

桂林产银杏叶最佳采收期的研究

杨金华¹, 陈文财², 孟杰^{2*}

1. 河南中医学院第一附属医院, 河南 郑州 450003

2. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541000

摘要: **目的** 通过对桂林地区的银杏叶 *Ginkgo Folium* 一年内的总黄酮苷与总内酯量检测, 分析总黄酮和总内酯的比例变化规律, 找到最佳“酮酯比”, 为确定桂林地区银杏叶药材的最佳采收期提供科学的实验依据。 **方法** 使用回流提取法提取样品中总黄酮苷和总内酯, 使用 HPLC 法对其进行定量分析, 色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 总黄酮测定采用甲醇-0.4%磷酸溶液 (48:52) 为流动相; 测波长 360 nm; 体积流量 1.0 mL/min。总内酯测定以甲醇-四氢呋喃-水 (25:10:65) 为流动相; 蒸发光散射检测器检测; 体积流量 0.6 mL/min。 **结果** 桂林地区产银杏叶药材, 在 1 年内不同采收期银杏叶总黄酮苷和总内酯量差异较大, 但 8 月份 2 种有效部位量均较高, 二者量比例最小。 **结论** 8 月份为桂林地区银杏叶的最佳采收季节, 为指导桂林产银杏叶的采收提供实验依据。

关键词: 银杏叶; 总黄酮苷; 总内酯; HPLC; 最佳采收期

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)13-1985-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.13.022

Best harvesting time of *Ginkgo Folium* from Guilin

YANG Jin-hua¹, CHEN Wen-cai², MENG Jie²

1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

2. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd, Guilin 541000, China

Abstract: Objective There are abundant Chinese medicinal herb resources in Guangxi province. Especially, there are lots of *Ginkgo Folium* in the north. To detect the contents of the total flavonoid glycoside and lactone in *Ginkgo Folium* and to find out their best concentration ratio during the year. **Methods** The reflux method was used for the distillation of the total flavonoid glycoside and lactone in *Ginkgo Folium* and HPLC was used for quantitative analysis. The contents of the total flavonoid glycoside and lactone in *Ginkgo Folium* were determined on a Ultimate XB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) analytical column with different mobile phases and detectors. **Results** The concentration ratio of the total flavonoid glycoside and lactone in *Ginkgo Folium* in August was the smallest and their contents were high. **Conclusion** There is significant difference between total flavonoid glycoside and lactone content in *Ginkgo Folium* from different picking periods during the year, and the concentration ratio of the two compositions in August is the smallest with high contents, which can be used to provide the basis for guiding the farmer to collect *Ginkgo Folium* in August.

Key words: *Ginkgo Folium*; total flavonoid glycoside; total lactone; HPLC; harvesting time

采收期是指中药材的采收时间, 中药材的采收期对有效成分量、制剂质量、临床疗效等方面均有直接影响^[1]。银杏叶 *Ginkgo Folium* 为银杏树的干燥绿叶, 有较高的药用价值, 其药用成分主要有槲皮素、山柰素和异鼠李素等黄酮类化合物^[2-3], 以及银杏内酯 A、B、C 和白果内酯等萜内酯类化合物, 这些化合物具有抗氧化、清除自由基、提高机体免疫力、延缓衰老等药理作用^[4-7]。有研究表明, 银杏叶的有效成分量受

气候地域^[8]、采收期^[9-11]等因素的影响, 其中选择恰当的采收期可以较为容易地避免其影响, 为更合理规范地开发利用银杏叶资源, 有必要研究不同采收期银杏叶中总黄酮苷与总内酯的变化情况以确定 1 年内银杏叶的最佳采收期。广西桂北地区有丰富的银杏树资源, 本实验研究广西桂北地区不同采收期银杏叶中总黄酮苷与总内酯的变化情况, 结合二者量高低和二者比值大小确定该区产银杏叶的最佳采收期。

收稿日期: 2015-01-13

作者简介: 杨金华 (1966—), 男, 本科, 副主任药师, 研究方向为中药制剂与鉴定。Tel: (0371)66221486 E-mail: yangjinhua1010@163.com

*通信作者 孟杰, 男, 高级工程师, 主要从事中药新药和新工艺研究。Tel: (0773)5849548 E-mail: doctormj@sina.com

1 仪器与材料

Waters2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Waters2998 光电二极管阵列检测器(美国 Waters 公司), Waters2420 蒸发光检测器(美国 Waters 公司), Ultimate XB-C₁₈ 液相色谱柱 [中国月旭材料科技(上海)有限公司]。槲皮素、山柰素、异鼠李素、白果内酯、银杏内酯 A、B、C 对照品均购于中国食品药品检定研究院。银杏叶 *Ginkgo Folium* 分别于 2013 年 5—10 月采自广西桂林, 经桂林三金药业股份有限公司科研所卢志标研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 总黄酮色谱条件 Ultimate XB-C₁₈ 液相色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以甲醇-0.4%磷酸溶液 (48:52) 为流动相; 检测波长 360 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。

2.1.2 总内酯色谱条件 色谱柱 Ultimate XB-C₁₈ 液相色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以甲醇-四氢呋喃-水 (25:10:65) 为流动相; 蒸发光散射检测器检测; 体积流量 0.6 mL/min; 进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 总黄酮对照品溶液制备 取槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别配制成含槲皮素 100 μg/mL、山柰素 100 μg/mL、异鼠李素 80 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.2.2 总内酯对照品溶液制备 取银杏内酯 A、B、C 和白果内酯对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇分别配制成含银杏内酯 A 200 μg/mL、银杏内酯 B 100 μg/mL、银杏内酯 C 100 μg/mL、白果内酯 200 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 银杏叶粉末的制备 将采摘得到的银杏叶即

刻清洗干净后于 60 °C 烘干, 然后用高速多功能粉碎机粉碎, 过 60 目筛。

2.3.2 总黄酮苷供试品溶液制备 取“2.3.1”项制得粉末 0.5 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加三氯甲烷回流提取 2.5 h, 弃去三氯甲烷液, 药渣挥干, 加甲醇回流提取 4 h, 提取液蒸干, 残渣加甲醇-25% 盐酸溶液 (4:1) 混合液 25 mL, 加热回流 30 min, 放冷, 转移至 50 mL 量瓶中, 并加甲醇至刻度, 摇匀, 制得。

2.3.3 总内酯供试品溶液制备 取“2.3.1”项制得粉末 0.5 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加石油醚 (30~60 °C) 在 70 °C 水浴上回流提取 1.5 h, 弃去石油醚液, 药渣挥干并置于烘箱中 60 °C 下烘干, 加甲醇回流提取 6 h, 提取液蒸干, 加甲醇溶解残渣, 转移至 10 mL 量瓶中超声处理 (功率 300 W, 频率 50 kHz) 30 min, 取出放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 静置, 精密量取上清液 5 mL, 加入酸性氧化铝柱 (200~300 目, 3 g, 内径 1 cm, 甲醇湿法装柱), 用甲醇 25 mL 洗脱, 收集洗脱液, 回收溶剂至干, 残渣容甲醇 5 mL 分次转移至 10 mL 量瓶中, 加水约 4.5 mL, 超声处理 (功率 300 W, 频率 50 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 标准曲线的绘制及线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项制得对照品溶液 2、4、6、8、10 μL, 依次注入液相色谱仪, 在“2.1”项下色谱条件下测定峰面积, 以峰面积 (*Y*) 为纵坐标, 以对照品进样量 (*X*) 为横坐标绘制标准曲线, 分别得各对照品回归方程及线性范围, 见表 1。

2.5 精密度试验

取上述对照品溶液, 以“2.1”项色谱条件进行分析, 重复进样 6 次, 槲皮素、山柰素、异鼠李素、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯峰面积 RSD 分别为 1.33%、2.01%、1.86%、2.26%、1.64%、2.52%、1.47%。

表 1 回归方程及线性范围 (*n* = 5)

Table 1 Regression equation and linear range (*n* = 5)

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg
槲皮素	$Y=2.02 \times 10^5 X - 1.03 \times 10^4$	0.999 8	0.20~1.00
山柰素	$Y=1.91 \times 10^5 X - 4.6 \times 10^3$	0.999 9	0.20~1.00
异鼠李素	$Y=2.53 \times 10^5 X - 5.01 \times 10^3$	0.999 7	0.16~0.80
银杏内酯 A	$Y=3.11 \times 10^5 X + 1.22 \times 10^3$	0.999 8	0.40~2.00
银杏内酯 B	$Y=2.65 \times 10^5 X + 4.33 \times 10^3$	0.999 9	0.20~1.00
银杏内酯 C	$Y=3.44 \times 10^5 X - 2.42 \times 10^3$	0.999 6	0.20~1.00
白果内酯	$Y=5.38 \times 10^5 X - 3.88 \times 10^3$	0.999 6	0.40~2.00

2.6 稳定性试验

分别取供各试品(5月样品)溶液每隔2h进样1次,以“2.1”项色谱条件进行分析,共测定6次,结果槲皮素、山柰素、异鼠李素、银杏内酯A、银杏内酯B、银杏内酯C、白果内酯峰面积RSD分别为2.68%、2.13%、1.62%、2.36%、1.78%、1.86%、1.97%。

2.7 重复性试验

精密称取5月份样品粉末6份,各0.25g,分别按“2.3.2”和“2.3.3”项下方法制备溶液,以“2.1”项色谱条件进行分析,计算总黄酮苷和银杏总内酯平均质量分数分别为0.641、0.565,RSD值分别为1.86%、1.74%。

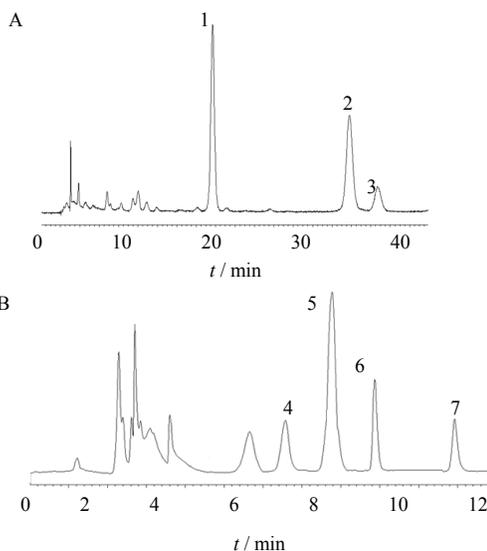
2.8 加样回收率试验

精密称取“2.3.1”项下粉末5份,各0.25g,分别加入各对照品的对应量,分别按“2.3.2”和“2.3.3”项下方法制备溶液,以“2.1”项色谱条件进行分析,计算槲皮素、山柰素、异鼠李素、银杏内酯A、银杏内酯B、银杏内酯C、白果内酯回收率分别为98.68%(RSD=1.98%)、99.46%(RSD=1.26%)、97.86%(RSD=1.18%)、100.38%(RSD=1.35%)、97.69%(RSD=1.71%)、101.02%(RSD=1.04%)、96.94%(RSD=1.52%)。

2.9 样品的测定

精密吸取“2.2”项下制备的对照品溶液和“2.3”项下制备的供试样品溶液,以“2.1”项色谱条件进行分析,用外标法计算总黄酮苷量[总黄酮苷量=(槲皮素量+山柰素量+异鼠李素量)×2.51]和总内酯量(4种内酯量之和)。总黄酮苷和总内酯色谱图见图1,样品测定结果见表2。

由表2可知,银杏叶中总黄酮苷量从5月到7月逐渐增大,从7月到10月又逐渐减小,质量分数最高出现在7月;总内酯从5月到8月逐渐增大,从8月到10月又逐渐减小,质量分数最高出现在8月。银杏叶中两者质量分数都有呈现出小逐渐增大再减小的过程,但是两者的变化不完全一样,总黄酮量最高出现在7月,而总内酯量最高出现在8月,因此在以银杏叶中有效成分为标准确定银杏叶的采收期时不能单以某一个成分的质量分数来定,本实验提出以二者比值最小为其中一个指标,二者比值最小值出现在8月。结合二者质量分数最大值,确定桂林产银杏叶的最佳采收期为8月。



1-槲皮素 2-山柰素 3-异鼠李素 4-银杏内酯 C 5-白果内酯
6-银杏内酯 A 7-银杏内酯 B
1-quercetin 2-kaempferde 3-isorhamnetin 4-ginkgolide C 5-bilobalide
6-ginkgolide A 7-ginkgolide B

图1 样品中总黄酮苷(A)和总内酯(B)的HPLC图
Fig. 1 HPLC of total flavonoid glycoside (A) and lactone (B)

表2 样品测定
Table 2 Sample test

月份	总黄酮苷/%	总内酯/%	总黄酮苷/总内酯
5	0.643	0.564	1.140
6	0.682	0.617	1.105
7	0.769*	0.652	1.179
8	0.759	0.728	1.041
9	0.716	0.645	1.110
10	0.638	0.563	1.113

3 讨论

中药材的采收加工对其药用成分的质量分数有较大的影响,以中药材的药效成分量为指标,评价中药材的采收加工方法是否恰当是最为直接有效的方法。银杏叶中最具代表性的药效成分是黄酮类化合物和萜内酯类化合物,考察银杏叶的采收加工方法是否合适,应该同时考虑银杏叶中这2类成分的质量分数。为此本实验测定不同采收期的银杏叶中总黄酮苷和总内酯的量,以二者比例小且二者的量这2个指标来确定最佳采收期。由实验结果得出,广西桂北地区的银杏叶中总黄酮苷质量分数最高出现在7月,总内酯质量分数最高出现在8月,二者质量分数比最小出现

在8月。由此可以看出,桂林地区8月采收的银杏叶中总黄酮苷和总内酯的质量分数都比较高,且二者的质量分数比最小。依此实验依据,确定桂林地区银杏叶药材的最佳采收期为8月份。

参考文献

- [1] 田新村. 中药材采收期研究概述 [J]. 中药材, 1989, 12(8): 40-43.
- [2] 钟雪庐. 我国开发银杏叶制剂的现状和前侧 [J]. 中国药房, 1945, 5(5): 3-5.
- [3] 李冰, 胡高升, 胡玲玲, 等. 银杏叶中双黄酮成分的提取与测定 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2552-2555.
- [4] Puttaraju N G, Venkateshaiah S U, Dharmesh S M. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(26): 9764-9767.
- [5] 牟玲丽, 寇俊萍, 朱丹妮, 等. 银杏叶的化学成分及其抗氧化活性 [J]. 中国天然药物, 2008, 6(1): 33-36.
- [6] Huang M H, Qian Y S, Guan T, *et al.* Different neuroprotective responses of Ginkgolide B and bilobalide, the two Ginkgo components, in ischemic rats with hyperglycemia [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 677(1/3): 71-76.
- [7] 汪素娟, 康安, 狄留庆, 等. 银杏叶提取物主要活性成分药动学研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 626-631.
- [8] 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.
- [9] 刘叔倩, 郑俊华, 王弘, 等. 不同气候区银杏叶中黄酮和萜内酯含量的变化 [J]. 中草药, 2000, 31(6): 424-426.
- [10] 范可武, 孟宪惠, 徐文豪. 银杏叶中黄酮含量的季节性变化 [J]. 中草药, 1997, 28(4): 211-212.
- [11] 周恩丽, 李雪峰, 王伟, 等. 树龄、采收期和干燥方法对银杏叶中总内酯的影响 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(4): 380-382.