

# 银杏叶中双黄酮成分的提取分离及其 HPLC 法测定

钟郁青\* 徐礼桑

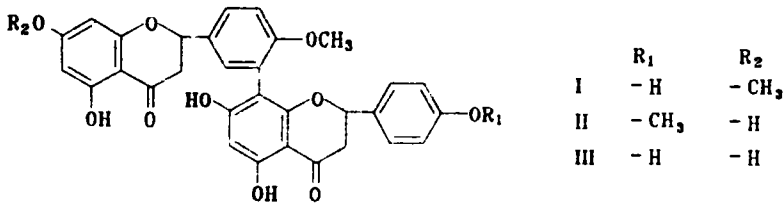
(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 研究了银杏叶中所含 3 种双黄酮成分: 银杏双黄酮、异银杏双黄酮及 7-去甲基银杏双黄酮的提取、分离、纯化及用 HPLC 法测定生药中 3 种成分含量。

**关键词** 双黄酮; 银杏叶; 高效液相色谱法

银杏是银杏科银杏属植物 *Ginkgo biloba* L. 的果实, 其性甘平, 有小毒, 有敛肺平喘、止遗尿、白带的<sup>(1)</sup>作用。近 20 年来, 国内外学者对银杏的化学成分、药理作用等方面作了大量研究工作, 其中银杏叶提取物可扩张冠状血管、增大脑血流量、改善脑营养, 还有明显的抗血小板活化因子及抗菌作用<sup>(2)</sup>。银杏的药用价值很高, 有待进一步开发利用。

银杏叶含有双黄酮类成分: 银杏双黄酮(ginkgetin, I)、异银杏双黄酮(isoginkgetin, II)和 7-去甲基银杏双黄酮(bilobetin, III)。另有苦味质、银杏内酯(ginkgolide A, B, C, M)、白果内酯(bilobalide)以及黄酮类成分等。双黄酮成分的结构如下<sup>(3,4)</sup>:



## 实验部分

### 仪器及药品

高效液相色谱仪, 由 510 型恒流泵(Waters)、紫外检测器 SPD-2A 型(Shimadzu)、7125 型进样阀(Rheodyne)、台式自动平衡记录仪(上海自动化仪表二厂)与数据处理机 C-R6A 型(Shimadzu)等组成。

双黄酮 I, II, III 均由市售银杏叶提取和分离。II 纯化后经 TLC 检查仅显一个斑点, HPLC 显一个峰, 紫外及质谱检测均为纯品。I 和 III 均含少量 II, 因未能进一步纯化, 故含量测定时, I 和 III 的含量均以 II 为对照。内标物为葱(GR, 捷克), 其它溶剂及药品均为 AR 级。

### 双黄酮成分的制备

**提取** 将市售干燥银杏叶细粉 1 kg 置于改良式提取器中(d=15 cm)。用乙醚 3000 ml 于

热水浴中回流提取 18 h, 浓缩提取液, 残渣置布氏漏斗上以石油醚(30~60℃)洗涤至滤液无色, 干燥, 得黄色沉淀物 24 g。

**分离与纯化** 取上述粗品, 加适量乙醚溶解后, 加硅胶(140~160目)搅拌, 挥干后上硅胶柱(5 cm×29 cm), 用乙酸乙酯洗脱至无色, 洗脱液减压浓缩得黄色固体, 于布氏漏斗中用石油醚(30~60℃)洗涤干燥, 得粗品 7 g, 再以吡啶-水(3:2)重结晶两次, 析出黄色颗粒状固体, 用蒸馏水洗涤, 干燥, 得精制品 2 g。

**薄层制备** 在聚酰胺薄板上(含石膏及 1% CMC-Na), 点上上述样品的甲醇液, 挥干后以甲醇-乙酸乙酯-甲酸(3.0:1.8:0.2)展开后, 在紫外灯(254 nm)下划出 3 条暗带。分别收集 3 条暗带的聚酰胺粉于小柱中, 用甲醇洗脱收集甲醇洗脱液浓缩至干, 分别用甲醇重结晶得 I, II, III 三个双黄酮精制品。

### 鉴定

**TLC 检查** 取上述 I, II, III 精品的甲醇液点于聚酰胺薄层上, 分别用以下两种溶剂系统展开: (1) MeOH-EtOAc-HCOOH(3.0:1.8:0.2); (2) CHCl<sub>3</sub>-MeOH-EtOAc(2.0:1.0:0.5)。展开后在紫外灯下观察, II 显一个斑点, I 和 III 均有微量 II。喷 3% AlCl<sub>3</sub> 醇溶液后显黄绿色荧光。

**紫外光谱** 取少量 I, II, III 分别以甲醇溶解后作紫外吸收光谱图, 与文献<sup>[5]</sup>比较, 完全一致。

**质谱** II 精制品作质谱分析, 试验表明, 其分子离子和碎片离子  $m/z$  值与异银杏双黄酮(II)的结果完全相同。

### 双黄酮的 HPLC 测定

**色谱条件** 色谱柱: 不锈钢柱 250 mm×4.6 mm, 固定相为 LiChrosorb RP-18(10 μm)。流动相为 CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O-HCOOH(85:15:0.8), 流速为 1.0 ml·min<sup>-1</sup>, 柱温: 室温, 检测波长 330 nm, 检测器灵敏度 0.02 AUFS。

**流动相系统选择** 比较了不同比例的 MeOH-H<sub>2</sub>O, MeOH-0.5 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, EtOH-0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaAc, MeOH-THF, MeOH-H<sub>2</sub>O-HCOOH 系统等。认为以 MeOH-H<sub>2</sub>O-HCOOH(85:15:0.8)为流动相分离效果最好。图 1 为 3 种双黄酮粗提取物的 HPLC 图。

**内标物选择** 试验了芦丁、小檗碱、泌尿灵、联苯双酯、葱、萘、对羟基苯甲醛等, 结果表明: 芦丁和葱作为内标较合适, 但由于生药样品中在 III 峰前有一杂质峰与芦丁重叠, 故选择葱为内标物, 见图 1。

**检测波长** 银杏双黄酮在 270 nm 和 330 nm 处均有最大吸收, 葱在 330 nm 处亦有较强吸收, 选择 330 nm 为检测波长。

**线性关系** 精密称取 II 纯品 1.111 mg, 用甲醇定容至 2 ml, 分别进样 2, 3, 4, 6, 8, 10 μl,

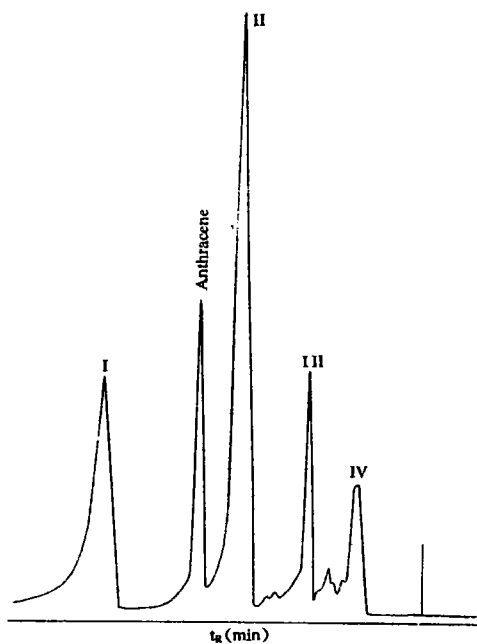


Fig 1 HPLC chromatogram of sample extract and anthracene(internal standard). I. Ginkgetin; II. Isoginkgetin; III. Bilobetin; IV. Unknown.

在上述色谱柱条件下,分别以峰高(H)对微克数(M)线性回归:

$$H = -2244.8877 M + 85961.237, r = 0.9951$$

以峰面积(A)对微克数(M)线性回归:  $A = 0.3488 M + 2.8632, r = 0.9961$

在上述色谱条件下,II的含量在1.1~5.6  $\mu\text{g}$ 范围,其微克数与峰高或峰面积皆成线性关系。为方便起见,可采用测量峰高计算含量。

**校正因子** 精密称取II纯品1.011, 1.589, 2.075  $\mu\text{g}$ ,分别置于1 ml量瓶中,各精确加入内标葱的甲醇溶液0.5 ml(1.0036  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )。超声波振荡溶解,加甲醇至刻度摇匀,在上述色谱条件下,取2  $\mu\text{l}$ 进样,得 $f_b = 4.985$ 。

以下步骤均采用 $f_b$ 计算含量。

### 生药中双黄酮的测定

**提取条件** 研究了提取溶剂,提取时间对实验结果的影响。提取溶剂包括乙醚、乙酸乙酯、95%乙醇和甲醇等,各加热回流2 h,结果表明,四种溶剂对双黄酮的提取率大致相同,但用乙醇或甲醇的提取物中杂质较多,乙醚提取比较完全且杂质含量较少,故确定以乙醚为溶剂。继而比较了提取时间和生药取量,结果表明,0.5 g生药以乙醚提取1 h,即可完全提尽双黄酮成分。

**回收率实验** 称取一定量异银杏双黄酮(II),加入生药样品中,按样品分析方法操作,异银杏双黄酮的回收率为98.76(表1)。

Tab 1 Recovery of isoginkgetin

No	Amount added ( $\mu\text{g}$ )	Amount determined ( $\mu\text{g}$ )	Recovery (%)	Average recovery (%)
1	3.463	3.385	97.17	98.76
2	3.463	3.410	98.47	
3	3.856	3.845	99.71	
4	3.856	3.845	99.71	

**样品分析** 准确称取银杏叶细粉(30目)0.5 g置改良提取器中,加入适量乙醚,在热水浴中回流1 h,浓缩至干,加甲醇超声溶解,并定容为10 ml。取5 ml离心后,取上清液0.5 ml(由于样品中一些杂质在甲醇中溶解度较小,故生药的提取物用甲醇定容后须离心吸取上清液进行测定)。加入内标溶液0.5 ml,混匀后,在上述色谱条件下进样,测得样品及内标峰高,由下式计算含量:

$$\text{含量}\% = \frac{f_b \cdot h_s \cdot M_i}{h_i \cdot M_s} \times 100$$

$f_b$ : 校正因子;  $h_s$ : 样品峰高;  $h_i$ : 内标峰高;  $M_i$ : 样品量( $\mu\text{g}$ );  $M_s$ : 内标物量( $\mu\text{g}$ )。

银杏叶中3种双黄酮的含量见表2。

Tab 2 Results of determination for crude drug ( $n = 3$ )

No.	Amount of sample ( $\mu\text{g}$ )	Peak height(cm)			Internal standard	Content(%)			RSD(%)		
		I	II	III		I	II	III	I	II	III
1	2.0	1.45	5.10	2.15	11.50	0.653	2.25	0.947	0.996	1.76	0.322
2	2.0	1.73	6.10	2.50	13.30	0.660	2.33	0.953			
3	3.0	2.45	8.70	3.60	19.20	0.647	2.30	0.951			
					Average	0.653	2.29	0.950			

I. Ginkgetin; II. Isoginkgetin; III. Bilobetin.

## 参 考 文 献

- 1 中国医学科学院药物研究所等编著. 中药志. 第三册. 北京: 人民卫生出版社, 1984 : 296
- 2 《全国中草药汇编》编写组编. 全国中草药汇编. 上册. 北京: 人民卫生出版社, 1976 : 801
- 3 Farkas L, Gagor M, Kallay F, eds. *Flavonoids and Biflavonoids Current Research Trends*. Amsterdam: Elsevier Scientific, 1977 : 49~66
- 4 Chari VM, Ilyas M, Wagner H *et al.*  $^{13}\text{C}$ NMR spectroscopy of biflavonoids. *Phytochemistry*, 1977, 16 : 1273
- 5 Baker W, Fince ACM, Clis WD *et al.* The structure of the naturally occurring biflavonyls. *J Chem Soc*, 1963 : 1477

## EXTRACTION, ISOLATION AND HPLC DETERMINATION OF BIFLAVONES IN GINKGO BILOBA L

YQ Zhong and LS Xu

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and  
Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

**ABSTRACT** Three kinds of biflavone (ginkgetin, isoginkgetin and bilobetin) were isolated from *Ginkgo biloba* L. and were determined by reversed phase HPLC using anthracene as internal standard. The column employed was a 10  $\mu\text{m}$  LiChrosorb RP-18 (250 mm  $\times$  4 mm), the eluting solvent consisted of methanol — water — formic acid (85 : 15 : 0.8 *v/v*) and the effluent was monitored at 330 nm. The method is simple, rapid and accurate, the relative standard deviations of the three compounds are 0.996%, 1.76% and 0.332%, respectively.

**Key words** Biflavone; *Ginkgo biloba* L.; HPLC