

## 不同产地及株龄果用银杏叶中总银杏酸含量的比较

姚鑫, 周桂生, 唐于平<sup>①</sup>, 钱大玮, 宿树兰, 段金赓

(南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

**Comparison of total ginkgolic acids content in leaf of fruit-utilization type of *Ginkgo biloba* with different tree ages and from different locations** YAO Xin, ZHOU Gui-sheng, TANG Yu-ping<sup>①</sup>, QIAN Da-wei, SU Shu-lan, DUAN Jin-ao (Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(4): 108-110

**Abstract:** Total ginkgolic acids content in leaf of fruit-utilization type of *Ginkgo biloba* L. from 17 locations in 12 provinces and with different tree ages from 10 to 100 a were analyzed by HPLC. The results show that total ginkgolic acids content in *G. biloba* leaf varies with changing of locations and tree ages. Total ginkgolic acids content in 10-30 year-old *G. biloba* is all lower (mass ratio 0.81%-0.93%), in which that in 25 year-old *G. biloba* is the lowest (mass ratio 0.81%), but that in 50 and 100 year-old *G. biloba* is higher with a mass ratio of 1.20% and 1.07%, respectively. Total ginkgolic acids content in *G. biloba* leaf from Changting of Fujian is the highest (mass ratio 2.80%), and that from Jiangsu, Shandong, Anhui and Zhejiang is all lower (mass ratio 0.51%-0.99%), showing a certain regional distribution characteristics.

**关键词:** 果用银杏; 叶片; 总银杏酸; 株龄; 产地

**Key words:** fruit-utilization type of *Ginkgo biloba* L.; leaf; total ginkgolic acids; tree age; location

中图分类号: Q946.82+7; S792.95.01 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)04-0108-03

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是中国特有的集叶用、果用、材用、防护和观赏于一体的多功能树种。银杏叶和果实具有独特的药理效应,广泛应用于食品、保健品、化妆品和药品中,已逐渐成为全球植物药制剂与保健食品的前列品种。银杏叶为银杏的干燥叶,其提取物制剂在临床上用于治疗冠心病<sup>[1]</sup>、高血压<sup>[2]</sup>、脑梗死<sup>[3]</sup>、痴呆<sup>[4-5]</sup>、哮喘<sup>[6]</sup>、乙型肝炎<sup>[7]</sup>和糖尿病<sup>[8]</sup>等疾病。银杏叶主要含黄酮类和萜内酯类成分,还含有银杏酸类成分。银杏酸类成分具有致敏性、细胞毒性和免疫毒性等,是银杏叶提取物及其制剂中的主要毒性成分,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<sup>[9]</sup>。

叶用银杏主要为株龄4~7 a的植株,由于存在气温差异,7月份至9月份银杏叶中黄酮和萜内酯含量均较高,采叶较为适宜,可作为银杏提取物的原料<sup>[10-11]</sup>;银杏大多生长9~10 a后结果,但10月份采果后,大量的银杏叶因黄酮与萜内酯类成分含量偏低<sup>[12-13]</sup>而被废弃。笔者前期的研究表明:果用银杏的落叶中黄酮类与萜内酯类成分含量不高,且其组成变化不大<sup>[14]</sup>,如果通过富集利用也可能成为银杏叶提取物的原料,但其中银杏酸含量则未知。

笔者采用HPLC方法<sup>[9,15-16]</sup>,对不同产地及株龄果用银杏叶中银杏酸含量的变化进行比较分析,以期为果用银杏叶资源的深度开发利用提供实验数据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

以2011年10月果实收获后的银杏叶为实验材料,分别采自位于山东郯城和泰安,江苏扬州、南京和泰兴,广西灵川,浙江安吉,安徽宁国,湖南永州,福建长汀,河北石家庄,贵州遵义和贵阳,辽宁丹东,河南洛阳以及四川成都和南台的银杏栽培区,每个产地收集1个样品(500 g);其中,在山东郯城分别选株龄10、15、20、25、30、50和100 a的植株采集样叶,其余产地样株的株龄均为20 a。样品经南京中医药大学严辉博士鉴定为银杏的干燥叶,样本存放于南京中医药大学江苏省方剂高技术研究重点实验室。样品采集后于45℃烘干,粉碎后过40目筛,备用。

主要仪器:Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)、BT-125D 型十万分之一电子分析天平(德国 Satorius 公司)、KH-2200B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)、Anke GL-16G-II 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)和 EPED-T 纯水器(南京易普易达科技发展有限公司)。

供含量测定的白果新酸对照品(批号:111690-200702)及供鉴别用的总银杏酸对照品(批号:111594-200603)均由中

收稿日期: 2012-04-13

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI04B03); 国家教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-09-0163); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2010)

作者简介: 姚鑫(1987—),男,江苏连云港人,硕士研究生,主要从事中药资源化学分析方面的研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: yupingtang@njutcm.edu.cn

国药品生物制品鉴定所提供;甲醇为色谱纯(江苏汉邦科技有限公司),水为自制超纯水,其他试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

1.2.1 对照品溶液制备及标准曲线绘制 精密称取白果新酸对照品适量,加甲醇配制成质量浓度 $0.1620\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。另取总银杏酸对照品适量,作为鉴别用对照品溶液。

分别精密吸取白果新酸对照品溶液 $1.0$ 、 $2.0$ 、 $4.0$ 、 $8.0$ 、 $16.0$ 和 $32.0\ \mu\text{L}$ ,参照文献[9]的色谱条件进行HPLC测定。以对照品进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标 $X$ 、峰面积积分为纵坐标 $Y$ 进行线性回归分析,得到回归方程 $Y=5.24\times 10^5 X-5.01\times 10^4$ ( $r=0.9999$ ),显示白果新酸进样量在 $0.162\sim 5.184\ \mu\text{g}$ 范围内呈良好的线性关系。

1.2.2 供试品溶液的制备及测定 取银杏叶粉末约 $1.0\text{ g}$ ,精密称定后准确加入 $20\text{ mL}$ 甲醇,闭塞并称取质量,用超声波辅助提取 $45\text{ min}$ (超声功率 $40\text{ kHz}$ ),冷却后再称取质量并用甲醇补足损失的质量,摇匀后用 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,滤液即为供试品溶液。每个样品取3份,平行提取。按照标准曲线的色谱条件进行HPLC分析,每份样品测定3次,并采用外标法以白果新酸对照品计算总银杏酸含量。

### 1.2.3 方法学考察

1.2.3.1 精密密度实验 精密吸取同一对照品溶液 $20\ \mu\text{L}$ ,按上述色谱条件重复进样测定6次,其峰面积的 $RSD$ 为 $0.67\%$ ,表明仪器精密密度良好。

1.2.3.2 重复性实验 取同一批银杏叶,制备6份供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,白果新酸和总银杏酸含量分别为 $0.114\%$ 和 $1.03\%$ , $RSD$ 分别为 $1.75\%$ 和 $1.59\%$ ,表明本方法重复性较好。

1.2.3.3 稳定性实验 取重复性实验中的供试品溶液1份,分别于 $0$ 、 $4$ 、 $8$ 、 $12$ 和 $24\text{ h}$ 按上述色谱条件进样测定,白果新酸和总银杏酸的 $RSD$ 分别为 $0.87\%$ 和 $1.00\%$ ,表明供试品溶液在 $24\text{ h}$ 内稳定性较好。

1.2.3.4 回收率实验 取总银杏酸含量已知的样品6份,每份约 $0.5\text{ g}$ ,精密称定后按照供试品溶液的制备方法处理并按上述色谱条件进样测定,平均回收率为 $99.7\%$ , $RSD$ 为 $1.7\%$ 。

## 1.3 数据处理

采用SPSS 16.0统计分析软件对实验数据进行处理。

## 2 结果和分析

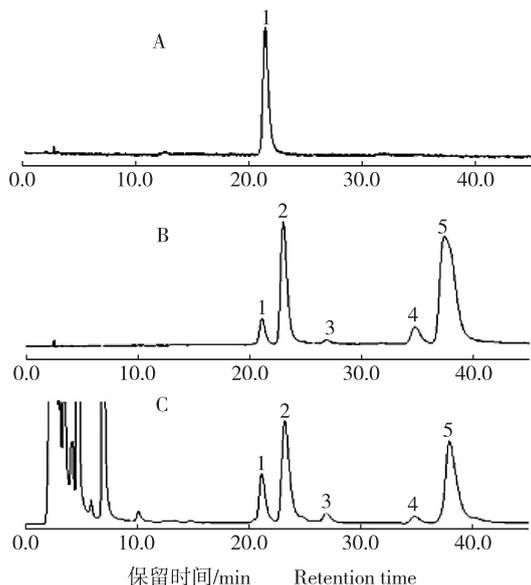
### 2.1 总银杏酸的HPLC分析结果

采用文献[9]的HPLC色谱条件及方法,果用银杏叶中5种主要银杏酸成分均得到较好的分离,对照品及样品的HPLC色谱图见图1。

### 2.2 不同株龄果用银杏叶总银杏酸含量的比较

来源于山东郯城的不同株龄果用银杏叶中总银杏酸含量的测定结果见表1。由表1可见:不同株龄果用银杏叶中总银

杏酸含量有一定差异,其中,总银杏酸含量在株龄 $50\text{ a}$ 的银杏叶中最高(质量分数 $1.20\%$ ),在株龄 $25\text{ a}$ 的银杏叶中最低(质量分数 $0.81\%$ )。株龄 $10\sim 30\text{ a}$ 的银杏叶中总银杏酸含量均低于质量分数 $1\%$ ,而株龄 $50$ 或 $100\text{ a}$ 的银杏叶中总银杏酸含量均高于质量分数 $1\%$ 。一般认为,叶用银杏叶中总银杏酸含量为 $0.48\%\sim 2.52\%$ [9],与此相比,来源于山东郯城不同株龄果用银杏叶中总银杏酸含量相对较低。



1: 白果新酸 Ginkgonic acid; 2-5: 其他4种银杏酸成分 Other four components of ginkgolic acids.

A. 白果新酸对照品色谱图 Chromatogram of ginkgonic acid standard; B. 总银杏酸对照品色谱图 Chromatogram of total ginkgolic acids standard; C. 银杏叶样品色谱图 Chromatogram of *G. biloba* leaf sample.

图1 银杏酸对照品及银杏叶样品HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of ginkgolic acid standard and *Ginkgo biloba* L. leaf sample

表1 不同株龄果用银杏叶中总银杏酸含量的测定结果

Table 1 Determination result of total ginkgolic acids content in leaf of fruit-utilization type of *Ginkgo biloba* L. with different tree ages

株龄/a	Tree age	含量/ $\%$ <sup>1)</sup>	Content <sup>1)</sup>
10	10	0.93	0.93
15	15	0.89	0.89
20	20	0.84	0.84
25	25	0.81	0.81
30	30	0.92	0.92
50	50	1.20	1.20
100	100	1.07	1.07

<sup>1)</sup>质量分数 Mass ratio.

### 2.3 不同产地果用银杏叶中总银杏酸含量的比较

来源于12个省区17个产地的果用银杏叶中总银杏酸含量的测定结果见表2。由表2可见:各产地果用银杏叶中总银

银杏酸含量差异较大。其中,福建长汀产果用银杏叶中总银杏酸含量最高(质量分数 2.80%),远超过文献[9]报道的叶用银杏叶中总银杏酸的含量(质量分数 0.48%~2.52%);江苏及其周边的山东、安徽、浙江等产地的果用银杏叶中总银杏酸含量均较低(质量分数 0.51%~0.99%),显示出果用银杏叶中总银杏酸含量具有一定的区域性。

表 2 来源于不同产地果用银杏叶中总银杏酸含量的测定结果  
Table 2 Determination result of total ginkgolic acids content in leaves of fruit-utilization type of *Ginkgo biloba* L. from different locations

产地 Location	含量/% <sup>1)</sup> Content <sup>1)</sup>
福建长汀 Changting of Fujian	2.80
贵州遵义 Zunyi of Guizhou	2.15
河北石家庄 Shijiazhuang of Hebei	1.91
辽宁丹东 Dandong of Liaoning	1.68
湖南永州 Yongzhou of Hu'nan	1.52
贵州贵阳 Guiyang of Guizhou	1.46
河南洛阳 Luoyang of He'nan	1.29
四川成都 Chengdu of Sichuan	1.24
四川南台 Nantai of Sichuan	1.03
浙江安吉 Anji of Zhejiang	0.99
广西灵川 Lingchuan of Guangxi	0.96
山东泰安 Tai'an of Shandong	0.94
山东郯城 Tancheng of Shandong	0.84
江苏南京 Nanjing of Jiangsu	0.74
安徽临国 Lin'guo of Anhui	0.69
江苏扬州 Yangzhou of Jiangsu	0.68
江苏泰兴 Taixing of Jiangsu	0.51

<sup>1)</sup>质量分数 Mass ratio.

### 3 讨论和结论

研究表明:果用银杏叶中银杏酸的含量因株龄和产地有较大差异。从株龄看,10~30 a 生果用银杏叶总银杏酸含量偏低,50 a 生果用银杏叶总银杏酸含量最高;按地区分布,来源于江苏及其周边山东、安徽和浙江等地的果用银杏叶中总银杏酸含量较低,而来源于福建长汀的果用银杏叶中总银杏酸含量最高。因此,在果用银杏叶利用过程中,除考虑其中银杏黄酮和萜内酯含量相对较高外,还应根据“总银杏酸含量较低”这一标准选择适宜的株龄和产地。

采用多层次成分富集技术,有望将果用银杏叶开发成为与银杏叶提取物相当的产品,并应用于医药与食品领域,为银杏的综合利用与开发提供新资源。

### 参考文献:

- [1] 张景云,路方红,吴坚美,等. 银杏叶口服液对冠心病病人低密度脂蛋白氧化的抑制作用[J]. 中国新药与临床杂志, 1998, 17(1): 13-14.
- [2] 耿秀芳,孙晓丽,王洪刚,等. 银杏叶总黄酮降压作用的实验与临床研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8): 606-608.
- [3] 朱日华,许尚臣,张秀清,等. 银杏叶提取物治疗急性脑梗塞 42 例[J]. 山东中医学院学报, 1995, 19(4): 238-240.
- [4] HAASE J, HALAMA P, HERR R. Effectiveness of brief infusions with *Ginkgo biloba* special extract EGB761 in dementia of the vascular and alzheimer type [J]. Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie, 1996, 29(4): 302-306.
- [5] KANOWSKI S, HERRMANN W M, STEPHAN K, et al. Proof of efficacy of the *Ginkgo biloba* special extract (GbE761) in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia [J]. Pharmacopsychiatry, 1996, 29(2): 47-56.
- [6] 耿志广,郝凤亮,毛学忠. 银杏叶片对缓解期哮喘患者气道高反应性及肺功能的影响[J]. 临床荟萃, 1999, 14(4): 151-152.
- [7] 王京,主余华,任万华,等. 银杏叶提取物治疗慢性乙型肝炎肝纤维化病人 32 例[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(1): 44-47.
- [8] 韩云丽,遼丹阳,滕东时. 银杏叶提取物治疗 2 型糖尿病 18 例疗效分析[J]. 哈尔滨医药, 2005, 25(4): 29.
- [9] 鞠建明,黄一平,钱士辉,等. 不同树龄银杏叶在不同季节中总银杏酸的动态变化规律[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 817-819.
- [10] 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): 1025-1027.
- [11] 孙兴力,周金彩,龙红萍,等. 不同生长季节银杏叶中总黄酮醇苷和总内酯的含量变化[J]. 中南药学, 2009, 7(8): 564-567.
- [12] 崔北米,潘巧娜,龙凌云,等. 银杏叶黄酮积累变化规律的初步研究[J]. 湖南农业科学, 2008(5): 134-136.
- [13] 仲英,唐文照,丁杏苞,等. 不同树龄的银杏叶在不同生长季节中银杏总黄酮和总内酯的含量变化[J]. 中草药, 1999, 30(12): 909-910.
- [14] 姚鑫,周桂生,唐于平,等. 银杏落叶化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(10): 1377-1381.
- [15] 吴向阳,仰榴青,陈钧. 不同生长季节银杏中有毒成分银杏酸含量的测定[J]. 食品科学, 2002, 23(12): 94-97.
- [16] 聂黎行,鲁静. 银杏叶提取物中总银杏酸的 HPLC 法限量检查[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(8): 909-911.

(责任编辑:张明霞)