

基于多元统计分析的银杏叶提取物中有机酸类成分含量研究

赵一懿¹, 殷海利², 郭洪祝^{1*}, 傅欣彤¹, 陈有根¹

1. 北京市药品检验所 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206
2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定银杏叶提取物中 9 种小分子有机酸类成分莽草酸、儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原儿茶酸、6-羟基犬尿喹啉酸、对羟基苯甲酸、对羟基肉桂酸、咖啡酸含量的方法, 并结合多元统计分析方法比较不同厂家生产的银杏叶提取物间质量差异。方法 采用 Inertsil ODS-3 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.4%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 波长切换测定 (220 nm 检测莽草酸、儿茶素、表儿茶素, 254 nm 检测没食子酸、原儿茶酸、6-羟基犬尿喹啉酸、对羟基苯甲酸, 310 nm 检测对羟基肉桂酸、咖啡酸), 柱温 40 ℃。结果 不同厂家生产的银杏叶提取物中有机酸总含量有差异, 厂家内部样品中各有机酸含量同样存在差异。经聚类分析、主成分分析、相关与回归分析等多元统计方法分析, 筛选出儿茶素、没食子酸、原儿茶酸及 6-羟基犬尿喹啉酸为体现样品质量差异的特征成分, 同时成分间具有内在相关性。结论 建立的方法操作简便、重复性好、结果可靠, 可用于银杏叶提取物中有机酸类成分的质量评价。筛选出的儿茶素、没食子酸、原儿茶酸及 6-羟基犬尿喹啉酸是体现质量差异的特征成分, 又是具有内在关联的共性成分, 为提升银杏叶提取物整体质量控制能力提供了依据, 同时表明银杏叶提取物的提取工艺并不统一, 企业内部工艺的稳定性也有待提高。

关键词: 银杏叶提取物; 有机酸; 多元统计分析; 儿茶素; 没食子酸; 原儿茶酸; 6-羟基犬尿喹啉酸; 莽草酸; 表儿茶素; 对羟基苯甲酸; 对羟基肉桂酸; 咖啡酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)14-3679-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.14.010

Study on organic acids in *Ginkgo biloba* extracts based on multivariate statistical analysis

ZHAO Yi-yi¹, YIN Hai-li², GUO Hong-zhu¹, FU Xin-tong¹, CHEN You-gen¹

1. Beijing Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine (Traditional Chinese Patent Medicine), Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing 102206, China
2. College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: **Objective** A method for simultaneous determination of nine active organic acids [shikimic acid, catechin, (–)-epicatechin, gallic acid, protocatechuic acid, 6-hydroxykynurenic acid (6HKA), p-hydroxybenzoic acid (PHBA), hydroxycinnamic acid, and caffeic acid] in *Ginkgo biloba* extracts (GBEs) by HPLC wavelength switching method was established, and its quality was evaluated by statistical analysis. **Methods** An Inertsil ODS-3 C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with a column temperature of 40 ℃ and a mobile phase gradient of acetonitrile-0.4% phosphoric acid. The detection wavelengths were 220 nm [shikimic acid, catechin, (–)-epicatechin], 254 nm (gallic acid, protocatechuic acid, 6HKA, PHBA), 310 nm (hydroxycinnamic acid, caffeic acid), respectively. **Results** Remarkable differences were found among the nine compositions in different producing areas samples. The samples from different manufacturers showed significant difference in organic acid compounds. There were great difference of the contents of organic acid in various batches from different manufacturers. The data were processed through unsupervised principal component analysis (PCA), cluster analysis (CA), correlation, and regression analysis to compare the quality differences. Catechin, gallic acid, protocatechuic acid, and 6HKA were recognized as characteristic chemical markers that contributed most to reflect the difference between samples, and there were internal relations among these compounds. **Conclusion**

收稿日期: 2020-02-11

基金项目: 国家中医药管理局中药标准化资助项目 (ZYBZH-C-HEB-16)

作者简介: 赵一懿, 女, 主管药师, 硕士, 主要从事中药成分分析与质量控制。E-mail: zhaoyiyi410@163.com

*通信作者 郭洪祝, 主任药师, 主要从事中药成分分析与质量控制。E-mail: guohz@bidc.org.cn

The established method was simple, accurate, and reliable with good precision, repeatability and stability, which can be used for the simultaneous determination of nine organic acid compounds. Through multivariate statistical analysis, the Q-markers that may affect the difference of GBEs were better identified, which can lay the foundation for the comprehensive quality control of GBEs. Meanwhile, the extracting process of GBEs were not uniform. The stability of process parameter in the enterprise was prepared to be further enhanced.

Key words: *Ginkgo biloba* extracts; organic acid; multivariate statistical analysis; catechinic; gallic acid; protocatechuic acid; 6-hydroxykynurenic acid; shikimic acid; (-)-epicatechin; p-hydroxybenzoic acid; hydroxycinnamic acid; caffeic acid

银杏 *Ginkgo biloba* L. 是最古老的孑遗植物之一, 素有裸子植物活化石之称, 我国银杏资源占世界总量的 70% 以上。银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba* extracts, GBE) 由银杏的干燥叶经加工制成, 具有抗氧化、扩张血管等作用, 对高血压、动脉粥样硬化、脑功能障碍等心脑血管疾病疗效显著, 深受国内外临床认可^[1-10]。近年来金纳多片、银杏叶胶囊、舒血宁注射液等以 GBE 为原料的现代中药制剂已经成为心脑血管疾病临床治疗的一线用药, GBE 也一直是国内外植物原料市场的重要品种^[11]。

银杏叶中化学成分十分复杂, 现已报道其中含有 160 多种成分, 主要为黄酮类、萜类、内酯类、有机酸和酚类等^[12-13]。一直以来对于 GBE 的质量控制, 主要关注黄酮、内酯 2 类有效成分, 对其他成分的分析较少^[14-17]。本研究团队已建立了银杏叶药材及提取物中有机酸类成分的液质含量测定方法, 揭示了此类成分稳定地存在于银杏叶药材中, 同时发现银杏叶中含有一种独特的有机酸类成分 6-羟基犬尿喹啉酸^[18,24-25]。GBE 作为药材提取的中间体原料, 同样含有丰富的有机酸, 已有文献报道其药理活性及在心血管疾病等方面的作用也越来越受到关注^[19-23]。关于该类成分是否稳定存在于提取物中及是否体现不同提取物样品的质量差异都是有必要分析研究的, 对于 GBE 及制剂整体质量控制, 以及与临床疗效相关的药理活性研究, 都奠定了基础。

本实验在前期研究基础上, 建立了 HPLC 法同时测定 GBE 中 9 种有机酸类成分含量的方法, 9 种成分含量相对较高, 信号响应较好, 还包括 6-羟基犬尿喹啉酸这一独特的有机酸类成分在 GBE 中的检测。该方法既解决了液质条件分析成本高的问题, 同时发挥了液相紫外检测分析简便快捷的优势, 并结合多元统计分析方法比较不同来源 GBE 样品中有机酸类成分组成含量差异, 揭示该类成分所反映的质量情况, 并筛选出体现样品质量差异的特征成分, 及反映样品质量共性关联的共有成分, 为 GBE 整体质量控制及评价提供更全面、更充足的依据。

1 仪器与试剂

Waters e2695-2998 高效液相色谱仪, 包括四元泵溶剂系统、自动进样器、PDA 检测器和 Empower 3 色谱工作站, 美国 Waters 公司; SB25-120 型超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Milli-Q 超纯水仪, 美国 Thermo Scientific 公司; Sartorius CP225D 电子分析天平, 德国赛多利斯集团。

对照品莽草酸(批号 S5375, 质量分数 90.88%)、对羟基苯甲酸(批号 B20328, 质量分数 99.99%)、对羟基肉桂酸(批号 20333, 质量分数 99.95%) 均购自于上海源叶生物科技有限公司; 对照品没食子酸(批号 110831-201605, 质量分数 99.84%)、原儿茶酸(批号 110809-201205, 质量分数 99.98%)、儿茶素(批号 110877-201604, 质量分数 98.84%)、咖啡酸(批号 110885-201703, 质量分数 99.96%)、表儿茶素(批号 110878-201703, 质量分数 91.44%) 均购于中国食品药品检定研究院; 对照品 6-羟基犬尿喹啉酸(质量分数大于 98%) 均由实验室自制。分析样品为 8 个厂家(A~H) 共 47 批 GBE (编号 A1~A17、B1~B3、C1~C3、D1~D12、E1~E3、F1~F3、G1~G3、H1~H3)。色谱纯乙腈, 美国 Sigma 公司; 超纯水自制; 其他试剂均为分析纯。

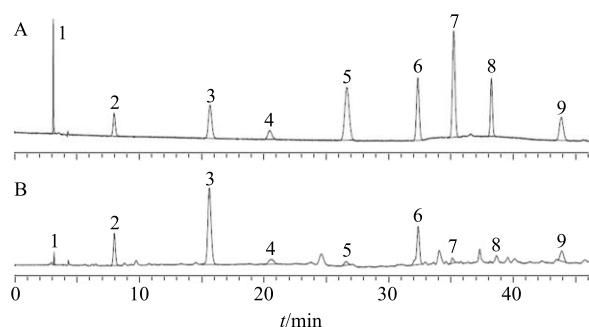
2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.4%磷酸缓冲溶液, 梯度洗脱: 0~8 min, 5%~6%乙腈; 8~13 min, 6%乙腈; 13~20 min, 6%~7%乙腈; 20~24 min, 7%~8%乙腈; 24~33 min, 8%~15%乙腈; 33~43 min, 15%乙腈; 43~44 min, 15%~100%乙腈; 44~50 min, 100%~5%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 柱温 40 °C; 进样体积 10 μL; 检测波长 220、254、310 nm。色谱图见图 1, 各定量成分峰分离度均大于 1.5。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取莽草酸、儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原儿茶酸、6-羟基犬尿喹啉酸、对羟基苯甲酸、



1-莽草酸 2-没食子酸 3-原儿茶酸 4-6-羟基犬尿喹啉酸 5-对羟基苯甲酸 6-儿茶素 7-咖啡酸 8-表儿茶素 9-对羟基肉桂酸
1-shikimic acid 2-gallic acid 3-protocatechuic acid
4-6-hydroxykynurenic acid 5-p-hydroxybenzoic acid 6-catechin
7-caffenic acid 8-epicatechin 9-p-hydroxycinnamic acid

图 1 混合对照品 (A) 及 GBE 样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC fingerprints of reference substances (A) and GBE (B)

表 1 各待测成分标准曲线、相关系数及线性范围

Table 1 Regressive equations, linear ranges of investigated components, and correlation coefficients

成分	回归方程	r^2	线性范围/ μg	检测限/ng	定量限/ng
莽草酸	$Y=1\ 704\ 556.818\ 1\ X-36\ 683.585\ 0$	0.999 8	0.388 1~3.880 6	58.80	194.05
表儿茶素	$Y=3\ 260\ 062.342\ 6\ X-2\ 599.681\ 2$	0.999 5	0.007 1~0.070 6	1.08	3.55
原儿茶酸	$Y=3\ 503\ 807.578\ 9\ X-17\ 348.998\ 3$	1.000 0	0.133 3~1.332 5	20.20	66.65
没食子酸	$Y=1\ 879\ 339.898\ 6\ X+1\ 747.410\ 8$	0.999 5	0.026 4~0.263 6	4.00	13.20
6-羟基犬尿喹啉酸	$Y=9\ 757\ 657.678\ 0\ X-5\ 856.568\ 8$	1.000 0	0.012 9~0.128 8	1.95	6.45
对羟基苯甲酸	$Y=5\ 654\ 194.725\ 8\ X-8\ 085.790\ 3$	0.999 7	0.012 9~0.129 4	1.95	6.45
儿茶素	$Y=5\ 907\ 863.392\ 9\ X-4\ 596.427\ 9$	0.999 3	0.016 9~0.084 7	2.56	8.45
对羟基肉桂酸	$Y=7\ 713\ 770.786\ 0\ X-3\ 692.674\ 5$	0.999 4	0.006 6~0.033 2	1.00	3.30
咖啡酸	$Y=4\ 311\ 825.444\ 8\ X+1\ 209.223\ 2$	0.999 9	0.003 4~0.016 7	0.52	1.70

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一批 GBE 样品 (D1), 按“2.3”项下制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算各成分峰面积的相对标准偏差 (RSD) 值。结果莽草酸、儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原儿茶酸、6-羟基犬尿喹啉酸、对羟基苯甲酸、对羟基肉桂酸及咖啡酸峰面积的 RSD 值分别为 1.41%、0.92%、0.68%、1.15%、0.81%、0.36%、0.93%、1.42%、1.22%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取同一批 GBE 样品 (D1), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、16、24、48 h 进样测定, 计算各成分峰面积的 RSD 值。结果莽草酸、儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原儿茶酸、6-羟基犬尿喹啉酸、对羟基苯甲酸、对羟基肉桂酸及咖啡酸峰面积的 RSD 值分别为 1.96%、1.50%、1.22%、1.16%、0.69%、0.50%、1.15%、1.08%、0.82%, 表明供试

品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取样品 0.035 g, 精密加入 80%甲醇 10 mL, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 30 min, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下配制的混合对照品溶液适量, 配制成多个质量浓度系列的混合对照品溶液, 按照“2.1”项色谱条件进行测定。以对照品质量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得线性回归方程、相关系数 (r^2) 和线性范围, 结果见表 1。逐级稀释混合对照品母液, 按信噪比 (S/N) = 10 计算定量限, 按 $S/N=3$ 计算检测限。

2.5.3 重复性试验 取同一批 GBE 样品 (D1) 6 份, 精密称定, 按“2.3”项方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 测得莽草酸、儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原儿茶酸、6-羟基犬尿喹啉酸、对羟基苯甲酸、对羟基肉桂酸及咖啡酸的平均质量分数分别为 99.907 4、1.472 1、0.380 9、1.927 0、14.228 7、2.011 6、1.211 1、1.181 5、0.187 5 mg/g, RSD 值分别为 0.40%、1.58%、1.46%、0.95%、0.83%、1.32%、1.00%、0.79%、1.03%, 表明本方法重复性良好。

2.5.4 准确度试验 采用加样回收法, 选同一批 GBE (D1), 各取 0.010、0.017、0.035 g, 分别精密加入一定量的混合对照品溶液, 按供试品溶液项下的制备方法操作, 制成低、中、高 3 个质量浓度 (50%、100%、200%) 供试品溶液共 9 份, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算莽草酸、儿茶素、表

儿茶素、没食子酸、原儿茶酸、6-羟基犬尿喹啉酸、对羟基苯甲酸、对羟基肉桂酸及咖啡酸的平均加样回收率分别为 103.06%、99.28%、98.87%、100.54%、104.26%、101.03%、101.89%、101.65%、100.12%，RSD 分别为 1.05%、2.77%、1.37%、3.01%、1.33%、1.56%、1.82%、1.78%、1.86%，结果表明该方法具有较好的准确度。

2.6 结果

2.6.1 样品直观分析 取 47 份不同厂家的 GBE 样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，外标法计算莽草酸、儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原儿茶酸、6-羟基犬尿喹啉酸、对羟基苯甲酸、对羟基肉桂酸及咖啡酸 9 个指标成分的含量。

从测定结果看出，不同厂家生产的 GBE 中有机酸类成分含量存在差异，厂家 D 生产的 GBE 样品有机酸总量高于其他厂家样品，其余厂家样品中有机酸总量差别不大（图 2）。从单一有机酸含量来看（图 3），D 厂家生产的样品与其他厂家相比，儿茶素、没食子酸、原儿茶酸及 6-羟基犬尿喹啉酸的含量明显偏高，其他成分含量在各样品间分布相差不大，且同一厂家内部样品有机酸含量相对集中，有个别样品离散明显。可见，GBE 中有机酸类成分普遍存在，但样品间含量差异明显，具体提取物中各有机酸类成分的质量差异情况，还需结合统计学方法进一步比较分析。

2.6.2 聚类分析 根据 47 份不同厂家 GBE 样品有机酸含量测定结果，运用 SPSS 20.0 分析软件对其进行聚类分析，采用组间连接法，以欧式平方距离为测度，Z 标准化，对样品进行聚类，结果见图 4。从图中可以看出，除 D 厂家 D1~D10 样品单独聚为一类之外，其余样品聚为一类，可见不同企业生产的 GBE 有机酸类成分存在差异，造成差异的特征成分组成还需进一步分析。

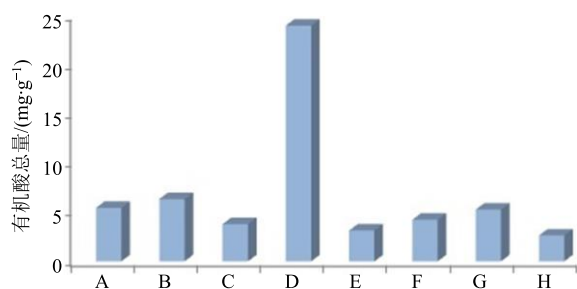


图 2 不同厂家 GBE 有机酸总量直观分析

Fig. 2 Total contents of organic acids in GBE

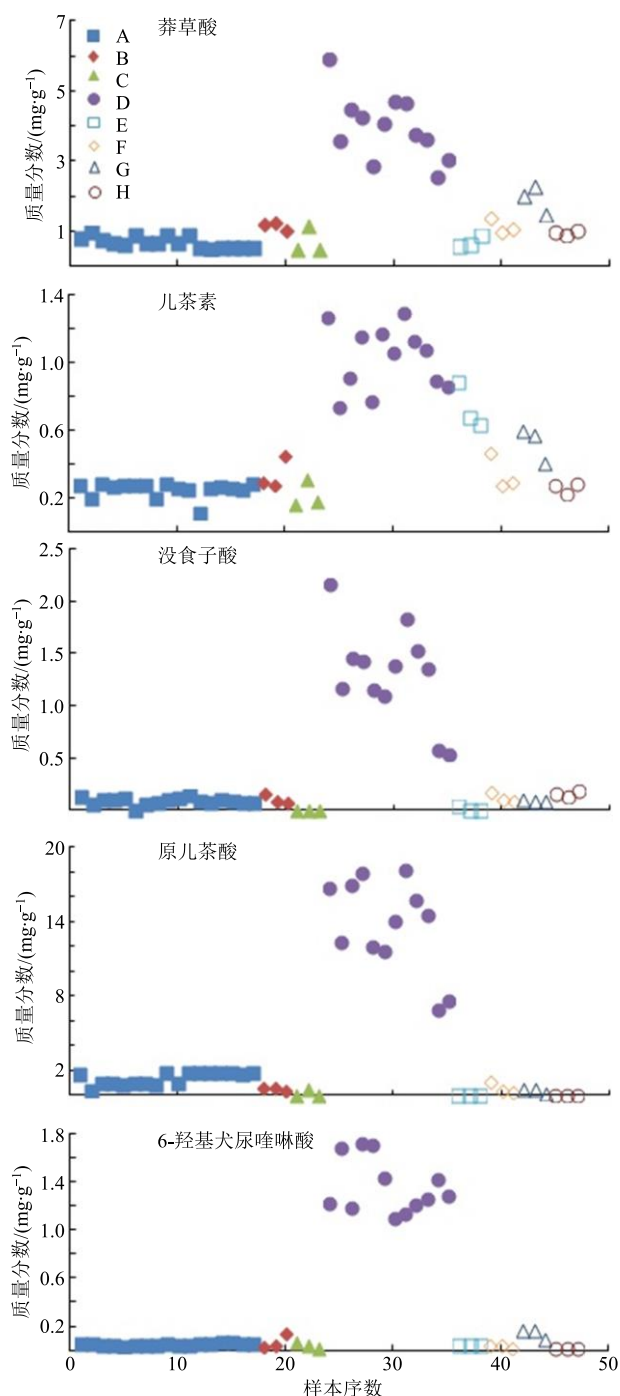


图 3 不同厂家 GBE 中各有机酸含量直观分析

Fig. 3 Contents of organic acids in GBE

2.6.3 主成分分析 根据 47 份不同厂家 GBE 中有机酸成分含量测定结果，运用 SPSS 20.0 分析软件对其进行主成分分析。主成分分析是在尽可能保持原有数据信息的前提下，通过降维处理达到简化指标的目的。主成分的特征值及贡献率是选择主成分的依据，表 2 描述了主成分分析初始值对原有变量的总体描述情况。从表中可知前 2 个主成分的累积方差贡献率达到 85.653% (>85%)，因此选择前 2

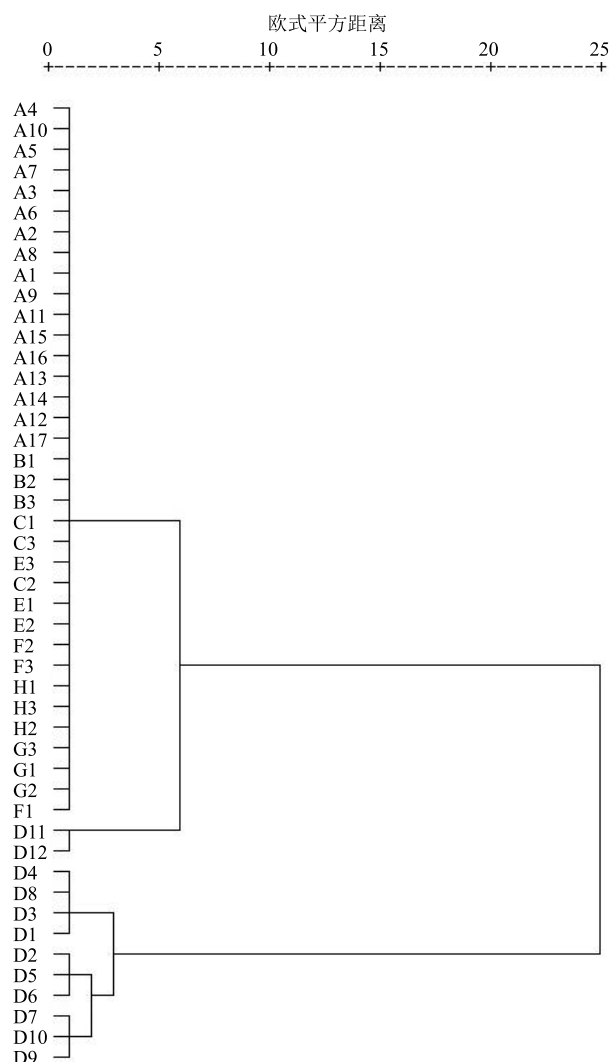


图 4 47 批 GBE 样品的聚类分析树状图

Fig. 4 Hierarchical cluster analysis for 47 batches of GBE

表 2 特征值和方差贡献率

Table 2 Characteristic value and variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率/%	
		初始特征值	累积
1	6.722	74.689	74.689
2	0.987	10.964	85.653
3	0.592	6.576	92.228
4	0.310	3.449	95.677
5	0.160	1.781	97.458
6	0.117	1.300	98.758

个主成分，即可代表样品全部的信息。

用 Simca 13.0 软件以 2 个主成分建立坐标系得到 PCA 分布图，见图 5。从图上可以看出，D 厂家生产的 GBE 样品独自聚集在一起，与聚类结果一致，其他厂家各样品相对分散。可见不同 GBE 样品质量差异体现在不同生产厂家之间，可能与原料及生产工艺等因素有关。

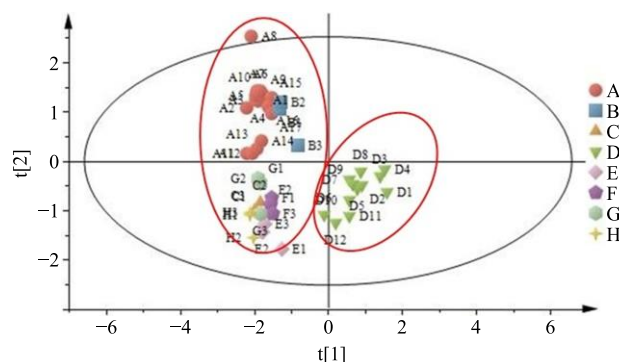


图 5 GBE 样品的 PCA 图

Fig. 5 PCA/Scores plot based on global chemical profiling of GBE

为进一步确定造成质量差异的主要成分，通过载荷因子筛选出特征成分，结果见表 3。表 3 是经方差最大正交旋转后的因子载荷矩阵，用以鉴别有实际意义的因子。从中可以看到，第 1 个主因子上儿茶素、没食子酸、原儿茶酸及 6-羟基犬尿喹啉酸有较高的载荷（载荷绝对值大于 0.9），可见这 4 个化合物是造成 GBE 质量差异的特征成分。

2.6.4 相关性分析 通过主成分分析，筛选出体现 GBE 样品间质量差异的特征成分。进一步分析各有机酸待测指标成分间的相关性，探索其在样品中的内在联系，揭示在提取物中趋于共性的信息特征。相关性分析结果见表 4。可见儿茶素、没食子酸、原儿茶酸及 6-羟基犬尿喹啉酸相互之间呈显著正相关，表明 4 个化合物具有密切的联系。

2.6.5 回归分析 对上述相关关系明显的指标成分含量进行回归分析，建立直线回归方程。分析结果表明儿茶素、没食子酸、原儿茶酸及 6-羟基犬尿喹啉酸 4 个成分之间具有较好的线性关系，呈现明显的直线相关趋势，相关系数均大于 0.8。因此选取一个成分作为共性指标（例如儿茶素）就能代表其他

表 3 旋转变换后的因子矩阵

Table 3 Component matrix

元素	主成分		
	1	2	总和
莽草酸	0.851	0.047	0.898
儿茶素	0.966	-0.122	0.844
表儿茶素	-0.738	0.596	-0.142
没食子酸	0.975	0.015	0.990
原儿茶酸	0.943	-0.017	0.926
6-羟基犬尿喹啉酸	0.938	-0.096	0.842
对羟基苯甲酸	0.855	0.301	1.156
对羟基肉桂酸	0.817	-0.117	0.700
咖啡酸	0.634	0.708	1.342

表 4 GBE 样品相关性结果

Table 4 Canonical correlation analysis of GBE

成分	相关性								
	莽草酸	儿茶素	表儿茶素	没食子酸	原儿茶酸	6-羟基犬尿喹啉酸	对羟基苯甲酸	对羟基肉桂酸	咖啡酸
莽草酸	1.000 0	0.832 7	-0.630 5	0.771 0	0.704 3	0.687 2	0.608 6	0.754 4	0.634 9
儿茶素		1.000 0	-0.767 3	0.948 5	0.921 4	0.917 7	0.752 6	0.756 8	0.526 4
表儿茶素			1.000 0	-0.688 5	-0.658 6	-0.716 8	-0.429 0	-0.655 2	-0.128 0
没食子酸				1.000 0	0.971 3	0.933 2	0.842 1	0.735 8	0.607 7
原儿茶酸					1.000 0	0.940 3	0.830 3	0.664 9	0.532 4
6-羟基犬尿喹啉酸						1.000 0	0.836 3	0.677 9	0.478 7
对羟基苯甲酸							1.000 0	0.638 3	0.667 9
对羟基肉桂酸								1.000 0	0.456 1
咖啡酸									1.000 0

3 个有机酸成分, 其他成分含量可以通过构建数学模型明确量化关系。各成分间的线性趋势及方程见图 6。

3 讨论

3.1 供试品溶液提取溶剂的选择

GBE 中酚酸和非酚酸类的有机酸类成分由于酸性及化学性质不同, 造成极性相差较大, 在固液

比固定的基础上, 本实验分别考察了 20%、40%、60%、80% 甲醇及纯甲醇的提取溶剂对提取结果的影响, 液相结果显示, 80% 甲醇做提取溶剂时各有机酸类成分的提取效果最好, 效率最高。

3.2 色谱条件的优化

本实验分别对 Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Inertsil ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Hibar RP-18e (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、TechMate ST PAK C₁₈-ES (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 等色谱柱进行考察, 综合分离度及响应信号情况, 最终选择 Inertsil ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。同时分别采用甲醇-0.4% 磷酸缓冲溶液、乙腈-0.4% 磷酸缓冲溶液、乙腈-0.1% 磷酸缓冲溶液作为流动相进行考察, 最终采用乙腈-0.4% 磷酸缓冲溶液能使各成分得到较好的分离。

通过测定 9 个待测指标成分的最大紫外吸收, 结果显示莽草酸、儿茶素、表儿茶素的最大吸收波长集中在 220 nm 附近, 没食子酸、原儿茶酸、6-羟基喹啉酸、对羟基苯甲酸最大吸收波长集中在 254 nm 附近, 对羟基肉桂酸、咖啡酸的最大吸收波长集中在 310 nm 附近。为了使成分都得到准确定量, 本实验采用切换波长测定, 选取 3 个波长定量分析。

通过运用多种统计分析方法, 建立数学模型, 对 GBE 中 9 种有机酸类成分含量进行分析, 聚类分析和主成分分析结果揭示了厂家间样品质量分布情况, 并筛选出儿茶素、没食子酸、原儿茶酸及 6-羟基犬尿喹啉酸为体现 GBE 样品质量差异的特征成分, 与直观分析结果相吻合, 说明从直观上看出虽然莽草酸含量是导致样品中有机酸总量相差悬殊的主要原因, 但儿茶素、没食子酸、原儿茶酸及 6-羟

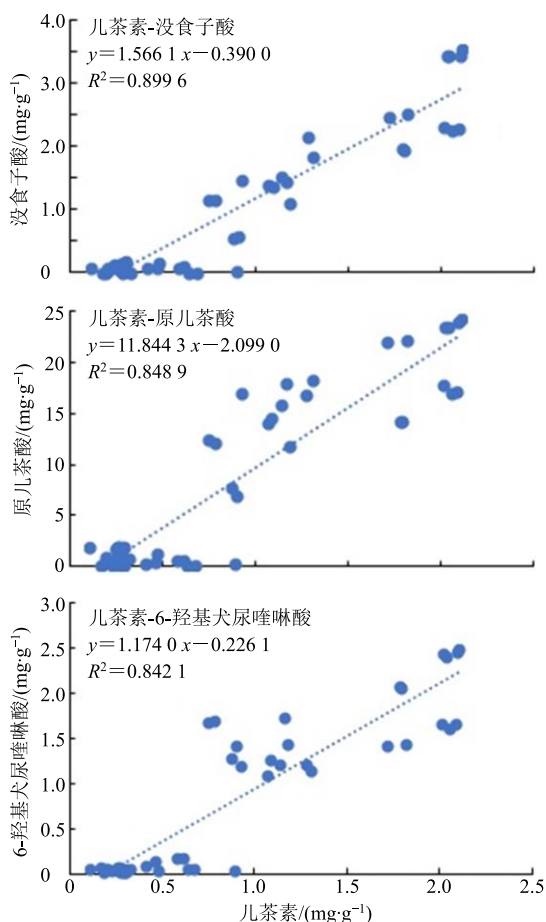


图 6 有机酸类成分间直线相关趋势及回归方程

Fig. 6 Linear trends and equations of compounds

基犬尿噻啉酸 4 个成分是体现各厂家之间及内部整体样品质量差异的特征成分。同时经相关和回归分析发现,上述 4 个成分还是具有内在关联的共性成分。因此,在 GBE 的质量控制时,可以选取相应的特征成分为分析指标,反映有机酸类成分含量情况,既简化了质量控制方案,同时又表明该多成分含量测定方法可用于 GBE 质量控制及评价,较单一成分测定更为全面准确,对 GBE 整体质量控制与评价研究 also 具有重要的指导意义。

通过建立 HPLC 法测定 GBE 中 9 种有机酸类成分含量,分析结果表明不同厂家生产的 GBE 中有机酸含量存在差异,分析原因除了和银杏叶药材原料差异有关外,主要还是由生产工艺的差异造成的。进一步发现厂家内部不同批次的样品有机酸含量并不稳定,存在波动,可见有机酸类成分分析对于银杏叶提取物整体质量控制较为重要,不应被忽视。本实验所建立的方法及揭示的现象,为 GBE 质量评价提供了重要的依据,同时,为后续 GBE 中有机酸类成分在药理活性及临床使用方面的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 汪素娟,康安,狄留庆,等.银杏叶提取物主要活性成分药动学研究进展[J].中草药,2013,44(5): 626-631.
- [2] 魏学立,曲摇玮,梁敬钰.银杏的研究进展[J].海峡药学,2013,25(3): 1-8.
- [3] 赵军,吴胜波,陆青春.银杏叶提取物注射液联合奥拉西坦治疗急性脑梗死的临床研究[J].现代药物与临床,2019,34(8): 2326-2329.
- [4] 张鹏飞,廖丽君,邓祯,等.银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展[J].辽宁中医杂志,2017,44(2): 426-429.
- [5] 王雪,张伟,李家春,等.高效液相体积排阻色谱法测定银杏二萜内酯提取物中大分子物质[J].中草药,2016,47(3): 436-439.
- [6] 李思佳,耿剑亮,张悦,等.银杏药理作用研究进展[J].药物评价研究,2017,40(6): 731-741.
- [7] 李无双,周燕.银杏叶提取物抗氧化作用的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(26): 37-38.
- [8] 刘磊,卫昊,陈丹丹,等.银杏叶提取物调控 TLR4/NF- κ B 通路减轻急性脑缺血小鼠脑皮质缺血研究[J].中草药,2019,50(21): 5282-5288.
- [9] 王捷,龙禹,汪小祝,等.银杏叶药理作用、临床应用及制剂研究综述[J].中外医疗,2011,5(5): 116-117.
- [10] 齐惠珍,周霞瑾,王明霞.银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展[J].河北中医,2013,10(12): 1899-1901.
- [11] 杨扬,周斌,赵文杰.“银杏叶事件”的分析与思考[J].中草药,2016,47(14): 2397-2407.
- [12] Van Beek T A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 967: 21-55.
- [13] Singh B, Kaur P, Gopichand, et al. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba* [J]. *Fitoterapia*, 2008, 79: 401-418.
- [14] Van Beek T A, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 2002-2032.
- [15] 王淑梅.银杏二萜研究进展[J].河北医药,2015,37(9): 1401-1404.
- [16] Nakanishi K. Terpene trilactones from *Ginkgo biloba*: From ancient times to the 21st century [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 4987-5000.
- [17] Stromgaard K, Nakanishi K. Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba* [J]. *Angew Chem Int*, 2004, 43: 1640-1658.
- [18] 殷海利,赵一懿,郭洪祝,等.银杏叶中 6 种有机酸类成分定量分析[J].中国新药杂志,2019,28(12): 1505-1510.
- [19] 汤喜兰,刘建勋,李磊,等.中药有机酸类成分的药理作用及在心血管疾病的应用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(15): 243-246.
- [20] 任红,乔洪翔,黄海波,等.一测多评法测定银杏叶片中小分子有机酸含量[J].药物分析杂志,2016,36(6): 1037-1043.
- [21] 张雅丽,李建科,刘柳,等.五倍子没食子酸研究进展[J].食品工业科技,2013,34(10): 386-390.
- [22] 乔洪翔,吴健,何厚洪,等.HPLC 测定银杏叶制剂中 6-羟基犬尿噻啉酸的含量[J].中国现代应用药学,2014,31(10): 1225-1227.
- [23] 杨冰月,李敏,任敏,等.基于灰色关联度分析法对半夏及其炮制品总有机酸止咳作用的谱-效关系研究[J].中草药,2016,47(13): 2301-2307.
- [24] 陈晶,王京辉,傅欣彤,等.高效液相色谱法测定银杏叶提取物中 4 个酚酸类化合物的含量[J].药物分析杂志,2013,33(5): 818-821.
- [25] Zhao Y Y, Guo H Z, Chen Y G, et al. Simultaneous quantification of flavonol glycosides, terpene lactones, polyphenols and carboxylic acids in *Ginkgo biloba* leaf extract by UPLC-QTOF-MSE based metabolomic approach [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2017, 26(11): 789-804.