

蒲擎宇,杨朗生,王 刚. 银杏叶原料与产品中游离黄酮苷元含量的相关性分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):344-346.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.117

银杏叶原料与产品中游离黄酮苷元含量的相关性分析

蒲擎宇,杨朗生,王 刚

(四川农业大学,四川成都 611130)

摘要:以不同树龄、产地、采收期的银杏叶为原料制备银杏叶提取物,并采用高效液相色谱分别测定银杏叶及其产品中游离槲皮素、山奈酚、异鼠李素 3 种黄酮苷元的含量,确定银杏叶原料与产品中 3 种游离黄酮苷元的含量变化关系,为银杏叶提取物产品的质量控制在提供翔实的参数,杜绝向银杏叶提取物中人为添加相关黄酮苷元,促进银杏产业的健康发展。

关键词:银杏叶;银杏叶提取物;黄酮苷元;高效液相色谱

中图分类号:R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-0344-03

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科(Ginkgoaceae)银杏属植物,别称白果树、公孙树、鸭脚通,是我国特有的珍贵植物。银杏叶提取物是以银杏树叶为原料,采用现代工艺加工而成的天然药物,具有清除人体自由基,降低过氧化脂质的产生,抑制血小板活化因子,提高红细胞活性,增强红细胞的变形能力,降低血液黏度,防止血栓形成等作用,能有效促进人体心、脑血管及外周微细血液循环,防治心脑血管疾病^[1]。银杏叶提取物对眩晕、耳鸣、头痛等脑神经功能障碍及老年性痴呆症等也有良好的治疗作用。目前,银杏叶和银杏叶提取物作为原料药,已被广泛用于制作治疗心脑血管疾病的制剂,仅《中国药典》就收录了包括银杏叶在内的 5 个相关品种。《欧洲药典》规定了银杏叶和银杏叶提取物的标准;《美国药典》将银杏叶及其制剂作为食品补充剂收录。尽管国内外尚无统一标准,但各国对该类药品的质量控制手段基本一致,如《中国药典》(2010 版)中银杏叶提取物质量标准对银杏黄酮苷的要求为:黄酮苷含量 $\geq 24\%$ 。测定方法是将银杏叶提取物水解后,采用 HPLC 法测定槲皮素、山奈酚、异鼠李素 3 种黄酮苷元的含量,再将其总含量 $\times 2.51$ 转化为银杏黄酮苷的含量,同时要求槲皮素与山奈酚的峰面积比值在 0.8~1.2 之间;异鼠李素与槲皮素的峰面积比值大于 0.15。植物中黄酮大部分以苷的形式存在,少部分以游离形式存在^[2],此检测方法未扣除产品中已有的游离黄酮苷元,因此测定的银杏黄酮苷含量高于实际结果,为不法商贩对银杏叶提取物产品掺假创造了机会。虽然《中国药典》(2010 版)中的 TLC 鉴别法^[1]可对银杏黄酮苷进行识别,但黄酮苷展开剂很难判断游离黄酮,且不能对银杏叶提取物中的游离黄酮苷元定量,致使不法厂家、商贩按比例向银杏叶提取物产品中添加槲皮素、山奈酚等黄酮类化合物,以提高产品中银杏黄酮苷的含量并达到《中

国药典》(2010 版)的质量要求。为杜绝掺假行为,有必要对银杏叶及其产品中 3 种游离黄酮苷元的含量进行相关性分析,并确定含量标准。关于银杏叶中黄酮类化合物的测定已有研究^[3-5],但银杏叶提取物、银杏叶及其产品中 3 种游离黄酮苷元含量变化的相关分析尚未见报道。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括 LC-10ATvp 型输液泵,SPD-10Avp 型可变波长紫外检测器,CTO-10AS 型柱温箱,N2000 型色谱数据处理系统;TU-180PC 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);RE52-98 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);KQ-500 型超声器(昆山超声仪器有限公司)。四川银杏树叶采于四川省都江堰市,其工业生产用叶由四川省什邡市华康药物原料厂提供;山东银杏树叶(工业生产用叶,树龄 10 年以上)由四川省都江堰市芳华园林有限责任公司提供;江苏银杏树叶(工业生产用叶,树龄 10 年以上)由成都世熙生物技术有限公司提供。槲皮素、山奈酚、异鼠李素对照品均由中国药品生物制品检定所生产,纯度均为 98%;甲醇(色谱纯);磷酸(分析纯);二次蒸馏水(自制);提取用甲醇(分析纯)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

在《中国药典》(2010 版)^[1]的色谱条件下,3 种黄酮苷元的保留时间适中,主峰与相邻物质峰的分度大于 1.5,理论塔板数按槲皮素峰计算大于 3 500,完全达到药典要求(图 1)。

2.2 对照品溶液的制备

准确称取槲皮素 4.5 mg、山奈酚 3.1 mg、异鼠李素 2.0 mg 置于 25 mL 容量瓶中,加适量甲醇使其溶解并定容至刻度,摇匀后即得对照品储备混合液(槲皮素 0.176 4 mg/mL、山奈酚 0.121 52 mg/mL、异鼠李素 0.078 4 mg/mL)。

2.3 银杏叶提取物的制备

银杏叶于 60 ℃烘干,粉碎后过 40 目筛,取粉末 100 g 按《中国药典》(2010 版)中的条件制备银杏叶提取物^[1]。

收稿日期:2014-11-26

基金项目:国家星火计划(编号:2012GA810002)。

作者简介:蒲擎宇(1990—),男,四川都江堰人,主要从事天然产物的研究。E-mail:516109225@qq.com。

通信作者:王 刚,硕士,教授,主要从事天然产物及生态林业的研究。E-mail:2932195732@qq.com。

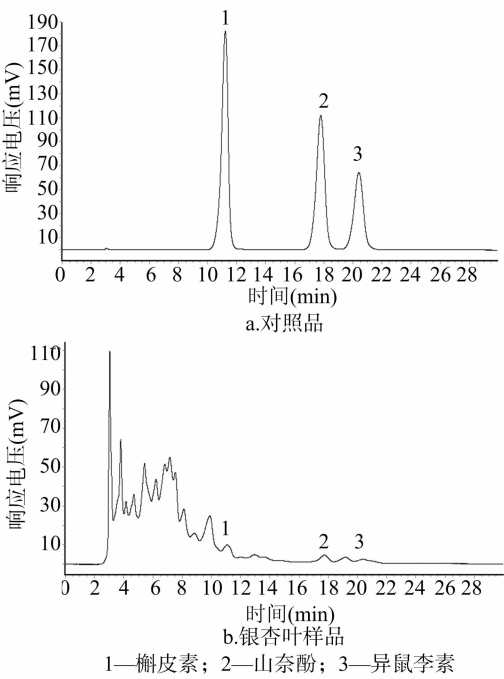


图1 对照品与银杏叶样品的 HPLC 图

2.4 银杏叶供试品溶液的制备

银杏叶于 60 ℃ 烘干,粉碎后过 40 目筛,准确称取 5 g 粉末并置于圆底烧瓶中,用甲醇提取 3 次,每次加甲醇 50 mL,分别于 60 ℃ 回流提取 3、2、1 h,以转速 5 000 r/min 离心 5 min 并过滤,合并提取液减压浓缩干,再用甲醇溶解并定容至 50 mL,摇匀后用 0.45 μm 滤膜滤过,保存备用。

2.5 银杏叶提取物供试品溶液的制备

准确称取适量银杏叶提取物粉末,置于 25 mL 容量瓶中,加适量甲醇使其溶解并定容至刻度,摇匀后用 0.45 μm 滤膜滤过,保存备用。

2.6 3 种游离黄酮苷元含量及产品中提取率的计算

含量 (mg/g) = (C × V)/m; 提取率 = (B₁ × m₁)/(B₂ × m₂) × 100%。

式中,C 为测量液中黄酮苷元的浓度 (mg/mL);V 为测量液总体积 (mL);m 为原料或产品的质量 (g);m₁ 为银杏叶提取物的质量 (g);m₂ 为银杏叶的质量 (g);B₁ 为银杏叶提取物中游离黄酮苷元的含量;B₂ 为银杏叶中游离黄酮苷元的含量。

2.7 方法学考察

2.7.1 线性关系 分别准确吸取对照品溶液 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 mL 于 25 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀后即得对照品系列标准溶液。分别准确吸取对照品系列标准溶液各 10 μL,按“2.1”节所述色谱条件进行分析。以进样量 (μg) 为横坐标 (x),色谱峰面积为纵坐标 (y) 绘制标准曲线,得到 3 种黄酮苷元的回归方程。槲皮素:y = 3 × 10⁶x + 303.21, r² = 0.999 9;山奈酚:y = 4 × 10⁶x - 537.56, r² = 0.999 9;异鼠李素:y = 3.8 × 10⁶x - 624.47, r² = 0.999 9。结果表明,槲皮素、山奈酚、异鼠李素 3 种黄酮的进样量依次在 0.003 528 0 ~ 0.112 896 0、0.002 430 4 ~ 0.077 728 0、0.001 568 0 ~ 0.050 176 0 μg 范围内,线性关系良好。

2.7.2 精密度试验 准确吸取同一对照品标准溶液 10 μL,重复进样 6 次,记录色谱图并测定峰面积,得到 3 种黄酮苷元

(槲皮素、山奈酚、异鼠李素) 峰面积的相对标准偏差 (RSD) 依次为 0.31%、0.80%、0.25%,表明色谱系统重复性良好。以四川产工业用银杏叶为原料,按“2.4”节所述方法平行制备供试溶液 6 份,测得 3 种游离黄酮苷元(槲皮素、山奈酚、异鼠李素)的平均含量依次为 0.003 3%、0.002 8%、0.002 6%;RSD 依次为 0.96%、0.85%、0.78%,表明方法的精密度良好。以四川产工业用银杏叶制备的银杏叶提取物为原料,按“2.5”节所述方法平行制备供试溶液 6 份,测得 3 种游离黄酮苷元(槲皮素、山奈酚、异鼠李素)的平均含量依次为 0.29%、0.10%、0.09%;RSD 依次为 0.96%、0.91%、0.82%,表明方法的精密度良好。

2.7.3 稳定性试验 将同一供试溶液于室温下分别放置 0、2、4、6、8、10、12 h 后进样,每次 10 μL,记录色谱图并测定峰面积,槲皮素、山奈酚、异鼠李素 3 种黄酮苷元峰面积的 RSD 依次为 0.94%、0.97%、0.82%,表明样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.7.4 加标回收试验 准确称取 6 份已知 3 种游离黄酮苷元含量的样品(四川产工业用银杏树叶,槲皮素、山奈酚、异鼠李素的含量依次为 0.033、0.028、0.026 mg/g),每份取 5 g。向每份样品中各加入 3 种黄酮苷元对照品储备液 1.0 mL,按“2.4”节所述方法制备供试品溶液,并按上述色谱条件进样,测定峰面积,计算 3 种黄酮苷元的含量,根据加入量计算出槲皮素、山奈酚、异鼠李素的平均加样回收率依次为 100.3%、101.1%、99.7%;RSD 依次为 1.6%、1.3%、0.8%。

2.8 银杏叶中 3 种游离黄酮苷元含量的测定

试验以不同月份、不同树龄、不同产地的银杏树叶为原料,按“2.4”节所述方法制备样品溶液。准确吸取各样品溶液 10 μL,重复进样 3 次,分别测定峰面积。用回归方程计算 3 种游离黄酮苷元在样品中的平均含量(表 1、表 2、表 3)。

表 1 不同月份银杏树叶中游离黄酮苷元的含量

采摘月份	游离黄酮苷元含量 (mg/g)		
	槲皮素	山奈酚	异鼠李素
7	0.027	0.023	0.032
8	0.026	0.025	0.037
9	0.045	0.021	0.042
10	0.019	0.008	0.013

表 2 不同树龄银杏树叶中游离黄酮苷元的含量

树龄 (年)	游离黄酮苷元含量 (mg/g)		
	槲皮素	山奈酚	异鼠李素
1	0.088	0.055	0.038
2	0.034	0.059	0.016
3	0.032	0.056	0.025
5	0.033	0.045	0.022
8	0.028	0.049	0.026
10	0.030	0.012	0.024
12	0.045	0.007	0.021
15	0.026	0.006	0.032
25	0.031	0.003	0.038
30	0.016	0.004	0.026

2.9 银杏叶提取物中 3 种游离黄酮苷元含量的测定

分别以四川省、山东省、江苏省产的工业用银杏叶为原

表 3 不同产地银杏树叶中游离黄酮苷元的含量

产地	游离黄酮苷元含量(mg/g)		
	槲皮素	山奈酚	异鼠李素
四川省	0.033	0.028	0.026
山东省	0.025	0.067	0.021
江苏省	0.065	0.045	0.032

料,按“2.3”节所述方法制备银杏叶提取物,再按“2.5”节所述方法制备样品溶液。准确吸取各样品溶液 10 μL,重复进样 3 次,分别测定峰面积。用回归方程计算 3 种游离黄酮苷元在样品中的平均含量及提取率(表 4)。

表 4 银杏叶提取物中游离黄酮苷元的含量

银杏叶 提取物	槲皮素		山奈酚		异鼠李素		备注
	含量 (mg/g)	提取率 (%)	含量 (mg/g)	提取率 (%)	含量 (mg/g)	提取率 (%)	
提取物 A	0.840	76.3	0.710	76.5	0.670	76.8	四川叶
提取物 B	0.630	81.2	1.680	80.3	0.530	80.9	山东叶
提取物 C	1.760	78.6	1.230	79.2	0.860	78.1	江苏叶

3 讨论

3.1 银杏叶中游离黄酮苷元的提取

本研究对提取溶剂(水、50% 甲醇、100% 甲醇)、提取方法(超声提取、回流提取)、提取温度(室温、40、60、80 ℃)进行了试验,结果表明本试验的各项条件最优。由于银杏叶中 3 种游离黄酮苷元的含量都很低,将提取液浓缩干,再用甲醇溶解并定容可提高样品液中有效成分的浓度,以保证高效液相色谱检测时进样量在设定的线性范围内。

3.2 银杏叶中游离黄酮苷元含量的变化

由表 1 至表 3 可知,各供试原料中 3 种游离黄酮苷元的含量均很低,每种含量均在万分之一以下,且与采叶月份、树龄、产地的相关性不显著。试验按照《中国药典》(2010 版)所述方法^[1]对各银杏叶中 3 种总黄酮苷元、游离黄酮苷元的含量进行测定。以四川产工业用叶为例,原料水解后总黄酮苷元的含量为 3.100 mg/g(槲皮素、山奈酚、异鼠李素的含量分别为 1.690、1.150、0.260 mg/g),不水解原料中游离黄酮苷元的含量为 0.087 mg/g,仅占黄酮苷元总含量的 2.8%,可见银杏叶中的黄酮主要以苷的形式存在,仅有少量以游离黄酮苷元的形式存在于银杏树叶中。

3.3 银杏叶原料与产品中 3 种游离黄酮苷元的相关性分析

3 种游离黄酮苷元在银杏叶提取物中的含量高低与其在银杏叶中的含量密切相关,且受到生产工艺的影响。由表 1 至表 4 可知,在原料与产品中,3 种游离黄酮苷元的含量均很低且呈正相关,但其提取率均较为稳定,与原料中含量的相关性不显著。试验对不同工艺制备的银杏叶提取物作了比

较^[6-10],以四川产工业用银杏树叶为例,各种工艺制备的银杏叶提取物中,3 种游离黄酮苷元的提取率基本相近,均为原料中总量的 76%~82%,与制备工艺的相关性不显著。产品中游离黄酮苷元的总量少于银杏树叶中的总量,是制备过程中的正常损耗。与原料中 3 种游离黄酮苷元的总量相比,产品中的总量并无增加,可见将银杏叶加工为银杏叶提取物产品时,银杏黄酮苷基本不会水解为游离的黄酮苷元。我国部分厂家生产的银杏叶提取物产品,部分产品虽符合《中国药典》(2010 版)的质量要求,但产品中 3 种游离黄酮苷元的含量总和却高达 32~52 mg/g,是正常量的 8~10 倍,掺假现象非常严重。究其原因,《中国药典》(2010 版)中的测定方法并未对游离黄酮苷元与水解黄酮苷元进行区分,致使不法商贩有机可乘。

4 结论

本试验采用高效液相色谱法,对不同采摘月份、树龄、产地的银杏树叶及其产品中 3 种游离黄酮苷元进行了检测。结果表明,银杏叶中 3 种游离黄酮苷元(槲皮素、山奈酚、异鼠李素)主要以苷的形式存在,仅有少量以游离的形式存在于银杏叶中;银杏叶提取物中单一游离黄酮(槲皮素、山奈酚、异鼠李素)的含量均很低,且基本不受原料及制备工艺的影响。因此,通过检测银杏叶提取物中游离黄酮苷元的含量,可有效识别产品掺假行为。本研究为我国银杏叶提取物产品质量标准的修订提供了理论依据,有助于杜绝人为掺假。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2010 版. 北京:中国医药科技出版社,2010:392-393.
[2] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000:191.
[3] 王 弘、赵国斌、刘叔情,等. 不同产地栽培银杏叶中黄酮类成分的含量测定[J]. 中国中药杂志,2000,25(7):24-26.
[4] 冯 明、张丽萍、孙 敏. 银杏叶中五种黄酮测定方法研究[J]. 福建分析测试,2013,22(4):8-11.
[5] 赵一懿、郭洪祝、王京辉,等. 超高效液相色谱法同时测定银杏叶提取物中 11 种黄酮苷类成分的含量[J]. 中国药学杂志,2012,47(24):2032-2037.
[6] 刘秋琼、张文智、袁春平. 注射用银杏叶提取物的工艺研究[J]. 中国新药杂志,2005,14(6):733-736.
[7] 杨荣华、徐 斌. 银杏叶中有效成分提取最优化生产工艺研究[J]. 中国现代医生,2007,45(3):20-21.
[8] 李大枝、张长花、党艳秋,等. 从银杏叶中高效提取分离银杏黄酮的研究[J]. 科技信息:科学·教研,2008(1):48.
[9] 韩学哲、王东双、安晓东,等. 银杏黄酮提取和精制工艺的研究[J]. 化学工程师,2011,25(4):60-62.
[10] 吴 昊、宗志敏、石金龙. S-8 大孔吸附树脂分离纯化银杏黄酮的工艺研究[J]. 食品科技,2013,38(4):224-227.