

鄂西南不同核用银杏品种叶中主要黄酮苷元及碳、氮元素含量比较研究

赵广华, 肖强*, 周大寨, 唐巧玉

生物资源保护与利用湖北省重点实验室 湖北民族学院, 恩施 445000

摘要: 为了比较鄂西南不同核用银杏品种叶中主要黄酮苷元含量, 并进一步探讨影响其含量的因素, 采用 RP-HPLC 法对样品中黄酮苷元进行定量分析, 同时采用德国 elementar vario MICRO CUBE 元素分析仪测定样品中碳、氮等元素含量。结果表明: 不同银杏品种叶片中黄酮含量存在差异, 三种主要黄酮苷元组成比例在各品种间差异更加显著, 恩银 15 号及恩银 23 号具有较好苷元比例, 可以作为叶用银杏发展的优先考虑品种。进一步分析表明, 叶片总黄酮含量与叶中氮含量之间显著正相关, 提示合理施氮有助于改善三种苷元的比例关系, 从而使其比例达到最佳。通过比较鄂西南不同银杏品种银杏叶中有效成分的含量, 为提高银杏叶质量, 优化银杏叶资源提供了理论依据。

关键词: 银杏; 黄酮; 槲皮素; 山柰酚; 异鼠李素

中图分类号: Q819

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.04.014

Content Variation of Flavonoid Aglycones, Carbon and Nitrogen in Ginkgo (*Ginkgo biloba*) Leaf from Different Species in the Southwest of Hubei Province

ZHAO Guang-hua, XIAO Qiang*, ZHOU Da-zhai, TANG Qiao-yu

Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization of

Hubei Province / Hubei Institutes for Nationalities, Hubei Enshi 445000, China

Abstract: To compare the contents of flavonoid aglycones in the leaves of *Ginkgo biloba* L. from different species in the southwest of Hubei province and to discuss the influential factors of environment. RP-HPLC was used to determine the flavonoid aglycones. The contents of carbon, hydrogen and nitrogen were measured by elementar vario MICRO CUBE analyzer. The results showed that the contents of flavonoids and flavonoid aglycones varied greatly from different species. Ratio of flavonoid aglycones in the leaves of EnG15 and EnG23 were better than others. Furthermore, the flavonoids content and the corresponding nitrogen content was correlated positively. Appropriate nitrogen may help improve ratio of flavonoids component in the leaves of *G. biloba*. The results of this study may provide a basis for the optimization of the quality and resources of *G. biloba*.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; flavonoids; quercetin; kaempferol; isorhamnetin

目前, 世界上许多厂家正在用银杏叶提取物 (GBE) 制造各种药物。一般认为, GBE 主要有效成分为黄酮类和银杏萜内酯类化合物; 银杏叶中黄酮类化合物普遍以黄酮醇苷类化合物存在, 按苷元的不同主要可分为 3 类: (1) 槲皮素 (quercetin) 衍生

物; (2) 山柰酚 (kaempferol) 衍生物; (3) 异鼠李素 (isorhamnetin) 衍生物。通过测定银杏总黄酮的含量及各主要苷元的比例可以直接反应产品的质量。90 年代以来, 我国银杏栽培面积大幅度增加。鄂西南拥有丰富银杏资源, 在上世纪 90 年代大力推广银杏栽培过程中, 各县市陆续筛选了一些本地优良银杏品种, 但这些品种的审定主要是根据单株银杏果实产量来确定, 随着银杏叶用价值的开发, 如何选择适合本地气候及自然环境的叶用品种, 增强叶用银杏开发的理论指导, 从而带动当地叶用银杏产业发

收稿日期: 2014-02-18 接受日期: 2014-07-03

基金项目: 国家自然科学基金 (31260057, 31360498); 湖北民族学院大学生创新创业训练计划 (201310517029); 生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金 (PKLHB1310)

* 通讯作者 Tel: 86-015971698508; E-mail: 275975926@qq.com

展,具有十分重要的意义。目前研究表明,不同产地、不同采收期的银杏叶,其有效成分含量相差甚远^[1,2]。因此,有必要对不同产地银杏叶黄酮含量变化进行系统研究。本文测定比较了我国鄂西南不同核用银杏品种叶中主要黄酮苷元含量及其比例关系,分析了影响黄酮含量可能因素,通过对原有核用银杏品种的重新筛选为当地银杏资源转向叶用发展提供直接指导,为优化银杏叶资源提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

2012年6月对鄂西南各县市银杏品种母树采集银杏叶(表1),银杏叶置烘箱及时烘干粉碎,过40目筛备用。

表1 各银杏品种基本情况

Table 1 Basic factor in different species

| 地点 Location | 品种 Species | 树龄 Age(a) | 胸径 DBH(cm) |
|----------------|---------------|--------------|---------------|
| 宣恩沙道沟 | 恩银1号 | 320 | 156 |
| 咸丰中心场 | 恩银2号 | 90 | 66 |
| 咸丰梅子坪 | 恩银5号 | 100 | 68 |
| 咸丰白果坝 | 恩银15号 | 400 | 170 |
| 宣恩天狮湾 | 恩银23号 | 230 | 124 |

1.2 仪器、药品与试剂

测定黄酮含量的HPLC仪为美国戴安公司:P680二元泵;Rheodyne 8125手动进样器,PDA100紫外检测器;色谱柱为迪马公司Diamonsil C₁₈(2)(250×4.6 mm, 3 μm);对照品:槲皮素(querctetin, Q)、山柰酚(kaempferol, K)、异鼠李素(Isorhamnetin, I)购自中国药品生物制品检定所,批号分别为100081-200907、MUST-11041101、110860-201109。提取溶剂均为分析纯,色谱用甲醇为迪马色谱纯,水为超纯水。

2 实验方法

2.1 黄酮标准品溶液的制备

分别准确称取11.0 mg槲皮素,7.0 mg山柰酚,2.1 mg异鼠李素,加甲醇溶解,完全转移并定容至100 mL容量瓶中备用。用时分别精密吸取一定量的上述储备液加甲醇稀释至一定刻度,摇匀即可。

2.2 黄酮样品溶液的制备

样品处理参照苑可武等^[3]方法:取烘干粉碎过

40目筛的银杏叶粉末1 g置索氏提取器中以甲醇提取完全,提取液减压浓缩至干,以30 mL甲醇溶解残渣,加5 mL 25%盐酸,80℃水浴回流1 h,水解液以甲醇定容至50 mL,供HPLC分析用。

2.3 黄酮含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱 Diamonsil C₁₈(2)(250×4.6 mm, 3 μm);流动相:甲醇(A)~0.4%磷酸-水(v/v)(B);梯度洗脱程序:0~15 min, 38%~80% A;15~17 min, 80%~30% A;流速:0.8 mL/min;检测波长368 nm;柱温30℃;进样量10 μL。

2.3.2 线性关系

分别吸取上述Q、K、I标准储备液,加甲醇稀释到不同浓度,按上述色谱条件进样10 μL,色谱图见图1;测定峰面积,以峰面积对进样量(μg)进行回归分析,得到3条直线,其回归方程和相关系数为Q: $Y = 1.799X + 0.283, R^2 = 0.9991$; K: $Y = 1.898X + 1.125, R^2 = 0.9993$; I: $Y = 1.857X + 0.294, R^2 = 0.9999$ 。采用外标法,计算样品水解后各苷元含量,根据黄酮苷元与黄酮苷平均分子量之比,得换算系数,换算成总黄酮含量 = $2.39 \times Q + 2.64 \times K + 2.51 \times I$ ^[4]。

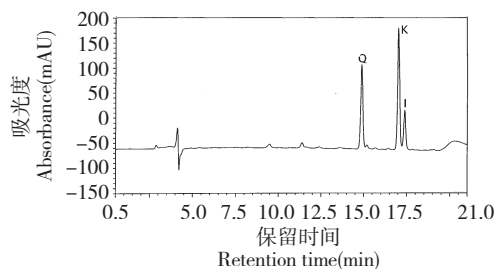


图1 银杏叶片黄酮苷元 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of flavonoid aglycones in the leaves of *G. biloba*

2.3.3 精密度

取银杏叶样品,按照2.2项下方法制备供试样品溶液,连续进样5次,记录色谱图。结果表明三种主要苷元色谱峰的相对保留时间RSD值均小于0.08%,相对峰面积的RSD值均小于3.2%,符合定量分析要求,表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性

取银杏叶样品5份,按照2.2项下方法制备供试样品溶液,分别进行检测,记录色谱图。色谱图中三种主要苷元色谱峰的相对保留时间RSD值均小

于 0.06%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 3.4%, 符合定量分析要求, 表明方法的重复性良好。

2.4 C、H、N 元素含量测定

采用德国 elementar vario MICRO CUBE 元素分析仪按下列步骤进行测定: 1) 开启 PC 和打印机; 2) 拔掉主机尾气的堵头; 3) 开启 vario MICRO 主机电源, 等待仪器球阀和进样盘初始化结束; 4) 打开氦气和氧气, 将气体减压阀的出口压力调至: He: 0.12 MPa; O₂: 0.20 Mpa; 5) 启动 vario MICRO cube 操作软件, 设定进样盘到初始位置(0); 6) 检查气体压力和流速: Press: 1200 ~ 1250 mbar, MFC TCD: 200 mL/min, MFC O₂: 0 mL/min, Flow He: 200 mL/min; 7) 检查加热温度: 燃烧管温度 1150 °C, 还原管温度 850 °C; 8) 设定样品测定序列, 选用“2 mg plant 80 s”方法进行样品测定。

3 结果与分析

3.1 不同品种银杏叶总黄酮含量及组成变化

图 2 为鄂西南 5 个银杏品种叶片总黄酮含量。由图可见, 除了恩银 2 号总黄酮含量显著高于恩银 5 号, 其余各品种间在总黄酮含量上差异不显著; 但从表 2 来看, 虽然各银杏品种总黄酮含量之间差异不显著, 但各品种间在主要苷元构成上却出现了较大区别: 恩银 1 号山奈酚含量显著高于其他 4 个品种, 恩银 23 号则显著低于其他 4 个品种; 异鼠李素含量则出现了另外的规律, 恩银 1 号异鼠李素含量显著低于其他 4 个品种, 而在异鼠李素含量方面, 恩银 2 号则显著高于其余 4 个品种(表 2)。从表 3 来看, 5 个品种间 Q/I 及 K/I 值相互间均存在显著差异; 其中, 恩银 1 号 Q/I 及 K/I 值显著高于其他品

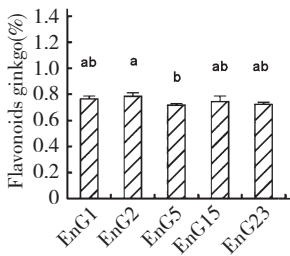


图 2 不同银杏品种叶片总黄酮含量 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Contents of flavonoids in the leaves of *G. biloba* from different species ($n=3, \bar{x} \pm s$)

注: 图中不同字母表示在 0.05 水平差异具有显著性。

Note: Bars with different letters means significantly different at $P < 0.05$ level.

表 2 不同银杏品种叶片总黄酮含量 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Contents of flavonoids in the leaves of *G. biloba* from different species ($n=3, \bar{x} \pm s$)

| 品种 Species | 槲皮素含量 Quercetin (%) | 山奈酚含量 Kaempferol (%) | 异鼠李素含量 Isorhamnetin (%) |
|---------------|------------------------|-------------------------|----------------------------|
| EnG1 | 0.237 ± 0.008ab | 0.456 ± 0.011a | 0.072 ± 0.002c |
| EnG2 | 0.243 ± 0.015ab | 0.364 ± 0.010b | 0.179 ± 0.002a |
| EnG5 | 0.219 ± 0.006b | 0.378 ± 0.002b | 0.120 ± 0.005b |
| EnG15 | 0.256 ± 0.013a | 0.380 ± 0.020b | 0.107 ± 0.011b |
| EnG23 | 0.262 ± 0.004a | 0.339 ± 0.017c | 0.121 ± 0.006b |

注: 同一栏内数据后不同字母者在 0.05 水平上差异显著。

Note: Values followed by a different letter means significantly different at $P < 0.05$ level.

表 3 不同银杏品种叶片主要黄酮种类构成比例 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Ratio of flavonoids component in the leaves of *G. biloba* from different species ($n=3, \bar{x} \pm s$)

| 品种 Species | 槲皮素含量/ 异鼠李素含量 Quercetin/Isorhamnetin | 山奈酚含量/ 异鼠李素含量 Kaempferol/Isorhamnetin |
|---------------|--|---|
| EnG1 | 3.11 ± 0.01a | 5.58 ± 0.21a |
| EnG2 | 1.29 ± 0.07d | 1.84 ± 0.04d |
| EnG5 | 1.74 ± 0.03c | 2.85 ± 0.14c |
| EnG15 | 2.28 ± 0.14b | 3.22 ± 0.18b |
| EnG23 | 2.07 ± 0.15b | 2.54 ± 0.11c |

注: 同一栏内数据后不同字母者在 0.05 水平上差异显著。

Note: Values followed by a different letter means significantly different at $P < 0.05$ level.

种, 恩银 2 号 Q/I 及 K/I 之比显著低于其他品种。

3.2 不同银杏品种叶片中 C、N 元素含量

通过元素分析仪对 5 个品种银杏叶片 C、N 元素含量进行进一步分析, 5 个品种在 N 元素含量上相互间存在显著差异, 其中以恩银 1 号 N 含量最高, 恩银 15 号则最低(表 4), 前者高于后者 25.5%; 在 C 含量上, 则是恩银 1 号含量最低, 而恩银 2 号最高; 对 C/N 值的分析表明, 5 个品种间存在显著差异, 其中以恩银 1 号为最低, 而恩银 15 号最高, 较前者高 27.8%。进一步分析总黄酮与 N 含量之间关系, 二者呈显著正相关, 与 C 含量则呈显著负相关, 与 C/N 值则呈显著负相关, Q 苷元含量与 N 及 C 含量之间相关不显著, K 与 N 含量之间显著正相关, 与 C/N 值则呈显著负相关; I 含量与 C 含量则是显著正相关, Q/I 值与 N 含量之间显著正相关, 与 C 含量之间则是显著负相关, 与 C/N 值则呈显著负相关, 而 K/I 值也呈现出与 Q/I 值相同的规律。

表4 不同品种叶片 C、N 元素含量 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)Table 4 Contents of elements in the leaves of *G. biloba* from different species ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

| 品种 Species | N 含量 Nitrogen (%) | C 含量 Carbon (%) | C/N Carbon/Nitrogen |
|---------------|----------------------|--------------------|------------------------|
| EnG1 | 2.90 ± 0.047a | 45.56 ± 0.378d | 15.71 ± 0.118d |
| EnG2 | 2.57 ± 0.021b | 47.30 ± 0.100a | 18.30 ± 0.117c |
| EnG5 | 2.48 ± 0.015c | 46.92 ± 0.051ab | 18.87 ± 0.118b |
| EnG15 | 2.31 ± 0.01d | 46.41 ± 0.085bc | 20.08 ± 0.051a |
| EnG23 | 2.41 ± 0.025d | 45.99 ± 0.143cd | 19.05 ± 0.122b |

注:同一栏内数据后不同字母者在 0.05 水平上差异显著。

Note: Values followed by a different letter means significantly different at $P < 0.05$ level.

4 讨论

目前国际上一般公认的银杏叶制品质量指标为 1991 年德国 Schwabe 制药厂生产的产品 EGb761 标准,即黄酮苷 24% 以上,内酯 6% 以上,银杏酸 10 mg/kg 以下。其中,3 种苷元的大体比例是 3:2.6:1。内酯中白果内酯与萜内酯的含量大致相等,而萜内酯 A、B、C 的比例约为 2:2:1^[5]。银杏叶提取物的功效质量与其中所含的槲皮素、山柰酚、异鼠李素 3 种苷元的比例有很大关系,质量好的其三者的比例应为 (0.30 ~ 0.40):(0.30 ~ 0.40):(0.10 ~ 0.20)^[6]。既往对银杏叶用品种的筛选主要基于总黄酮苷元含量,而很少考察不同苷元比例关系^[2];本研究首次分析了不同苷元比例在品种选育中的重要性,结果表明:鄂西南不同品种银杏叶虽然在总黄酮含量上差异不大,但在三种主要苷元构成上差异却极显著,恩银 15 号及恩银 23 号中三种苷元比例比较符合上述比例要求,可以作为叶用银杏发展的优先考虑品种。

通常认为,GBE 的有效成分主要是黄酮类化合物和萜类内酯,而它们在叶中的含量变化可能是多种因子相互作用的结果。钱大玮等对郑州银杏叶黄酮类成分含量测定表明,在三种黄酮苷元中,槲皮素、山柰酚所占比例较大,异鼠李素含量相对较少^[7];本研究中鄂西南几个品种银杏叶黄酮苷元的比例也接近这一规律。树龄是影响总黄酮含量的另一个因子,本研究中,各品种银杏叶总黄酮含量在 8 mg/g 以上,远高于贵州等地的同龄大树^[8]。施肥是影响银杏黄酮含量的重要因素,既往有关施氮对银杏叶片黄酮含量和黄酮总量的相关研究表明,1.5 g/株施氮量的叶片黄酮含量和黄酮总量最大;其原

因在于,植株正常生长发育需要保持相对恒定的氮磷钾比例。缺乏氮素,氮磷和氮钾比值低,蛋白质的合成受到抑制;施氮量过高时,氮磷和氮钾比值过大,则氮多磷钾相对少,过多的氮同化过程要消耗大量的糖分,影响碳水化合物积累。因此,保持适当的氮磷钾比例。就是保持苗木碳水化合物、蛋白质和核酸等物质含量之间的动态平衡,有助于苗木的正常生长^[9]。本研究表明,叶片总黄酮含量与 N 含量之间显著正相关,但与 C 含量则呈显著负相关,进一步分析,Q 含量与 N 及 C 含量之间相关不显著,K 与 N 含量之间显著正相关,I 含量与 C 含量则是显著正相关。表明银杏固定的 C 在不同种类黄酮苷元之间可能存在一定分配关系,而具有不同的规律;施用 N 对不同苷元的积累影响来看,N 可以促进 K 积累,并促进 K/I 及 Q/I 值提高。本研究首次分析了银杏叶主要黄酮苷元含量与叶片碳、氮等元素之间关系,这对于通过营养手段调控主要黄酮苷元含量,改善三种苷元的比例关系提供了依据,对指导银杏叶生产具有重要价值。

通过上述研究,初步确定了鄂西南地区叶用银杏品种,进一步研究这些品种萜类内酯含量及组成规律可以为我们选择最佳叶用银杏品种提供更多依据。

参考文献

- 1 Liu SQ(刘叔倩),Zheng JH(郑俊华),Wang H(王弘),et al. Variation of flavonoids and terpenolactones in *Ginkgo biloba* leaf conditions from regions with different climatic conditions. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2000, 31:424-426.
- 2 Li YJ(李艳杰). Biological properties and medicinal components in leaves of ginkgoes grown in Nanjing and Changchun. Changchun:Northeast Normal University(东北师范大学),MSc. 2008.
- 3 Du AQ(杜安全),Wang XR(王先荣),Zhou ZH(周正华),et al. Concentration of *Ginkgo* flavonoids glycosides in *Ginkgo Biloba* leaves in relation to the various season and tree's age. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2000 (12):49-51.
- 4 Yuan KW(苑可武),Meng XH(孟宪惠),Xu WH(徐文豪). Seasonal changes in the flavonoid content of *Ginkgo biloba*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),1997,4:211-212.
- 5 Sticher O. Quality of ginkgo preparations. *Planta Med*,1993, 59:2-11.