

不同气候区银杏叶中黄酮和萜内酯含量的变化[△]

北京医科大学生药学生物技术研究室 (100083) 刘叔倩* 郑俊华** 王 弘 陈 旭*** 丘 澄 果德安

摘 要 目的: 为了比较不同气候区银杏叶中黄酮和萜内酯的含量, 并进一步探讨影响二者含量的环境因素。方法: 采用 RP-HPLC 法对样品中黄酮和萜内酯进行定量分析。结果: 不同气候区之间银杏叶中两类成分的含量存在很大差异, 贵州高原区银杏叶中总黄酮和总内酯的含量明显高于其它地区。结论: 通过系统比较全国不同银杏分布区银杏叶中有效成分的含量, 为提高银杏叶质量, 优化银杏叶资源提供了理论依据。
关键词 银杏 黄酮 萜内酯

Variation of Flavonoids and Terpenlactones in Ginkgo (*Ginkgo biloba*) Leavic Conditions from Regions with Different Climatic Conditions

Department of Pharmacognostical Biotechnology, Beijing University of Medical Sciences (Beijing 100083) Liu Shuqian, Zheng Junhua, Wang Hong, Chen Xu, Qiu Cheng and Guo De'an

Abstract To compare the contents of flavonoids and terpenlactones in the leaves of *Ginkgo biloba* L. from different regions and discuss the influential factors of climatic environment. RP-HPLC was used to determine the flavonoids and terpenlactones. The contents of these active constituents varied greatly from place to place. The contents of total flavonoids and terpenlactones were much higher in the leaves of *G. biloba*. from Guizhou Plateau than those from other regions. Data from this experiment may provide a basis for the optimization of the quality and resources of *G. biloba*.

Key words *Ginkgo biloba* L. flavonoids terpenlactones

目前, 世界上许多厂家正在用银杏叶提取物 (GBE) 制造各种药物。90年代以来, 我国银杏栽培面积大幅度增加。但研究表明, 不同产地、不同采收期的银杏叶, 其有效成分含量相差甚远^[1,2]。因此, 有必要对不同产地银杏叶黄酮和萜内酯含量变化进行系统研究。本文测定比较了我国 6 个农业气候区 23 份银杏叶中黄酮和萜内酯的含量, 分析了不同生态环境对两种成分含量的影响, 为提高银杏叶质量, 优化银杏叶资源, 同时对其进行道地性研究提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料: 全国银杏主产区可划分为 6 个农业气候区^[3,4], 1997年 9月本着具有产区代表性原则, 在每个农业气候区 2~ 4个银杏产区, 采集 2~ 10年实生银杏叶样品共 23份 (表 1)。采集时间均为当地银杏叶采收期。银杏叶及时晒干粉碎, 过 40目筛备用。

1.2 仪器、药品、试剂: 测定黄酮含量的 HPLC 仪为美国 TSP 公司 P400 系统; 测定萜内酯含量的 HPLC 仪为惠普公司 1100 系统。

表 1 材料来源

编号	农业气候区	采集地点	样品个数
1	辽东半岛区	丹东 大连	3
2	黄淮海平原区	郯城 泰安 邳州	4
3	江苏南部栽培区	泰兴 南京 杭州	4
4	伏牛山 大别山区	新县 随州 安陆	4
5	贵州高原区	盘县 正安 惠水	4
6	南岭山地区	南雄 兴安 灵川 桂林	4

对照品: 槲皮素 (Q)、白果内酯 (BB)、银杏内酯 A (GA)、银杏内酯 B (GB) 购自 Sigma 公司; 芦丁、银杏内酯 C (GC) 购自中国药品生物制品检定所; 山柰酚 (K)、异鼠李素 (I) 由北京市新技术研究所惠赠。提取溶剂均为分析纯, 色谱用甲醇为色谱纯, 水为双蒸水。

1.3 方法

1.3.1 黄酮含量测定: a) 色谱条件: 色谱柱: Inertsil ODS-3 柱, 4.6 mm× 150 mm, 5 μ m; 流动相: 甲醇-水-磷酸 (60: 40: 0.2); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长 360 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L
b) 线性关系: 分别称取 Q, K, I 对照品 5.1 mg、4.1 mg、2.2 mg, 加甲醇溶解, 定容 50 mL, 按上述

* Address: Liu Shuqian, Department of Pharmacognostical Biotechnology, Beijing University of Medical Sciences, Beijing
刘叔倩 北京医科大学药学院 97级博士研究生

** 课题负责人 *** 现在桂林医学院

[△] 国家教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (9720) 资助课题

色谱条件分别进样 2, 4, 6, 8, 10 μ L,测定峰面积,以峰面积对进样量(μ g)进行回归分析,得到 3条直线,其线性范围和相关系数为 Q 2.04~ 10.2 μ g, r = 0.999 9; K 1.64~ 8.2 μ g, r = 0.999 9; I 0.88~ 4.4 μ g, r = 0.999 7 总黄酮苷的计算方法参照文献的方法计算^[5],即将 3种苷元之和乘以系数 2.51

c)样品处理采用酸水解法^[6],色谱图见图 1

d)精密度和回收率:吸取上述对照品溶液,依色谱条件进行分析,重复进样 5次,每次 10 μ L,测得 Q, K, I峰面积 RSD 分别为 1.2%, 0.9%, 0.7%。称取加入一定量芦丁的银杏叶样品,按上述方法处理,计算芦丁的回收率为 97.6% (n = 3), RSD 为 1.22%,表明该方法水解完全

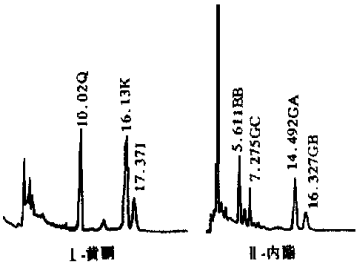


图 1 HPLC图谱

1.3.2 萜内酯含量测定: a)色谱条件: 色谱柱: 惠普公司 HP ODS hypersil 柱, 4 mm $\times$ 125 mm 5 μ m; 流动相: 甲醇-水 (23: 77); 流速: 0.5 mL/min; 检测器: 示差折光检测器; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 进样量 5 μ L

b)线性关系: 称取 GA, GB, GC 和 BB 对照品 10.80, 12.40, 10.70, 9.70 mg, 加甲醇溶解, 定容 2 mL, 依次稀释原浓度的 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 按上述色谱条件, 各进样 5 μ L, 测定峰面积, 以峰面积对进样量(μ g)进行回归分析, 得到 4条直线, 其线性范围和相关系数为 GA 0.844~ 27.00 μ g, r =

表 2 6个气候区银杏叶各成分平均含量及气候区之间的变异程度

	黄酮 (%)				内酯 (%)				
	Q	K	I	总黄酮	BB	GA	GB	GC	总黄酮
$\bar{x}$	0.154	0.118	0.035	0.781	0.104	0.148	0.037	0.082	0.372
s	0.062	0.034	0.010	0.224	0.064	0.096	0.014	0.028	0.197
RSD%	40.40	28.53	27.32	28.70	61.28	64.71	38.19	34.07	53.05
F值	7.1*	13.1*	1.5	10.7*	13.8*	16.8*	5.6*	6.1*	13.1*

$\bar{x}$: 23份样品的平均值 6个气候区之间各成分含量的比较: ** $P < 0.01$ ($F_{0.05} = 2.81, F_{0.01} = 4.34$)

2.2 不同气候区银杏叶中总黄酮和总内酯含量的差异: 对 6个气候区银杏叶总黄酮和总内酯的含量进行多重比较 (表 3), 结果表明, 贵州高原区的银杏叶中两种成分的含量均为最高, 并与其它气候区的含量呈显著差异。这说明该气候区的生态环境和栽

0.999 9; GB 0.969~ 31.00 μ g, r = 0.999 9; GC 0.836~ 26.75 μ g, r = 0.999 9; BB 0.758~ 24.25 μ g, r = 0.999 9

c)样品采用双柱法处理^[7], 色谱图见图 1

d)精密度和回收率: 吸取上述对照品溶液, 依色谱条件进行分析, 重复进样 4次, 每次 5 μ L, 测得 GA, GB, GC, BB峰面积 RSD 分别为 0.7%, 0.5%, 0.5%, 0.3%。称取加入一定量 4种对照品的银杏叶样品, 按以上方法提取分离及测定。计算 GA GB GC BB的加样回收率分别为 96.0%, 91.4%, 99.3%, 99.1%, RSD 分别为 4.7%, 3.6%, 4.1%, 4.9% (n = 3)

2 结果与分析

2.1 不同气候区银杏叶各成分平均含量及变异程度: 表 2为全国 6个气候区银杏叶中各成分的平均含量、气候区之间的变异系数及方差分析结果。由表 2各成分的平均值可见, 6个气候区银杏叶中总黄酮的平均含量为 0.781%, 萜内酯类为 0.372%, 两类成分占叶干重的 1.153%, 在 3种黄酮苷元中, 槲皮素 (Q)的含量最高, 约占 1/2, 其次为山柰酚 (K)。在 4种内酯中, 银杏内酯 A (GA)和白果内酯 (BB)的含量较高, 银杏内酯 B (GB)的含量较低。由变异系数可以看出, 不同气候区之间总黄酮含量的变异小于总内酯的变异; 黄酮苷元中 Q含量变异较大, 内酯类中 GA和 BB的含量变异较大。由单因素方差分析的 F值可见, 6个气候区之间的银杏叶中除异鼠李素 (I)外, 其综合成分的含量差异均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。这说明生态条件和栽培技术对银杏叶中以异鼠李素为苷元的黄酮苷的含量影响较小, 而对总黄酮、总内酯及其它各成分含量影响较大, 表现出地区间的显著差异。

表 2 6个气候区银杏叶各成分平均含量及气候区之间的变异程度

	黄酮 (%)				内酯 (%)				
	Q	K	I	总黄酮	BB	GA	GB	GC	总黄酮
$\bar{x}$	0.154	0.118	0.035	0.781	0.104	0.148	0.037	0.082	0.372
s	0.062	0.034	0.010	0.224	0.064	0.096	0.014	0.028	0.197
RSD%	40.40	28.53	27.32	28.70	61.28	64.71	38.19	34.07	53.05
F值	7.1*	13.1*	1.5	10.7*	13.8*	16.8*	5.6*	6.1*	13.1*

$\bar{x}$: 23份样品的平均值 6个气候区之间各成分含量的比较: ** $P < 0.01$ ($F_{0.05} = 2.81, F_{0.01} = 4.34$)

培技术有利于银杏叶黄酮和内酯的积累。其它几个气候区黄酮和内酯的含量未表现出一致性, 如长江中下游区银杏叶中总黄酮含量较低, 而总内酯含量较高。二者综合比较, 除贵州高原区外, 南岭山地区两种成分的含量较高。

表 3 6个气候区银杏叶中总黄酮和总内酯含量的多重比较

气候区 编号*	总黄酮		总内酯	
	平均含量 (%)	差异显著性 $P < 0.01$	平均含量 (%)	差异显著性 $P < 0.01$
5	1.132 1	A	0.631 4	A
6	0.909 8	AB	0.413 4	C
2	0.794 3	B	0.281 3	D
1	0.704 6	BC	0.145 0	E
4	0.629 3	BC	0.532 1	B
3	0.494 5	C	0.170 5	E

* 编号的代表地区见表 1

2.3 银杏叶中各成分间的相关关系: 由表 4可见, 总黄酮和总内酯含量呈显著正相关, 槲皮素和山柰酚呈显著正相关, 4种内酯成分相互之间均为正相

关关系。由此说明, 环境条件对这些成分含量的影响是比较一致的。异鼠李素与其它成分均呈负相关, 但未达到极显著水平。

表 4 银杏叶中各成分间的相关系数

成分	K	I	总黄酮	BB	GA	GB	GC	总内酯
Q	0.630 *	-0.223	0.949 *	0.551 *	0.302	0.658 *	0.276	0.580 *
K		-0.225	0.808 *	0.403	0.164	0.638 *	0.444	0.514
I			-0.085	-0.334	-0.427 *	-0.394	-0.333	-0.402
总黄酮				0.508 *	0.217	0.666 *	0.317	0.560 *
BB					0.863 *	0.878 *	0.677 *	0.962 *
GA						0.741 *	0.707 *	0.873 *
GB							0.687 *	0.963 *
GC								0.762 *

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01(r_{0.05} = 0.413, r_{0.01} = 0.526)$

4 讨论

不同地区的银杏叶, 其有效成分的含量也存在很大变化。贵州高原区银杏叶中黄酮和内酯含量明显高于其它地区。我们比较了 6个气候区的海拔、年降水量、 $> 10^{\circ}\text{C}$ 积温、年平均温度及土质 5个环境因子与银杏叶总黄酮和总内酯含量的关系, 发现单一的环境因子与二者含量无明显的相关性。如贵州高原区海拔最高, 为 1 000~ 1 500 m, 而黄淮海平原区海拔最低, 为 100 m 以下, 但该区银杏叶中黄酮和内酯的含量均不是最低。又如, 江苏南部栽培区和南岭山地区年降水量较接近, 分别为 1 100~ 1 800 mm 和 1 500~ 1 500 mm, 但这两个气候区银杏叶中黄酮和内酯的含量存在显著差异。再如, 江苏南部栽培区和伏牛山-大别山区年均温度均为 $15^{\circ}\text{C} \sim 17^{\circ}\text{C}$, $> 10^{\circ}\text{C}$ 积温均为 4 500~ 5 000 $^{\circ}\text{C}$, 但这两个气候区银杏叶中内酯的含量存在显著差异。由此可见, 银杏叶总黄酮和总内酯的含量变化可能是多种环境

因子相互作用的结果, 而并非只与单一的环境因子有直接的相关关系。总黄酮和总内酯的含量均为最高的贵州高原区属中亚热带, 年平均气温 $13.5^{\circ}\text{C} \sim 16^{\circ}\text{C}$, 年降水量 900~ 1 300 mm, 土壤为黄壤和黄棕壤, 这些环境条件对银杏生长发育较为有利, 而对银杏叶中黄酮和内酯的积累是否有利, 尚需进一步研究。

致谢: 本文承蒙北京医科大学药学院药物分析教研室徐秉玖教授、生药生物技术研究室马小军博士审阅。

参考文献

1 庄向平, 等. 中草药, 1992, 23(3): 122
2 池静端, 等. 药物分析杂志, 1998, 18(6): 367
3 席承藩, 等编著. 中国自然区划概要. 北京: 科学出版社, 1984
4 张云跃, 等. '97银杏国际研讨会论文集. 1997: 66
5 Hasler A, et al. J Chromatogr, 1992, 605: 41
6 范可武, 等. 中草药, 1997, 28(4): 211
7 Van Beek T A, et al. Jof Chromatogr, 1991, 543: 375

(1999-09-08收稿)

(上接第 403页)

参考文献

1 中国药材公司. 中国中药资源. 北京: 科学出版社, 1995: 152
2 傅立国主编. 中国植物红皮书——稀有濒危植物. 北京: 科学出版社, 1992: 2
3 中国药材公司. 中国常用中药材. 北京: 科学出版社, 1995: 161, 848, 1118

4 陈品良, 等. 植物资源与环境, 1992, 1(4): 6
5 李达孝, 等. 生物多样性, 1995, 3(4): 195
6 彼得·H·雷文. 植物资源与环境, 1992, 1(4): 1
7 秦慧贞, 等. 植物资源与环境, 1996, 5(3): 1
8 朱建国, 等. 生物多样性, 1994, 2(2): 82

(1999-12-14收稿)