

不同生长季节银杏叶中总银杏酸的动态变化研究

鞠建明¹, 沈红¹, 钱士辉¹, 柯清^{2*}, 周擎^{2*}, 段金廛²

(1. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046)

摘要:目的 探索不同栽培模式银杏叶在不同生长季节中总银杏酸量变化规律。方法 采用 HPLC 测定银杏叶中总银杏酸的量。色谱条件为 Alltima C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相甲醇-1%冰醋酸水溶液(90:10), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 310 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL, 外标法计算质量分数。结果 银杏叶中总银杏酸范围为 0.49%~3.43%。同一栽培模式下不同采收期银杏叶中总银杏酸量呈逐月下降趋势, 5月量最高, 9月底10月初量最低。剪枝和移栽对银杏酸量均有明显的影响。结论 这一变化规律为确定银杏叶的栽培模式和采收期提供了科学依据。

关键词:银杏叶;总银杏酸;HPLC;不同栽培模式;不同采收期;变化规律

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)02-0305-03

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 干燥叶, 主要是扩张血管、改善脑循环、抑制血小板活化因子作用, 用于冠心病、脑血栓、哮喘和神经系统疾病的治疗。银杏叶的主要活性成分是黄酮类(flavonoids)和萜内酯类(terpenes)化合物, 还含有另一类具有重要生理活性的组分^[1], 系 6-烷基或 6-烯基水杨酸的衍生物, 6位上的侧链碳原子数可从 13 至 19, 侧链双键数可为 0~3 个, 因此银杏酸是一同系混合物, 其侧链分别为 C₁₃H₂₇ (C₁₃:0), C₁₅H₃₁ (C₁₅:0), C₁₅H₂₉ (C₁₅:1), C₁₇H₃₃ (C₁₇:1), C₁₇H₃₁ (C₁₇:2) 等。银杏酸是银杏叶、银杏叶提取物(EGb)及其制剂中的主要毒性物质, 具有致敏性、细胞毒性和免疫毒性等作用, 对人类健康存在潜在危害, 因此银杏酸的限量是评价银杏叶制剂质量的关键指标之一^[3]。

《中国药典》2005 年版一部银杏叶质量标准仅对其活性成分总黄酮醇苷和总内酯进行了测定, 而对其毒性成分总银杏酸尚未做限量规定。本研究参考有关文献^[4,5], 制定了银杏叶中总银杏酸的 HPLC 测定方法, 对国家中药材 GAP 基地“银杏叶 GAP 邳州示范基地”种植的不同栽培模式银杏叶在不同生长季节中总银杏酸进行了测定, 分析了银杏酸的动态变化规律, 为银杏叶的合理采收和质量控制提供了科学依据。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪 (Alliance2695 四元泵

及自动进样系统, 996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站), KQ-250E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Millipore Milli-Q 超纯水制备仪(美国), Mettler 万分之一及十万分之一电子天平(瑞士)。

白果新酸(批号:111690-200501)由中国药品生物制品检定所提供, 供定量测定用;总银杏酸(批号:111594-200501)由中国药品生物制品检定所提供供鉴别用;甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

银杏叶样品采自银杏叶 GAP 邳州示范基地, 该基地引进法国规范化种植技术, 具有规范的采样条件。本研究采集了不同栽培模式的银杏在 5~10 月不同采集时间的银杏叶样品 70 份。银杏叶采集方法为:在每一种栽培模式的试验田中随机采样 6 株, 将 6 株树叶全部采下后混匀, 置鼓风干燥箱中 50 °C 干燥, 真空包装, 避光保存, 待样品全部采集后同时测定, 避免了背景干扰。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Alltima C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-1%冰醋酸水溶液(90:10);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:310 nm;柱温:35 °C;进样量:20 μL。外标法计算质量分数。在所拟色谱条件下, 银杏叶中主要的 5 种银杏酸得到了较好的分离, HPLC 图见图 1。

2.2 对照品溶液制备:精密称取白果新酸对照品适量, 加甲醇制成 0.122 0 mg/mL 的溶液, 作为对照

* 收稿日期:2009-04-22

基金项目:国家“十五”科技攻关计划重点项目(2004BA721A20)

作者简介:鞠建明(1972-), 男, 江苏泰兴人, 硕士, 副研究员, 主要从事中药质量标准研究及其制剂工艺研究。

Tel: (025) 85639640 E-mail: jjm405@sina.com

*2009 届实习生

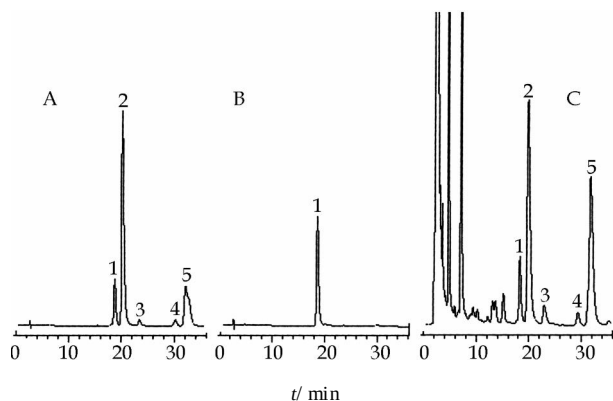


图 1 银杏叶总银杏酸(A)、白果新酸(B)和样品(C)的 HPLC 图

Fig 1 HPLC Chromatograms of total ginkgolic acids in *G. biloba* leaves (A), ginkgolic acid (B), and samples (C)

品溶液。另取总银杏酸对照品适量,加甲醇制成 0.139 6 mg/mL 的溶液,作为定位用对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备:取银杏叶粉末约 1.0 g,精密称定,置 100 mL 三角烧瓶中,精密加入甲醇 20 mL,闭塞,称质量,超声处理 45 min,取出,冷却,称质量,以甲醇补足减失的质量,摇匀,先用滤纸滤过,然后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.4 线性范围考察:精密吸取白果新酸对照品溶液(0.167 4 mg/mL) 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0 μL,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定。以进样量为横坐标(X),峰面积积分为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程: $Y = 5.21 \times$

$10^5 X - 5.35 \times 10^4$, $r = 0.999 9$,结果表明白果新酸在 0.837~5.859 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取同一白果新酸对照品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件重复测定 6 次,测定白果新酸峰面积,计算其 RSD 为 0.8 %。

2.6 稳定性试验:对同一供试品溶液每隔 4 h 进样 1 次,依法测定峰面积,结果白果新酸和总银杏酸峰面积积分值的 RSD 均为 0.5 %,表明供试品溶液在 16 h 内稳定性较好。

2.7 重现性试验:分别取同一银杏叶药材 1 g,共 6 份,精密称定,制备供试品溶液,依法测定,结果白果新酸和总银杏酸质量分数分别为 0.20 %、1.81 %,RSD 分别为 1.2 %、1.1 %。

2.8 回收率试验:取银杏叶(银杏叶药材粉末中白果新酸为 1.985 mg/g) 9 份,每份约 0.5 g,精密称定,分别按相当于样品中白果新酸量的 80 %、100 %、120 %的量加入对照品,平行处理 3 份,制备供试品溶液,测定,计算回收率,结果平均回收率分别为 99.4 %、98.1 %、102.3 %,RSD 分别为 1.8 %、0.4 %、0.8 %。

2.9 样品测定:将银杏叶样品分别按上述制备方法制备供试液,分别精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪,测定,计算供试品溶液中与总银杏酸对照品相应色谱峰的总峰面积,以白果新酸对照品外标法计算总银杏酸量,结果见表 1。

表 1 银杏叶中总银杏酸测定结果(n=3)

Table 1 Determination of total ginkgolic acids in *G. biloba* leaves (n=3)

银杏叶样品	总银杏酸/ %										平均值
	5月12日	5月31日	6月15日	7月1日	7月15日	8月1日	8月15日	9月2日	9月16日	10月3日	
四年生	1.78	2.52	2.00	1.67	1.86	1.14	1.24	1.06	1.04	0.86	1.52
四年生低剪一年	1.87	2.30	1.85	2.12	1.76	1.52	1.52	1.11	1.00	1.13	1.62
四年生低剪两年	2.97	2.68	2.64	2.25	1.38	1.23	1.52	1.35	0.98	0.69	1.77
五年生低剪三年	3.43	3.05	2.46	2.59	2.22	1.70	1.61	1.07	1.14	0.49	1.98
三年生低剪后高剪	2.67	2.35	2.26	2.03	1.78	1.44	1.30	0.97	0.84	0.50	1.61
三年生(移栽)	1.81	2.18	2.01	1.54	1.38	0.95	1.12	0.85	0.70	0.64	1.32
三年生(未移栽)	2.21	2.52	1.92	1.89	1.94	1.59	1.61	1.39	1.17	1.23	1.80
平均值	2.39	2.51	2.16	2.01	1.76	1.37	1.42	1.11	0.98	0.72	

3 讨论

3.1 不同栽培模式的银杏叶在不同季节总银杏酸的动态变化分析:由表 1 可见,在同栽培模式下,不同采收期的银杏叶中总银杏酸量基本呈逐月下降趋势,5 月份量最高,9 月底 10 月初量最低。将不同栽培模式相同采集时间的银杏叶总银杏酸量进行平均则更清晰地显示这一变化趋势(2.51 %→0.72 %)。具体在什么时间采叶,还要结合银杏叶中总黄酮和

总内酯的量,即以活性成分量高,总银杏酸量低的银杏叶作为优质银杏叶原料。

由同一栽培模式下银杏叶在 5~10 月总银杏酸平均质量分数可以看出,经过剪枝后银杏叶中总银杏酸量有逐年增加的趋势(1.52 %→1.98 %),而经过二次剪枝后量比不剪枝有所增加;三年生移栽银杏叶中总银杏酸量明显低于不移栽。

3.2 银杏叶中总银杏酸 HPLC 方法的确定:采用

HPLC 法测定银杏叶提取物中总银杏酸量的文献报道较多,而测定银杏叶中总银杏酸量不多见。本研究参考《中国药典》2005 年版银杏叶提取物中总银杏酸的检测方法,以供试品溶液中与 5 种银杏酸对照品相应色谱峰的峰面积之和,对白果新酸对照品峰面积,用外标法计算总银杏酸量,方法学研究结果表明,本法操作简便、重现性好、精密度高,可用于银杏叶中总银杏酸量限度的检测。

3.3 供试品制备方法的确定:根据银杏酸的理化性质,在供试品制备过程中,比较了甲醇回流、甲醇超声、石油醚回流 3 种提取方法,根据所拟色谱条件,测得总银杏酸峰面积,表明甲醇提取量明显高于石油醚提取,而甲醇超声和回流没有明显差异,为了操

作方便,选择甲醇超声作为最适宜的提取方法。另比较了不同提取时间对总银杏酸量的影响,结果以甲醇超声提取 30、45、60、90、120 min 银杏叶中总银杏酸的量分别为 0.173%、0.180%、0.177%、0.179%、0.177%,表明超声提取 45 min 即可把银杏酸提取完全,故选择超声提取时间为 45 min。

参考文献:

- [1] Jaggy H, Koch E. Chemistry and biology of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. [J]. *Pharmaze*, 1997, 52(10): 735-738.
- [2] 仰榴青,吴向阳,杨克迪,等. 银杏酸分析方法研究进展[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(3): 241-244.
- [3] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [4] 杨小明,夏磊,张秀丽,等. RP-HPLC 测定微乳剂中银杏酸同系物含量[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 207-208.
- [5] 鞠建明,钱士辉,钱大玮,等. 银杏半同胞家系种质资源质量的分析与评价[J]. 林业科技开发, 2007, 21(6): 31-33.

RP-HPLC 法测定菊花中 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷和绿原酸

沈智¹, 张文婷², 黄琴伟², 陈丽珏¹, 赵维良^{2*}

(浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验所, 浙江 杭州 310004)

摘要:目的 建立菊花中 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷、绿原酸 3 种成分定量测定的方法,并对 4 种菊花 3 种成分的量进行比较。方法 采用高效液相色谱法在同一色谱条件(色谱柱为 Shimadzu VP-ODS 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流动相:乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱; 体积流量:1.0 mL/min; 柱温:30 °C)下对菊花中 3 种成分同时进行定量测定。结果 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷、绿原酸分别在 0.039 1~0.781 0 μg ($r=1.000\ 0$), 0.013 2~0.396 0 μg ($r=1.000\ 0$), 0.017 0~0.510 0 μg ($r=0.999\ 3$) 线性关系良好。3 者的平均回收率分别为 97.7% (RSD=2.7%), 101.7% (RSD=1.5%), 98.0% (RSD=1.2%)。结论 所建立的方法可在同一色谱条件下检测出 3 个成分,4 种菊花的 3 种成分量有不同程度的差别。

关键词:菊花; 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸; 木犀草苷; 绿原酸; HPLC

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)02-0307-04

菊花 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 为常用中药,具有散风清热,平肝明目之功效。用于治疗风热感冒,头痛眩晕,目赤肿痛,眼目昏花。《中国药典》2005 年版菊花项下收载了毫菊、滁菊、杭菊和贡菊 4 个品种,并设定了绿原酸定量测定项目^[1]。目前国内对菊花定量测定的报道有:用 RP-HPLC 对木犀草苷以及芹菜苷和金合欢苷进行测定^[2,3]; 用 GC 对菊花中的挥发油进行测定^[4]; 用薄层扫描法对菊花中的木犀草素进行测定^[5]。菊花中黄酮类成分量较高,其中木犀草苷临床和药理作用明显^[6],另外,菊花中的 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸具有抗呼吸病毒活性^[7,8],因此两者均可作为菊花质量控

制的指标。本实验用 RP-HPLC 对《中国药典》收载的 4 种菊花中的 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷和绿原酸 3 个指标成分同时进行了测定,目前未见同时测定这 3 种成分的相关报道。该研究为全面控制菊花的质量提供了依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器:岛津高效液相色谱仪 LC-20AT (DGU-20AS 在线脱气机, SIL-10AT 自动进样器, SPD-M20A 二极管阵列检测器, CTO-20AT 柱温箱), 色谱工作站 LC Solution。KQ-300VDB 型双频数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

* 收稿日期: 2009-04-20

作者简介: 沈智(1983—), 男, 浙江桐乡人, 硕士研究生, 研究方向为中药有效成分及质量标准研究和药物分析。

Tel: 15868486360 E-mail: sz831104@126.com

* 通讯作者 赵维良 Tel: (0571) 86452373 E-mail: zwl@zjy.org.cn