

基于“组分结构”理论对不同厂家银杏叶提取物中黄酮类活性成分 的对比研究

刘 丹^{1,2}, 贾晓斌^{1,2*}, 萧 伟^{3*}

1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013

2. 江苏省中医药研究院 中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028

3. 江苏康缘药业股份有限公司 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 基于组分结构理论对不同厂家生产的银杏叶提取物中黄酮类活性成分进行分析比较。**方法** 采用 HPLC 法同时测定银杏叶提取物中槲皮素、山柰酚、异鼠李素 3 种黄酮类成分; 利用 *F* 检验考察 7 个厂家银杏叶提取物黄酮类成分相互间的显著性差异程度。**结果** 7 个厂家 (A~G) 生产的银杏叶提取物中槲皮素、山柰酚、异鼠李素的质量分数差异较大, 其中 E 厂家样品中槲皮素质量分数最高, 平均为 6.933 1%; D 和 G 两厂家的样品中槲皮素质量分数分别只为 E 厂家的 56.52%、54.88%; A、B、C、F 4 个厂家样品中槲皮素质量分数分别是 E 厂家的 71.50%、69.99%、67.87%、63.34%。C 厂家样品中山柰酚质量分数最高, 平均为 5.367 0%; 而 D、G 两厂家样品中山柰酚质量分数分别只有 C 厂家的 66.51%、66.82%; A、B、E、F 4 个厂家样品中山柰酚质量分数分别是 C 厂家的 90.90%、87.03%、67.14%、77.05%。D 厂家样品中异鼠李素质量分数最高, 平均为 1.526 9%, 而 C、E 两厂家样品中异鼠李素只有 D 厂家的 40.88%、51.04%; A、B、F、G 4 个厂家的异鼠李素质量分数分别是 D 厂家的 70.69%、92.49%、82.49%、80.82%。**结论** 市场上银杏叶制剂疗效参差不齐, 通过试验比较研究银杏叶提取物黄酮组分中有效成分的质量分数及其配比, 发现存在显著性差异。

关键词: 银杏叶提取物; 黄酮类成分; 组分结构; 成分配比; HPLC

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)02-0170-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.010

Comparison on active flavonoids in *Ginkgo biloba* extract from different manufactories based on “component structure” theory

LIU Dan^{1,2}, JIA Xiao-bin^{1,2}, XIAO Wei³

1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Jiangsu Kanion Pharmaceut Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: **Objective** To compare the contents of the active flavonoids in *Ginkgo biloba* extract (GBE) from different manufactories based on “component structure” theory. **Methods** The HPLC method was used to determine the contents of quercetin, kaempferol, and isorhamnetin in GBE. The significant differences of flavonoids in GBE from seven manufactories (A—G) were investigated by using *F* test investigation ingredients. **Results** The significant differences were found in the contents of quercetin, kaempferol, and isorhamnetin among these GBEs from the seven manufactories. The content of quercetin from the manufactory E was the highest, being 6.93%, whereas the contents of quercetin from the manufactories D and G were the lowest, being 56.52% and 54.88% of that in the manufactory E. In addition, the contents of quercetin from A—C, and F were 71.50%, 69.99%, 67.87%, and 63.34% of that in the manufactory E. The content of kaempferol from the manufactory C was the highest, being 5.367 0%. The contents of kaempferol from

收稿日期: 2012-05-28

基金项目: 江苏省中医药科技项目 (LZ09061); 中药制药过程新技术国家重点实验室开放基金 (SKL2010Z0303)

作者简介: 刘 丹 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型的开发。Tel: 18205095220 E-mail: liudan0513@yeah.net

*通信作者 贾晓斌 Tel: (025)85637809 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

萧 伟 Tel: (0518)85521956 Fax: (0518)85522017

网络出版时间: 2012-09-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120928.1205.002.html>

the manufactories D and G were 66.51% and 66.82% of that in the manufactory C. In addition, the contents of kaempferol from manufactories A, B, E, and F were 90.90%, 87.03%, 67.14%, and 77.05% of that in the manufactory C, respectively. The content of isorhamnetin from manufactory D was the highest, being 1.526 9%. The contents of isorhamnetin from manufactories C and E were 40.88% and 51.04%. The contents of isorhamnetin from manufactories A, B, F, and G were 70.69%, 92.49%, 82.49%, and 80.82% of that in the manufactory D, respectively. **Conclusion** The contents of flavonoids in GBEs from the different manufactories have the significant differences. The contents of market effective flavonoid component and content ratios of GBE exist the significant differences, causing that the curative effect of ginkgo preparations are different.

Key words: *Ginkgo biloba* extract; flavonoids; component structure; component ratio; HPLC

银杏树为我国古老树种之一, 银杏叶作为我国传统中药已有上千年的历史。随着现代中药制剂的发展, 银杏叶提取物成为制备银杏制剂的重要原料药。银杏叶提取物的主要活性成分包括黄酮类组分和萜内酯类组分, 其黄酮类组分水解产物主要包括槲皮素、山柰酚和异鼠李素 3 种成分, 该组分药理作用广泛^[1-3], 尤其是对心脑血管性疾病具有很好的治疗作用, 此外还是极好的天然抗氧化剂。由于银杏叶提取物具有极高的药用价值, 其市场需求量不断增大, 生产银杏叶提取物的厂家不断增多。然而, 市场上的银杏叶提取物质量差异大, 从而导致其疗效差异明显。

由于中药物质基础是多成分构成的, 而且多种成分并不是简单的堆积, 而是一个有序的整体, 单体成分是其最基本的单位, 相似的单体成分按照一定的比例构成了组分, 不同的组分又按照一定的比例构成了中药的整体^[4]。笔者认为可能由于各生产厂家所生产的银杏叶提取物存在黄酮组分中各成分“量比结构”的差异而导致其疗效存在差异。中药发挥药效强调整体性, 中药中各成分也存在一定的比例关系, 要发挥好中药最佳整体药效, 应该明确最佳的中药成分配比关系。笔者提出在中药质控方面, 应明确量化中药组分间及组分内部各成分的配比结构关系、设定中药组分间及成分间比例最优可控范围窗的新思想^[5], 并认为在中药物质基础研究的过程中应该深入到中药多组分及多成分微量比结构的研究, 为今后建立更为合理的中药质量控制体系打下基础。

1 仪器与材料

BP—211D 分析电子天平(德国 Sartorius 公司, 十万分之一); Agilent 1100 型液相色谱仪; HH—4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)。

对照品槲皮素(批号 100081-200907)、异鼠李素(批号 110860-200608)、山柰酚(批号 110861-200808)购自中国食品药品检定研究院; 银杏叶提

取物样品(批号 110722、110709、110518、110701、XC110410、110801、XP110702)分别由徐州恒凯银杏制品有限公司(A)、徐州康泰生物制品有限公司(B)、湖州恩贝希生物原料有限公司(C)、宁波中药制药有限公司(D)、西安小草植物科技有限公司(E)、惠州仙草植物保健科技有限公司(F)、桂林兴达制药厂(G)提供。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.4%磷酸水溶液(48:52), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 360 nm, 进样量为 20 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品 6.16、5.61、5.94 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解稀释配制质量浓度分别为 616、561、594 μg/mL 的对照品原液, 待用。

2.2.2 供试品溶液的制备^[6] 精密称取各个供试品 35 mg, 加入甲醇-25% HCl 溶液(4:1)的混合溶液 25 mL。置 90 °C 水浴中加热回流 60 min, 迅速冷却至室温, 转移至 50 mL 量瓶中定容。摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取各对照品原液适量置同一量瓶中加甲醇稀释, 配制一系列不同质量浓度的混合对照品溶液。混合对照品溶液所含槲皮素质量浓度依次为 30.8、15.4、6.16、3.08、1.54、0.77 μg/mL; 所含山柰酚质量浓度依次为 56.1、28.05、14.025、5.61、2.805、0.701 25 μg/mL; 所含异鼠李素质量浓度依次为 59.4、29.7、14.85、7.425、2.97、1.485 μg/mL。精密吸取各对照品溶液 20 μL, 按上述色谱条件测定, 以测得峰面积值为纵坐标(Y), 以质量浓度为横坐标(X)进行线性回归, 得 3 种成分的

回归方程、相关系数及线性范围分别为槲皮素 $Y=440.0 X-1.29$, $r=0.999\ 5$, $0.77\sim 30.8\ \mu\text{g/mL}$; 山柰酚 $Y=535.0 X-139.1$, $r=0.999\ 8$, $0.702\sim 56.1\ \mu\text{g/mL}$; 异鼠李素 $Y=641.8 X-173.1$, $r=0.999\ 8$, $1.49\sim 59.4\ \mu\text{g/mL}$ 。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液, 槲皮素、山柰酚、异鼠李素质量浓度分别为 30.8 、 19.8 、 $18.7\ \mu\text{g/mL}$, 进样 $20\ \mu\text{L}$ 进行分析, 重复 6 次, 计算峰面积的 RSD, 结果槲皮素、山柰酚、异鼠李素的 RSD 分别为 0.06% 、 0.26% 、 0.23% 。

2.4.2 重复性试验 精密称定同一样品 (批号 110722), 按供试品溶液制备方法分别制备 6 份供试品溶液, 测定 3 种成分的量, 计算各成分质量分数的 RSD, 结果槲皮素为 0.6% , 山柰素为 1.2% , 异鼠李素为 0.9% 。

2.4.3 稳定性试验 取同一样品 (批号 110722), 分别于 0、2、4、8、12、48 h 进样分析, 计算峰面积的 RSD, 结果槲皮素为 1.9% , 山柰酚 2.4% , 异鼠李素 2.1% , 表明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.4.4 加样回收率试验 精密称取同一银杏叶提取物样品 (批号 110722) 9 份, 每份约 $35\ \text{mg}$, 均分为 3 组, 每组分别加入一定量的对照品溶液 (各含槲皮素约为 0.70 、 1.40 、 $1.75\ \text{mg}$, 山柰酚约为 0.68 、 1.37 、 $1.71\ \text{mg}$, 异鼠李素约为 0.16 、 0.31 、 $0.40\ \text{mg}$), 按“2.2.2”项供试品溶液制备方法制备, 按上述色谱条件测定, 进样 $20\ \mu\text{L}$ 进行分析, 计算各对照品的平均加样回收率, 结果槲皮素为 98.8% , RSD 为 1.54% ; 山柰酚为 100.1% , RSD 为 2.59% ; 异鼠李素为 98.4% , RSD 为 2.63% 。

2.5 样品测定

按供试品溶液的制备方法, 制备 7 个不同生产厂家的银杏提取物供试品溶液, 测定 3 种成分的量, 各测定 3 次, 计算 3 次试验测得槲皮素、山柰酚、异鼠李素的平均质量分数, 按照总黄酮醇苷 = (槲皮素 + 山柰酚 + 异鼠李素) $\times 2.51$ 来计算总黄酮醇苷质量分数^[7], 并对 7 个不同生产厂家的银杏提取物中 3 种有效成分质量分数构成进行比较分析, 结果见表 1。可以发现 7 个厂家生产的银杏叶提取物中槲皮素、山柰酚、异鼠李素的质量分数差异较大, 其中 E 厂家样品中槲皮素质量分数最高, 平均为 $6.933\ 1\%$; D 和 G 两厂家的样品中槲皮素质量分数分别只为 E 厂家的 56.52% 、 54.88% ; A、B、C、F

表 1 7 个厂家样品中各成分测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of each component in samples from seven manufactories ($n=3$)

厂家	质量分数 / %			
	槲皮素	山柰酚	异鼠李素	总黄酮醇苷
A	4.957 3	4.880 5	1.140 4	27.555 2
B	4.852 1	4.671 0	1.412 1	27.422 3
C	4.705 5	5.367 0	0.624 1	26.597 5
D	3.918 8	3.569 7	1.526 9	22.628 8
E	6.933 1	3.603 9	0.779 4	28.404 2
F	4.391 6	4.135 7	1.259 5	24.564 9
G	3.844 0	3.586 7	1.234 1	21.757 7

4 个厂家样品中槲皮素质量分数分别是 E 厂家的 71.50% 、 69.99% 、 67.87% 、 63.34% 。C 厂家样品中山柰酚质量分数最高, 平均为 $5.367\ 0\%$; 而 D、G 两厂家样品中山柰酚质量分数分别只有 C 厂家的 66.51% 、 66.82% ; A、B、E、F 4 个厂家样品中山柰酚质量分数分别是 C 厂家的 90.90% 、 87.03% 、 67.14% 、 77.05% 。D 厂家样品中异鼠李素质量分数最高, 平均为 $1.526\ 9\%$; 而 C、E 两厂家样品中异鼠李素只有 D 厂家的 40.88% 、 51.04% ; A、B、F、G 厂家的异鼠李素质量分数分别是 D 厂家的 70.69% 、 92.49% 、 82.49% 、 80.82% 。7 个厂家黄酮类活性成分槲皮素、山柰酚、异鼠李素 3 者的量比关系也存在差异。中药发挥整体药效, 关键在于有效成分的协同作用, 各个成分对整体药效必然存在贡献度大小的差异, 因此, 只有各有效成分达到一定量比关系才可能发挥重要的最好疗效。这里说的量比关系是指某中药成分存在一定自身特有的结构构成。

2.6 数据分析

利用 SPSS 16.0 对各厂家经样品测定的槲皮素、山柰酚、异鼠李素 3 者的质量分数数据进行显著性差异分析, 结果见表 2。当 P 值大于 0.05 时说明两者间无显著差异; 当 P 值小于 0.05 时说明两者间存在显著性差异; 当 P 值小于 0.01 时说明两者间存在非常显著性差异。通过数据分析表明各厂家生产的银杏提取物黄酮活性成分配比存在显著性差异, 槲皮素非常显著差异表现为 A/F、D/E、D/F、E/G 之间, 异鼠李素非常显著差异表现为 A/D、B/D、B/E、C/D、D/E、D/F、D/G 之间, 总黄酮醇苷非常显著差异表现为 A/E、A/G、B/D、B/G、C/D、C/E、C/G、

表2 厂家间各成分的 F 检验
Table 2 F test among each component between
every two manufactories, respectively

厂 家	槲皮素	山柰酚	异鼠李甙	总黄酮醇苷
A 与 B	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$
A 与 C	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.05$	$P>0.05$
A 与 D	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.01$	$P<0.05$
A 与 E	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.01$
A 与 F	$P<0.01$	$P<0.05$	$P>0.05$	$P<0.05$
A 与 G	$P<0.05$	$P<0.05$	$P>0.05$	$P<0.01$
B 与 C	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$
B 与 D	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.01$	$P<0.01$
B 与 E	$P<0.05$	$P>0.05$	$P<0.01$	$P<0.05$
B 与 F	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.05$
B 与 G	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.01$
C 与 D	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.01$	$P<0.01$
C 与 E	$P>0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.01$
C 与 F	$P<0.05$	$P<0.05$	$P>0.05$	$P<0.01$
C 与 G	$P<0.05$	$P>0.05$	$P<0.05$	$P<0.01$
D 与 E	$P<0.01$	$P>0.05$	$P<0.01$	$P<0.01$
D 与 F	$P<0.01$	$P<0.05$	$P<0.01$	$P<0.05$
D 与 G	$P>0.05$	$P<0.05$	$P<0.01$	$P>0.05$
E 与 F	$P<0.05$	$P>0.05$	$P<0.05$	$P<0.01$
E 与 G	$P<0.01$	$P>0.05$	$P<0.05$	$P<0.01$
F 与 G	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.01$

D/E、E/F、E/G、F/G 之间,最终导致黄酮活性成分配比的差异,这很可能是导致其疗效差异的主导原因之一。该结果提示银杏叶提取物黄酮类组分可能存在特定的最优“组分结构”关系而发挥多靶点、多途径的最佳药效作用。因此,应该根据特定的“组分结构”关系对银杏叶提取物进行更为科学的质量控制。

3 讨论

近年来,心脑血管疾病已成为我国群体慢性疾病之一,发病率居高不下,且发病年龄趋于年轻化。尽管作为治疗心脑血管疾病的常见药银杏制剂早已风靡全球,但是其质量控制标准及方法各国都有差异^[8]。现在中国生产银杏叶提取物原料药的厂家很多,但不同厂家生产的银杏叶提取物疗效差异明显,分析其原因主要有两个方面:首先,各厂家对原药

材的提取、干燥等工艺不尽相同,可能是导致各厂家产品成分质量分数差异较大的主观原因。此外,笔者认为影响中药疗效差异的因素很大程度上取决于中药“组分构成”的不同或差异太大——客观原因。“组分构成”指的是对于某个特定的中药,其发挥药效的多个有效成分发挥协同综合药效,各成分疗效贡献度有大有小,但必然存在自身的最佳成分配比范围,使得各成分协同作用最优,此时的结构就是该中药的组分构成。如何才能科学的保证中药提取物/制剂疗效的安全性、稳定性和有效性呢?笔者认为要合理科学地控制中药质量(中药提取物/中药材/制剂)必须基于“组分构成”理论制定出符合中医基础理论的中药质量控制体系。针对不同的中药,开展深层次的物质基础研究,明确中药发挥药效的主要药效成分,通过药理药效及优化配比成分实验,借助现代化计算机辅助手段,研究各成分相对于总体中药的贡献度大小,最终确定中药最优药效的有效成分量化配比结构范围,根据该有效配比范围对中药质量进行科学合理有效地控制。这将是现代中药质控前进的大方向,只有这样中药才能真正走向国际化市场,达到质量可控、药理效用结构明确,真正被世界人民所接受的具有中国特色的中药产物。

参考文献

- [1] 潘洪平. 银杏叶制剂药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 93-96.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 贾晓斌, 陈彦, 李霞, 等. 中药复方物质基础研究新思路和方法[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(5): 420-425.
- [5] 刘丹, 贾晓斌, 郁丹红. 基于“组分构成”理论的中药质量控制新思路[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(6): 865-870.
- [6] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [7] 陈仲良. 银杏提取物的化学成分和制剂的质量[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(6): 326-331.
- [8] van Beek T A, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals[J]. *J Chromatogr A*, 1216(11): 2002-2032.