

含银杏叶提取物胶囊中黄酮类化合物检测方法改进

Improvement of determination method of total flavonoids in extract of *Ginkgo biloba* leaves of capsules

雷爱秋^{1,2} 华洋林² 孙为正¹

LEI Ai-qiu^{1,2} HUA Yang-lin² SUN Wei-zheng¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640; 2. 无限极(中国)有限公司, 广东 广州 510665)
(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 2. Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510665, China)

摘要:黄酮类化合物是银杏叶提取物中最重要的成分之一, 采用亚硝酸钠—硝酸铝—氢氧化钠显色法测定保健食品中总黄酮含量存在一定缺陷。通过研究 6 种银杏叶提取物中主要的黄酮类组分对总黄酮含量的贡献值, 结果表明槲皮苷是该方法下对总黄酮含量贡献最大的组分。进一步研究了该方法测定 HZ 胶囊(某公司生产的银杏叶提取物胶囊)中总黄酮含量过程中取样量、洗脱液乙醇浓度和超声时间对测定结果的影响, 结果表明洗脱液乙醇浓度和超声时间对 HZ 胶囊中总黄酮含量具有重要影响。改进方法后, HZ 胶囊中总黄酮含量在 1.68~1.83 g/100 g, 平均含量为 1.71~1.77 g/100 g, 相对标准偏差为 1.36%~4.08%, 芦丁回收率为 94.05%~100.44%, 重复性、精密度和加标回收率结果表明改进后的方法符合 HZ 胶囊生产过程用于质量控制的检测方法要求。

关键词: 胶囊; 银杏叶提取物; 黄酮含量; 测定方法改进

Abstract: Flavonoids are the pharmacologically important chemical groups. NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH colorimetry assay for determination of total flavonoids in health foods have some defects. In this work, contribution of six key flavonoids components of extract of *Ginkgo biloba* leaves to total flavonoids content in the NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH colorimetry assay were evaluated. Results showed that quercetin made the most contribution to total flavonoids content. Sample quantity, alcohol concentration of eluant, and ultrasonic times in this assay were evaluated. Alcohol concentration of eluant and ultrasonic times affected total flavonoids content in HZ Capsules. By using the improved method, total flavonoids content of HZ Cap-

sules were between 1.68 g/100 g and 1.83 g/100 g, the average contents ranged from 1.71 g/100 g to 1.77 g/100 g, the relative standard deviation were between 1.36% and 4.08%, the recoveries of rutin ranged from 94.05% to 100.44%. Results from the repetitive test, precision test and recovery test indicated that this improved method could meet the demand for determination of total flavonoids in HZ Capsules to quality control during processing.

Keywords: capsules; extract of *Ginkgo biloba* leaves; total flavonoids content; improvement of the determination method

银杏叶提取物(extract of *Ginkgo biloba* leaves)是以银杏叶为原料, 利用溶剂分离纯化制得的一类产品, 主要含有黄酮类和萜内酯类两类活性成分^[1]。目前其标准物是按德国 Schwabe 专利工艺生产的 EGb761, 其成分包括黄酮 24%, 萜内酯 6%, 白果酸 < 0.000 5%, 原花青素类 7.0%, 羧酸类成分 13.0%, 儿茶素类 2.0%, 非黄酮苷类 20%, 高分子化合物 4.0%, 无机物 5.0%, 水分 3.0%, 其它 3.0%^[2-3]。黄酮类化合物是银杏叶提取物中的主要药效成分, 其中槲皮素、山奈素、异鼠李素、槲皮苷、山奈苷、水仙苷等是其主要的黄酮组分^[4], 该类化合物具有广泛的生物活性, 主要有抗氧化、抗肿瘤、提高人体免疫力等作用^[4]。

含有银杏叶提取物的保健食品, 其总黄酮含量是主要的质量控制指标, 测定方法主要有色谱法和光谱法等, 一般来说, 光谱法大多用于测定总黄酮含量, 而色谱法多用于黄酮各组分的定量定性分析^[5-6]。光谱法中主要采用紫外分光光度法(UV 法)测定, 最常用的方法是亚硝酸钠—硝酸铝—氢氧化钠^[7-9]。UV 法由于具有测定方法相对简单、快捷、价格低廉等优点, 常用于快速测定银杏叶提取物中总黄酮含量, 在其相应产品的生产中, 也多用该方法进行产品质量及稳定性等指标的生产控制。该方法的原理为先用亚硝酸钠还原黄酮, 再加 Al³⁺ 络合, 最后加 NaOH 使黄酮 C 环在碱性

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(编号: 2012B090600025); 企事业委托项目(编号: 2014440002010131)

作者简介: 雷爱秋, 女, 华南理工大学在读硕士研究生。

通讯作者: 孙为正(1983—), 男, 华南理工大学研究员, 博导, 博士。

E-mail: fewzhsun@scut.edu.cn

收稿日期: 2015-04-15

条件下开裂生成查耳酮结构而显红橙色,在500~510 nm处用比色法进行含量测定^[10]。但是它的显色发生在黄酮B环3',4'-邻二酚羟基部位,不具备邻二酚羟基结构的黄酮是不显色的,此外,各黄酮组分在该方法下的响应值也存在差异。因此,存在一些不法企业对银杏提取物进行掺假,人为加入某些在该方法下具有响应值的物质或者响应值高的黄酮组分。Demirezer等^[3]针对不同厂家生产的银杏叶提取物的化学成分进行分析测定,结果发现不同厂家的产品化学成分存在一定差异。

目前,银杏叶提取物中总黄酮测定方法已有大量文献报道,但关于含有银杏叶提取物的保健品,尤其是胶囊类产品中总黄酮含量的测定方法研究较少,且主要集中在检测波长、线性范围、精密度等方面^[11-12],未对样品前处理、取样量及各黄酮组分对总黄酮含量的影响等进行研究。本研究拟首先研究UV法下银杏叶提取物中6种典型黄酮类化合物对总黄酮含量的影响,再对含有银杏叶提取物的胶囊产品的总黄酮测定方法进行优化,以期对相关保健食品的生产过程监控提供方法指导。

1 材料与方 法

1.1 原料及试剂

芦丁标准品、槲皮素、山奈素、异鼠李素、槲皮苷、山奈苷、水仙苷:中国药品生物制品检定所;

亚硝酸钠、硝酸铝、无水乙醇、氢氧化钠、甲醇:分析纯,国药集团上海化学试剂公司;

聚酰胺树脂(80~100目):浙江台州路桥四甲生化塑料厂;

试验用水经过纯水仪纯化。

1.2 主要仪器与设备

紫外分光光度计:UV2100型,尤尼柯(上海)有限公司;
高功率超声波清洗器:KQ-800KDE型,昆山市超声仪器有限公司;

电子天平:AL204型,瑞士梅特勒—托利多公司。

1.3 试验方法

1.3.1 聚酰胺树脂处理 取聚酰胺树脂粉末6g,用95%的沸乙醇回流2h,放冷,取出,离心(2000×g,10min),换上新鲜的乙醇重新回流2h,离心(2000×g,10min),以水饱和,湿法装柱。装量约为2g。

1.3.2 标准品溶液制备及处理

(1)标准品溶液制备:分别称取一定量槲皮素、山奈素、异鼠李素、槲皮苷、山奈苷、水仙苷标准品配置,浓度分别为488.444、228.252、256.328 μg/mL标准品溶液,即得。

(2)标品处理:取过滤后的标品溶液5.00 mL上聚酰胺树脂,待测定液充分吸附后,用70%的乙醇洗脱,至流出液基本无色,以洗脱液定容至25 mL容量瓶中,待用。

(3)未过柱标品处理:取标准品溶液5.00 mL定容至25 mL容量瓶中,待用。

1.3.3 标准曲线制作 以芦丁标准品溶液,采用亚硝酸钠—硝酸铝—氢氧化钠显色法,504 nm处测定吸光值,绘制芦丁浓度(μg/mL)与吸光值的标准曲线。标准曲线方程为

$Y = 169.1X - 1.838$ ($R = 0.997$),其中Y为芦丁浓度(μg/mL),X为吸光值。

1.3.4 总黄酮含量测定 分别精密量取定容后的样品液5.00 mL于10 mL比色管中,采用亚硝酸钠—硝酸铝—氢氧化钠显色法,测定504 nm处吸光值,以零管或洗脱液做空白,计算样品中的总黄酮含量以芦丁计。

1.3.5 UV法测定HZ胶囊中总黄酮含量的优化

(1)取样量的影响:分别取HZ胶囊粉0.1、0.3、0.5、0.7 g,70%的乙醇定容至25 mL,超声60 min,摇匀,过滤,取续滤液5.00 mL上聚酰胺树脂,待测定液充分吸附后,用70%的乙醇洗脱,至流出液基本无色,以洗脱液定容至25 mL量瓶中,待用。以总黄酮含量为考察值。黄酮化合物测定方法同1.3.3。

(2)洗脱液的影响:洗脱液浓度分别为50%、70%、95%的乙醇,其余操作同1.3.3。

(3)超声时间的影响:超声时间分别为30、60、120 min,其余操作同1.3.3。

(4)重复性、精密度和回收率:以优化方法进行重复性、精密度和回收率(加入一定量芦丁标准品)试验。

1.4 数据统计与分析

采用SPSS 17.0对数据进行分析处理。

2 结果与讨论

2.1 各黄酮组分对总黄酮含量的贡献

亚硝酸钠—硝酸铝—氢氧化钠测定总黄酮含量时要求黄酮醇类成分邻位无取代的邻二酚羟基部位,不具有邻位无取代邻二酚羟基的黄酮醇类成分在该体系下不显色^[10]。因此,该方法具有一定的特异性,即使具备上述结构,不同黄酮类化合物与铝盐生成螯合物的吸光值也存在一定差异,进而在计算含量时(以芦丁计)造成差异。由表1可知,在亚硝酸钠—硝酸铝—氢氧化钠显色法测定总黄酮含量时,各黄酮组分标准品对总黄酮含量的贡献值具有较大差异。在聚酰胺树脂洗脱前,槲皮苷对总黄酮含量的贡献值最大,达到136.11%,其次是槲皮素,达到57.99%,其余4种黄酮标准品对总黄酮含量的贡献均较小,均不超过20%,其中山奈苷仅为1.95%。

以银杏提取物为原料生产的保健食品,在测定总黄酮含量时,需要进行前处理,即使用聚酰胺树脂进行吸附洗脱,利用黄酮类化合物富含酚羟基的特点,通过分子中的酚羟基与聚酰胺分子中的酰胺基形成氢键缔合产生吸附^[13]。聚酰胺树脂对产品中的黄酮进行吸附,然后洗脱进行测定。因此,洗脱过程可能会造成黄酮一定量的损失。由表1可知,各黄酮组分在洗脱后对总黄酮含量的贡献值降低,损失率较大的是山奈苷、水仙苷和异鼠李素,损失率均超过40%。经洗脱后,槲皮苷对总黄酮含量的贡献率仍为105.15%。

表2是不同黄酮组分的UV响应值,以已知的标准品作为待测样品,按照保健食品中总黄酮规定的检测方法进行样品处理。由表2可知,只有槲皮苷的响应值与芦丁/样品分子量比值基本一致,故此测定的6种黄酮组分中槲皮苷对总黄酮含量贡献值最大。

表 1 各黄酮组分对总黄酮含量贡献率

Table 1 The contribution rate of different flavonoids components on total flavonoids content

标准品名称	洗脱前				洗脱后			
	吸光值	相当于芦丁浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	真实浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	贡献率/%	吸光值	相当于芦丁浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	损失率/%	贡献率/%
槲皮素	0.346	283	488	57.99	0.319	261	7.77	53.48
山奈素	0.107	81	444	18.24	0.101	76	6.17	17.12
异鼠李素	0.046	30	228	13.16	0.031	17	43.33	7.46
槲皮苷	0.416	343	252	136.11	0.324	265	22.74	105.15
山奈苷	0.017	5	256	1.95	0.002	-7	240.00	-2.73
水仙苷	0.023	10	328	3.05	0.014	3	70.00	0.91

表 2 不同黄酮组分的 UV 响应值

Table 2 UV response value of different flavonoids components

样品	槲皮素	山奈酚	异鼠李素	槲皮苷	山奈苷	水仙苷	检测机构
响应值	0.62	0.07	0.12	1.06	0.04	0.07	实验室
响应值	0.58	0.18	0.13	1.36	0.02	0.03	第三方
分子量	302.23	286.23	316.26	448.38	578.57	638.18	—
芦丁/样品 分子量比值	2.02	2.13	1.93	1.36	1.06	0.96	—

2.2 UV 法检测 HZ 胶囊总黄酮含量的优化

针对以银杏叶提取物为原料的保健食品总黄酮的测定方法存在一定问题,对其成品取样量、超声时间、洗脱液乙醇浓度进行研究,该批 HZ 胶囊经第三方检测,总黄酮含量约为 1.75 g/100 g。

2.2.1 取样量的影响 表 3 是 HZ 胶囊成品取样量对总黄酮含量的影响。由表 3 可知,随着取样量的增加,黄酮含量增加,取样量达在 0.3~0.5 g 时总黄酮含量较为稳定,为了称取的准确性选取样品取样量为 0.5 g。

表 3 成品取样量对 HZ 胶囊总黄酮含量的影响

Table 3 Effect of product sample quantity on total flavonoids content of HZ capsules

取样量/g	吸光值	黄酮含量/($10^{-2}\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
0.1	0.074	1.33
0.3	0.258	1.74
0.5	0.425	1.75
0.7	0.633	1.88

2.2.2 洗脱液的影响 表 4 是洗脱液乙醇浓度对 HZ 胶囊总黄酮含量的影响。由表 4 可知,随着洗脱液乙醇浓度升高,黄酮含量呈现先增加后下降的趋势,洗脱液乙醇浓度在 70% 时含量较为符合 HZ 胶囊中总黄酮的实际含量,因此选取洗脱液乙醇浓度为 70%。

表 4 洗脱液对 HZ 胶囊总黄酮含量的影响

Table 4 Effect of eluent on total flavonoids content of HZ capsules

洗脱液乙醇浓度/%	吸光值	黄酮含量/($10^{-2}\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
50	0.401	1.65
70	0.421	1.73
95	0.251	1.02

2.2.3 超声时间的影响 由表 5 可知,随着超声时间的延长,黄酮含量呈现增加趋势,超声时间在 60 min 时含量较为符合 HZ 胶囊中总实际含量,因此选取超声时间为 60 min。

2.2.4 重复性和精密度 对上述优化的 3 个试验参数进行重复性和精密度试验,结果(表 6)表明 HZ 胶囊中总黄酮含

表 5 超声时间对 HZ 胶囊总黄酮含量的影响

Table 5 Effect of ultrasonic times on total flavonoids content of HZ capsules

超声时间/min	吸光值	黄酮含量/($10^{-2}\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
30	0.354	1.45
60	0.426	1.75
120	0.462	1.89

表 6 重复性试验

Table 6 The repetitive test and precisiion test ($n=12$)

样品序号	吸光值	黄酮含量/ ($10^{-2}\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	黄酮含量平均值/ ($10^{-2}\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%
1	0.411	1.71		
2	0.421	1.75	1.72	1.36
3	0.416	1.71		
4	0.430	1.77		
5	0.427	1.76	1.74	2.70
6	0.406	1.68		
7	0.447	1.83		
8	0.411	1.69	1.77	4.08
9	0.433	1.78		
10	0.405	1.68		
11	0.413	1.71	1.71	2.03
12	0.423	1.75		

量在 1.68~1.83 g/100 g, 平均含量为 1.71~1.77 g/100 g, 相对标准偏差在 1.36%~4.08%, 说明该方法的重复性和精密密度较好, 符合 HZ 胶囊生产过程中用于质量控制的检测方法对重复性和精密密度的要求。

2.2.5 回收率 称取质量如表 7 所列的 HZ 胶囊样品和对

应的芦丁标准品, 采用上述改进后的方法进行加标回收率试验, 结果见表 7。改进后的方法芦丁回收率在 94.05%~100.44%, 平均回收率为 97.69%, 相对标准偏差为 3.88, 结果表明改进后的方法符合 HZ 胶囊生产过程中用于质量控制的检测方法要求。

表 7 回收率试验

Table 7 The recovery test ($n=5$)

样品 序号	HZ 原粉 质量/g	HZ 原粉中黄酮含量/ ($10^{-2} \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	芦丁添加量/ mg	吸光值	测定黄酮含量/ ($10^{-2} \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
1	0.253 4	1.73	3.5	0.374	2.98	94.05		
2	0.250 4	1.71	3.4	0.375	3.03	100.44		
3	0.251 0	1.71	3.2	0.355	2.86	93.19	97.69	3.88
4	0.251 3	1.71	3.0	0.358	2.89	101.34		
5	0.250 2	1.72	3.2	0.365	2.96	99.44		

3 结论

(1) 本试验考察了银杏叶提取物中 6 种主要黄酮化合物对亚硝酸钠—硝酸铝—氢氧化钠紫外分光光度法测定总黄酮含量时对总黄酮含量的贡献, 各黄酮单体在该方法中对总黄酮含量的贡献值不同, 槲皮苷是贡献最大的黄酮组分。利用该方法测定胶囊产品中总黄酮含量具有较大的局限性, 不能应用于银杏叶提取物原料的筛选, 可用于银杏叶提取物原料确定后, 产品的质量控制。

(2) 取样量、洗脱液乙醇浓度和超声时间对亚硝酸钠—硝酸铝—氢氧化钠紫外分光光度法测定胶囊中总黄酮含量具有重要影响, 改进后的测定条件为取样量 0.5 g、洗脱液乙醇浓度 70%、超声时间 60 min, 上述条件下, 方法的重复性和精密密度良好, 加标回收率平均为 97.69%, 因此, 改进后的测定方法符合银杏叶提取物胶囊产品生产过程中的质量控制。

本研究针对该测定方法进行了优化, 可进一步对该方法的测量不确定度进行深入研究。

参考文献

- [1] 郭玉梅, 杨景和, 吴霞. 银杏叶提取物中总黄酮含量的分析方法研究[J]. 山东大学学报: 理学版, 2009, 44(5): 40-44.
- [2] 徐芳, 李杰, 毛宇, 等. 银杏叶提取物的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(16): 124-127.
- [3] Demirezer L Ö, Büyükkaya A, Uçaktürk E, et al. Adulteration determining of pharmaceutical forms of ginkgo biloba extracts from different international manufacturers[J]. Records of Natural Products, 2014, 8(4): 394-400.
- [4] 吴超, 苏红利, 张晓鸣. 银杏叶提取物制取黄酮苷元的酶解工艺研究[J]. 食品与机械, 2005, 21(6): 27-35.
- [5] Van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1 216(11): 2 002-2 032.
- [6] Liu Xin-guang, Wu Si-qi, Li Ping, et al. Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoid in Ginkgo biloba[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2015, 113: 212-225.
- [7] 丁嘉信, 李万忠, 李慧芬, 等. 银杏叶提取物总黄酮紫外分光光

度法含量测定的适应性研究[J]. 食品与药品, 2012, 14(7): 260-263.

- [8] 刘小柔, 王存芳, 严启新. 银杏叶提取物在保健食品中总黄酮测定方法的应用[J]. 食品工业科技, 2005, 26(6): 174-175.
- [9] 张志红, 黄毅. 银杏叶提取物中黄酮类化合物的分光光度分析研究[J]. 分析试验室, 2005, 24(6): 17-19.
- [10] 任珊珊, 包保全, 毛婷, 等. 中药中总黄酮的含量测定方法研究进展[J]. 北方药学, 2015(3): 112-115.
- [11] 王严国, 许勇, 凌娟. 紫外分光光度法测定复方银杏叶胶囊总黄酮含量[J]. 东南国防医药, 2005, 7(3): 206-207.
- [12] 巫军, 李松林. 紫外分光光度法测定银杏叶胶囊总黄酮含量[J]. 解放军药学学报, 2002, 18(2): 109-110.
- [13] 王克勤, 严志慧, 罗军武, 等. 聚酰胺树脂分离纯化芹菜黄酮的工艺研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 46-50.

(上接第 36 页)

- [12] 华鹤良. 乳酸菌的分离鉴定及其抗菌肽与发酵性能研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2014: 32.
- [13] Plessas S, Bekatorou A, Gallanagh J, et al. Evolution of aroma volatiles during storage of sourdough breads made by mixed cultures of Kluyveromyces marxianus and Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus or Lactobacillus helveticus[J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 883-889.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [15] 马燕, 倪永清, 卢士玲, 等. 新疆特色干酪中乳酸菌的分离鉴定[J]. 中国酿造, 2011(8): 38-40.
- [16] 卢晓莉. 鱼鲑制品中乳酸菌的分离、筛选及应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007: 26-27.
- [17] Greco M, Mazzette R. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausage[J]. Meat Science, 2005, 69(4): 733-739.
- [18] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999: 176-182.
- [19] Buchanan R E, Gibbons N E, Holt J G, 等. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [20] 刘贞, 刘小翠, 赵思明, 等. 发酵米浆中高发酵性能酵母菌和乳酸菌的筛选和鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 232-235.