

银杏叶的指纹图谱建立及质量评价研究

丁银花^{1,3}, 孙永成^{2,3}, 王振中^{2,3}, 毕宇安^{2,3}, 万 琴^{2,3}, 徐连明^{2,3}, 萧 伟^{2,3*}

1. 北京中医药大学, 北京 100020

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘 要: 目的 比较不同产地、树龄、采收期银杏 *Ginkgo biloba* 叶的质量, 固定欣脉胶囊处方中银杏叶的来源产地。方法 建立银杏叶的 HPLC 指纹图谱测定方法, 对不同产地、树龄、采收期银杏叶的指纹图谱进行测定, 并测定不同产地、树龄、采收期银杏叶总黄酮醇苷和总萜内酯的量, 对各批次银杏叶主要成分的量及指纹图谱进行对比分析。结果 不同产地、树龄、采收期的银杏叶总黄酮醇苷、萜类内酯量以及指纹图谱均不同。结论 所建立的指纹图谱测定方法为银杏叶的合理采收及质量评价提供了科学依据; 江苏邳州、2~3 年树龄、6~8 月份采集的银杏叶质量较佳, 可以作为欣脉胶囊处方中银杏叶的固定来源产地。

关键词: 银杏叶; 高效液相色谱法; 总黄酮醇苷; 总萜内酯; 定量测定; 指纹图谱

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)06-0901-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.06.022

Establishment of fingerprint of *Ginkgo biloba* leaves and study on its quality evaluation

DING Yin-hua^{1,3}, SUN Yong-cheng^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3}, BI Yu-an^{2,3}, WAN Qin^{2,3}, XU Lian-ming^{2,3}, XIAO Wei^{2,3}

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100020, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To compare the quality *Ginkgo biloba* L. leaves collected from various habitats, different tree ages, and different harvesting times and to confirm the source of *G. biloba* leaves used in Xin Mai Capsule. **Methods** To establish the HPLC fingerprint of *G. biloba* leaves to determine the fingerprint and content of total flavonol glucoside and terpene lactones in *G. biloba* leaves collected from various habitats, different tree ages, and different harvesting time, and then to analyze the results. **Results** The contents of total flavonol glucoside and terpene lactones and fingerprint similarity in *G. biloba* leaves from various regions, different tree ages, and collecting times were different. **Conclusion** The fingerprint control method has provided the scientific basis for the reasonable collection and quality evaluation of *G. biloba* leaves. The *G. biloba* leaves in June to August, 2—3 year-old from Pizhou, Jiangsu province are better, which could be considered as the source of *G. biloba* leaves used in Xin Mai Capsule.

Key words: *Ginkgo biloba* leaves; HPLC; total flavonol glucoside; terpene lactones; quality determination; fingerprint

银杏叶药材为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶。秋季叶尚绿时采收, 及时干燥。具有活血化瘀、通络止痛、敛肺平喘、化浊降脂的功效^[1]。银杏叶中的主要有效化学成分为黄酮类成分和萜类

内酯成分^[2-5]。现代药理研究表明, 银杏黄酮和萜类内酯均具有改善心血管系统、调血脂、抗氧化、抗衰老等作用^[6-7]。

欣脉胶囊是江苏康缘药业股份有限公司正在研

收稿日期: 2014-10-11

基金项目: 江苏省科技成果转化项目 (BA2012020); 创新中药中试放大研究技术平台

作者简介: 丁银花 (1988—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药生药学。Tel: 15150991528 E-mail: dingyinhua0113@163.com

*通信作者 萧 伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337/13905136437 E-mail: wzzhz-nj@163.net

发的中药 6 类新药, 由山楂、银杏叶等 5 味中药组成。银杏叶作为欣脉胶囊处方中的主要药材, 其药材的来源产地对于产品的质量至关重要。本实验利用 HPLC 建立了银杏叶指纹图谱的测定方法, 分别对不同产地、树龄、采集期的银杏叶的指纹图谱以及总黄酮醇苷、萜类内酯的量进行了测定, 并通过聚类分析, 固定了欣脉胶囊处方中银杏叶的主要来源产地, 同时也为银杏叶质量的全面评价提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1200-UV 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), Agilent 1200-ELSD 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), SetraBL-410S 型电子分析天平、BP211D 型电子分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司], 直立粉碎机 (北京环亚天元机械技术有限公司)。

芦丁 (批号 100081-200907)、槲皮素 (批号 100080-200707)、山柰素 (批号 100861-201209)、异鼠李素 (批号 100860-200608)、银杏叶内酯 A (批号 110862-201310)、银杏叶内酯 B (批号 110863-201209)、银杏叶内酯 C (批号 110865-200605)、白果内酯 (批号 110862-201009) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。

乙腈 (上海星可生化有限公司)、甲醇 (美国天地有限公司)、四氢呋喃 (美国天地有限公司) 均为色谱纯, 甲醇、石油醚 (60~90 °C)、磷酸、甲酸、盐酸、三氯甲烷 (南京化学试剂有限公司) 均为分析纯, 水为超纯水。

银杏叶来自 10 个产地, 共 34 批, 经江苏康缘药业股份有限公司执业药师吴舟鉴定均为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶。各药材样品的来源信息见表 1。

表 1 药材来源信息
Table 1 Sources of *G. biloba* leaves

编号	来源	树龄	采收时间	编号	来源	树龄	采收时间
S1	江苏邳州	2~3 年	2013-04	S17	河北安国	2~3 年	2013-06
S2	江苏邳州	2~3 年	2013-05	S18	河北安国	2~3 年	2013-06
S3	江苏邳州	2~3 年	2013-06	S19	安徽亳州	2~3 年	2013-06
S4	江苏邳州	2~3 年	2013-07	S20	安徽亳州	2~3 年	2013-06
S5	江苏邳州	2~3 年	2013-08	S21	安徽亳州	2~3 年	2013-06
S6	江苏邳州	2~3 年	2013-09	S22	浙江宁波	2~3 年	2013-06
S7	江苏邳州	2~3 年	2013-10	S23	浙江杭州	2~3 年	2013-06
S8	四川北川	2~3 年	2013-06	S24	广西玉林	2~3 年	2013-06
S9	四川北川	4~5 年	2013-06	S25	广西玉林	2~3 年	2013-06
S10	四川北川	5~6 年	2013-06	S26	广西玉林	2~3 年	2013-06
S11	四川北川	6~7 年	2013-06	S27	重庆	2~3 年	2013-06
S12	四川北川	8~9 年	2013-06	S28	重庆	2~3 年	2013-06
S13	湖北安陆	2~3 年	2013-06	S29	甘肃合水	2~3 年	2013-06
S14	湖北安陆	2~3 年	2013-06	S30	甘肃合水	2~3 年	2013-06
S15	湖北安陆	2~3 年	2013-06	S31	山东焱城	2~3 年	2013-06
S16	河北安国	2~3 年	2013-06	S32	山东焱城	2~3 年	2013-06
S17	河北安国	2~3 年	2013-06	S33	山东焱城	2~3 年	2013-06
S18	河北安国	2~3 年	2013-06	S34	山东焱城	2~3 年	2013-06

2 方法与结果

2.1 色谱条件

经过一系列色谱条件的选择和优化, 最终采用 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B),

梯度洗脱条件见表 2; 柱温为 30 °C; 进样量 10.0 μL; 检测波长 360 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取芦丁对照品适量, 加甲醇制成含 200 μg/mL 芦丁的对照品溶液, 即得。

表 2 梯度洗脱比例

Table 2 Proportion of gradient elution		
保留时间/min	A/%	B/%
0	12	88
20	19	81
35	22	78
40	25	75
50	30	70
85	80	20

2.2.2 供试品溶液的制备 取银杏叶粉末（过 80 目筛）约 2.5 g，精密称定，置索氏提取器中，加氯仿加热回流提取 2 h，弃去氯仿液，药渣挥干，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，超声提取 40 min（功率 250 kW，频率 40 kHz），滤过，滤液蒸干，转移至 20 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，即得。

2.3 方法学试验

2.3.1 精密度试验 取同一份供试品溶液，连续进样 6 次，以芦丁为参照峰，考察各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的一致性，结果表明，各主要色谱峰的相对保留时间 RSD 小于 1.3%，相对峰面积 RSD 小于 2.0%，表明精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一份供试品溶液，分别在 0、8、16、24、30、36 h 进样，以芦丁为参照峰，考察各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的一致性，结果表明，各主要色谱峰的相对保留时间 RSD 小于 1.8%，相对峰面积 RSD 小于 2.2%，表明供试品溶液至少在 36 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批银杏叶粉末，按上述“2.2.2”项制备 6 份样品，分别进样，以芦丁为参照峰，考察各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的一致性，结果表明，各色谱峰的相对保留时间 RSD 小于 2.1%，相对峰面积 RSD 小于 2.4%。

2.4 结果与分析

2.4.1 指纹图谱共有峰的标定 根据 34 批银杏叶的 HPLC 图，标定了 28 个色谱峰作为银杏叶的 HPLC 指纹图谱的共有峰，28 个共有峰的面积之和占总峰面积和 90% 以上，符合指纹图谱的技术要求，见图 1。

2.4.2 样品测定结果 将各批次银杏叶按上述 HPLC 指纹图谱方法测定，采用国家药典会公布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版”软件计算相似度，见图 2；并依照《中国药典》2010 年版一部中银杏叶项下测定方法测定总黄酮醇苷、萜类内酯的量，结果见表 3。

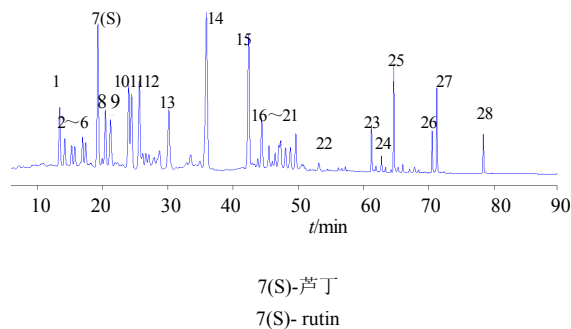


图 1 银杏叶共有峰 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC of common peak of *G. biloba* leaves

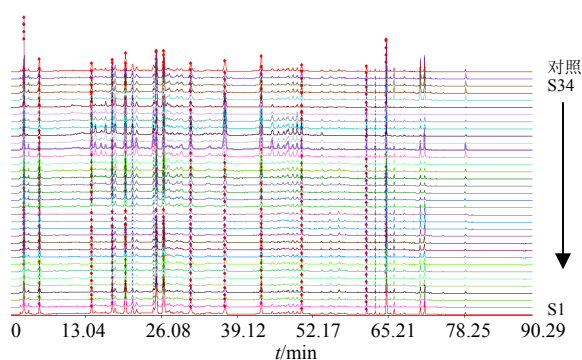


图 2 银杏叶 HPLC 指纹图谱
Fig. 2 HPLC fingerprint of *G. biloba* leaves

2.4.3 产地与银杏叶质量的关系 利用 SPSS 16.0 版本软件对以上同一树龄同一采收期分别采自 10 个产地的银杏叶（编号 S3、S8、S13、S16、S19、S22、S24、S27、S29、S34）进行聚类分析，以总黄酮醇苷、萜类内酯的质量分数为变量。结果见图 3。

由图 3 可见，当分类距离为 10 时，可将 10 个产地的银杏叶分为 3 类，江苏产地的银杏叶聚为第一类，且为质量分数较高的一类；四川、山东、湖北、重庆产地的银杏叶聚为第 2 类；其余 5 个产地的银杏叶为第 3 类。

2.4.4 树龄与银杏叶质量的关系 对四川北川 6 月份采收的银杏叶（S8~S12）测定结果进行分析，比较不同树龄银杏叶的主要成分量及指纹图谱相似度，结果见图 4。

由图 4 可知，随着树龄的增加，银杏叶中的总黄酮醇苷和萜类内酯的量整体呈下降趋势，以 2~3 年树龄的银杏叶质量为佳，此结果与钱大玮等^[8]的研究结果基本相一致。此外通过表 3 可知，不同树龄银杏叶的指纹图谱相似度为 0.84~0.97，变化较大，可知树龄对银杏叶的化学成分组成和比例有一定的影响。

表 3 各银杏叶样品总黄酮醇苷、萜类内酯量和相似度测定结果

Table 3 Determination of total flavonol glucoside, terpene lactones, and fingerprint similarity in *G. biloba* leaves

编号	总黄酮醇苷/%	萜类内酯/%	相似度	编号	总黄酮醇苷/%	萜类内酯/%	相似度
S1	0.338	0.147	0.718	S17	0.440	0.313	0.809
S2	0.984	0.239	0.821	S18	0.520	0.230	0.767
S3	0.980	0.541	0.961	S19	0.479	0.315	0.727
S4	0.913	0.696	0.927	S20	0.330	0.215	0.745
S5	0.799	0.745	0.909	S21	0.451	0.219	0.692
S6	0.510	0.757	0.797	S22	0.482	0.278	0.812
S7	0.400	0.263	0.698	S23	0.492	0.268	0.791
S8	0.892	0.487	0.955	S24	0.260	0.309	0.932
S9	0.710	0.490	0.974	S25	0.360	0.264	0.941
S10	0.575	0.325	0.839	S26	0.290	0.329	0.893
S11	0.510	0.308	0.867	S27	0.602	0.392	0.797
S12	0.460	0.278	0.883	S28	0.682	0.379	0.819
S13	0.842	0.474	0.937	S29	0.402	0.129	0.696
S14	0.702	0.364	0.912	S30	0.412	0.269	0.657
S15	0.592	0.344	0.933	S31	1.040	0.534	0.905
S16	0.410	0.333	0.779	S32	1.053	0.479	0.897
S17	0.440	0.313	0.809	S33	0.693	0.387	0.944
S18	0.520	0.230	0.767	S34	0.574	0.493	0.912

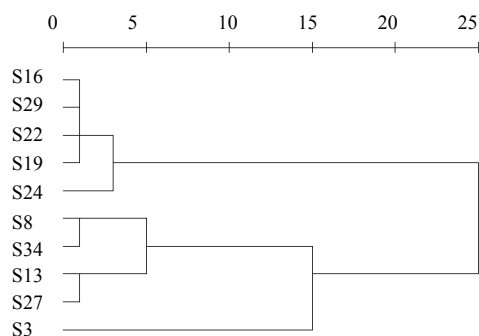


图 3 10 个产地银杏叶聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis on *G. biloba* leaves from 10 habitats

2.4.5 采收期与银杏叶质量的关系 对江苏邳州 2~3 年生的银杏叶 (编号 S1~S7) 测定结果进行分析, 比较不同采收期银杏叶的主要成分含量及指纹图谱相似度, 结果见图 5。

由图 5 可知, 不同采收时期银杏叶成分量变化较大, 总黄酮醇苷量在 5 月份达到了最高峰, 而银杏叶萜类内酯在 8~9 月份量较高。由表 3 中不同采收期银杏叶的指纹图谱相似度可以看出, 6~8 月份银杏叶的指纹图谱相似度变化范围较小, 均大

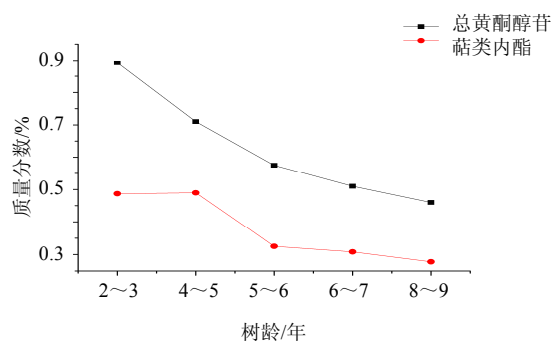


图 4 不同树龄银杏叶总黄酮醇苷、萜类内酯量变化

Fig. 4 Variation of total flavonol glucoside and terpene lactones in *G. biloba* leaves at different tree ages

于 0.90, 表明 6~8 月份银杏叶的化学成分组成和比例较一致, 质量稳定。综合比较可知, 6~8 月份采收的银杏叶主要成分量较高, 质量也较稳定。

3 讨论

不同产地、树龄、采收期银杏叶的指纹图谱相似度变化较大, 表明产地、树龄、采收期对银杏叶的化学成分均有影响。通过上述结果分析, 可以得出结论, 江苏邳州、2~3 年树龄、6~8 月份采集的银杏叶质量尚佳, 可以考虑作为作为欣脉胶囊处方

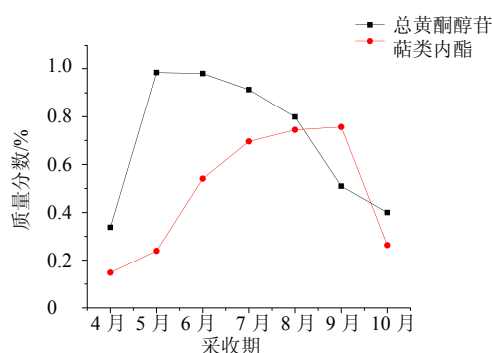


图 5 不同采收期银杏叶总黄酮醇苷、萜类内酯量变化

Fig. 5 Variation of total flavonol glucoside and terpene lactones in *G. biloba* leaves at different harvesting times

银杏叶药材的固定来源产地。

此外，本实验为控制银杏叶内在质量所建立的指纹图谱测定方法，为银杏叶的合理采收及质量评价提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 孙笑槐. 银杏叶中有效成分的研究进展 [J]. 中国科技信息, 2011(4): 111-114.
- [3] 牟玲丽, 寇俊萍. 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): 26-28.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 黄金龙, 殷之武, 何新华, 等. 银杏叶总黄酮纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 922-925.
- [8] 钱大玮, 鞠建明, 朱玲英, 等. 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 [J]. 中草药, 2002, 33(11): 1025-1026.