·银杏二萜内酯葡胺注射液研究专题(二)·

银杏叶中内酯类成分的研究进展

耿婷[1,2], 申文雯[1,2], 王佳佳[1,2], 黄文哲[1,2], 王振中[1,2], 萧伟[1,2*]

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

[摘要] 银杏内酯类成分作为银杏叶的重要活性成分,具有较高的药用价值,在临床上应用广泛。该文综述了近年来国内外学者关于银杏内酯类化学成分、构效关系、分析方法、生物活性及药代(ADME)特征等方面的研究成果,为更加深入地开发利用银杏内酯提供参考依据。

[关键词] 银杏内酯; 化学成分; 构效关系; 分析方法; 生物活性; 药代(ADME)

DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20180312.001

Research development of ginkgo terpene lactones

GENG Ting[1,2], SHEN Wen-wen[1,2], WANG Jia-jia[1,2], HUANG Wen-zhe[1,2], WANG Zhen-zhong[1,2], XIAO Wei[1,2*]

(1. *Jiangsu Kanion Parmaceutical Co., Ltd., Lianyungang* 222001, *China*;
2. *State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang* 222001, *China*)

[Abstract] Ginkgo terpene lactones, as an important active ingredient from Ginkgo leaves, has high medicinal values and has been widely used in clinics. This article would review the researches both at home and abroad, including chemical composition, structure-activity relationship, analytical methods, pharmacological effects, pharmacokinetic characteristics, and so on, providing a reference for further development and utilization of ginkgo terpene lactones.

[Key words] ginkgo terpene lactones; chemical composition; structure-activity relationship; analytical methods; pharmacological effects; pharmacokinetic characteristics (ADME)

银杏 *Ginkgo biloba* L.,又名公孙树、白果树,为新生代第四纪冰川时期的孑遗植物,素有"活化石"、"植物界的熊猫"之称,是我国特有的经济植物资源,被列为国家重点保护植物[1]。银杏叶作为银杏的主要药用部位,具有活血化瘀、通络止痛、敛肺平喘之功效,临床应用广泛,疗效显著。近年来,银杏叶提取物制剂与保健食品的市场用量逐年增加,已成为全球植物药市场上最热门的品种之一,主要用于治疗脑部、周边等血液循环障碍,对失智症、血管性痴呆、老年性痴呆等亦有较好疗效。

银杏内酯和银杏黄酮是银杏叶及其提取物中的重要活性成分[2]。目前,国际上标准的银杏叶提取物是按照德国 Schwabe 专利工艺生产的 EGb761,含有 24% 的黄酮苷和 6% 的萜内酯(2.8% ~3.4% 的银杏内酯 A,B,C 及 2.6% ~3.2% 的白果内酯),该标准已成为世界许多国家进出口银杏叶制剂的质量标准。尽管银杏内酯在银杏叶提取物中所占含量不高,但其独特的生理活性和复杂的结构特征依然引起了学者们的广泛关注[3]。研究发现,银杏内酯是一类高效的血小板活化因子受体(PAFR)拮抗剂。PAF 是由血小板和多种炎症组织分泌产生的一种内源性磷脂,可有效诱导血小板聚集,被称为心脑血管疾病的杀手。银杏内酯可通过对 PAFR 的特异性抑制作用,改善脑部血液循环及能量代谢,在预防和治疗心脑血管疾病方面显示了较好的市场前景[4]。近年的研究发现,银杏内酯类成分亦是甘氨酸受体(GlyR)强有力的拮抗剂,具有明显的中枢神经系统保护作用。

尽管银杏叶提取物及其制剂在近年来取得较快发展,但仍存在许多不足:①黄酮类成分的鉴别方法在识假、辨假方

[收稿日期] 2018-02-05
[基金项目] 国家"重大新药创制"科技重大专项(2013ZX09402203)
[通信作者] * 萧伟,研究员,博士,研究方向为中药新药研发与中药制药过程新技术研究,Tel:(0518)81152367,E-mail:kanionlunwen@163.com
[作者简介] 耿婷,博士,Tel:(025)87181863,E-mail:yilinger110@126.com

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

面具有很大的局限性,给改变工艺和添加非法物质带来可乘之机,尤其是 2015 年的“银杏叶事件”,部分厂家为降低成本而非法采用稀盐酸代替乙醇作为提取剂进行提取,严重影响了银杏叶提取物的安全性。而银杏内酯作为银杏叶的特征成分,是一类罕见的天然化合物,迄今尚未发现存在于其他植物中,提示银杏内酯类成分可作为银杏叶及制剂质量标准的重要指标[5]。②黄酮类成分具有广泛的药理活性,文献报道较多,而银杏内酯类成分的研究相对欠缺,尤其是构效关系、药代动力学特征等方面还有待深入研究。③银杏内酯类成分由于其特殊的刚性结构,不溶于水,生物利用度较差,使得药效难以充分发挥,极大地限制了银杏内酯类制剂的开发。因此,本文在进行系统文献调研的基础上,对银杏内酯类化学成分、构效关系、分析方法、生物活性及药代(ADME)特征等进行综述,以期为更好地开发利用银杏内酯提供参考依据。

1 银杏内酯类化学成分研究

1.1 银杏内酯类成分的发现 银杏内酯类成分主要包括二萜和倍半萜类结构,它们是目前为止发现的唯一拥有叔丁基官能团[$C_{17}(CH_3)_3$]的天然物质[6]。早在 20 世纪 30 年代,已有学者开展了银杏叶中活性成分的提取分离。1932 年,Furukawa 等[7]首次从银杏叶中分离得到银杏内酯 A,B,C。1967,Nakanishi[8-9]和 Sakabe[10]等采用化学和光谱等方法对其结构进行鉴定,并从银杏的根皮中分离得到银杏内酯 M,1971 年又从银杏叶中分离得到倍半萜类成分白果内酯[11]。随着科学技术的发展,1972 年 Weinges 等[12]利用核磁和质谱技术对白果内酯和银杏内酯 A,B,C 的结构进行鉴定,1987 年又从银杏叶中分离得到银杏内酯 J[13]。2001 年,王颖等[14]从银杏内酯提取物中分离得到银杏内酯 K 和银杏内酯 L。2009 年,Zhang 等[15]从银杏叶中分离出银杏内酯 N。2011 年,Liao 等[16]从银杏叶中分得 2 个微量成分银杏内酯 P 和银杏内酯 Q。在上述各成分中,银杏内酯 B,M,J,P 互为同分异构体;银杏内酯 Q 与银杏内酯 C 互为同分异构体。各成分的结构见图 1。

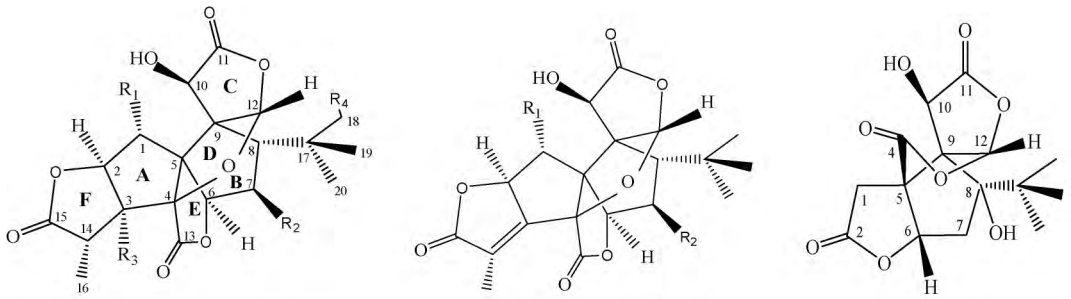

图 1 银杏内酯类成分的化学结构

Fig. 1 Structural formulas of ginkgo terpene lactones

1.2 银杏内酯类成分的结构特征 银杏内酯类成分中的二萜内酯具有独特的 20 碳骨架结构,嵌有 1 个天然化合物中罕见的叔丁基和 6 个五元环 A ~ F 形成的刚性骨架,其中包括 1 个螺-[4,4]-壬烷 A、1 个四氢呋喃环 D 和 3 个 γ-内酯环 C,E,F。其中,顺式的 F,A,D 和 C 环形成 1 个半球状笼式空洞,F 和 C 环为空洞的两平行边。四氢呋喃环 D 居于笼式的中心,螺环 A 处于空洞的顶部;D 环上的醚氧原子,F 和 C 环上的酯氧原子构成 1 个多齿系统。各银杏二萜内酯的差别仅是羟基数目和位置的不同,这些成分在一定条件下可以相互转化。同时,分子结构中 C_4-O-C_{12} 醚键和 C_4-C_6 内酯桥至关重要,若不含该醚键和内酯桥,则其抗 PAF 活性显著下降[17]。白果内酯是目前从银杏叶中发现的唯一 1 个倍半萜内酯,由 15 个碳原子组成,含有 4 个五元环,包括 1 个戊烷环和 3 个 γ-内酯环,同时侧链上亦含有 1 个叔丁基。实际上白果内酯是二萜内酯的环氧化开裂降解产物。

银杏二萜内酯 3 个 γ-内酯环的结构稳定性与溶解介质的 pH 密切相关,当介质为酸性时,内酯环的稳定性较好;为碱性时,内酯环易发生水解反应而开环。这一开环反应是可逆的,在强酸条件下,开环结构又可重新闭环生成银杏二萜内酯原型,且分子结构不会发生任何改变。Zekri 等[18]采用

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

电位测定法对银杏内酯在不同 pH 下的开环情况进行检测，采用 NMR 法进行结构鉴别。结果发现，当 pH 为 7 时，内酯环开始开环；当 pH 为 8 时，50% 的 F 环开环，20% 的 E 环开环；随着 pH 的增加，开环的程度也逐渐增大；当 pH 为 13 时，40% 的 E 环开环，C 环和 F 环则全部开环。其可能的开环途径见图 2。白果内酯在酸性条件下稳定性较好，而在 pH > 7 时内酯环即可发生水解反应而开环，且酸化后不会再重新闭合[19]。

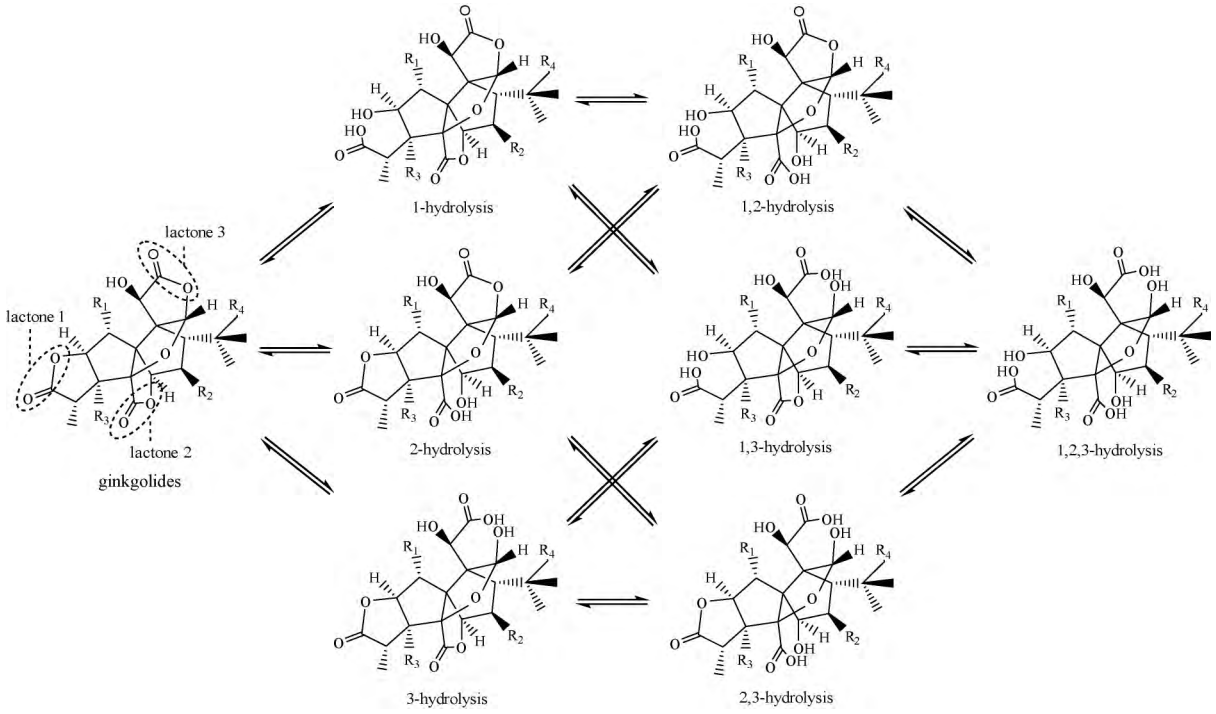

图 2　银杏内酯类成分可能的开环途径

Fig. 2　Theoretical hydrolysis pathways of ginkgolides

2　银杏内酯类成分的构效关系研究

2.1　拮抗 PAFR 活性的构效关系　银杏内酯对 PAF 具有强大的特异性抑制作用，能高度选择性地拮抗由 PAF 诱导的血小板聚集，从而防止血栓形成。因此，阐明该作用与银杏内酯结构的相关性，对进一步研制开发疗效更佳的银杏内酯类 PAF 受体拮抗剂具有重要意义。

王奎龙等[20-22]采用体外血小板聚集试验考察了系列银杏内酯类成分拮抗 PAF 的活性，发现其抑制能力大小为 GK > GB > GA > GC > GM > GJ > GL。其中，GA，GB，GC，GM 和 GJ 分子结构的差别仅在于含有羟基的数目和位置不同，而 GK 和 GB 的区别仅在于 F 环的双键结构，但它们拮抗 PAF 的能力却有明显的差异，说明银杏内酯类成分在结构上的微小变化就能产生较大的生物活性改变。胡立宏等[23]对银杏内酯(GB)的结构及其与 PAF 受体拮抗活性之间的关系进行了系统研究。基于大量数据的分析处理，构建了全息定量构效关系(QSAR)预测模型，阐释了原子的空间排列、疏水作用、静电作用及单个原子等影响 PAF 拮抗剂生物活性的方式。在充分考虑静电作用、疏水作用、氢键接受位点及供给位点信息的基础上，推论出 PAF 与银杏内酯配体可能的结合机制，见图 3，并经实验证明在 C-10 位多引入苄基的衍生物对拮抗活性更为有利。Nakanishi 等[24-25]在对一系列银杏内酯(GA，GB，GC 等)类似物结构及抑制常数 K_i 数据分析的基础上，归纳出银杏内酯与 PAF 的构效关系，见图 4，这一构效关系充分说明了 C，D 环及叔丁基存在对于活性的重要性。

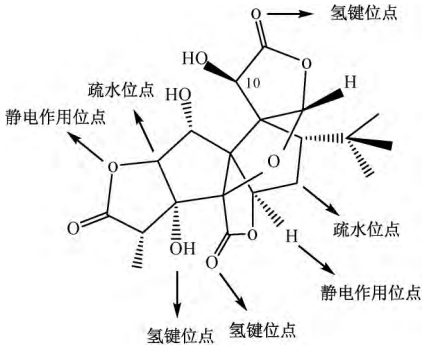

图 3　银杏内酯与 PAF 可能的结合机制

Fig. 3　The binding mechanism of ginkgolides and PAF

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

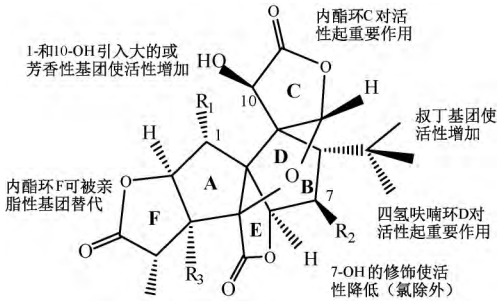

图4　银杏内酯与 PAF 的构效关系

Fig. 4　The structure-activity relationship of ginkgolides and PAF

2.2　拮抗 GlyR 活性的构效关系　甘氨酸受体(GlyR)是中枢神经系统的抑制性递质。甘氨酸受体与离子通道相偶联，参与介导成人中枢神经系统中的抑制性突出传递，是主要的神经抑制性调控受体之一。近年的研究证实，银杏内酯类成分对 GlyR 亦表现出明显的拮抗作用，因而具有中枢神经系统保护作用，且银杏内酯与 GlyR 的结合位点位于离子通道的中间。

研究发现[26]，具有 C-1 羟基的 GB，GC 和 GM 拮抗 GlyR 的活性均明显优于无 C-1 羟基的 GA 和 GJ，说明银杏内酯的 C-1 羟基对其拮抗 GlyR 活性具有重要作用。2004 年，Jaracz 等[27]通过成醚、成酯及引入氨甲酰基等方式对银杏内酯 C 的 C-1，C-7 和 C-10 位的羟基进行修饰，合成了 40 余种银杏内酯衍生物，并对其拮抗 GlyR 的活性进行考察，这也是银杏内酯衍生物与 GlyR 之间相互关系的首次报道。结果发现，各衍生物的活性均低于天然产物银杏内酯 C，说明羟基的存在对拮抗 GlyR 活性的重大作用。2007 年，Nakanishi 等[28]运用 GlyR 的 $\alpha1$，$\alpha1\beta$ 和 $\alpha2$ 3 种亚型对 5 种天然银杏内酯 A，B，C，J，M 及 29 种类似物进行研究，以期寻找银杏内酯拮抗 GlyR 活性的最简单结构。同样发现，各类似物的活性均不如 5 种天然银杏内酯，且 GM 的活性最优。随后进一步根据药效团模型进行虚拟筛选，证明银杏内酯分子的紧凑结构对 GlyR 拮抗活性至关重要。这一构效关系与银杏内酯类成分拮抗 PAF 的构效关系是截然不同的。

3　银杏内酯类成分的分析方法研究

银杏内酯的含量是银杏叶及其制剂质量控制的关键指标，但是由于银杏内酯在银杏叶中的含量很低，一般的分析方法很难测定，目前文献报道的主要有 TLC，GC-MS，HPLC，^{1}H-NMR 等。其中 TLC 重现性差，受环境和操作影响大，而 GC-MS 需衍生化，操作复杂。下面仅对常用的检测方法进行介绍。

3.1　HPLC-UV　高效液相色谱法是目前应用最广泛的分离分析方法，而紫外检测器也是最常见的检测器。Pietta 等[29]采用 HPLC-UV，以异丙醇与水为流动相，对银杏内酯提取物中银杏内酯 A，B，C 和白果内酯进行了定性和定量分析。雷凯琴等[30]采用 HPLC，以甲醇-水为流动相，选用 225 nm 检测波长，建立了银杏内酯提取物和银杏总内酯中银杏内酯 A，B，C 和白果内酯的含量测定方法。该方法简便，准确，快速，能够用于银杏总内酯和各原料的含量测定。

3.2　HPLC-ELSD　尽管紫外检测器可用于银杏内酯的定量分析，但由于该类化合物的紫外吸收较差，且在银杏提取物中含量较少，因此在检测时，容易受到其他类型成分的干扰。目前，银杏内酯的检测多采用蒸发光检测器(ELSD)。韩林涛等[31]采用 ELSD 检测器，以甲醇-四氢呋喃-水(20∶8∶72)为流动相，建立了银杏叶片中 GA 和 GC 的含量测定方法。伍清龙等[32]采用 HPLC-ELSD，以四氢呋喃-甲醇-水为流动相，建立了银杏二萜内酯葡胺注射液中 GA，GB，GC 和 GK 的含量测定方法。该方法简便准确，重复性好，可有效应用于制剂的质量控制。

3.3　HPLC-RID　示差折光检测器(RID)是一种通用型检测器，利用物质之间不同的折射率进行定性、定量分析。马海霞等[33]采用甲醇-水(28∶72)为流动相，建立了银杏达莫注射液中 GA，GB，GC 和 BB 的 HPLC-RID 快速测定方法。袁传勋等[34]以甲醇和水为流动相，采用 Symmetryshield 型 C_{18} 色谱柱(3.9 mm×150 mm，5 μm)，RID 检测器，建立了银杏叶提取物中 GA，GB，GC 和 BB 的含量测定方法。

3.4　HPLC-MS　液质联用技术(HPLC-MS)具有高选择性、高灵敏度等优点，可实现成分的快速高效检测。周欣等[35]以甲醇和水为流动相，采用 SIM 扫描模式，电喷雾离子源，建立了银杏提取物中银杏内酯 A，B，C 和白果内酯的 LC-MS 分析检测方法。沈涛等[36]采用多反应检测模式(MRM)，以甲醇-水为流动相，电离方式为电喷雾正离子，建立了银杏叶中银杏内酯和白果内酯 LC-MS/MS 的定量分析方法，并将该方法应用于不同采摘时间银杏叶中银杏内酯和白果内酯的含量测定，为确定最佳采收期提供数据支持。

3.5　^{1}H-NMR　氢核磁共振(^{1}H-NMR)目前多用于定性分析，通过化学位移(δ)、谱线积分面积、裂分情况等提供分子中质子的类型等信息，从而对化合物的结构进行分析。Choi 等[37]基于银杏内酯类结构上均有 H-12，核磁共振法对银杏叶中的银杏内酯 A，B，C 和白果内酯进行定量分析，该方法具有分析时间短，且所分析的样品不需任何色谱纯化过程的优势。Teris 等[38]以马来酸为内标，建立了白果内酯和银杏内酯 A，B，C 和 J 的 ^{1}H-NMR 定量分析方法，该方法的重现性和灵敏度可与 HPLC-IR 相媲美，且可显著减少分析时间。

4　银杏内酯类成分的生物活性研究

4.1　拮抗 PAF 作用　银杏内酯是天然的 PAF 受体拮抗剂，可高度选择性地拮抗由 PAF 诱导的血小板聚集。研究表明，GB 可抑制 PAF，ADP 诱导的血小板聚集，提升血小板中 eNOS 总蛋白含量，抑制血栓形成[39]，且 GA，GB 共用较 GB 单用对抗血小板聚集能力更强，说明两者间存在协同作用[40]。GB 还可通过抑制 PAF，调节信号通路中 caspase 3，

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

细胞色素 C，Ca^{2+} 浓度和 p38 活化蛋白(MAPK)，对阿霉素导致的大鼠心肌毒性具有一定治疗作用[41]。Stefanie 等[42]研究发现，银杏内酯可上调胚胎大鼠心肌梗死细胞模型中 PAF 受体的 mRNA 表达和蛋白表达，进而保护心肌细胞。

4.2　改善脑缺血作用　脑缺血再灌注时，易发生脑细胞内 Ca^{2+} 超载，造成细胞内蛋白质破坏。银杏内酯可提升缺血脑组织中降钙素基因相关肽(CGRP)的含量，保护缺氧缺血脑细胞[43]；GB 可下调 Ca^{2+} 超载引起的 IP3-IP3R 通路表达的增加，减少脑组织中 Ca^{2+} 浓度[44]。华骏等[45]研究发现，BB 可减少缺血再灌注(I/R)模型小鼠恢复期脑梗死面积，降低脑含水量，在 24 h 后给药能够发挥缺血性脑损伤后期脑组织保护作用。另有研究表明[46]，GK 在小鼠局灶性脑缺血再灌注(tMCAO)损伤恢复期具有促血管再生作用，并于急性期参与神经保护，下调小鼠脑内神经营养因子 BDNF，GDNF 和 FGF-2 的表达水平。GK 对神经细胞的保护作用较 GB 和 BB 强[47]。

4.3　神经保护作用　银杏内酯可调节神经细胞的凋亡。Ahlemeyer 等[48]研究了银杏内酯对无血清或星形孢菌素处理的鸡神经元凋亡的影响，发现经 GB，GJ 和 BB 处理后，鸡神经元凋亡明显减少，其中 BB 的抗凋亡能力最强，GA 作用不明显。缺血缺氧模型大鼠动物实验表明，GB 抑制神经元凋亡最显著的时间点为缺血缺氧后 24 h[49]，GB 抗凋亡的机制与抑制 NF-κB 活性有关[50]，同时可能影响 JAK-STAT，PI3K/AKT 等信号通路[51]。另外，GK 可保护 PC12 细胞免于谷氨酸诱导的细胞凋亡，显著回调谷氨酸引起的异常生化指标(MDA，SOD，GSH-PX，LDH，ROS)和 Bax/Bcl-2，caspase-3 蛋白指标等[52]。GN 亦可抑制 PC12 神经细胞的凋亡，对 MCAO 损伤大鼠的神经具有保护作用[53-54]。

此外，银杏内酯还具有抗氧化、抗炎、抗休克、抗焦虑/抑郁以及改善记忆能力等作用。

5　银杏内酯类成分的 ADME 研究

5.1　吸收动力学研究　银杏内酯类成分的吸收主要受温度、pH 和 p-gp 外排蛋白的影响。Madgula 等[55]研究发现，银杏内酯在 Caco-2 细胞模型中主要以被动扩散的方式被细胞摄取和转运，药物的摄取与时间呈正相关，吸收具有 pH 依赖性。李川等[56]采用 LC-MS/MS 法考察了银杏叶提取物经大鼠口服给药后各银杏内酯的绝对生物利用度，分别为 GA: 51.5% ~ 58.2%；GB: 32.9% ~ 39.7%；GC: 5.1% ~ 9.9%；GJ: 32.9% ~ 34.7%；BB: 60.4% ~ 63.5%。连续给药 7 d 后，各成分均无明显的体内蓄积现象。司海红等[57]考察了 GA，GB 和 BB 单体成分在大鼠体内的绝对生物利用度，分别为 61.1%，27.2%，56.2%。Kressmann 等[58]研究发现，提取物的类型和给药剂型等对其药代动力学特征和绝对生物利用度影响较大，即药学等效未必生物等效。如与粗粉相比，银杏内酯 A，B，C 纳米冻干粉具有更短的 T_{max}，而 C_{max} 和 AUC 均为粗粉剂的 2 倍，表明适宜的药剂手段可有效改善药物吸收[59]。

5.2　组织分布研究　银杏内酯(GA，GB，GK，GL)经大鼠静脉给药后，可快速分布至各组织，以肝脏和肾脏为主，并可在 4 ~ 6 h 迅速消除[60-61]。银杏内酯在健康大鼠的脑组织中含量极低[62]，在缺血性脑组织中含量明显升高，说明脑缺血可改变银杏内酯的体内分布行为[63]。另外，剂型改进及联合用药，亦可有效改善药物的脑组织分布水平。杨鹏飞等[64]设计了 GB 油体纳米乳剂，药动和药效学结果发现，该剂型可明显增加脑内 GB 含量，改善大鼠记忆力，为 GB 在阿尔茨海默病(AD)的应用提供参考。王磊等[65]发现 GB 合用免疫抑制剂环孢素 A(CyA)，可抑制脑组织中 P-gp 的外排，有效增加 GB 在脑中的分布。

5.3　代谢转化研究　汪电雷等[66]研究发现，GB 经大鼠静脉给药后，在体内存在闭环和水解形式的平衡状态，平均排泄量约为 1∶1。由于内酯类成分的水解反应具有重要生理作用，因此银杏内酯的体内特征描述应对原型和水解产物结合考虑。Liu 等[67]采用超临界流体色谱串联三重四极杆质谱(SFC-QQQ MS)技术，对大鼠血浆中的 3 种银杏内酯(GA，GB 和 GC)和 6 种水解产物进行同时定量，并将其成功应用于银杏提取物静脉给药后的药动学研究。耿婷等[68]对银杏二萜内酯葡胺注射液在人尿液中的代谢产物进行分析，共检测出 12 个代谢产物，其中 GA 和 GB 的代谢途径主要为羟基化和内酯环水解，并进一步参与Ⅱ相代谢共价结合生成硫酸酯类化合物，GB 还可生成葡萄糖醛酸或谷胱甘肽结合物，GK 的主要代谢途径为甲基化葡萄糖醛酸结合反应。

5.4　排泄动力学研究　肾脏是主要的排泄器官。Qiu 等[69]研究了肾脏中药物转运蛋白在 GB 尿液排泄中的潜在作用，发现有机阴离子转运蛋白/多肽可影响 GB 的肾排泄，但多药耐药蛋白对 GB 肾排泄影响较小。Dew 等[70]研究发现，口服银杏补充剂的健康参与者 24 h 尿液中，GA，GB，GC，GJ，BB 均可完好排出，GA，GB，BB 的入尿情况存在剂量依赖性。王磊等[65]发现 CyA 可对 GB 的血药浓度、排泄能力造成影响，可显著提高 GB 的血药浓度，减少肾脏排泄。

6　创新制剂的开发

传统的银杏内酯制剂存在生物利用度低、半衰期短、不易通过血脑屏障等缺陷，严重限制了其在临床的应用。近年来，学者们重点通过提高银杏内酯类成分的溶解度、延长药物的作用时间、提高生物利用度等途径进行了银杏内酯新型制剂的开发。主要的技术手段有自微乳化释药系统、固体分散体技术、缓/速释技术、纳米粒/脂质载体技术等。

郭梦翔等[71]以自微乳化释药系统为载体制备了银杏内酯 B 的自微乳化制剂，粒径为(41.6 ± 1.11) nm，透射电镜下呈圆球形，分布均匀，自微乳化时间大约 2 min。制剂质量稳定，可显著提高药物的溶解度和生物利用度。韩丽妹等[72]通过固体分散体增溶技术与渗透泵片控释技术相结合的策略，首先将银杏内酯制成固体分散体，提高难溶性成分的溶

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

解度,再进一步制成银杏内酯渗透泵片,实现银杏内酯中复杂成分的同步缓慢释放,减少给药次数,提高患者顺应性。萧伟和唐星等[73]发明了一种银杏内酯 B 的无定形固体分散体,将银杏内酯 B 与药用辅料先经干法研磨微粉化处理,使药物与载体形成粒径 < 10 μm 的共晶,降低其熔点至 300 ℃,后控制挤出温度为 60 ~ 180 ℃以一定速率热熔挤出制备而成。结果发现,体外溶出实验 30 min 内,溶出量 > 80%,且与普通片相比生物利用度极大提高。同时,该课题组还发明了一种银杏内酯 B 的速释微丸[74],该微丸由空白丸芯和含药层组成,质量比为 1∶1.1 ~ 10.0;含药层由银杏内酯 B、晶体稳定剂及固化稳定剂组成,银杏内酯 B 与固化稳定剂的质量比为 1∶1.0 ~ 2.5。该制剂在提高载药量的同时,起效快,吸收好,安全稳定,亦能显著提高体内生物利用度。付艳等[75]采用共沉淀法制备了银杏内酯 PELGE 纳米粒,所得纳米粒外观圆整,包封率为(66.9 ± 1.7)%,粒径为(123.3 ± 44.0) nm,体外 24 h 累积释放率为 60.2%,可有效延缓药物释放。

7 展望

银杏分布于我国大部分地区,拥有量占世界总量的 70% 以上,资源丰富,种植历史悠久,药用价值和经济效益极高。但是,我国银杏叶提取物及其制剂的质量控制标准与欧美等发达国家还存在一定差距,尤其是"银杏叶事件"警示应进一步规范银杏内酯提取工艺,重视和加强银杏叶及其制剂质量评价标准的提高,可将指纹图谱等技术有效应用于质量控制中,使中药所含有的多种化学成分整体可视化,避免生产过程中不投料、少投料、二次提取后直接添加含量测定的指标成分等问题,同时保证临床用药安全,向国际化标准靠拢。

银杏内酯作为银杏叶的重要活性成分,其独特的生理活性,复杂的结构,较低的毒性,正引起越来越多学者的关注。目前,部分银杏内酯制剂,如银杏二萜内酯葡胺注射液、银杏内酯注射液等已在临床上得到有效应用,主要用于预防和治疗动脉粥样硬化以及缺血性中风、脑梗死等,疗效显著。但同时也应关注临床使用过程中药物不良反应的发生,避免与抗凝药物等联合应用,以防因合用药而导致药物相互作用,进而产生毒副作用。

随着科学技术的发展,为了更好地解决银杏内酯类成分水溶性差、生物利用度低等问题,学者们亦积极研制各种银杏内酯的新型制剂,以期提高药物的安全性和有效性。虽然目前已取得一定的进展,但仍处于试验研究阶段,未来任重而道远。另外,银杏内酯组合物协同增效及其机制研究、银杏内酯治疗青光眼、降血压等新用途等均是以后研究的重要方向,需要我们进一步探索。

参考文献

[1] Jacobs B P, Browner W S. *Ginkgo biloba*: a living fossil [J]. Am J Med, 2000, 108: 341.

[2] Akiba S, Kawauchi T, Oka T, et al. Inhibitory effect of the leaf extract of *Ginkgo biloba* L. on oxidative stress-induced platelet aggregation [J]. Biochem Mol Biol Int, 1998, 46(6): 1243.

[3] Adnot S, Lefort J, Braquet P, et al. Interference of the PAF-acether antagonist BN 52021 with endotoxin-induced hypotension in the guinea-pig [J]. Prostaglandins, 1986, 32(6): 791.

[4] Adnot S, Lefort J, Lagente V, et al. Interference of BN 52021, a PAF-acether antagonist, with endotoxin-induced hypotension in the guinea-pig [J]. Pharmacol Res Commun, 1986, 18(4): 197.

[5] 刘丹,张振海,陈小云,等. 银杏内酯组分固体分散体微丸释药单元的制备 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(6): 1002.

[6] 刘彬果,张新萍,刘岩,等. 银杏叶中萜内酯类化合物的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2011, 29(6): 421.

[7] Furukawa S. Studies on the constituents of *Ginkgo biloba* L. leaves [J]. Chem Res, 1932, 19: 27.

[8] Maruyama M, Terahara A, Itagaki Y, et al. The ginkgolides. Ⅰ. Isolation and characterization of the various groups [J]. Tetrahedron Lett, 2015, 8(4): 299.

[9] Nakanishi K. The ginkgolides [J]. Pure Appl Chem, 1967, 14(1): 89.

[10] Sakabe N, Takada S, Okabe K. The structure of ginkgolide A, a novel diterpenoid trilactone [J]. Chem Comm, 1967, 6(6): 259.

[11] Nakanishi K, Habaguchi K, Nakadaira Y, et al. Structure of bilobalide, a rare tert-butyl containing sesquiterpenoid related to the C20-ginkgolides [J]. J Am Chem Soc, 1971, 93(14): 3544.

[12] Weinges K, Bahr W. Natural products from medicinal plants. XVI. A comparison of the NMR- and mass spectra of bilobalide $C_{15}H_{18}O_8$ and of the ginkgolides $C_{20}H_{24}O_9$ [J]. Justus Liebigs Ann Chem, 1972, 759: 158.

[13] Beek T A V, Lelyveld G P. Preparative isolation and separation procedure for ginkgolides A, B, C, and J and bilobalide [J]. J Nat Prod, 1997, 60: 735.

[14] 王颖,盛龙生,楼凤昌. 银杏内酯提取物中微量成分的 LC-DAD-ESI-MS 分析及结构鉴定 [J]. 药学学报, 2001, 36(8): 606.

[15] Zhang X T, Li Y, Zhang L H, et al. A new ginkgolide from *Ginkgo biloba* [J]. J China Pharm, 2009, 40(4): 306.

[16] Liao H J, Zheng Y F, Li H Y, et al. Two new ginkgolides from the leaves of *Ginkgo biloba* [J]. Planta Med, 2011, 77(16): 1818.

[17] 夏晓晖,张宇,郗砚彬,等. 银杏叶化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 100.

[18] Zekri O, Boudeville P, Genay P, et al. Ionization constants of ginkgolide B in aqueous solution [J]. Anal Chem, 1996, 68(15): 2598.

[19] 李洪成. 一种倍半萜内酯类组合物新药的稳定性研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.

[20] 徐君,王奎龙,曹泽彧,等. 银杏二萜内酯类化合物拮抗 PAF 诱导的血小板聚集及对神经细胞的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24): 4716.

[21] 王奎龙,李卓琼,曹泽彧,等. 银杏二萜内酯 A、B、K 抗血小板聚集作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(24): 4722.

[22] 陶晓倩，曹泽彧，曹亮，等. 银杏二萜内酯 K 抗血小板聚集及神经保护作用研究 [J]. 中国中药杂志，2017，42(24): 4727.

[23] Zhu W, Chen G, Hu L, et al. QSAR analyses on ginkgolides and their analogues using CoMFA, CoMSIA, and HQSAR [J]. Bioorgan Med Chem, 2005, 13(2): 313.

[24] Strømgaard K, Nakanishi K. Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba* [J]. Angew Chem Int Edit, 2004, 43(13): 1640.

[25] Nakanishi K. Terpene trilactones from *Gingko biloba*: from ancient times to the 21st century [J]. Cheminform, 2005, 36(47): 4987.

[26] 常玉，丁克，蒋建勤. 银杏内酯类化合物的结构修饰与构效关系研究进展 [J]. 中药材，2013，36(3): 497.

[27] Kondratskaya E L, Krishtal O A. Effects of *Ginkgo biloba* extract constituents on glycine-activated strychnine-sensitive receptors in hippocampal pyramidal neurons of the rat [J]. Neurophysiology, 2002, 34(2): 155.

[28] Jaracz S, Nakanishi K, Jensen A A, et al. Ginkgolides and glycine receptors: a structure-activity relationship study [J]. Chemistry, 2004, 10(6): 1507.

[29] Pietta P G, Mauri P L, Rava A. Analysis of terpenes from *Ginkgo biloba* L. extracts by reversed phase high-performance liquid chromatography [J]. Chromatographia, 1990, 29(5): 251.

[30] 雷凯琴，李旭红，苏一多. 用 HPLC-UV 法测定银杏萜类内酯的含量 [C]. 北京: 第九届全国中药和天然药物学术研讨会，2007.

[31] 韩林涛，黄芳. HPLC 法测定银杏叶片中萜类内酯的含量 [J]. 湖北中医杂志，2009，31(9): 74.

[32] 伍清龙，孙永成，万琴，等. HPLC-ELSD 法测定注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K [J]. 现代药物与临床，2014，29(3): 255.

[33] 马海霞，王秋萍，吴竹，等. HPLC-RID 测定银杏达莫注射液中银杏内酯含量 [J]. 药物分析杂志，2015，35(9): 1664.

[34] 袁传勋，潘见，胡学桥，等. HPLC-RI 法测定银杏叶提取物中 4 种内酯的含量 [J]. 药物分析杂志，2008，28(5): 739.

[35] 周欣，张雪琴，袁牧，等. 液相色谱-电喷雾质谱定量测定银杏内酯的研究 [J]. 中国中药杂志，2005，30(24): 1915.

[36] 沈涛等，高彦慧，娄红祥. LC-MS/MS 快速测定不同采摘时间银杏叶中银杏内酯和白果内酯的含量 [J]. 中国药学杂志，2008，43(5): 380.

[37] Choi Y H, Choi H K, Hazekamp A, et al. Quantitative analysis of bilobalide and ginkgolides from *Ginkgo biloba* leaves and ginkgo products using ^{1}H-NMR [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(2): 158.

[38] Teris A, Beek A, Gerrit P. Quantitation of bilobalide andginkgolides A, B, C and J by means of nuclear magneticresonance spectroscopy [J]. Phytochem Anal, 1993, 4: 261.

[39] 张小丽，韦晟. 银杏内酯 B 抑制血小板活化研究 [J]. 全科医学临床与教育，2015(2): 135.

[40] 任佳伟，宋玉. 银杏叶有效成分抗血小板聚集和清除 DPPH 自由基的量效关系和协同作用 [J]. 世界科学技术——中医药现代化，2015(11): 2367.

[41] Yan W, Xuan C, Xuan L, et al. BN52021 protects rat cardiomyocyte from doxorubicin induced cardiotoxicity. [J]. Int J Clin Exp Patho, 2015, 8(2): 1719.

[42] Stefanie Maerz, Liu C H, Guo W, et al. Anti-ischaemic effects of bilobalide on neonatal rat cardiomyocytes and the involvement of theplatelet-activating factor receptor [J]. Biosci Rep, 2011, 31(5): 439.

[43] 谢立新，方芳，刘志晖，等. 银杏内酯上调 CGRP 对大鼠脑缺血再灌注损伤产生保护作用 [J]. 中国药理学通报，2004，20(9): 993.

[44] 黄贱英. 银杏内酯 B 抗脑缺血作用及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学，2005.

[45] 华骏. 白果内酯对缺血性脑损伤的神经保护作用及其机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学，2017.

[46] 陈萌. 银杏内酯 K 通过激活 JAK2/STAT3 通路发挥脑缺血再灌注后促血管再生作用 [D]. 南京: 南京医科大学，2017.

[47] 卞雅琦. 银杏内酯 K 对脑缺血再灌注急性期损伤的保护作用及机制 [D]. 南京: 南京医科大学，2016.

[48] Ahlemeyer B, Möwes A, Krieglstein J. Inhibition of serum deprivation- and staurosporine- induced neuronal apoptosis by *Ginkgo biloba* extract and some of its constituents [J]. Eur J Pharmacol, 1999, 367(2/3): 423.

[49] 王军，杜江华，程萍萍，等. 银杏内酯 B 对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠脑神经元凋亡及 P-AKT(ser473) 表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志，2017，39(9): 646.

[50] Gu J H, Ge J B, Li M, et al. Inhibition of NF-κB activation is associated with anti- inflammatory and anti-apoptotic effects of ginkgolide B in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 47(4): 652.

[51] 程萍萍. 银杏内酯 B 对 HIBD 新生大鼠脑细胞凋亡的影响及其机制研究 [D]. 郑州: 郑州大学，2017.

[52] Ma S, Liu H, Jiao H, et al. Neuroprotective effect of ginkgolide K on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells via inhibition of ROS generation and Ca^{2+} influx [J]. Neurotoxicology, 2012, 33(1): 59.

[53] 赵珍东，夏黎，张现涛，等. 银杏叶内酯 N 对 PC12 细胞凋亡的保护作用 [J]. 中国老年学，2017，37(15): 3656.

[54] 张现涛，梁军，刘红霞，等. 银杏叶内酯 N 对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18(1): 141.

[55] Madgula V L, Avula B, Yu Y B, et al. Intestinal and blood-brain barrier permeability of ginkgolides and bilobalide: *in vitro* and *in vivo* approaches [J]. Planta Med, 2010, 76(6): 599.

[56] Chen F, Li Li, Li C, et al. Systemic and cerebral exposure to and pharmacokinetics of flavonols and terpene lactones after dosing standardized *Ginkgo biloba* leaf extracts to rats via different

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

toutes of administration [J]. Brit J Pharmacol,2013, 170: 440.

[57] 司海红, 耿婷, 孙晓萍, 等. 银杏内酯类化合物在大鼠体内的绝对生物利用度研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2882.

[58] Wonnemann M. Influence of pharmaceutical quality on the bioavailability of active components from *Ginkgo biloba* preparations [J]. J Pharm Pharmacol, 2002, 54(11): 1507.

[59] Rui T Q, Zhang L, Qiao H Z, et al. Preparation and physicochemical and pharmacokinetic characterization of ginkgo lactone nanosuspensions for antiplatelet aggregation [J]. J Pharmaceut Sci, 2016, 105(1): 242.

[60] Fan Z Y, Liu X G, Guo R Z, et al. Pharmacokinetic studies of ginkgolide K in rat plasma and tissues after intravenous administration using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2015, 988: 1.

[61] Wang J X, Liu X G, Fan Z Y, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution study of ginkgolide L in rats by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2015, 1006: 30.

[62] Wang S, Ouyang B, Aa J, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of ginkgolide A, ginkgolide B, and ginkgolide K after intravenous infusion of ginkgo diterpene lactones in a rat model [J]. J Pharmaceut Biomed, 2016, 126: 109.

[63] 梅世昌, 白林, 陈卫东, 等. 银杏内酯 B 在中脑缺血/再灌后大鼠脑组织分布 [J]. 解放军药学学报, 2009, 25(2): 159.

[64] Yang P, Cai X, Zhou K, et al. A novel oil-body nanoemulsion formulation of ginkgolide B: pharmacokinetics study and *in vivo* pharmacodynamics evaluations [J]. J Pharm Sci, 2014, 103(4): 1075.

[65] 王磊, 李宁, 韩德恩, 等. 环孢素 A 对银杏内酯 B 大鼠体内药动学的影响 [J]. 药学学报, 2009(6): 632.

[66] Wang D L, Peng D Y, Tao X H, et al. The pharmacokinetics and conversion of the lactone to the carboxylate forms of ginkgolide B in rat plasma [J]. J Asian Nat Prod Res, 2013, 15(4): 337.

[67] Liu X G, Qi L W, Fan Z Y, et al. Accurate analysis of ginkgolides and their hydrolyzed metabolites by analytical supercritical fluid chromatography hybrid tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2015, 1388: 251.

[68] 耿婷, 张射兵, 李艳静, 等. LC-MS/MS 分析银杏二萜内酯葡胺注射液在人尿液中的代谢产物 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017(11): 90.

[69] Qiu Z, Wang L, Dai Y, et al. The potential drug-drug interactions of ginkgolide B mediated by renal transporters [J]. Phytother Res, 2015, 29(5): 662.

[70] Dew T P, Wang G, Williamson G. Urinary excretion of ginkgolide terpene lactones following acute consumption of *Ginkgo biloba* extract [J]. Biofactors, 2013, 40(2): 268.

[71] 郭梦翔, 胡海燕, 唐仕波, 等. 银杏内酯 B 自微乳化释药系统的制备及质量评价 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 2967.

[72] 韩丽妹, 王建新, 马琳怡, 等. 银杏内酯渗透泵片及其制备方法: 中国, CN103142532A [P]. 2013-06-12.

[73] 萧伟, 唐星, 王振中, 等. 热熔挤出法制备银杏内酯 B 无定形固体分散体: 中国, CN105412021A [P]. 2016-03-23.

[74] 萧伟, 唐星, 王振中, 等. 一种银杏内酯 B 速释微丸及其制备方法: 中国, CN105412022A [P]. 2016-03-23.

[75] 付艳, 张志荣, 韩丽妹, 等. 银杏内酯 PELGE 纳米粒的制备及理化性质 [J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(6): 431.

[责任编辑　孔晶晶]

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net