

银杏叶中银杏酸含量的测定

陈君^{1,2}, 陈岑², 任红², 黄海波³, 乔洪翔^{2,3*}, 王如伟³ (1.云南希康生物科技有限公司, 昆明 650217; 2.云南康恩贝植物研究院, 昆明 650217; 3.浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江省中药制药技术重点实验室, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定银杏叶中银杏酸含量的方法。方法 样品经甲醇超声提取, 采用 C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为含 0.1%三氟乙酸的乙腈(A)-0.1%三氟乙酸水(B), 梯度洗脱(0~30 min, 75%→90%A; 30~35 min, 90%A; 35~36 min, 90%→75%A; 36~45 min, 75%A), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 310 nm。结果 样品经甲醇超声提取, 快速简便制备银杏酸供试品, 白果新酸浓度在 0.917~45.85 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系($n=6$, $r^2=0.999$); 平均回收率为 97.34%, RSD 为 0.57%。结论 该方法灵敏、准确、简便, 适用于银杏叶中银杏酸含量的测定。

关键词: 银杏酸; 银杏叶; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)01-0072-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.01.016

引用本文: 陈君, 陈岑, 任红, 等. 银杏叶中银杏酸含量的测定[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 72-75.

Determination of Ginkgolic Acids in the Ginkgo Leaf

CHEN Jun^{1,2}, CHEN Cen², REN Hong², HUANG Haibo³, QIAO Hongxiang^{2,3*}, WANG Ruwei³ (1.Yunnan Xikang Biological Technology Co., Ltd., Kunming 650217, China; 2.Yunnan Institute for Botany of Conba Group, Kunming 650217, China; 3.Zhejiang Conba Pharmaceutical Co., Ltd., Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for the determination of Ginkgolic acids content in the Ginkgo leaf. **METHODS** The sample was extracted by ultrasonic extraction with methanol as the solvent, the separation was performed on C₁₈ column(4.6 mm×150 mm, 5 μm), with 0.1% trifluoroacetic acid solution of acetonitrile(A)-0.1% trifluoroacetic acid aqueous solution(B) as mobile phase, and eluted with a gradient program(0-30 min, 75%A→90%A; 30-35 min, 90%A; 35-36 min, 90%→75%A; 36-45 min, 75%A), flow rate 1 mL·min⁻¹, and UV detection wavelength at 310 nm. **RESULTS** It was convenient to prepare the sample of Ginkgolic acids by ultrasonic extraction with methanol as the solvent. The linear range for the content of ginkgoneolic acid was 0.917-45.85 μg·mL⁻¹ ($r^2=0.999$), the average recovery was 97.34%, and RSD was 0.57%. **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate and speedy, therefore suitable for the determination of Ginkgolic acids content in the Ginkgo leaf.

KEY WORDS: Ginkgolic acids; the Ginkgo leaf; content determination; HPLC

银杏是我国重要植物资源, 占世界 70%^[1], 银杏酸(Ginkgolic acids, 简称 GA)是银杏叶中除黄酮、内酯和原花青素^[2-3]外又一具有重要生理活性的组分, 占银杏叶干重的 1%~2%^[4]。GA 为水杨酸的 6-烷基或 6-烯基衍生物, 其主要由白果新酸、白果酸、氢化白果酸、氢化白果亚酸、白果二酚等组成^[5]。

现代毒理学研究表明, GA 具有致敏性、胚胎毒性、免疫毒性和细胞毒性等多种生物毒性^[6-7], 被认为是银杏叶提取物中最主要的毒性成分。

《美国药典》(39 版)^[8]和《欧洲药典》(9.0 版)^[9]对银杏叶提取物中 GA 含量限定在百万分之五以下, 中国药典 2015 年版^[10]限定银杏叶提取物中 GA 的含量在百万分之十以下, 且其仅对银杏叶提

取物中 GA 含量检测及其限度予以明确规定, 未对银杏叶中 GA 含量进行规定, 而实际工作中, 银杏叶中 GA 含量的检测对银杏叶种植、采购、销售等环节至关重要。随着银杏产业规模的不断扩大, 银杏产品也在逐渐增多, 银杏茶即为其中之一, 银杏茶是以银杏嫩叶为原料精制而成的一种保健品, 目前市售银杏茶已有上百种。2010 年, 国家正式将银杏茶从食品当中分离出来确定为保健品^[11], 但对其中 GA 的提取、含量测定等方面没有明确的标准, 文献报道较少。GA 定性定量分析方法有 TCL 分析、GC 和 GC-MS 分析及 HPLC 分析等^[12], 仰榴青等^[13]采用高效液相色谱法测定白果中的 GA 含量为 200 mg·kg⁻¹。本研究建立的银杏叶中

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2011ZX09203-001-16); 浙江省科技计划项目(2009E10009)

作者简介: 陈君, 女, 硕士 Tel: 13575461226 E-mail: chenjun2@conbagroup.com *通信作者: 乔洪翔, 男, 博士, 高级工程师 Tel: (0571)87774831 E-mail: qiaohx@conbagroup.com

GA 含量测定方法既是对中国药典 2015 年版的补充, 也是对实际生产工作的技术支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 紫外检测器(美国 Agilent 公司); KQ-250DB 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); BS 210S 型电子天平(德国赛多利斯公司); DFY 摇摆式高速中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

色谱柱: Agilent Ultimate XB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Acchrom Unitary C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Dikma Diamonsil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)。

1.2 试剂

白果新酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 111690200702, 供含量测定用); 总 GA(中国药品生物制品检定所, 批号: 111594-200502, 供定位用); 甲醇(上海凌峰化学试剂有限公司, 批号: 20160317); 乙醇(安徽安特食品股份有限公司, 批号: 1610073601); 乙腈(默克股份两合公司, 批号: JA043930); 三氟乙酸(SIGMA-ALDRICH, 批号: WXBB5807V)。银杏叶(浙江康恩贝制药股份有限公司, 批号: 20170206)。

2 方法与结果

2.1 提取方法的确定

取银杏叶中粉(取银杏叶适量, 粉碎机粉碎, 取能过四号筛、不能过五号筛粉末)约 1 g, 精密称定, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 分别考察不同提取溶剂、料液比、超声时间、提取温度对总 GA 含量的影响。提取完成后, 用相应的提取溶剂补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 测定并计算 GA 的含量。总 GA 计算公式: $G = (C_0 \times A_1 \times V_1) / (A_0 \times M_1) \times 100$ 。其中: G 为银杏叶中总 GA 含量(%); C_0 为白果新酸对照品浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); A_1 为样品总 GA 峰面积; A_0 为白果新酸对照品峰面积; M_1 为银杏叶质量(g); V_1 为提取溶剂体积(mL)。

2.1.1 提取溶剂的考察 ①提取溶剂种类考察: 按“2.1”项下方法分别精密加入甲醇、无水乙醇 50 mL, 称定重量, 室温超声提取 30 min, 测定并计算总 GA 的含量。结果显示, 以甲醇和无水乙醇为提取溶剂, 总 GA 含量分别为 2.197%和 2.181%, 结合色谱图 1, 比较峰形及分离度, 当以乙醇为提取溶剂时, GA 色谱峰出现包裹、拖尾等现象, 因

此甲醇较为适合于银杏叶 GA 的提取。②提取溶剂甲醇的浓度考察: 按“2.1”项下方法, 分别精密加入甲醇、90%甲醇、70%甲醇、50%甲醇 50 mL, 室温超声提取 30 min, 测定总 GA 的含量。结果总 GA 含量分别为 0.000%(50%甲醇提取)、1.229%(70%甲醇提取)、1.841%(90%甲醇提取)、2.154%(甲醇提取)。由结果可得, 50%甲醇几乎无法提取 GA, 随着甲醇浓度的增高, GA 含量增大, 选择甲醇作为 GA 的提取溶剂。

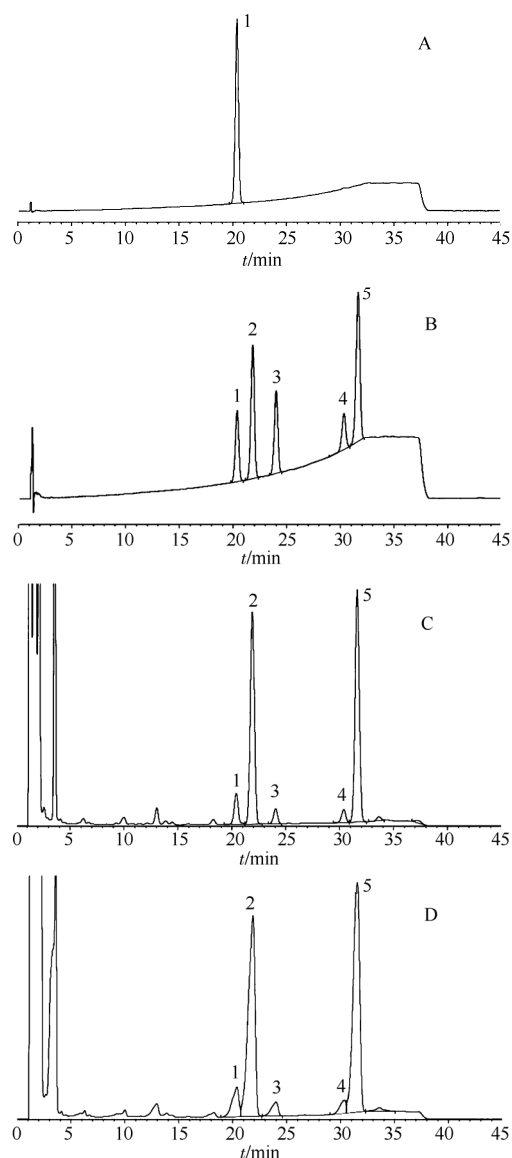


图 1 银杏叶中 GA 提取溶剂考察结果

A—白果新酸; B—总 GA; C—银杏叶甲醇提取液; D—银杏叶乙醇提取液; 1—GA_{C13:0}; 2—GA_{C15:1}; 3—GA_{C17:2}; 4—GA_{C15:0}; 5—GA_{C17:1}。

Fig. 1 Results of solvents for extracting ginkgolic acids from *Ginkgo biloba* leaves

A—ginkgoneolic acid; B—total Ginkgolic acids in the Ginkgo leaf; C—Ginkgo leaf extract of methanol; D—Ginkgo leaf extract of ethanol; 1—Ginkgolic acids C13:0; 2—Ginkgolic acids C15:1; 3—Ginkgolic acids C17:2; peak4—Ginkgolic acids C15:0; peak5—Ginkgolic acids C17:1.

2.1.2 料液比的考察 按“2.1”项下方法,加入甲醇使料液比依次为1:10,1:20,1:30,1:40,1:50,1:60,结果GA含量依次为2.032%,2.114%,2.157%,2.179%,2.185%,2.171%。料液比1:50时,GA含量最高,因此,选择料液比1:50。

2.1.3 超声时间的考察 按“2.1”项下方法,精密加入甲醇50 mL,室温超声时间分别为15,30,45,60 min,测定GA含量。结果显示,随着超声时间的增加,GA含量依次为2.157%,2.154%,2.162%,2.157%,即超声时间对总GA含量影响不显著,为避免因超声仪器性能波动而导致提取不完全,同时节约时间,选取30 min为超声时间。

2.1.4 提取温度的考察 按“2.1”项下方法,精密加入甲醇50 mL,超声提取30 min,温度分别为室温、40,50,60℃,测定GA含量。结果显示,随着温度的升高,GA含量依次为:2.135%,2.128%,2.124%,2.131%,说明温度对GA的提取影响不显著,结合超声操作便捷性及安全性,选择室温提取。

2.2 总GA含量测定方法照中国药典2015年版一部银杏叶提取物项下总GA测定

色谱条件及系统适应性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(150 mm×4.6 mm,5 μm),以含0.1%三氟乙酸的乙腈为流动相A,含0.1%三氟乙酸的水为流动相B,梯度洗脱(0~30 min,75%→90%A;30~35 min,90%A;35~36 min,90%→75%A;36~45 min,75%A)。理论板数按白果新酸峰计应≥4 000。

对照品溶液的制备:取白果新酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含20 μg的溶液,作为对照品溶液;另取总GA对照品适量,用甲醇制成每1 mL含20 μg的溶液,作为定位用对照溶液。

供试品溶液的制备:取银杏叶中粉约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定重量,超声提取30 min,放冷至室温,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

测定法:精密吸取供试品溶液、对照品溶液及定位用对照溶液各50 μL,注入液相色谱仪,计算供试品溶液中与总GA对照品相应色谱峰的总峰面积,以白果新酸对照品外标法计算总GA含量,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 自白果新酸储备液(白果新酸浓度为0.764 4 mg·mL⁻¹)中,分别精密量取0.1,

0.5,2,2.5,3,5 mL入10 mL量瓶,甲醇稀释并定容至刻度,摇匀即得。分别取上述溶液,精密吸取50 μL注入液相色谱仪,按“2.2”项下色谱条件进行测定。以白果新酸峰面积(Y)为纵坐标,其浓度(X,μg·mL⁻¹)为横坐标,进行线性回归处理,得线性回归方程为:Y=29.29X+4.216, $r^2=0.999$;结果显示,白果新酸浓度在0.917~45.85 μg·mL⁻¹内,峰面积值与浓度呈良好线性关系。

2.3.2 精密度试验 取白果新酸对照品溶液,连续进样测定6次,考察仪器精密度。结果白果新酸峰面积的RSD值为1.11%。说明仪器精密度良好。

2.3.3 中间精密度试验 考察不同日期、不同人员、不同仪器的实验精密度。分别制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定。结果总GA的中间精密度试验的RSD为0.09%。说明该方法的中间精密度良好。

2.3.4 重复性试验 称取6份同一批银杏叶中粉,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定峰面积,计算总GA含量。结果总GA含量RSD为0.24%。说明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取同一批银杏叶中粉约0.5 g,共6份,精密称定,置于100 mL具塞锥形瓶中,取拟定分析方法供试品中所含白果新酸与加入的白果新酸对照品量之比约为1:1的对照品溶液,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算平均回收率。测定结果见表1。

表1 银杏叶白果新酸加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 1 The result of recovery test (n=6)					
原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.566 4	0.573 3	1.122 1	96.92	97.34	0.57
0.563 1	0.573 3	1.118 0	96.79		
0.563 4	0.573 3	1.126 2	98.16		
0.563 0	0.573 3	1.120 8	97.31		
0.563 0	0.573 3	1.119 0	96.98		
0.566 6	0.573 3	1.127 6	97.86		

2.3.6 稳定性试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在制备后0,3,9,12,18,24 h进行测定。结果24 h内,供试品溶液总GA含量RSD为0.44%。说明供试品溶液在室温放置24 h,稳定性良好。

2.3.7 耐用性试验 分别考察25,30,35℃柱温下的银杏叶中总GA含量,计算RSD值。结果,不同柱温RSD为0.61%,说明柱温在25~35℃范围内波动对检测结果影响不显著。

分别考察 0.8, 1, 1.2 mL·min⁻¹ 流速下的银杏叶中 GA 含量, 计算 RSD 值。结果不同流速 RSD 为 1.42%, 说明流速值 0.8~1.2 mL·min⁻¹ 内波动对检测结果影响不显著。

分别考察 305, 310, 315 nm 波长下的银杏叶中总 GA 含量, 计算 RSD 值。结果不同波长 RSD 为 0.08%, 说明波长在 305~315 nm 内波动对检测结果影响不显著。

分别考察 Agilent Ultimate XB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Acchrom Unitary C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Dikma Diamonsil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱对银杏叶中总 GA 含量的影响, 计算 RSD 值。结果, 不同柱子 RSD 为 2.13%, 说明不同柱子对检测结果影响不显著。

2.4 银杏茶中 GA 的含量测定

将市面上购得的银杏茶按“2.2”项下的方法进行 GA 含量的测定, 结果为: 银杏茶 A(总 GA 含量为 2.35%), 银杏茶 B(总 GA 含量为 1.86%), 银杏茶 C(总 GA 含量为 1.96%), 即市面上的银杏茶中均含有大量的 GA 成分, 且厂家不同, GA 含量有较大差异。

3 讨论

中国药典 2015 年版一部银杏叶项并未对 GA 含量进行规定, 这可能是由于: 其一, 影响银杏叶中 GA 含量的因素复杂, 如产地、气候、种质资源、栽培等因素, 在现阶段生产力条件下, 无法对银杏叶药材的 GA 含量进行法定要求。其二, 银杏叶目前使用途径主要为经过一定的生产工艺获得银杏叶提取物, 而非直接食用原药材, 银杏叶经过生产加工后, 对其提取物的 GA 含量可控, 因此, 中国药典 2015 年版一部仅对银杏叶提取物项下 GA 含量进行了规定。本研究测定 GA 的高效液相色谱条件即来自于中国药典 2015 年版一部银杏叶提取物项下。结果显示, 该方法同样适用于银杏叶药材中的 GA 含量的测定。

在应用本试验方法进行银杏叶 GA 检测的过程中, 存在一个问题: 银杏叶不同, 其中 5 种 GA 的比例间存在一定差异; 本方法结果中, 白果新酸因具有法定单一对照而含量准确可测, 但总 GA 只有定位用对照, 其含量由于目前缺乏法定的其余 4 种单一 GA 对照品, 仅以白果新酸含量计, 其含量可靠性有待验证。因此, 为获得更准确的 GA 含量还需要进一步的研究。

银杏叶作为药品和保健品, 其功能和作用越

来越受到人们的重视^[14], 其应用范围也十分广泛。随着生产技术的提高, 除银杏叶药品外, 银杏叶茶及饮料、银杏叶食品、银杏叶化妆品等将会逐渐出现在市场上并占据一席之地。笔者对市售某品牌银杏茶进行常规开水冲泡, 并对银杏茶水进行 GA 含量测定, 结果显示银杏茶冲泡过程中, GA 的浸出率为 39 μg·g⁻¹, 远高于国际公认银杏叶提取物中 GA 限度——5 μg·g⁻¹。因此, 准确测定银杏叶及其产品中 GA 含量, 并规定银杏叶产品中 GA 的限量就显得尤为重要。

本研究首次建立了测定银杏叶中 GA 含量的方法, 操作简便、稳定可行, 对银杏叶中化学成分做了更深入的研究, 在质量控制和评价模式中具有良好的应用前景, 也为银杏叶质量控制和标准提高提供了依据。

REFERENCES

- [1] DING Q L, WANG Y Z, GU W H, et al. The study of *Ginkgo biloba* flavontrins and its preparation [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 1998, 15(5): 11-13.
- [2] HANG H B, LIU H C, JIN Z M, et al. Proanthocyanidins from *Ginkgo biloba* L. and their anti-oxidant activities [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(6): 686-690.
- [3] HUANG R M, LIU W R, LIU C H, et al. Determination of total lactones content in *Ginkgo Folium* by QAMS[J]. Pharm Today(今日药学), 2016, 26(4): 231-234.
- [4] YANG L Q, WU X Y, CHEN J. Determination of Ginkgolic acids in *Sarcotesta* of *Ginkgo biloba* by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2002, 30(8): 901-905.
- [5] LEE J S, CHO Y S, PARK E J, et al. Phospholipase C_γ1 inhibitory principles from the *sarcotestas* of *Ginkgo biloba* [J]. J Nat Prod, 1998, 61(7): 867-871.
- [6] BARON-RUPPERT G, LUEPKE N P. Evidence for toxic effects of alkylphenols from *Ginkgo biloba* in the hen's egg test [J]. Phytomedicine, 2001, 8(2): 133-138.
- [7] HECKER H, JOHANNISSON R, KOCH E, et al. *In vitro* evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L [J]. Toxicology, 2002, 177(2/3): 167-177.
- [8] USP 39 [S]. 2015.
- [9] EP 9. 0 [S]. 2011: 1368-1370.
- [10] 中国药典. 一部 [S]. 2015: 416.
- [11] QIN J Z, GUO Y X, XI Z J. Optimization of ultrasound assisted extraction of ginkgolic acids in ginkgo tea by response surface methodology [J]. China Brew(中国酿造), 2011(10): 71-74.
- [12] 仰榴青, 吴向阳, 杨克迪, 等. 银杏酸分析方法研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2003, 24(3): 241-244.
- [13] YANG L Q, WU X Y, CHEN J. HPLC determination of Ginkgolic acids in fruits of *Ginkgo biloba* [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2004, 24(6): 636-639.
- [14] HE X Y, LIU J, LUO C, et al. Network pharmacological research of *Ginkgo Folium* against hypercholesterolemia [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2016, 36(10): 787-791.

收稿日期: 2017-05-19

(本文责编: 李艳芳)