

。药材。

不同树龄银杏叶在不同季节中总黄酮和总内酯的含量变化

钱大玮¹, 鞠建明¹, 朱玲英¹, 段金威¹, 王宇环¹, 张绍君², 郭巧生^{3*}

(1. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028; 2. 江苏银杏生化集团股份有限公司, 江苏 邳州 221300; 3. 南京农业大学, 江苏 南京 210000)

摘要:目的 确定银杏叶最适宜采收季节。方法 采用 HPLC 法(二级管阵列检测器 DAD 和蒸发光散射检测器 ELSD) 分别测定银杏叶中总黄酮和总内酯的含量。结果 不同树龄、不同季节的银杏叶总黄酮、总内酯含量不同。结论 银杏叶的总黄酮、总内酯以二、三年生的为高; 总黄酮在 5 月份、总内酯在 9 月份含量为高。

关键词: 银杏叶; 总黄酮; 总内酯; 季节; 树龄

中图分类号: R286.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2002)11-1025-03

Study on changing rules for total flavonoids and total terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves at different ages of tree and collecting seasons

QIAN Da-wei¹, JU Jian-ming¹, ZHU Ling-ying¹, DUAN Jin-ao¹,
WANG Yu-huan¹, ZHANG Shao-jun², GUO Qiao-sheng³

(1. Jiangsu Academy of TCM, Nanjing 210028, China; 2. Jiangsu Biochemistry of *Ginkgo biloba* Group Co., Ltd., Pizhou 221300, China; 3. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210000, China)

Abstract **Object** To define suitable gathering season of *Ginkgo biloba* L. leaves. **Methods** The content of total flavonoids and total terpene lactones in *G. biloba* leaves were determined by HPLC-DAD and HPLC-ELSD. **Results** The content of total flavonoids and total terpene lactones in *G. biloba* were distinct in different ages of tree and collecting seasons. **Conclusion** The content of total flavonoids and total terpene lactones in *G. biloba* are the highest in 2-3 ages of tree. The total flavonoid is the highest in May and total terpene lactone is the highest in September.

Key words *Ginkgo biloba* L. leaves; total flavonoids; total terpene lactones; season; ages of tree

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶。银杏叶提取物 (EGB) 在治疗心脑血管疾病、神经系统疾病等方面有显著疗效。银杏叶主要含黄酮类 (flavonoids) 和萜烯内酯 (terpene lactones) 类化合物, 银杏叶中总黄酮的含量测定方法^[1-3]已经成熟, 而总内酯含量测定由于银杏叶所含成分复杂、干扰大而报道较少, 其中文献有报道测 4 种内酯较成功的方法^[4], 但其样品前处理复杂, 需用聚酰胺及硅胶双柱处理, 而且采用梯度洗脱法分离样品。本实验着重优化了银杏叶样品净化方法, 采用单一氧化铝柱处理样品, 并利用 HPLC-ELSD 法测定, 获得了满意的结果。

有文献报道银杏叶中总黄酮、总内酯含量随树龄不同^[4, 5], 含量变化较大, 特别是总内酯含量下降幅度很大, 树龄大的银杏叶几乎不能作为生产银杏

叶提取物的原料。为了充分利用银杏资源, 对最有药用价值树龄的邳州银杏叶中总黄酮、总内酯进行了较全面系统的研究, 为生产出高质量的银杏叶提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器: Waters 高效液相色谱仪 (510 泵、996 二极管阵列检测器); Alltech ELSD 2000 蒸发光散射检测器; Millipore-Q 超纯水制备仪。

1.2 试剂: 槲皮素、山柰酚、异鼠李素、银杏内酯 A (GA)、银杏内酯 B (GB)、银杏内酯 C (GC)、白果内酯 (BB) 均由中国药品生物制品检定所提供。甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.3 银杏叶样品: 2000 年 5 月至 2000 年 10 月采自邳州银杏叶种植基地 (国家中医药管理局药源基地之一) 的银杏叶, 该基地引进法国规范化种植技

* 收稿日期: 2002-03-30

基金项目: 国家科委“中药现代化研究与产业化开发”资助项目 (99-929-01-01 AE99206)

作者简介: 钱大玮 (1962-), 男, 副教授, 主要从事中药分析研究工作。

术,具有规范的采叶条件,同时所采集的银杏叶采用统一的干燥方法,这样避免了背景干扰

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 测定总黄酮色谱条件: Waters Nova-Pak C₁₈ 色谱柱 (3.9 mm× 150 mm, 4 μm); 流动相: 甲醇-0.5% 磷酸水溶液 (43: 57); 流速 0.7 mL/min; 检测波长 360 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL, 外标法计算含量^[1]。在所拟色谱条件下, 银杏叶中 3 种黄酮苷元得到了较好的分离, HPLC 色谱图见图 1

2.1.2 测定总内酯色谱条件: Waters Nova-Pak C₁₈ 色谱柱 (3.9 mm× 150 mm, 4 μm); 流动相: 甲醇-四氢呋喃-水 (20: 12: 75); 流速 0.6 mL/min; ELSD 漂移管温度 100 °C; 载气流量 2.5 L/min; 进样量 20 μL, 以外标两点对数方程计算样品的含量^[6]。在所拟色谱条件下, 银杏叶中 4 种内酯得到了较好的分离, HPLC 色谱图见图 1

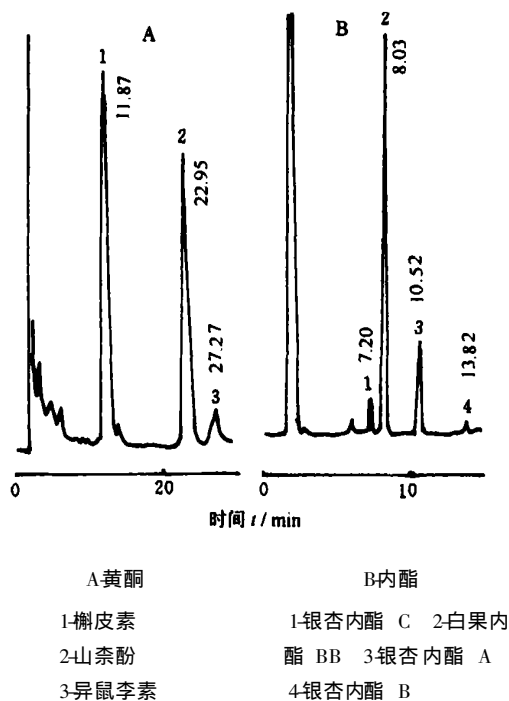


图 1 样品 HPLC 色谱图

2.2 供试品溶液制备

2.2.1 银杏总黄酮供试品溶液制备: 取已测过水分 (2000 年版《中华人民共和国药典》一部附录 IX H 第一法) 的银杏叶粉末 0.8 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇-25% 盐酸溶液 (4: 1) 混合液, 闭塞, 称重, 沸水浴回流 1 h, 取出放冷, 称重, 以甲醇补足减失重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液用 0.45 μm 的滤膜过滤, 作为供试品溶液

2.2.2 银杏总内酯供试品溶液的制备: 取已测过水

分的银杏叶粉末 0.9 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加 100 mL 石油醚 (30 °C~ 60 °C) 于 70 °C 水浴中回流 1 h, 取出, 挥干石油醚后换用 80 mL 甲醇回流 3 h, 取出, 减压回收甲醇至约 2 mL, 以甲醇 5 mL 转移残渣至酸性氧化铝柱上 (100~ 200 目, 5 g 直径 10 mm), 用 20 mL 甲醇洗脱, 洗脱液蒸干, 残渣用流动相溶解至 10 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的滤膜过滤, 作供试品溶液

2.3 对照品溶液的制备

2.3.1 黄酮对照品溶液的制备: 精密称取槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品适量加甲醇制成每毫升分别含 0.315 6, 0.249 2, 0.140 0 mg 的溶液作为储备液, 临用前分别精密吸取 1, 1, 0.4 mL 置 5 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 内酯对照品溶液的制备: 精密称取 GA, GB, GC 和 BB 对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加少量甲醇溶解后以流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度分别为 0.465, 0.292, 0.316, 0.598 mg/mL 的浓对照品溶液, 然后吸取浓溶液适量稀释 4 倍作为稀对照品溶液。

2.4 线性关系考察

2.4.1 黄酮标准曲线的制备: 分别配制不同浓度的槲皮素、山柰酚、异鼠李素混合对照品溶液, 各进样 20 μL, 按色谱条件测定, 计算各对照品的回归方程为槲皮素: $Y = 123\,438\,756X + 53\,012$, $r = 0.999\,5$, 线性范围 0.231~ 1.580 μg; 山柰酚: $Y = 120\,892\,697X + 103\,102$, $r = 0.999\,8$, 线性范围 0.149~ 0.947 μg; 异鼠李素: $Y = 132\,079\,414X - 1\,412$, $r = 0.999\,6$, 线性范围 0.028~ 0.224 μg

2.4.2 内酯标准曲线的制备: 配制一定浓度的 BB, GA, GB, GC 混合对照品溶液, 分别进样 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL, 按色谱条件测定, 以峰面积的自然对数为纵坐标, 进样量的自然对数为横坐标, 线性回归, 计算各对照品的回归方程为 BB $Y = 1.53X + 11.57$, $r = 0.998\,7$, 线性范围 1.63~ 16.32 μg; GA $Y = 1.64X + 11.32$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 0.644~ 6.44 μg; GB $Y = 1.65X + 11.09$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 0.36~ 3.60 μg; GC $Y = 1.65X + 11.35$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 0.37~ 3.74 μg

2.5 精密度试验: 结果 RSD 为: 槲皮素 0.22%; 山柰酚 0.60%; 异鼠李素 0.80%; BB 1.08%; GA 0.40%; GB 1.34%; GC 1.13% ($n = 6$)

2.6 稳定性试验: 对同一供试品溶液每隔 3 h 进样 1 次, 依法测定, 计算各峰峰面积积分值的 RSD 结

果表明,3个黄酮苷元在 18 h内均稳定,4个内酯成分在 12 h内均稳定。

2.7 重复性试验:按样品测定方法,对同一样品进行 6次平行测定,测得各组分的 *RSD* 为槲皮素 1.50%;山柰酚 1.57%;异鼠李素 1.13%;BB 1.82%;GA 1.95%;GB 1.99%;GC 1.51%,结果表明本方法重复性好。

2.8 回收率试验

2.8.1 3种黄酮苷元回收率试验:采用加样回收法,取已知含量的银杏叶粉末 0.4 g,精密称定,定量加入适量 3种黄酮苷元对照品(槲皮素 1.815 mg 山柰酚 1.545 mg 异鼠李素 0.174 mg),按上述方法操作及测定,计算回收率,见表 1 结果表明本法回收率良好。

2.8.2 4种内酯回收率试验:采用加样回收法,取已知含量的银杏叶粉末 0.45 g,精密称定,定量加入适量内酯对照品(BB 1.362, GA 0.706, GB 0.333, GC 0.351 mg),按上述方法操作及测定,计算回收率,见表 1 结果表明本法回收率良好。

表 1 回收率测定结果 (n= 6) (%)			
组 分		回收率	<i>RSD</i>
3种黄酮苷元	槲皮素	98.6	1.02
	山柰酚	97.8	1.70
	异鼠李素	98.7	1.59
4种内酯	白果内酯	107.5	2.8
	银杏内酯 A	107.5	2.3
	银杏内酯 B	102.6	2.7
	银杏内酯 C	107.8	2.1

2.9 样品测定:将银杏叶样品分别按上述方法制备,依法测定其总黄酮和总内酯含量。黄酮分别计算 3种黄酮苷元含量,按下式换算成总黄酮苷的含量:总黄酮苷的含量=(槲皮素含量+ 山柰酚含量+ 异鼠李素含量)× 2.51;总内酯含量为 4种内酯含量之和。样品中总黄酮 总内酯含量测定结果见表 2,3

3 讨论

3.1 不同树龄银杏叶,总黄酮随树龄的增长,呈下

表 2 不同树龄银杏叶总黄酮含量测定结果 (n= 3) (mg/g)

树龄 (年)	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
2	21.11	19.70	16.950	15.562	14.05	10.61	10.68	10.20	8.97	7.48
3	19.76	17.77	12.70	11.26	9.42	9.16	8.47	8.64	7.56	7.88
4	12.62	12.96	11.25	9.98	10.88	7.71	7.66	8.55	7.04	9.03
5	10.25	9.71	8.53	8.98	6.73	7.07	5.63	6.14	6.60	6.38
6	9.43	9.69	8.00	7.32	8.63	7.95	6.89	7.22	7.27	7.87

表 3 不同树龄银杏叶总内酯含量测定结果 (n= 3) (mg/g)

树龄 (年)	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
2	7.03	7.48	9.85	9.19	8.99	9.32	8.67	10.11	10.74	12.37
3	8.24	7.32	9.71	8.96	10.33	9.24	11.01	12.04	10.01	11.22
4	5.90	7.90	7.63	7.22	7.19	7.68	8.53	7.83	7.61	6.96
5	4.67	5.98	6.00	6.37	5.92	7.63	8.23	6.42	6.43	6.32
6	6.32	8.43	7.26	8.69	7.63	6.72	5.73	7.43	4.63	5.33

降趋势,其中 2年生的为最高;1年中,不同树龄银杏叶总黄酮以 5月份含量为最高,随后逐月下降。

3.2 不同树龄银杏叶,总内酯含量不同,以 3年生最高,以后随树龄增长呈下降趋势;1年中,总内酯含量也有较明显的变化,有一个最高值,2,3年生在 9月下旬、10月初含量为最高,随树龄增长,含量的最高值在向前变化。

3.3 并非所有银杏叶都可以采收作为药材,通过本实验可以看出,银杏叶若以黄酮为主要成分,采收的最适宜季节为 5月,若以内酯为主要成分,采收的最适宜季节为 9月,采收树龄以 2,3年生为最好。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 2000年版.一部.
[2] 苑可武,孟宪惠,徐文豪.银杏叶中总黄酮的季节性变化[J]. 中草药,1997,28(4): 211.
[3] 管玉民,王健.气候、季节、树龄对银杏叶中总黄酮含量的影响[J]. 中成药,2000,22(5): 368.
[4] 颜玉贞,谢培山. HPLC-ELSD法测定银杏叶的 4种萜内酯含量[J]. 药物分析杂志,2001,21(3): 173.
[5] 王先荣,周正华,杜安全.不同生长季节及生长年限银杏叶总萜内酯含量的相关性研究[J]. 中国药科大学学报,2000,31(2): 88.
[6] 田南开,王颀,厉进忠.高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定银杏叶提取物中内酯的含量[J]. 药物分析杂志,1997,17(4): 282.

欢迎订阅《中草药》杂志 2002年增刊

为了加快中药现代化的进程,交流中药指纹图谱研究的经验,讨论入世后我国中药产业面临的挑战和对策,本刊在 2002 年 10月底出版以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容的增刊。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅。定价: 60.00元,另加 5.00元邮费,款到寄刊。

本刊另有 1996- 2001年增刊,欢迎订阅。
编辑部地址:天津市南开区鞍山西道 308号
邮编: 300193 电话: (022) 27474913 23006821 传真: (022) 23006821 E-mail: zcyzzbjl@ tjipr.com