

基于高分辨质谱和代谢组学技术对不同银杏叶制剂 差异成分的快速分析

曹国秀, 陆文捷, 叶 慧, 田 扬, 郝海平*

(中国药科大学药物代谢动力学重点实验室, 南京 210009)

摘 要 采用高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(HPLC-Q/TOF-MS), 利用代谢组学技术, 比较银杏叶制剂组成成分的差异, 包括银杏叶滴丸、银杏酮酯滴丸、银杏叶提取物片。采用 XSELECT HSS T3 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm), 以 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相, 柱温为 40 °C 进行色谱分离, 采用 ESI-Q/TOF 检测, 负离子模式扫描。采用偏最小二乘判别分析方法(PLS-DA)进行数据统计, 比较不同银杏叶制剂中的差异成分。结果表明, 采用高分辨质谱鉴定了 21 种银杏叶提取物片与银杏叶滴丸的差异成分, 其中滴丸中含量大于银杏叶提取物片的有 7 种, 主要是黄烷醇类化合物, 银杏叶提取物片中含量大于滴丸的有 14 种, 多数是有机酸类化合物。鉴定了银杏叶滴丸与银杏酮酯滴丸的 12 种差异成分, 其中银杏叶滴丸中含量大于酮酯滴丸的有 7 种, 主要是黄烷醇类化合物, 酮酯滴丸中含量大于银杏叶滴丸的有 5 种, 主要是金松双黄酮和有机酸。结果阐明了不同厂家的银杏叶制剂之间的差异物质, 为建立更完善的银杏制剂质控标准提供了科学指导。

关键词 银杏; 不同制剂; 高分辨质谱; 偏最小二乘判别分析; 代谢组学; 有机酸类

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)04-0441-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180409

引用本文 曹国秀, 陆文捷, 叶慧, 等. 基于高分辨质谱和代谢组学技术对不同银杏叶制剂差异成分的快速分析[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(4): 441–448.

Cite this article as: CAO Guoxiu, LU Wenjie, YE Hui, et al. Rapid identification of constituents from different *Ginkgo biloba* preparations by high resolution mass spectrometry and metabolomics technology[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(4): 441–448.

Rapid identification of constituents from different *Ginkgo biloba* preparations by high resolution mass spectrometry and metabolomics technology

CAO Guoxiu, LU Wenjie, YE Hui, TIAN Yang, HAO Haiping*

Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract A qualitative analysis was developed to identify different ingredients from three *Ginkgo biloba* preparations (including *Yinxingye Diwan*, extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets and *Yinxingtongzhi Diwan*) based on high resolution mass spectrometry and metabolomics technology. An XSELECT HSS T3 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) column was used for separation, with the mobile phases consisting of acetonitrile and water containing 0.1% formic acid. The column temperature was set at 40 °C. Negative ion mode was used for mass spectrometric data acquisition. Through partial least squares projection to latent structure-discriminant analysis (PLS-DA), we firstly found the different compounds among different *Ginkgo biloba* preparations. Subsequently, the compounds displaying different abundance levels via database searching and literature matching were identified. Finally, we identified 21 different compounds between the extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets and *Yinxingye Diwan*, which mostly belong to the organic acids and flavonols families. Quantitative analysis showed that the ingredients which had higher abundance in extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets were mainly organic acids, whereas those exhibiting

收稿日期 2018-04-05 *通信作者 Tel: 025-83271179 E-mail: hhp_770505@hotmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81430091, No. 81325025); 中央高校基本科研业务费资助项目(No. 2632018ZD07); 中国药科大学药学院基地科研训练及科研能力提高项目资助(No. J1310032); 国家基础科学人才培养基金资助项目(NFFTBS)

higher levels in *Yinxingye Diwan* are flavonols. We also identified 12 different ingredients between the *Yinxingye Diwan* and *Yinxingtongzhi Diwan*, which were flavonols, sciadopitysin and organic acids. The results of this study are useful for studying different chemical constituents from distinct *Ginkgo biloba* preparations.

Key words *Ginkgo biloba*; different preparations; high resolution mass spectrometry; PLS-DA; metabolomics; organic acid

The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81430091, No. 81325025); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2632018ZD07); the College Students Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. J1310032); the National Found for Fostering Talents of Basic Science (NFFTBS)

银杏叶 (*Ginkgo Biloba* Linn.) 提取物成分复杂, 目前已发现的有 160 多种, 研究证实其有效成分主要为银杏黄酮类和银杏萜内酯类化合物^[1-2]。银杏黄酮类化合物主要是由槲皮素、山柰酚和异鼠李素等黄酮苷元及其与葡萄糖或鼠李糖等单糖连接的糖苷组成, 主要表现为清除自由基、抗脂质过氧化等作用^[3-5]。银杏萜内酯化合物主要包括二萜类和倍半萜类, 其中, 二萜类主要包括银杏内酯 A、B、C 等, 倍半萜主要为白果内酯。银杏内酯是选择性的血小板活化因子拮抗剂, 具有治疗阿尔兹海默病的辅助作用, 表现出一定的脑保护作用, 而白果内酯可以抑制 GABA 受体^[6-8]。

目前关于银杏叶提取物的提取方法根据提取溶剂的不同主要有 3 种: (1) 国际上标准的银杏提取物系按 Schwabe 专利工艺生产的银杏叶提取物, 银杏叶以丙酮/水提取制成提取物, 主要制剂是德国生产的银杏叶提取物片。(2) 《中华人民共和国药典》(2015 年版) 上的银杏叶提取物 (全提取物) 是以乙醇/水加热回流提取, 银杏叶滴丸制剂则是根据我国药典的提取方法生产制备的。(3) 银杏酮酯是我国自主研发的一种新的银杏叶标准提取物, 是将银杏叶中的主要组成成分 (银杏内酯和银杏黄酮) 高度富集的提取物, 银杏酮酯滴丸则是该标准提取物的代表制剂^[9-10]。银杏叶制剂的质量控制指标为银杏黄酮高于 24%, 银杏内酯高于 6%, 对其他可能的有效成分未进行含量规定, 上述主要的 3 种制剂尽管都满足质控标准, 但其他成分的相对含量则有较大的差别, 因此对其差异成分的研究则尤为重要^[11-13]。

代谢组学技术对于大量样品组间差异的研究具有极大优势, 能够将原始的反映样品信息的复杂数据 (比如 HPLC/MS 数据, GC/MS 数据和 NMR 数据等) 经过一系列的降维处理, 筛选出能够反映

复杂数据主要信息的简单维度的成分^[14]。常用的代谢组学数据分析技术有主成分分析 (PCA), 偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 和聚类分析等。PLS-DA 利用降维的思想, 把多指标的数据转化为少数几个综合指标 (即主成分) 可以表征的数据。因此, 在大量原始数据产生的复杂模型中无法直观发现样品组间差异时, 则可以利用 PLS-DA 分析, 通过一系列的降维分析, 利用最小二乘法原理找到样品间的最大差异。

因此, 本研究建立了适用于银杏叶制剂复杂成分分析和鉴定的色谱质谱条件, 通过高分辨质谱进行中药成分的全扫描分析, 结合偏最小二乘判别分析策略进行差异化合物的筛选, 并且将精确的质荷比及二级质谱信息与数据库或参考文献进行匹配, 完成化合物的鉴定。本研究中一共鉴定了 21 种银杏叶提取物片与银杏叶滴丸的差异成分, 其中银杏叶滴丸中含量大于银杏叶提取物片的有 7 种, 主要是黄烷醇类化合物, 银杏叶提取物片中含量大于银杏叶滴丸的有 14 种, 多数是有机酸类化合物。进一步鉴定了银杏叶滴丸与酮酯滴丸的 12 种差异成分, 其中银杏叶滴丸中含量大于酮酯滴丸的有 7 种, 主要是黄烷醇类化合物, 酮酯滴丸中含量大于银杏叶滴丸的有 5 种, 主要是金松双黄酮和有机酸类。该研究为阐明银杏叶制剂的差异物质组研究提供依据, 为建立更合理的质量控制标准及进一步阐明各银杏叶制剂之间的药效差异提供借鉴。

1 材 料

1.1 仪 器

Triple TOF 5600 (美国 AB SCIEX 公司) 配有岛津高效液相仪 (日本 Shimadzu 公司), Analyst 1.6.1 工作站, CBM-20A 系统控制器, SIL-20AC 自动进样器, LC-20AB 二元泵, CTO-20AC 柱温箱,

DGU-20A5 型在线脱气机。Milli-Q Gradient A10 超纯水器(美国 Millipore 公司);IEC 低温高速离心机(美国 Thermo 公司);Savant SPD 2010 离心浓缩装置(美国 Thermo 公司)。

1.2 药品与试剂

银杏叶滴丸(浙江万邦德制药有限公司);银杏酮酯滴丸(浙江九旭药业有限公司);银杏叶提取物片(德国威玛舒培博士药厂)。东莨菪内酯(纯度 >98%,成都普菲德生物科技有限公司)。实验室用水均由 Milli-Q Gradient A10 超纯水器制备;甲醇、乙腈为色谱纯试剂(德国默克集团)。

2 方法

2.1 样品前处理方法

储备液的制备:银杏叶滴丸(每丸相当于银杏叶提取物 16 mg),取 10 丸,称重后研磨,计算滴丸重量的平均值,称量相当于 0.625 丸的重量(相当于银杏提取物 10 mg),用含 10 $\mu\text{g/mL}$ 内标(东莨菪内酯)的甲醇稀释成 1 mg/mL 的溶液($n=5$);银杏酮酯滴丸(每丸相当于银杏提取物 10 mg),取 10 丸,称重后研磨,计算平均值,称量相当于一丸的重量(相当于银杏提取物 10 mg),用含 10 $\mu\text{g/mL}$ 内标(东莨菪内酯)的甲醇稀释成 1 mg/mL 的溶液($n=5$);银杏叶提取物片剂(每片含有银杏提取物 40 mg),取 5 片,称重后研磨,称量相当于 0.25 片的重量(相当于银杏提取物 10 mg),用含 10 $\mu\text{g/mL}$ 内标(东莨菪内酯)的甲醇稀释成 1 mg/mL 的溶液($n=5$)。以上溶液超声 1 h,静置 10 min,18 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液于 EP 管中作为储备液备用。进样时,取储备液 50 μL ,加入甲醇 450 μL ,18 000 r/min 离心 10 min,离心 2 次后,取上清液准备进样。

2.2 色谱与质谱条件

色谱柱为 XSELECT HSS T3 柱(4.6 mm \times 150 mm,3.5 μm),流动相:水相为含有 0.1% 甲酸的水溶液,有机相为乙腈,流速为 0.7 mL/min,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。采用梯度洗脱方式进行色谱分离,梯度洗脱的条件:0~3 min,5% B;3~4 min,5%~30% B;4~12 min,30%~60% B;12~13 min,60%~95% B;13~15 min,95% B;15~16 min,95%~5% B;16~20 min,5% B。

质谱检测方法:ESI 离子源,负离子模式检测,

质谱扫描范围: m/z 100~1 000,离子喷雾电压设定为 -4.5 kV,喷雾温度设定为 550 $^{\circ}\text{C}$,雾化气、辅助气和气帘气均为氮气,分别设定为 50,50,30 psi (1 psi = 6.895 Pa)。TOF-MS 扫描时去簇电压(DP)和碰撞能量(CE)分别设为 -100 和 -10 V。进行 MS/MS 碎裂时,去簇电压和碰撞能量分别设为 -100 和 -30 V。进样过程中精确相对分子量的校准采用 EasyMass Accuracy 装置。

2.3 统计学分析

将质谱分析所得的 Wiff 格式的原始数据导入配套的 MarkerView(美国 AB SCIEX 公司)工作站中,对色谱峰进行对齐,将各批次所得数据用内标进行校正,软件将自动运行并产生一个包含前体离子(m/z),保留时间和峰面积的矩阵。将产生的多元数据矩阵导入 SIMCA-P(瑞典 Umetrics 公司)中进行偏最小二乘判别分析(PLS-DA),选出变量重要性因子(VIP) >1 的候选化合物,这些候选化合物都通过提取其离子色谱峰并手动检查后,剔除掉可能的加合峰、二聚体、同位素峰等假阳性结果。随后对其进行 t 检验分析,挑选出 $P < 0.05$ 的有显著性差异的化合物。将化合物的精确质荷比导入 PeakView(美国 AB SCIEX 公司)软件中计算出可能的化学分子式,并且根据二级碎片信息与 ChemSpider 数据库(<http://www.chemspider.com/>)以及相关文献进行对比,对筛选出的差异化合物进行鉴定。根据差异化合物的精确质荷比以及保留时间信息,应用 MultiQuant(美国 AB SCIEX 公司)软件,对这些化合物在不同制剂中的含量进行相对定量。

3 结果

3.1 银杏叶制剂色谱质谱分析

将 3 种银杏产品按照上述样品处理方法进行前处理后,通过 HPLC-Q/TOF-MS 分析,所获取的负离子模式下总离子流图见图 1-A,其总离子流图表明 3 种银杏叶制剂中多数成分是相同的,但是有少数成分的含量存在显著差异。将所得的质谱原始数据进行色谱峰对齐,峰面积数据用内标归一化后,产生一个包含前体离子(m/z),保留时间和峰面积的矩阵。剔除该矩阵中可能的加合峰、二聚体、同位素峰等假阳性结果。根据矩阵中的质荷比以及保留时间对这些化合物在不同制剂中的含量进行相对定量,根据定量结果,分析不同制剂组成

成分的相对含量,如图 1-B,同一制剂的组内分析结果表明样品的重复性较好,不同制剂间的热图分析进一步表明 3 种制剂的组成成分具有显著差异,

对这些差异成分进行鉴定则对药效物质基础的研究具有重要意义。

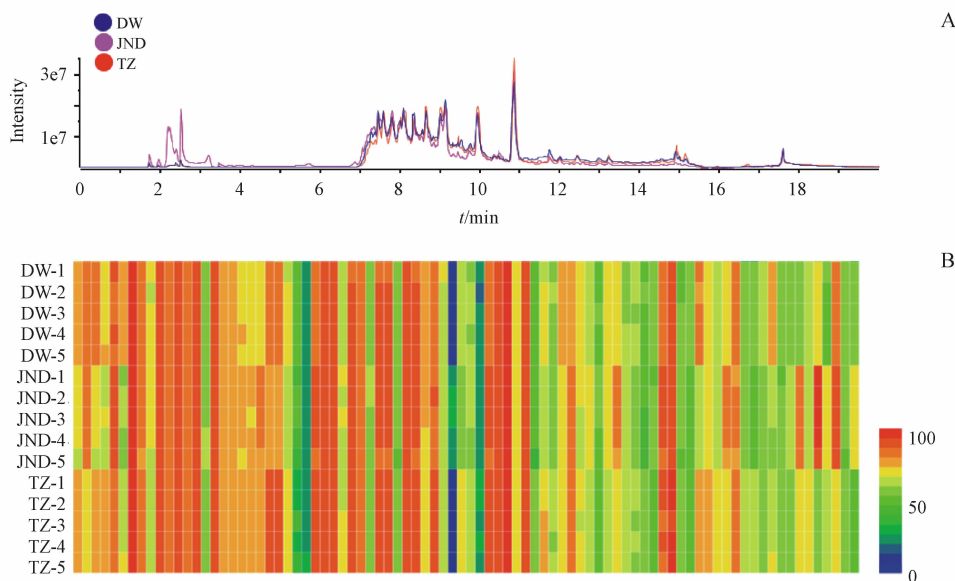


Figure 1 Qualitative and quantitative analysis of three *Ginkgo biloba* preparations based on HPLC-Q/TOF-MS

A: Total ion chromatograms of three *Ginkgo biloba* preparations; B: Heatmap illustrates distinct compositions of herbal compounds in three *Ginkgo biloba* preparations ($n = 5$)

DW: Yinxingye Diwan; JND: Extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets; TZ: Yinxingtongzhi Diwan

3.2 基于代谢组学技术的银杏叶制剂差异成分的筛选及鉴定

银杏叶滴丸是按照《中华人民共和国药典》(2015 年版)规定的提取溶剂(醇/水体系)进行提取的,但目前没有文献报道过国内标准提取物和按照德国专利生产制备的银杏叶提取物片剂的成分差异,因此研究首先考察了银杏叶滴丸和银杏叶提取物片剂这两种制剂的差异成分。银杏酮酯滴丸是在醇/水体系提取的基础上进一步纯化银杏黄酮和银杏内酯的产品,因此比较银杏酮酯滴丸和银杏叶滴丸制剂的差异成分,考察同一提取体系,方法改变后对组成成分含量的影响。

差异成分筛选时采用了 PLS-DA 分析策略,利用专门的软件将多维的复杂数据降维成由几个简单维度组成的数据模型,从而快速筛选复杂样品组间的最大差异,减少了多指标选择的工作量。组间差异的筛选是根据少数几个主成分来判定的,但是这几个简单的指标可以保留绝大部分原始数据的信息,在保持信息准确性的基础上减少计算工作量。因此,研究中采用了 PLS-DA 分析方法,评价银杏叶滴丸和银杏叶提取物片剂、银杏叶滴丸和银

杏酮酯滴丸制剂的组间差异成分,客观而合理地筛选出反映两种制剂间差异的主成分。

3.2.1 银杏叶滴丸与银杏叶提取物片剂制剂的比较

考察银杏叶滴丸与银杏叶提取物片两种制剂的成分差异,将包含前体离子(m/z)和峰面积的矩阵导入 SIMCA-P 中进行 PLS-DA 分析($R^2X:0.974$, $R^2Y:0.990$, $Q^2:0.986$, R^2Y 接近于 1,表明模型拟合可靠)。如图 2-A 所示,银杏叶滴丸与银杏叶提取物片两种制剂成分分析的得分图,从得分图可以观察样品的聚集以及离散程度,即样品分布点越聚集则说明这些样品中所含有的成分组成及含量越接近,反之样品点较为离散时则说明组成成分及含量在制剂之间差异较大。该得分图表明银杏叶滴丸以及银杏叶提取物片样品在第一主成分得分上有明显差异,在第二主成分上也具有一定的差异(横坐标、纵坐标分别表示第一、第二主成分得分),进一步分析发现这两组样品分布在不同的区域,说明样品间具有明显的组间差异,即这两种制剂的组成成分以及成分含量具有明显差异。对同一组的样品点分析可以发现银杏叶提取物片组内的差异大于银杏叶滴丸的组内差异,提示进样的重复性良好。

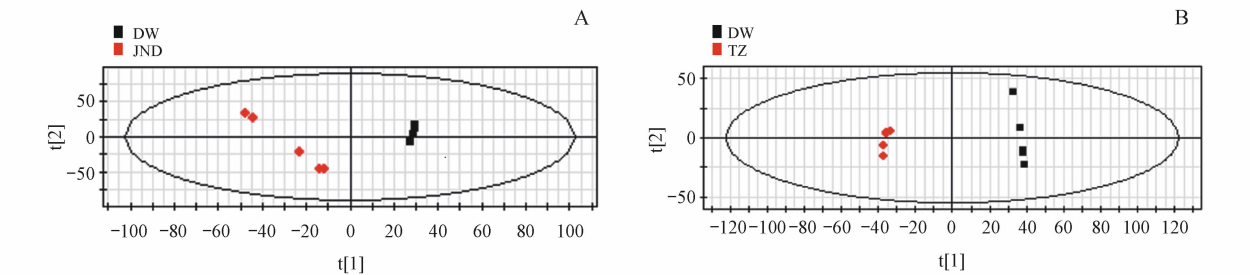


Figure 2 PLS-DA analysis of three *Ginkgo biloba* preparations. (A) The score plot of two *Ginkgo biloba* preparations (Yinxingye Diwan and extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets); (B) The score plot of two *Ginkgo biloba* preparations (Yinxingye Diwan and Yinxingtongzhi Diwan)

按照“2.3”项下的统计方法进行数据分析后,对筛选出的差异化合物进行鉴定。对筛选出的化合物的鉴定结果,精确质荷比及保留时间等信息见表 1。

Table 1 Information of compounds that exhibit different abundance levels in Yinxingye Diwan and extract of <i>Ginkgo biloba</i> leaves tablets						
No.	t_R /min	m/z	Fragment ion	Formula	Identification	Area ratio (JND/DW)
1	7.94	137.024	93.035	$C_7H_6O_3$	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	74.15
2	2.41	173.046	137.025	$C_7H_{10}O_5$	Shikimic acid	71.75
3	8.05	167.035	153.026	$C_8H_8O_4$	Vanillic acid	28.87
4	7.40	153.021	108.021	$C_7H_6O_4$	Protocatechuic acid	28.39
5	7.94	179.036	135.045	$C_9H_8O_4$	Caffeic acid	11.55
6	7.18	204.031	160.040	$C_{10}H_7NO_4$	6-Hydroxykynurenic acid	7.33
7	8.70	163.041	119.050	$C_9H_8O_3$	<i>p</i> -Coumaric acid	4.73
8	10.27	285.041	243.030	$C_{15}H_{10}O_6$	Luteolin	3.80
9	2.41	191.057	93.033	$C_7H_{12}O_6$	Quinic acid	3.35
10	8.34	353.085	191.057	$C_{16}H_{18}O_9$	Chlorogenic acid	2.92
11	7.85	193.050	178.026	$C_{10}H_{10}O_4$	Ferulic acid	2.78
12	9.29	301.036	151.004	$C_{15}H_{10}O_7$	Quercetin	2.54
13	10.86	407.136	389.126	$C_{20}H_{24}O_9$	Ginkgolide A	2.48
14	11.96	537.083	375.051	$C_{30}H_{18}O_{10}$	Amentoflavone	2.45
15	15.80	579.130	547.101	$C_{33}H_{24}O_{10}$	Sciadopitysin	0.47
16	14.99	565.115	533.088	$C_{32}H_{22}O_{10}$	Ginkgetin	0.38
17	2.43	609.126	305.066	$C_{30}H_{26}O_{14}$	Prodelphinidin	0.27
18	7.30	305.067	219.066	$C_{15}H_{14}O_7$	Gallocatechin	0.25
19	14.50	283.062	151.004	$C_{16}H_{12}O_5$	Acactein	0.24
20	9.31	317.031	245.044	$C_{15}H_{10}O_8$	Myricetin	0.21
21	7.59	289.072	245.081	$C_{15}H_{14}O_6$	Catechin	0.15

为了比较差异化合物在两种制剂中的含量,对其代表性的差异化合物进行色谱峰提取。比如,图 3-A 和图 4-A 分别是前体离子是 173.046 的化合物的提取离子流图和该化合物的二级质谱信息,图 3-B 和图 4-B 分别是前体离子是 137.024 的化合物的提取离子流图和该化合物的二级质谱信息,图 3-C 和图 4-C 分别是前体离子是 289.070 的化合物的提取离子流图和该化合物的二级质谱信息。两种制剂中 3 个典型差异化合物的提取离子流色谱图的比较,进一步表明了这些差异化合物在两种制剂的含量是有差异的。进一步对这些差异化合物进行定量分析,根据所鉴定的化合物的质荷比以及保留时间信息对这些化合物进行相对定量,并计算这些化合物在两种制剂中相对含量的比值,结果表明一共鉴定了 21 种差异成分,其中银杏叶滴丸中

含量大于银杏叶提取物片的有 7 种化合物(图 5-A),主要是黄烷醇类化合物(包括儿茶素、没食子儿茶素和前翠华素);银杏叶提取物片中含量大于银杏叶滴丸的化合物有 14 个(图 5-B 和 5-C),主要是儿茶素类化合物。表 1 总结了银杏叶提取物片与银杏叶滴丸制剂的差异物质及该物质在两种制剂中的相对定量的比值(“JND/DW”表示化合物在银杏叶提取物片与银杏叶滴丸中的相对含量的比值)。结果表明了银杏叶提取物片和银杏叶滴丸最明显的差异物质是有机酸类化合物,其中对羟基苯甲酸和莽草酸在银杏叶提取物片剂中的相对含量是银杏叶滴丸制剂中的 74 倍,而且银杏叶提取物片剂中含量高于银杏叶滴丸制剂 10 倍以上的化合物均是有机酸类化合物,而儿茶素和没食子儿茶素在银杏叶滴丸。

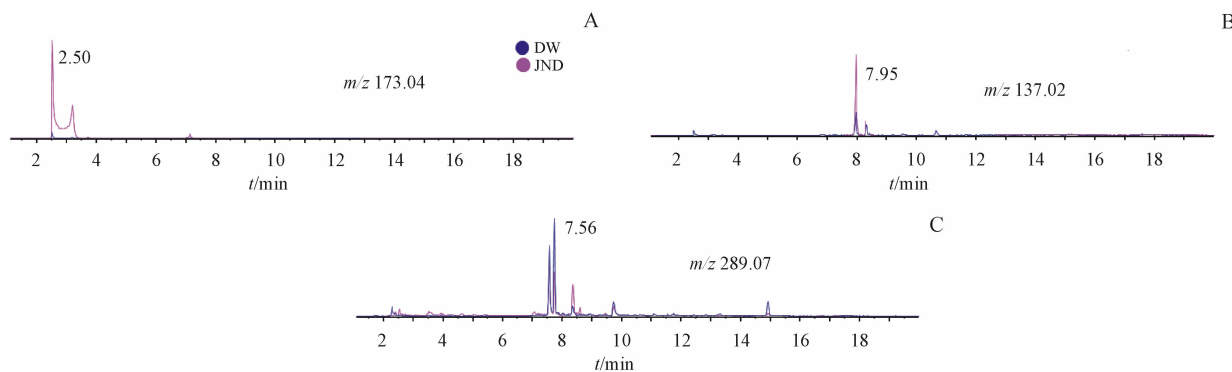


Figure 3 Extraction ion chromatogram (XIC) of representative compounds that exhibit different abundance levels in *Yinxingye Diwan* and extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets

A: XIC of the precursor ion at m/z 173.04 detected in *Yinxingye Diwan* and extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets; B: XIC of the precursor ion at m/z 137.02 in *Yinxingye Diwan* and extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets; C: XIC of the precursor ion at m/z 289.07 in *Yinxingye Diwan* and extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets

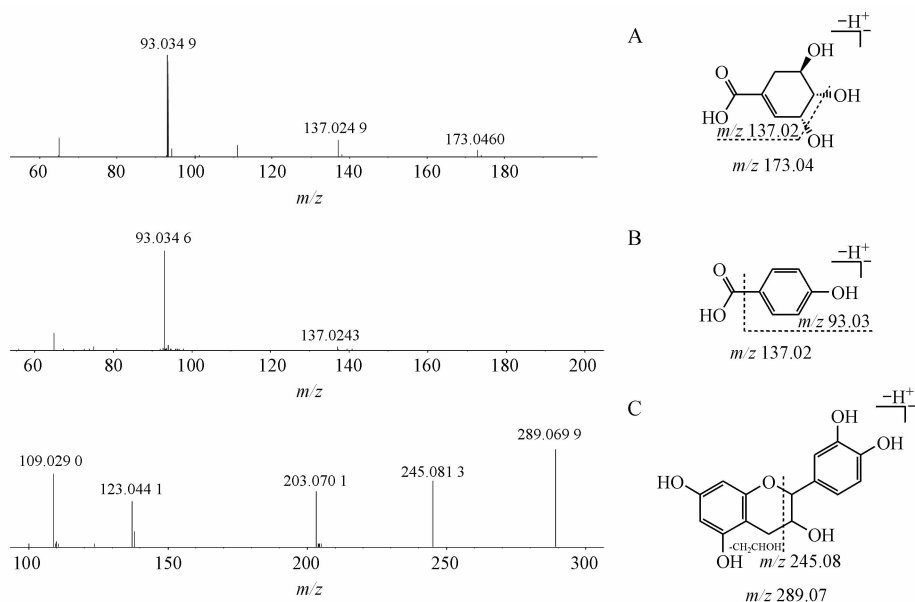


Figure 4 Corresponding MS/MS mass spectrum of representative compounds that exhibit different abundance levels in *Yinxingye Diwan* and extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets

A: MS/MS mass spectra of the precursor ion at m/z 173.04; B: MS/MS mass spectra of the precursor ion at m/z 137.02; C: MS/MS mass spectra of the precursor ion at m/z 289.07

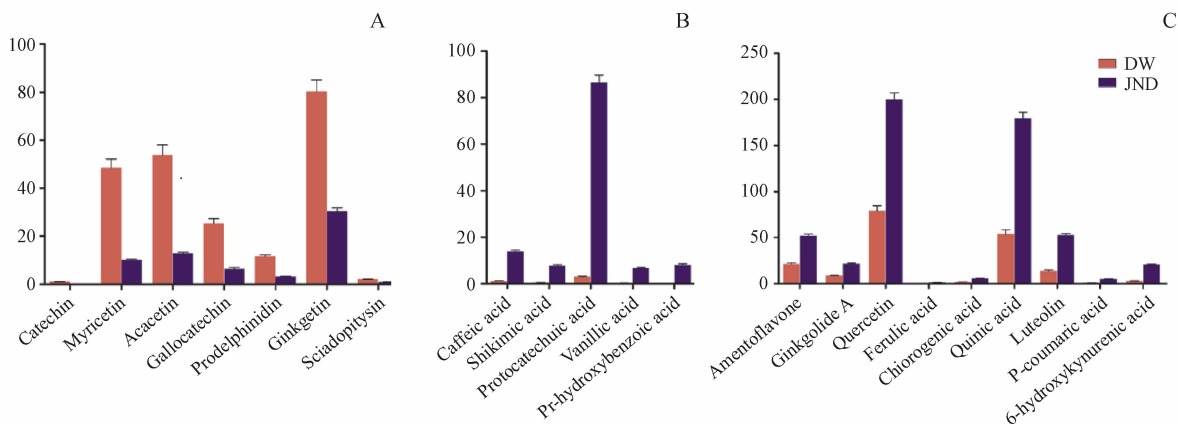


Figure 5 Quantitative analysis of compounds that exhibit different abundance levels in *Yinxingye Diwan* and the extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets (A) represents that compounds content were high in *Yinxingye Diwan*; (B and C) represents that compounds content were high in extract of *Ginkgo biloba* leaves tablets ($\bar{x} \pm s; n = 5$)

3.2.2 银杏叶滴丸与银杏酮酯滴丸制剂的比较

考察银杏叶滴丸与酮酯滴丸的差异成分,比较提取方法纯化后两种制剂组成成分的差异,对两种制剂进行了 PLS-DA 分析(图 2-B, R2X:0.912, R2Y:0.998; Q2:0.994),结果表明银杏叶滴丸与银杏酮酯滴丸存在成分含量的差异。筛选出 VIP>1 的候选化合物,按照上述方法对候选化合物进行鉴定,这些差异化合物的鉴定信息在表 2 中进行了总结。根据所鉴定的化合物的质荷比以及保留时间对这些化合物进行相对定量(“DW/TZ”表示化合物在银杏叶滴丸与酮酯滴丸中相对含量的比值),结果表明,实验鉴定出 12 种差异成分,其中银杏叶滴丸中含量大于银杏酮酯滴丸的有 7 种化合物(图 6-A),主要是黄烷醇类化合物(儿茶素、没食子儿茶素和前翠华素);银杏酮酯滴丸中含量大于银杏叶滴丸的有 5 种化合物,主要是金松双黄酮和有机酸类(图 6-B)。研究结果表明了银杏酮酯滴丸与银杏叶滴丸组成成分的相对含量存在显著差异,说明同样的提取溶剂,经过对银杏黄酮和银杏内酯两类化合物进行纯化后,其他有效成分的含量也会发生改变。因此,为达到质量控制以及统一药效的目的,需要对其提取溶剂以及步骤进行详细的规定。表 2 总结了银杏叶滴丸与银杏酮酯滴丸两种制剂

中的差异物质及该物质在两种制剂中的相对含量的比值,莽草酸在银杏叶滴丸中的含量是银杏酮酯滴丸中的 5 倍左右,方法改变后莽草酸化合物的含量进一步下降。上述研究表明了同一种提取溶剂下,其化合物的含量比值最高是 5 倍,而且差异化化合物的种类较多,如银杏叶滴丸高于银杏酮酯滴丸的化合物有有机酸类、黄烷醇类、黄酮醇类等,而银杏酮酯滴丸中含量高于银杏叶滴丸的化合物有有机酸类、银杏内酯类。

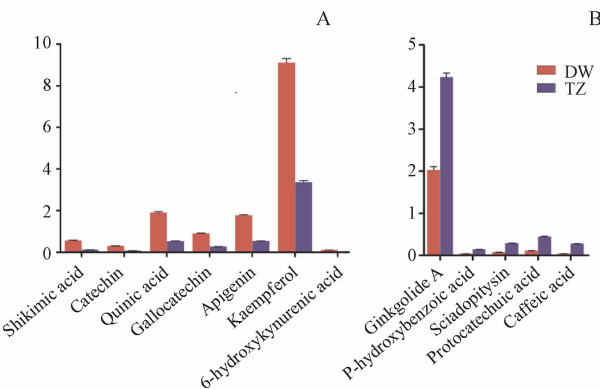


Figure 6 Quantitative analysis of compounds that exhibit different abundance levels in Yinxiangye Diwan and Yinxiangtongzhi Diwan ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$) (A) represents that compounds content were high in yinxiangye Diwan; (B) represents that compounds content were high in Yinxiangtongzhi Diwan

Table 2 Information of compounds that exhibit different abundance levels in Yinxiangye Diwan and Yinxiangtongzhi Diwan

No.	t_R/min	m/z	Fragment ion	Formula	Identification	Area ratio (DW/TZ)
1	2.41	173.046	137.024	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5$	Shikimic acid	4.95
2	7.59	289.072	245.081	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	Catechin	4.55
3	2.41	191.057	93.033 3	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6$	Quinic acid	3.61
4	7.30	305.067	219.066	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7$	Gallo catechin	3.39
5	11.44	269.046	151.004	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	Apigenin	3.30
6	10.28	285.042	243.030	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	Kaempferol	2.71
7	7.18	204.031	160.040	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_4$	6-Hydroxykynurenic acid	2.53
8	10.86	407.136	389.127	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_9$	Ginkgolide A	0.48
9	7.94	137.024	93.035	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	p-Hydroxybenzoic acid	0.32
10	7.40	153.021	108.021	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	Protocatechuic acid	0.25
11	15.80	579.130	547.101	$\text{C}_{33}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	Sciadopitysin	0.25
12	7.94	179.036	135.045	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	Caffeic acid	0.16

4 讨 论

本实验首先建立了基于高分辨质谱的银杏叶制剂复杂成分的分析方法,结合代谢组学数据分析技术对银杏叶滴丸、银杏叶提取物片和银杏酮酯滴丸制剂进行差异化化合物的筛选与鉴定。样品组间差异成分的筛选中,尤其是具有复杂成分的中药化

合物的分析中,采用经典的代谢组学技术(PLS-DA)能够快速找到组间的最大差异。在银杏叶滴丸与银杏叶提取物片的差异成分研究中,共鉴定了 21 种差异化化合物,相对定量分析说明了银杏叶滴丸与银杏叶提取物片以有机酸类化合物的含量差异最为显著。

临床上,银杏叶制剂主要用于治疗心血管疾

病,如心绞痛等。尽管针对不同银杏叶制剂的药效差异研究仍是空白,但是有文献表明咖啡酸等小分子有机酸类化合物在抗氧化、抗炎、免疫调节方面表现出独特的生理作用,黄烷醇类化合物具有一定的抗氧化作用。因此,对于不同银杏叶制剂的差异成分分析提示不同种类产品存在潜在的药效差异。

不同银杏叶制剂差异成分可能来源于其生产工艺的不同。银杏叶提取物片是根据德国专利生产的制剂,作为银杏提取物的“金标准”。其提取溶剂是丙酮/水体系,与《中华人民共和国药典》(2015 年版)规定的醇/水体系不同。研究结果不同提取溶剂对有机酸类化合物以及黄烷醇类化合物的含量有显著影响,即丙酮/水体系对有机酸类化合物的提取效果好,而醇/水溶剂则对黄烷醇类化合物的提取效率高。银杏叶滴丸与银杏酮酯滴丸的研究则表明了仅仅对于主要成分(银杏黄酮与银杏内酯)进行纯化虽然会提高银杏内酯的含量,但是会影响其他可能的有效成分的相对含量,如进一步降低有机酸类(莽草酸等)化合物的含量。目前关于银杏叶制剂的质量控制仅仅是遵循“24+6”的原则,即银杏黄酮的含量为 24%,银杏内酯为 6%,上述 3 种主要制剂均符合“24+6”的原则。但本实验表明,银杏叶提取物片、银杏叶滴丸及银杏酮酯滴丸的其他组成成分的相对含量具有较大的差异,可通过加入有机酸类成分来减少银杏叶提取物片和银杏滴丸的差异成分或者在提取剂中加入适量丙酮改善有机酸类化合物的提取效率。因此,本研究为进一步建立合理的质量控制标准及药效差异的阐明提供了指导意义。

参考文献

- [1] Liu XG, Cheng CY, Wang JX, et al. A metabolic exposure-oriented network regulation strategy for the identification of effective combination in the extract of *Ginkgo biloba* L. [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, **149**: 151–159.
- [2] Avula B, Sagi S, Gafner S, et al. Identification of *Ginkgo biloba* supplements adulteration using high performance thin layer chromatography and ultra high performance liquid chromatography-diode array detector-quadrupole time of flight-mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, **407**(25): 7733–7746.
- [3] DeFeudis FV, Drieu K. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications [J]. *Curr Drug Targets*, 2000, **1**(1): 25–58.
- [4] Liebgott T, Miollan M, Berchadsky Y, et al. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion [J]. *Basic Res Cardiol*, 2000, **95**(5): 368–377.
- [5] Weng XJ, Chen LL, Zhang HQ. Effect of total flavonoid in leaves of *Ginkgo biloba* on the apoptosis of eosinophil in broncho alveolar lavage fluid [J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 2008, **43**(5): 480–483.
- [6] Geng XH, Yang QC, Lu P, et al. Therapeutic time window of dimethylaminoethyl ginkgolide B mesylate in focal cerebral ischemia of rats [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, **42**(2): 149–152.
- [7] Li WZ, Wu WY, Huang H, et al. Protective effect of bilobalide on learning and memory impairment in rats with vascular dementia [J]. *Mol Med Rep*, 2013, **8**(3): 935–941.
- [8] Yuan Y, Zhang PY, Jin SY, et al. Effects of ginkgolide on early apoptosis of rat cortical neurons induced by hypoxia [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2003, **34**(5): 465–468.
- [9] He J, Yang S, Yang J, et al. Extraction of ginkgolides from *Ginkgo biloba* [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, **35**(9): 1127–1129.
- [10] Lichtblau D, Berger JM, Nakanishi K. Efficient extraction of ginkgolides and bilobalide from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *J Nat Prod*, 2002, **65**(10): 1501–1504.
- [11] Lopez-Gutierrez N, Romero-Gonzalez R, Vidal JLM, et al. Quality control evaluation of nutraceutical products from *Ginkgo biloba* using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, **121**: 151–160.
- [12] Liu XG, Wu SQ, Li P, et al. Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoid in *Ginkgo biloba* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, **113**: 212–225.
- [13] van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromatogr A*, 2009, **1216**(11): 2002–2032.
- [14] Wagner S, Scholz K, Sieber M, et al. Tools in metabolomics: an integrated validation approach for LC-MS metabolic profiling of mercapturic acids in human urine [J]. *Anal Chem*, 2007, **79**(7): 2918–2926.