

基于衰老大鼠模型的银杏叶提取物血清指纹图谱研究

牟玲丽¹, 陈 丽¹, 李 峰¹, 艾芳芳¹, 颜光华¹, 王西佳¹, 余 鹏^{2*}

1. 湖南师范大学医学院, 湖南 长沙 410006

2. 中南大学药学院, 湖南 长沙 410013

摘要: **目的** 研究银杏叶提取物用于衰老大鼠模型的血清指纹图谱, 探讨其体内药效成分。 **方法** 建立 D-半乳糖致衰老大鼠模型, 同时 ig 给予银杏叶提取物, 制备衰老大鼠的含药血清, 采用 HPLC-UV 和 HPLC-ESI-MS 法, 分别针对黄酮类成分和内酯类成分建立指纹图谱, 分析入血成分。 **结果** HPLC-UV 指纹图谱显示了 10 个入血成分, 大多为代谢成分; HPLC-MS 指纹图谱标定了 9 个共有峰, 其中 7 个为原型成分。 **结论** 首次进行了银杏叶提取物的血清药物成分图谱研究, 可反映银杏叶提取物口服给药吸收入血药物成分的变化, 为其体内药效物质研究奠定基础。

关键词: 银杏叶提取物; 血清指纹图谱; HPLC-UV; HPLC-MS; 药效物质基础

中图分类号: R285.51; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0690-04

Studies on serum fingerprint of extract from *Ginkgo biloba* leaves in aging rat

MU Ling-li¹, CHEN Li¹, LI Feng¹, AI Fang-fang¹, YAN Guang-hua¹, WANG Xi-jia¹, YU Peng²

1. Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410006, China

2. School of Pharmaceutical Science, Central South University, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To investigate the serum fingerprint of extract from *Ginkgo biloba* leaves (EGBL) in aging rats and explore the pharmacological constituents *in vivo*. **Methods** D-galactose was used to induce aging rats, then rat serum was prepared after ig administration of EGBL. Aimed at flavonoids and terpenoids, HPLC-UV and HPLC-ESI-MS methods were developed, respectively, and chemical constituents in blood were investigated. **Results** As a result, HPLC-UV fingerprint showed ten common peaks in serum of rats and most of them were metabolite. In HPLC-MS fingerprint, there were nine common peaks among which seven peaks were original compounds. **Conclusion** This study explores the fingerprint of EGBL in aging rat serum for the first time, it can reveal the change of chemical constituents after ingestion, and provide some data on material basis study *in vivo* for EGBL.

Key words: extract from *Ginkgo biloba* L. leaves (EGBL); serum fingerprint; HPLC-UV; HPLC-MS; efficacious material basis

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶, 具有抗氧化、改善心脑血管循环、延缓衰老、防治痴呆、提高机体免疫力等多种保健和药用价值^[1-6], 是近年来国内外研究的热点之一。银杏叶的指纹图谱研究报道较多, 主要用于成分分析及品质评价^[7-9], 然而目前的指纹图谱研究均为“体外”指纹图谱, 即提取液直接获取指纹图谱, 并未经过动物体内的吸收代谢过程。

众所周知, 中药虽成分众多, 但只有那些被消化吸收进入血液的成分或其代谢产物(血中移行成分)才可能产生药效^[10]。本研究利用血清药物化

学方法, 研究银杏叶提取物用于衰老模型大鼠的含药血清指纹图谱, 借以探索银杏叶的体内药效成分, 更科学地揭示银杏叶发挥抗衰老药效作用的物质基础。

银杏叶含有多种化学成分, 其中黄酮类和萜内酯类化合物为主要有效成分^[11]。由于内酯类化合物无共轭双键结构, 紫外吸收极弱, 难以与黄酮在紫外检测器上的同时检测。为此, 本研究针对两类成分, 分别采用紫外和质谱检测器, 建立银杏叶提取物的 HPLC-UV 指纹图谱和 HPLC-MS 总离子流指纹图谱。

收稿日期: 2011-09-21

基金项目: 湖南省教育厅研究项目 (09C629); 湖南省中医药科研计划项目 (2010082); 2009 年湖南省大学生创新性实验计划项目

作者简介: 牟玲丽 (1979—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为中草药质量评价。Tel: (0731)88912473 15874027027 E-mail: linglimu1203@gmail.com

*通讯作者 余 鹏 Tel: (0731)82650446 E-mail: peng.yoo@gmail.com

1 仪器和材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括 Agilent 化学工作站和 DAD 检测器、自动进样器; Agilent 6410B 型三级四极杆液质联用仪, 配有自动进样器、液相色谱仪、柱温箱、电喷雾电离离子源 (ESI) 及 Agilent Mass Hunter Workstation Software 数据处理系统 (Agilent, 德国)。Z323K 冷冻高速离心机 (德国 Hermle 公司); QL-90 旋涡混合器 (江苏海门市麒麟医用仪器厂)。

银杏叶提取物 (批号 9840808, Egb 761, 德国施瓦伯制药集团); 芦丁、白果内酯、银杏内酯 B、银杏内酯 C 对照品由笔者分离并根据波谱数据及理化性质进行结构鉴定 (质量分数 > 95%)。乙腈 (美国 Tedia 公司)、甲醇 (Merck 公司) 色谱纯, 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司), 其他试剂均为分析纯。

雌性 Wistar 大鼠 30 只, 体质量 (200 ± 20) g, 由长沙市开福区东创实验动物科技服务部提供, 动物使用许可证号: SCXK (湘) 2009-0012。

2 方法与结果

2.1 动物分组及给药

大鼠随机分为模型组、给药组和空白组, 采用 D-半乳糖致亚急性衰老大鼠模型^[12-13]。模型组大鼠 ip D-半乳糖 125 mg/kg, 每日 1 次, 连续 42 d, 同时 ig 给予生理盐水 10 mL/kg。给药组 ip D-半乳糖的同时, 每天 ig 给予银杏叶提取物的生理盐水混悬液 250 mg/kg。空白组分别 ip 及 ig 相同体积的生理盐水。各组大鼠于末次给药后 2 h 眼眶静脉采血, 血液置离心管中 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血清。

2.2 含药血清 HPLC-UV 指纹图谱

2.2.1 血清样品制备 取血清 2 mL, 加入乙腈 6 mL, 快速涡旋 1 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 上清液挥干后, 用 0.1 mL 乙腈溶解, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液供 HPLC-UV 分析。

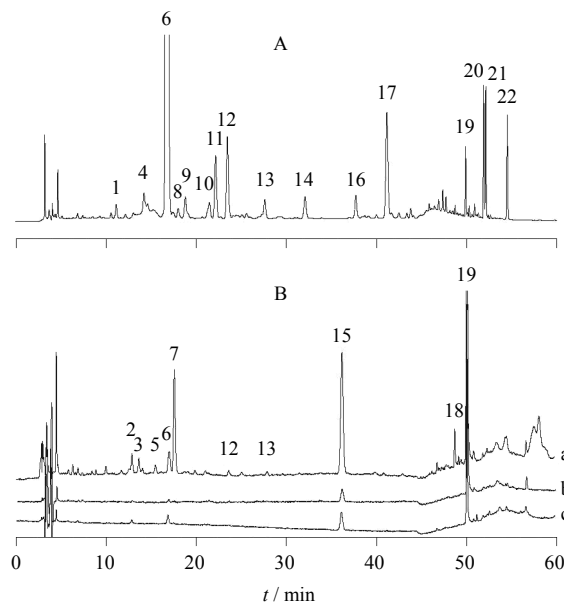
2.2.2 对照溶液配制 称取银杏叶提取物和芦丁对照品适量, 加甲醇分别配制成 1 g/L、50 mg/L 溶液。吸取银杏叶提取物溶液 50 μL, 加入至 2 mL 空白血清中, 再加入乙腈 6 mL, 按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Lichrosphere C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国 Phenomenex 公司); 流动相为 0.5% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 梯度洗脱: 0~30 min, 15%~24% B; 30~40 min, 24%~

30% B; 40~50 min, 30%~80% B; 50~60 min, 80% B; 检测波长 350 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C, 进样量为 10 μL, 分析时间 60 min。

2.2.4 方法学考察 吸取 1 g/L 的银杏叶提取物溶液, 按“2.2.2”项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 分别进样测定指纹图谱, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 考察方法的重现性。另吸取同一份银杏叶提取物供试品溶液, 分别在 0、4、8、16、24 h 连续进样 5 次, 测定指纹图谱, 考察方法的稳定性及精密度。结果表明, 各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 1%, 相对峰面积 RSD 均小于 5%, 说明方法稳定可靠。

2.2.5 结果与分析 HPLC-UV 指纹图谱见图 1。其中, 银杏叶提取物对照图谱标定了 16 个指纹峰, 6 号峰为芦丁。含药血清标定了 10 个指纹峰, 整体面貌与体外对照图谱差异较大, 说明大多黄酮类成分在体内已代谢。模型组血清与空白血清比较, 发现图谱基本一致, 仅在 6 号峰 ($t_R = 16.8$ min) 相应位置处多一小峰, 可能为造模后产生的内源性物质。



A-银杏叶提取物对照指纹图谱 B-血清指纹图谱
(a-给药组 b-空白组 c-模型组) 6-芦丁
A-fingerprint of EGBL B-serum fingerprint
(a-serum containing EGBL b-blank serum
c-serum in model group) 6-rutin

图1 HPLC-UV 指纹图谱比较

Fig. 1 Comparison on HPLC-UV fingerprint

银杏叶提取物含药血清与模型组血清及对照指纹图谱比较, 发现给药后 10 种血中移行成分中, 12、13 号峰与对照图谱相对应, 应为原型成分, 但在体

内其量甚微; 2、3、5、7、18 号峰在模型组血清色谱图及对照色谱图中均未出现, 推测为代谢产物; 6 号峰在模型组血清图谱中相应位置亦出峰, 因此不能断定是芦丁还是内源性物质, 亦或是二者叠加; 15 号峰在模型组血清图谱中虽有出峰, 然而在含药血清中其峰高远大于模型组血清, 因而推测 15 号峰为代谢产物和内源性物质的叠加; 19 号峰在对照及空白、模型组血清中均出现, 因而不能断定其来源。

2.3 含药血清 HPLC-MS 指纹图谱

2.3.1 血清样品制备 取血清 2 mL, 加入醋酸乙酯 6 mL, 快速涡旋 1 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 上清液挥干后, 用 0.1 mL 甲醇溶解, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液供 HPLC-MS 分析。

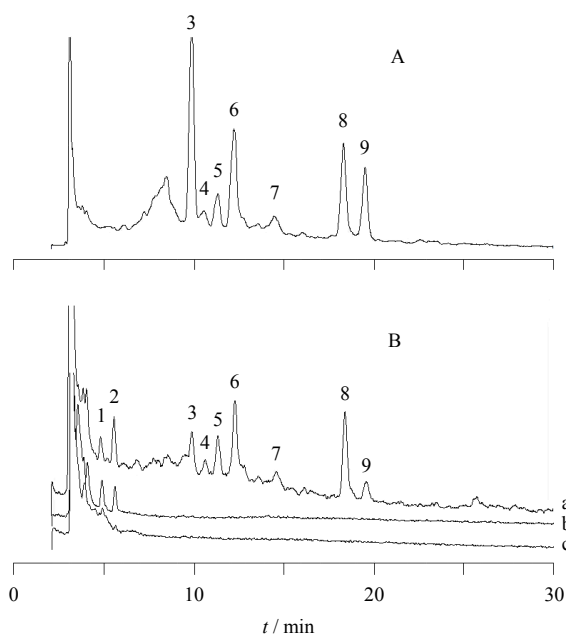
2.3.2 对照品溶液配制 分别称取白果内酯、银杏内酯 B 及银杏内酯 C 对照品适量, 加甲醇配制成 100 mg/L 的对照品溶液。另外, 吸取 1 g/L 的银杏叶提取物溶液 50 μ L, 加入至 2 mL 空白血清中, 再加入醋酸乙酯 6 mL, 按照“2.3.1”项下方法制备供试品溶液。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent XDB C₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为水 (A)-甲醇 (B) 梯度洗脱: 0~20 min, 25%~30% B; 20~30 min, 30%~40% B; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.3.4 质谱条件 采用 ESI 离子源, 负离子检测模式; 扫描质量范围: m/z 100~800; 干燥器温度 350 $^{\circ}$ C; 干燥气体积流量 8 L/min; 雾化气压力 275.8 kPa; 毛细管电压 4 000 V。

2.3.5 方法学考察 吸取 1 g/L 的银杏叶提取物溶液, 按“2.3.2”项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 分别进样测定指纹图谱, 考察方法的重现性。另吸取同一份供试品溶液, 分别在 0、4、8、16、24 h 连续进样 5 次, 测定指纹图谱, 考察方法的稳定性及精密度。结果表明, 各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2%, 相对峰面积 RSD 均小于 9%。

2.3.6 结果与分析 HPLC-MS 指纹图谱见图 2。其中, 银杏叶提取物对照图谱标定了 7 个指纹峰, 根据对照品确定 3 号峰为白果内酯, 6 号峰为银杏内酯 C, 9 号峰为银杏内酯 B。含药血清标定了 9 个指纹峰, 其中 3~9 号峰与对照图谱一一对应, 故推断均为药物原型成分; 1、2 号峰在模型组血清图谱中出现, 空白组血清中不明显, 推测可能为造模后产生的内源性物质。



A-银杏叶提取物对照指纹图谱 B-血清指纹图谱
(a-给药组 b-模型组 c-空白组)
A-fingerprint of EGBL B-serum fingerprint
(a-serum containing EGBL b-serum from model group
c-control serum)

图 2 HPLC-MS 总离子流色谱图比较

Fig. 2 Comparison on HPLC-MS total ion current chromatogram

提取含药血清总离子流图谱中各指纹峰的质谱图, 根据质谱图的解析, 对银杏叶中的主要萜内酯类成分进行初步辨认。其中 3、6、9 号峰通过对照品确定为白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 B (相对分子质量分别为 326、440、424)。5、8 号峰检测到 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, 分别为 m/z 423、407, 根据其色谱行为及质谱图, 推断 5 号峰为银杏内酯 B 的异构体银杏内酯 J, 8 号峰为银杏内酯 A (相对分子质量分别为 424、408)。该结果与文献报道^[14]的银杏内酯的质谱分析结论一致。

3 讨论

目前, 有关中药血清指纹图谱研究的报道并不多见, 而且现有的相关文献中, 血清样本的获取大多采用健康动物给药后采血^[15-16]。考虑到药物的功用是防治疾病, 而健康动物与患病动物对药物的吸收、处置可能有所差异, 因此, 本研究建立 D-半乳糖致衰老大鼠模型, 由衰老动物制备含药血清, 如此获得的血清样本能够更科学、客观地反映银杏叶的体内活性成分。根据本实验结果, 衰老模型大鼠的血清图谱与空白血清图谱存在一定的差异, 说明

不同状态下动物血清所含的内源性物质有所不同,而这些物质是否会对动物的生理机能起到一定的调节作用,以及能否影响药物的吸收代谢,均有待进一步研究。

HPLC-UV 指纹图谱分析时,分别采用甲醇和乙腈对含药血清及空白血清样本进行预处理,通过 HPLC 色谱图进行比较,发现采用乙腈处理的血清样品中,空白血清色谱峰较少,且基线较平稳,而含药血清出峰较多,因此确定乙腈为提取溶剂。

HPLC-MS 分析中,由于内酯类成分数目少,且相对量较低,易被黄酮类成分掩盖。为此,对血清样品的提取溶剂进行了考察,发现先后采用醋酸乙酯、甲醇提取内酯类成分具有更高的选择性,可较大程度上去除黄酮类成分的干扰。

综上所述,本实验采用 HPLC-UV 和 HPLC-MS 两种方法,对银杏叶提取物基于衰老大鼠模型的血清指纹图谱进行了初步探讨,并通过空白及模型组血清图谱、对照图谱与血清指纹图谱进行比较,对血清图谱中的药源性成分来源进行了初步推测,其中黄酮类成分在体内多为代谢产物,而内酯类成分多以原型被吸收。本研究可为银杏叶提取物的体内药效物质研究奠定基础,至于指纹图谱中指纹峰的归属和结构鉴定,尚需进一步研究确认。

参考文献

- [1] Saleem S, Zhuang H, Biswal S, *et al.* *Ginkgo biloba* extract neuroprotective action is dependent on heme oxygenase 1 in ischemic reperfusion brain injury [J]. *Stroke*, 2008, 39(12): 3389-3396.
- [2] 黄其春, 何玉琴, 李 焰, 等. 银杏叶提取物的免疫调节作用研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(2): 278-280.
- [3] 肖 璐, 易 涛, 刘 颖, 等. 银杏叶总黄酮自微乳化口腔速溶膜的制备及其性质研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(8): 1517-1522.
- [4] Walesiuk A, Braszko J J. Preventive action of *Ginkgo biloba* in stress- and corticosterone-induced impairment of spatial memory in rats [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(1): 40-46.
- [5] 徐艳芬, 张丽娟, 宋新波. 银杏叶提取物的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(6): 452-456.
- [6] 金 虹, 黄 毅, 王继生, 等. 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠的保护作用 [J]. *中草药*, 2010, 41(8): 1339-1342.
- [7] Song J J, Fang G Z, Zhang Y, *et al.* Fingerprint analysis of *Ginkgo biloba* leaves and related health foods by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry [J]. *JAOAC Int*, 2010, 93(6): 1798-1805.
- [8] 王京辉, 杜小伟, 王萌萌, 等. 舒血宁注射液、银杏叶提取物及银杏叶指纹图谱研究 [J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(7): 1026-1030.
- [9] 周 欣, 李章万, 张雪琴, 等. 银杏叶片剂中银杏黄酮的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(2): 93-95.
- [10] 贺玉琢. 日本汉方药“血清药理学”、“血清药化学”的研究概况 [J]. *国外医学: 中医中药分册*, 1998, 20(5): 3-7.
- [11] van Beek T A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 967(1): 21-55.
- [12] 徐 颖, 张志雄, 李 云, 等. 银杏酮酯对衰老模型大鼠学习记忆及海马细胞因子的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2008, 22(3): 51-54.
- [13] 孟宪军, 杨 平, 张 丽. 刺五加苷对 D-半乳糖致衰老模型大鼠免疫功能的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(2): 216-218.
- [14] 卢定强, 欧阳平凯, 陈 钧. 银杏叶中银杏萜内酯的高效液相色谱-电喷雾电离-质谱分析 [J]. *药物分析杂志*, 2002, 22(1): 9-11.
- [15] 窦志华, 丁安伟, 王陆军, 等. 复方五仁醇胶囊含药血清指纹图谱研究 [J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(12): 892-895.
- [16] 郭承军, 石俊英. 金银花小鼠血清移行成分指纹图谱研究 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(12): 2968-2970.