | | | 0.306 4 | 105.06 | | |
| 半乳糖 | 0.023 8 | 0.026 3 | 0.050 4 | 101.14 | 101.65 | 3.42 |
| | | | 0.051 1 | 103.80 | | |
| | | | 0.051 9 | 106.84 | | |
| | | | 0.050 7 | 102.28 | | |
| | | | 0.049 5 | 97.72 | | |
| | | | 0.049 6 | 98.10 | | |
| 阿拉伯糖 | 0.009 | 0.012 0 | 0.020 4 | 95.00 | 100.14 | 2.71 |
| | | | 0.021 2 | 101.67 | | |
| | | | 0.021 0 | 100.00 | | |
| | | | 0.021 3 | 102.50 | | |
| | | | 0.021 2 | 101.67 | | |
| | | | 0.021 0 | 100.00 | | |

市售口服液与自制口服液单糖组成相似度较高,指纹图谱中有 5 个共有峰,确定其分别为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖。将银杏蜜环口服液中各单糖峰面积代入线性回归方程,折算出单糖浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)后,再分别除以各单糖分子量,得到各单糖摩尔量,以最大的摩尔量为基准,进行归一化后,得到口服溶液单糖组成摩尔比,从表 4 中数据分析,4 批次市售口服液的单糖组成为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖,摩尔比基本一致;6 批次自制口

服液单糖组成为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖,摩尔比基本一致。建立的柱前衍生单糖组成 HPLC 指纹图谱法可用于口服液的质量控制。

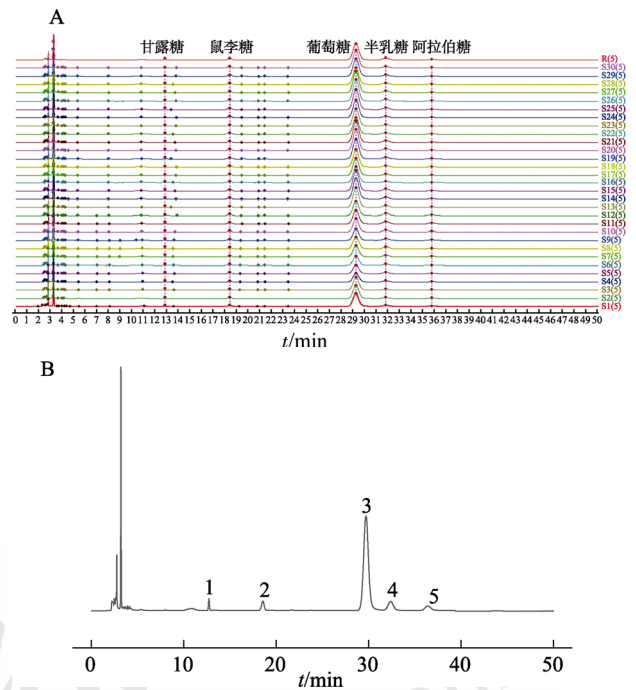


图 2 口服液单糖组成特征图谱

A-HPLC 特征图谱; B-标准特征图谱; 1-甘露糖; 2-鼠李糖; 3-葡萄糖; 4-半乳糖; 5-阿拉伯糖。

Fig. 2 Composition fingerprint of oral liquid monosaccharide A-HPLC characteristic spectrum; B-standard characteristic spectrum; 1-mannose; 2-rhamnose; 3-glucose; 4-galactose; 5-arabinose.

2.4.2 特征图谱中单糖来源分析 分别取“2.2.2”项下的银杏叶提取物、蜜环菌粉、辅料甜菊糖、十二烷基硫酸钠和苯甲酸钠,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样分析,记录各样品色谱图,见图 3,对自制口服溶液及原药材各单糖进行分类及来源分析,见图 4,单糖组成摩尔比见表 5。

通过对银杏蜜环口服溶液及其组方中原药材单糖组成测定可知,辅料十二烷基硫酸钠和苯甲酸钠中并未有单糖检出;水解口服溶液中的葡萄糖来源于蜜环菌粉浸膏、银杏叶提取物和辅料甜菊糖,所以最终口服液中葡萄糖占比高;鼠李糖来源于蜜环菌粉、银杏叶提取物和甜菊糖,在口服液中的占比提高;而甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖仅来源于蜜环菌粉,所以在口服液中的占比均下降。市售口服液与自制口服液单糖摩尔比差异主要是由于所用原料不同所带来的。

表 3 口服液相似度测定结果

Tab. 3 Oral liquid similarity test results

| 批号 | 来源 | 相似度 |
|----------|------------|-------|
| 标准图谱 | - | 1.000 |
| 181202-1 | 邛崃天银制药有限公司 | 0.999 |
| 181202-2 | 邛崃天银制药有限公司 | 0.999 |
| 181202-3 | 邛崃天银制药有限公司 | 1.000 |
| 191140-1 | 邛崃天银制药有限公司 | 0.999 |
| 191140-2 | 邛崃天银制药有限公司 | 0.999 |
| 191140-3 | 邛崃天银制药有限公司 | 0.999 |
| 200728-1 | 邛崃天银制药有限公司 | 0.999 |
| 200728-2 | 邛崃天银制药有限公司 | 0.999 |
| 200728-3 | 邛崃天银制药有限公司 | 0.998 |
| 200763-1 | 邛崃天银制药有限公司 | 0.999 |
| 200763-2 | 邛崃天银制药有限公司 | 0.999 |
| 200763-3 | 邛崃天银制药有限公司 | 1.000 |
| 201031-1 | 自制 | 0.999 |
| 201031-2 | 自制 | 0.999 |
| 201031-3 | 自制 | 0.999 |
| 201110-1 | 自制 | 0.999 |
| 201110-2 | 自制 | 0.999 |
| 201110-3 | 自制 | 0.999 |
| 210722-1 | 自制 | 0.999 |
| 210722-2 | 自制 | 1.000 |
| 210722-3 | 自制 | 1.000 |
| 210723-1 | 自制 | 0.999 |
| 210723-2 | 自制 | 0.999 |
| 210723-3 | 自制 | 0.999 |
| 210724-1 | 自制 | 0.999 |
| 210724-2 | 自制 | 1.000 |
| 210724-3 | 自制 | 1.000 |
| 210725-1 | 自制 | 0.999 |
| 210725-2 | 自制 | 0.999 |
| 210725-3 | 自制 | 0.999 |

表 4 口服液单糖组成及摩尔比

Tab. 4 Monosaccharide composition and molar ratio of oral liquid

| 来源 | 批号 | 单糖组成及摩尔比 | | | | |
|--------|--------|----------|------|------|------|------|
| | | 甘露糖 | 鼠李糖 | 葡萄糖 | 半乳糖 | 阿拉伯糖 |
| 市售口服液 | 181202 | 0.03 | 0.08 | 1.00 | 0.15 | 0.06 |
| | 191140 | 0.04 | 0.09 | 1.00 | 0.15 | 0.06 |
| | 200728 | 0.04 | 0.08 | 1.00 | 0.15 | 0.06 |
| | 200763 | 0.03 | 0.08 | 1.00 | 0.16 | 0.07 |
| 自制口服液 | 201031 | 0.02 | 0.06 | 1.00 | 0.09 | 0.03 |
| | 201110 | 0.02 | 0.06 | 1.00 | 0.08 | 0.03 |
| | 210722 | 0.02 | 0.06 | 1.00 | 0.08 | 0.03 |
| | 210723 | 0.02 | 0.06 | 1.00 | 0.09 | 0.03 |
| | 210724 | 0.02 | 0.06 | 1.00 | 0.08 | 0.03 |
| 210725 | 0.02 | 0.06 | 1.00 | 0.08 | 0.03 | |

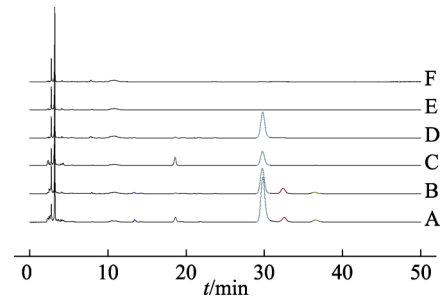


图 3 银杏蜜环口服液及其组方原药材单糖组成液相图谱

A-自制口服液; B-蜜环粉提取液; C-银杏叶提取物; D-甜菊糖; E-十二烷基硫酸钠; F-苯甲酸钠。

Fig. 3 Ginkgo Armillaria oral solution and its composition liquid phase chromatogram of the monosaccharide composition of the original medicinal materials

A-Homemade oral solution; B-honey ring powder extract; C-Ginkgo biloba extract; D-stevia; E-sodium lauryl sulfate; F-sodium benzoate.

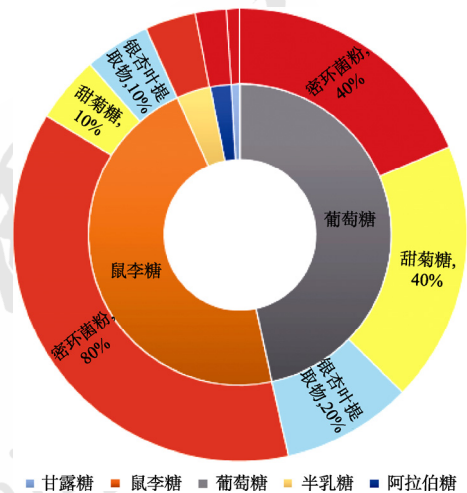


图 4 自制口服液单糖组成来源归属图

Fig. 4 Source map of monosaccharide composition of homemade oral solution

表 5 银杏蜜环口服液及其组方原药材单糖组成及摩尔比

Tab. 5 Monosaccharide composition and molar ratio of Ginkgo Armillaria oral solution and its ingredients

| 样品 | 单糖组成 | 摩尔比 |
|--------|--------------------------|----------------------------------|
| 自制口服液 | 甘露糖: 鼠李糖: 葡萄糖: 半乳糖: 阿拉伯糖 | 0.02 : 0.06 : 1.00 : 0.08 : 0.03 |
| | 蜜环菌粉浸膏 | 0.03 : 0.02 : 1.00 : 0.20 : 0.07 |
| 银杏叶提取物 | 鼠李糖: 葡萄糖 | 0.29 : 1.00 |
| 辅料甜菊糖 | 鼠李糖: 葡萄糖 | 0.02 : 1.00 |

2.5 化学模式识别分析

2.5.1 PCA 以 4 批市售银杏蜜环口服液样品和 6 批自制银杏蜜环口服液样品 HPLC 特征图谱的 5 个共有峰峰面积为变量, 导入 Origin2018 软件, 对进行标准化处理后的共有峰峰面积进行主成分分析。结果以特征值>1 为提取标准, 得到

2 个成分(即主成分)的累积方差贡献率, 为 93.08%, 表明这 2 个主成分能够较好地代表银杏蜜环口服溶液中单糖 HPLC 特征图谱的大部分信息, 结果见表 6, 5 个成分的 PCA 图见图 5。

表 6 口服溶液样品的主成分特征值与贡献率
Tab. 6 Characteristic value and contribution rate of principal components of oral solution samples

| 主成分 | 特征值 | 方差贡献率/% | 累积方差贡献率/% |
|-----|----------|-----------|------------|
| 1 | 2.853 62 | 57.072 40 | 57.072 40 |
| 2 | 1.800 63 | 31.012 53 | 93.084 93 |
| 3 | 0.219 21 | 4.384 17 | 97.469 10 |
| 4 | 0.094 99 | 1.899 72 | 99.368 82 |
| 5 | 0.031 56 | 0.631 18 | 100.000 00 |

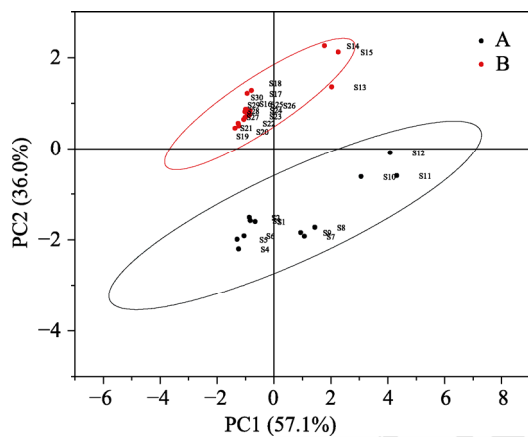


图 5 主成分分析得分图
Fig. 5 Principal component analysis score chart

PCA 结果表明, 10 批银杏蜜环口服溶液样品明显分为 A、B 2 组, 又可分为 4 类, S16~S30 在主成分得分图的左上侧分为第 1 类; S1~S6 在主成分得分图的左下侧分为第 2 类; S13~15 在主成分得分图的右上侧分为第 3 类; S7~9 和 S10~12 在主成分得分图的右下侧分为第 4 类。

2.5.2 聚类分析 采用 Origin2018 Heat Map 工具对 10 批口服溶液样品中的 5 个共有峰峰面积为变量, 对数据进行归一化处理, 以组间连接平方欧式距离测度的方式进行聚类分析, 得到聚类热图见图 6。

结果表明, 10 批银杏蜜环口服溶液样品明显聚为 2 大组, 4 类, S13~S15 和 S10~12 聚为第 1 组, S1~S9 和 S16~S30 聚为第 2 组。其中 S1~S9 和 S16~S30 差异较小, 而 S10~S15 这 6 批与其他批次差异较大, 可能是原料不同所致, 表明市售银杏蜜环口服溶液与自制银杏蜜环口服溶液既有差别也有联系, 同时市售样品和自制样品也分别存在批间差异, 其结果与 PCA 结果一致。

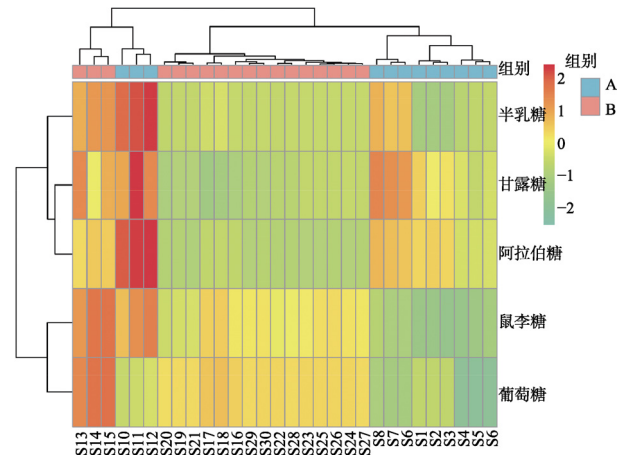


图 6 口服溶液聚类分析热图
Fig. 6 Oral solution cluster analysis heat map

2.6 不同厂家银杏叶提取物单糖组成结果分析

分别购买 5 个不同厂家银杏叶提取物, 按口服液制备工艺配制溶液, 按“2.2.2”项下供试品溶液制备, 在“2.1”项色谱条件下检测, 所得 HPLC 图谱见图 7, 单糖组成摩尔比见表 7。

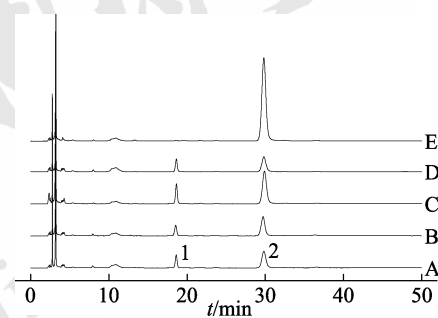


图 7 不同厂家银杏叶提取物单糖组成液相图谱
A-A 厂家; B-D 厂家; C-B 厂家; D-C 厂家; E-E 厂家; 1-鼠李糖; 2-葡萄糖。

Fig. 7 *Ginkgo biloba* extract monosaccharide composition liquid phase chromatogram in different manufacturers
A-manufacturer A; B-manufacturer D; C-manufacturer B; D-manufacturer C; E-manufacturer E; 1-rhamnose; 2-glucose.

表 7 不同厂家银杏叶提取物单糖组成摩尔比
Tab. 7 Monosaccharide composition molar ratio of *Ginkgo biloba* extract from different manufacturers

| 来源 | 单糖组成 | |
|------|------|------|
| | 鼠李糖 | 葡萄糖 |
| A 厂家 | 0.37 | 1.00 |
| B 厂家 | 0.29 | 1.00 |
| C 厂家 | 0.40 | 1.00 |
| D 厂家 | 0.34 | 1.00 |
| E 厂家 | 0.00 | 1.00 |

不同厂家的银杏叶提取物的单糖组成存在显著差异, 通过与口服液单糖组成对比发现, E 厂家不符合规定。从表 7 可知, 不同厂家的银杏叶

提取物单糖组成中葡萄糖占比较大,表明可在一定程度上表征和区分不同产地的银杏叶提取物。

2.7 不同厂家蜜环菌粉单糖组成结果分析

将 2 个不同厂家的蜜环粉按口服液制备工艺进行提取,得到浸膏,将浸膏按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件检测,所得 HPLC 图谱见图 8,单糖组成及摩尔比见表 8。

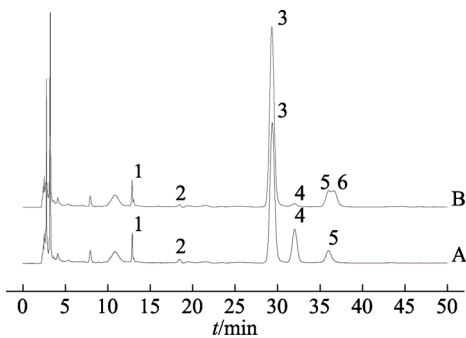


图 8 不同厂家蜜环菌粉单糖组成液相图谱
A-F 厂家; B-G 厂家; 1-甘露糖; 2-鼠李糖; 3-葡萄糖; 4-半乳糖; 5-阿拉伯糖; 6-木糖。
Fig. 8 liquid phase chromatogram of *Armillaria mellea* powder monosaccharide in different manufactures
A—manufacturer F; B—manufacturer G; 1—mannose; 2—rhamnose; 3—glucose; 4—galactose; 5—arabinose; 6—xylose.

表 8 不同厂家蜜环菌粉单糖组成及摩尔比
Tab. 8 Monosaccharide composition and molar ratio of *Armillaria mellea*

| 来源 | 单糖组成 | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|
| | 甘露糖 | 鼠李糖 | 葡萄糖 | 半乳糖 | 阿拉伯糖 | 木糖 |
| F 厂家 | 0.03 | 0.02 | 1.00 | 0.20 | 0.07 | 0 |
| G 厂家 | 0.03 | 0.01 | 1.00 | 0.02 | 0.17 | 0.17 |

不同厂家的蜜环菌粉的共有色谱峰存在差异。通过与口服液单糖组成对比发现, F 厂家生产的蜜环菌粉与市售口服液中单糖组成一致, 与文献报道蜜环菌粉单糖组成一致^[9], 因此通过建立的柱前衍生单糖组成 HPLC 指纹图谱法, 与市售口服液单糖组成比较, 可有效鉴别蜜环菌粉, 可为蜜环菌粉质量控制提供参考依据。

2.8 多糖的单糖组成测定

按口服液制备工艺分别对 100 g 蜜环菌粉提取所得的浸膏、3 g·L⁻¹ 的银杏叶提取物、1 L 市售口服液和自制口服液浓缩后加入 4 倍体积 95%乙醇醇沉过夜, 离心, 沉淀挥去乙醇, 烘干后按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样分析, 记录各样品色谱图见图 9, 单糖组成及摩尔比见表 9。

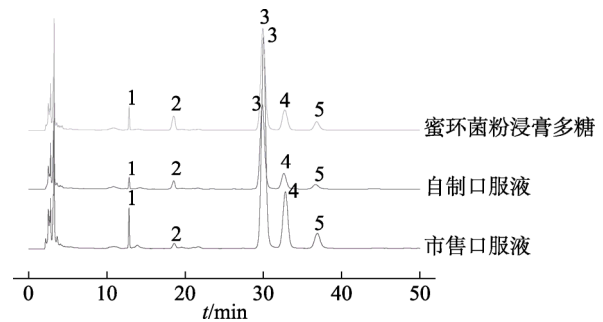


图 9 口服溶液及其原药材多糖单糖组成液相图谱
1-甘露糖; 2-鼠李糖; 3-葡萄糖; 4-半乳糖; 5-阿拉伯糖。
Fig. 9 Oral solution and its raw medicinal material polysaccharide monosaccharide composition liquid phase chromatogram
1—mannose; 2—rhamnose; 3—glucose; 4—galactose; 5—arabinose.

表 9 多糖单糖组成及摩尔比
Tab. 9 Polysaccharide monosaccharide composition and molar ratio

| 样品 | 单糖组成 | 摩尔比 |
|----------|--------------------------|------------------------------|
| 蜜环菌粉浸膏多糖 | 甘露糖: 鼠李糖: 葡萄糖: 半乳糖: 阿拉伯糖 | 0.05: 0.02: 1.00: 0.31: 0.15 |
| 自制口服液多糖 | 甘露糖: 鼠李糖: 葡萄糖: 半乳糖: 阿拉伯糖 | 0.05: 0.02: 1.00: 0.30: 0.14 |
| 市售口服液多糖 | 甘露糖: 鼠李糖: 葡萄糖: 半乳糖: 阿拉伯糖 | 0.05: 0.07: 1.00: 0.09: 0.08 |

辅料中并未有多糖生成, 同时结合银杏叶提取物提取工艺及实验研究发现, 银杏叶提取物中并无多糖沉淀。市售口服液、自制口服液与蜜环菌粉浸膏多糖的单糖组成一致, 其中葡萄糖占比较大; 自制口服液与市售口服液多糖的单糖摩尔比差异, 是由不同原料所带来的, 而自制口服液多糖与蜜环菌粉多糖的单糖组成摩尔比基本一致, 说明口服液中的多糖主要来源于蜜环菌粉。

3 讨论

糖类物质作为银杏蜜环口服溶液中各组分共有的成分, 多糖是蜜环菌粉中重要的活性物质^[20-21], 建立方法对其进行质量控制是十分必要的。对于糖的测定, 现行标准采用 3,5-二硝基水杨酸显色法, 药典中常采用硫酸苯酚显色法。由于口服液是复方, 其制作工艺中又添加了矫味剂甜菊糖, 在实际测定中, 辅料中的还原糖会对测定结果产生干扰, 从而造成测定值偏高。所以采用 3,5-二硝基水杨酸显色法或硫酸苯酚显色法测定其含量, 并无实际的质量控制意义。因此本实验建立的柱前衍生单糖组成 HPLC 特征图谱, 测定口服液及其组方中原药材的单糖组成, 以共有峰特征来区分银杏提取物、蜜环菌粉、矫味剂甜菊

糖的差异,并将其作为银杏蜜环口服液的质量检查项,对相关口服液的质量控制是非常必要的。

本实验对口服液与其组方中原药材进行单糖组成测定,发现葡萄糖占比较大,来源于蜜环菌粉、银杏叶提取物及甜菊糖;甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖主要来源于蜜环菌粉,鼠李糖主要来源于银杏叶提取物、甜菊糖。同时,本实验通过提取口服液及其组方中原药材多糖并对其单糖组成进行测定,发现口服液多糖来源于蜜环菌粉浸膏,沉淀多糖的单糖组成分析进一步证实了这个结论,自制口服液多糖的单糖组成及摩尔比为 0.05 : 0.02 : 1.00 : 0.30 : 0.14,与蜜环菌浸膏提取多糖基本一致。

综上所述,银杏蜜环口服液中单糖 HPLC 特征图谱共有峰经相似度评价、主成分分析及聚类分析均有明显差异,所建 HPLC 特征图谱可用于综合评价银杏蜜环口服液的质量,为其质量标准制定提供参考依据。

REFERENCES

- [1] WANG S J, YUAN T Y, ZHANG J N. Research advanced of *Ginkgo biloba* extract and its active components in improving cognitive function[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30(10): 1819-1824.
- [2] LIU L, WANG Y, ZHANG J, et al. Advances in the chemical constituents and chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaf, extract, and phytopharmaceuticals[J]. J Pharm Biomed Anal, 2021(193): 113704.
- [3] ZHANG L H, WU T T, ZHAO L G, et al. Advances in studies on anticancer activity of flavonoids from *Ginkgo biloba* extract[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2019, 54(6): 444-449.
- [4] NI J X. Effects of ginkgo folium extract combined with prednisone on ghrelin-obestatin signaling pathway in mice with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(7): 826-831.
- [5] REN X L, HUANG L, LIU Y, et al. A rapid health technology assessment of *Ginkgo biloba* extract injection for the treatment of ischemic stroke[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(11): 1048-1052.
- [6] ZUO W, YAN F, ZHANG B, et al. Advances in the studies of *Ginkgo biloba* leaves extract on aging-related diseases[J]. Aging Dis, 2017, 8(6): 812-826.
- [7] LIU T R, ZHANG W W, WANG Z Q, et al. Law of content change of extracellular enzymes and polysaccharides in *Armillaria gallica*[J]. J Chin Med Mat(中药材), 2019, 42(1): 57-61.
- [8] HUANG J W, LAI C J S, YUAN Y, et al. Correlative analysis advance of chemical constituents of *Polyporus umbellatus* and *Armillaria mellea*[J]. Chin J Chin Mat Med(中国中药杂志), 2017, 42(15): 2905-2914.
- [9] GENG G Q, SHAO J, XIE X R, et al. Protective effect of total *Hedysari radix* polysaccharide on brain and heart of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(3): 269-273.
- [10] LIN L Z, YAN G Z, GE C J, et al. Analysis on the effect of *Armillaria mellea* on the serum of patients with hyperglycemia[J]. Edible Fungi of China(中国食用菌), 2019, 38(3): 61-63.
- [11] LIN Y E, WANG H L, LU K H, et al. Water extract of *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. alleviates the depression-like behaviors in acute-and chronic mild stress-induced rodent models via anti-inflammatory action[J]. J Ethnopharmacol, 2021(265): 113395.
- [12] YANG C M. Design of Chinese materia medica compound preparation based on clinical value and inheritance and innovation[J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2019, 50(17): 3997-4002.
- [13] QIN K M, YANG B, HU J, et al. Application status and thinking of quantitative analysis of multi-components by single marker in quality control of multi-components traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2018, 49(3): 725-731.
- [14] LV J L, YANG B, LI M X, et al. Simultaneous determination of eleven components in *Ginkgo biloba* leaves by high performance liquid chromatography method[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(5): 931-935.
- [15] WANG T, BU L S, LIU D S, et al. Simultaneous determination of four free flavonoids extracted from *Ginkgo biloba* leaf and its extracts by HPLC[J]. China Food Additives(中国食品添加剂), 2019, 30(4): 154-158.
- [16] YE T, LIANG W Y, LIANG L J, et al. Application of HPLC fingerprint in quality of traditional Chinese medicine preparations[J]. Mod Trad Chin Mede Mat Med-World Sci Tech(世界科学技术-中医药现代化), 2017, 19(11): 1794-1800.
- [17] ZHAO Z F, ZOU T, WU A, et al. Establishment of the UPLC fingerprint of classical herbal prescription Huanglian Decoction and determination of the contents of 6 components[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(24): 2859-2867.
- [18] 游心涛. 银杏蜜环口服制剂及其制备方法: 中国, CN1899324A[P]. 2007-01-24.
- [19] CHEN N. The chemical constituents and biological activity research of *Armillaria mellea*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2012.
- [20] CHANG C C, CHENG J J, LEE I J, et al. Purification, structural elucidation, and anti-inflammatory activity of xylosyl galactofuran from *Armillaria mellea*[J]. Int J Biol Macromol, 2018(114): 584-591.
- [21] WU J, ZHOU J, LANG Y, et al. A polysaccharide from *Armillaria mellea* exhibits strong *in vitro* anticancer activity via apoptosis-involved mechanisms[J]. Int J Biol Macromol, 2012, 51(4): 663-667.

收稿日期: 2021-07-21
(本文责编: 陈怡心)