

银杏外种皮中活性成分的分离与鉴定

王 锋¹, 李稳宏¹, 李多伟², 毛秀光², 高丽雅¹

(1. 西北大学 化工学院; 2. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要:报道了一种通过溶剂提取, 乙醚和碱液萃取, 以及酸还原, 由银杏外种皮为原料得到氢化白果酸、白果酚、银杏黄酮类物质的新工艺方法, 利用薄层层析、高效液相色谱、红外光谱对产品进行的定性定量测量和结构分析。初提物生物测定结果表明: 对几种常见菌的抑制率为 60%~80%, 对几种常见害虫的杀虫率 70%~80%。纯化物活性测定结果表明: 黄酮类物质对几种菌的抑制率均超过 70%, 氢化白果酸对小麦白粉菌治疗和保护作用可分别大于 80%。

关键词:银杏外种皮; 活性成分; 分离纯化; 生物测定

中图分类号: TQ028.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274 X (2003)06-689-04

银杏(*Ginkgo biloba* L)又名公孙树, 是最古老的中生代子遗植物之一。多年以来, 人们对银杏叶、白果在药用、化妆品的开发利用方面投入很多, 而银杏外种皮却开发利用很少。为此, 笔者以银杏外种皮为原料对其中活性成分的提取工艺、分析方法, 以及杀虫、杀菌应用进行了研究。

1 实验部分

1.1 仪器、样品及试剂

1) 仪器。日本岛津 CS-930 型双波长薄层色谱扫描仪; 紫外分析仪; Waters 高效液相色谱仪; X-4 熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司)。

2) 样品及试剂。白果酸标准品(贵州大学生化中试基地提供, 纯度 $\geq 90.8\%$); 银杏外种皮(江苏泰兴市胡庄镇提供, 原植物标本经西北大学生命科学学院鉴定)。

甲醇为一级色谱纯, 其余有机试剂均为分析纯。

小麦赤霉病菌、辣椒疫霉病菌、番茄灰霉病菌、苹果炭疽病菌和玉米大斑病菌等(均由西北农林科技大学植物保护学院植物病理教研室提供)。

1.2 分析方法

1.2.1 高效液相色谱(HPLC)分析条件 HPLC 主要用于优化条件下产品中氢化白果酸含量的分析测

定。

1) 色谱工作条件。反相色谱柱 Symmetry C₁₈ 5 nm, 4.6 mm×150 mm, 流动相为甲醇:5%乙酸(9:1), 流速 1 mL/min, 在 310 nm 紫外检测氢化白果酸。

2) 样品处理。称取样品 25 mg 定容于 25 mL 容量瓶中, 高速离心, 取上清液 5 μ L 进样。

3) 工作曲线的制作。精确称取氢化白果酸 1 mg 用乙醇定容于 2 mL 容量瓶中。经预处理, 在上 HPLC 条件下分别进样 2, 4, 6, 8, 10 μ L, 得氢化白果酸工作曲线 $Y = -191\ 623.382\ 3 + 663\ 521.617\ 65\ X$, $R = 0.992\ 86$, 线性范围: 0~5 μ g。

1.2.2 薄层色谱扫描(TLC)分析条件 TLC 主要用于在试验条件研究产品氢化白果酸的含量的测定。

1) 薄层条件。硅胶 G 3.5 g 加入 0.5% CMC-Na 溶液约 10 mL, 研磨成稠状, 铺成 10 cm×15 cm 的薄板, 室温晾干, 在 105 C 活化 30 min。

2) 扫描条件。经对白果酸标准溶液的薄层斑点和样品溶液薄层斑点的对应点作光谱扫描。以 310 nm 为测定波长, 灵敏度 $\times 2$, 狭缝宽 2 nm \times 2 nm, 线性化参数 $S_x = 3$, 做反射锯齿扫描。

3) 展开剂。石油醚-乙酸乙酯-乙酸的比例为:。

收稿日期: 2002-04-28

基金项目: 陕西省教育厅重大产业培育项目(EH02337); 江苏泰德银杏制品有限公司委托开发课题(2001)

作者简介: 王 锋(1977-), 男, 陕西蒲城人, 西北大学硕士生, 从事天然植物有效成分提取、分离研究。

18:1:1。

4) 工作曲线的制作:精密吸取白果酸标准溶液 1,2,3,4,5 μ L (1~5 μ g/点),点于同一薄层板上,按实验条件展开,扫描,以斑点面积积分值为纵坐标,斑点浓度为横坐标做图,5次重复实验结果统计,浓度在每点 1~5 μ g 范围内呈线性关系,回归方程: $Y=0.0298+0.1791X$, $R=0.9963$ 。低于这个浓度薄层斑点不易检出,高于这个浓度薄层斑点拖尾严重。

1.2.3 分光光度法分析条件^[1] 分光光度法主要用于产品中黄酮类物质的分析。

1) 预处理。将一定量的样品液置于 25 mL 容量瓶中,用 30%乙醇补充至 12.5 mL,加入 0.7 mL NaNO_2 (1:20),摇匀,静置 5 min 后加入 0.7 mL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (1:10),6 min 后加入 5 mL 1 mol/L 的

NaOH ,摇匀,用 30%乙醇稀释至刻度,10 min 后于 510 nm 波长进行检测,试剂作为空白参比。

2) 工作曲线的制作。称量芦丁标准品 0.005 2 g 溶于 50 mL 容量瓶中,分别取 1,2,3,4,5 mL 于 10 mL 容量瓶中,按预处理方法进行测定。回归方程 $Y=-0.0014+9.58242X$, $R=0.99997$,线性范围 0~0.052 mg/mL。

1.3 分离纯化工艺过程

1.3.1 分离原理与流程 银杏外种皮的主要成分与银杏果、叶所含的成分相似,主要有白果酚、氢化白果酸、银杏黄酮、银杏内酯等^[2,3]。其初提物活性成分杀虫、抑菌效果有过一些简单报道^[4]。对外种皮中活性成分的分离曾有柱层析、化学分离等方法^[5,6]。本研究利用外种皮中各活性成分的物理化学性质,设计了一条提取分离工艺路线(见图 1)。

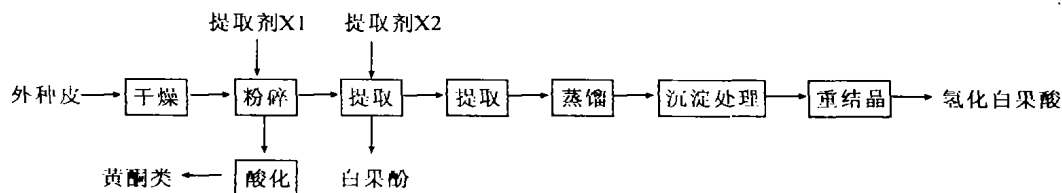


图 1 外种皮活性成分提取工艺流程

Fig. 1 The schematic diagram of extracting active compounds from the testa of *Ginkgo biloba* L

1.3.2 操作步骤 将外种皮在 70 $^{\circ}$ C 干燥 24 h 后粉碎至 $\Phi 0.51$ mm,在一定温度下用乙醇搅拌提取 3 次,合并提取液抽滤,滤液浓缩至约 100 mL,浓缩液经乙醚萃取,将乙醚萃取液合并过滤,常压浓缩,回收乙醚。分别用 Na_2CO_3 , NaOH 溶液萃取乙醚浓缩液,得萃余相,即红棕色液体,经真空蒸馏可得无色液体,即白果酚。调节 Na_2CO_3 萃取相 pH 有黄色粉末析出,收集结晶即得黄酮类物质。 NaOH 萃取相经铅盐沉淀处理、酸性还原,再用甲醇重结晶即可得氢化白果酸晶体。

2 结果与讨论

2.1 氢化白果酸的鉴定

白色晶体氢化白果酸样品 TLC 分析。对白果酸标准溶液和样品溶液薄层斑点的对应点在 200~400 nm 范围内进行光谱扫描,在 315 nm 处均有最大吸收峰,峰形相同。TLC 分析表明:氢化白果酸、白果酚被完全分离。利用 HPLC 在 315 nm 紫外检测进行定量研究,结果见图 2(3)。

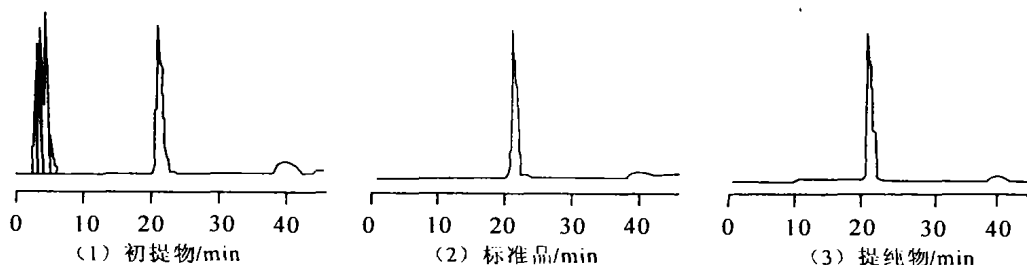


图 2 氢化白果酸的 HPLC 图谱

Fig. 2 Chromatogram of HPLC of ginkgolic acids

由图 2(3)可看出,经过本工艺制备的氢化白果酸已经达到标准品纯度水平,由工作曲线计算知其

纯度 >90%,如将样品继续重结晶其纯度可进一步提高。经熔点仪测定,氢化白果酸产品的熔点为 85

~89℃,与文献[6]报道的氢化白果酸的熔点相符。氢化白果酸产品经红外检测所得结果见图3,图谱结果与文献[5]报道的氢化白果酸结构吻合。

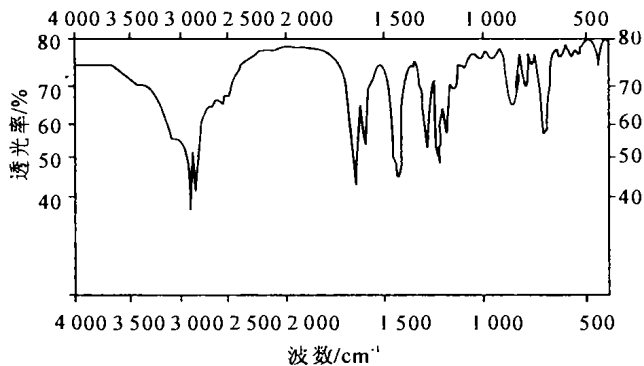


图3 氢化白果酸提纯物红外光谱图

Fig. 3 Chromatogram of IR of ginkgolic acids

2.2 白果酚的鉴定

由于尚无市售白果酚标准品,研究中以制备型薄层层析对白果酚富集物进行纯化,所得产品经紫外光谱扫描得最大吸收波长为275nm。对白果酚进行红外分析,结果见图4,与文献[6]报道的白果酚结构吻合。

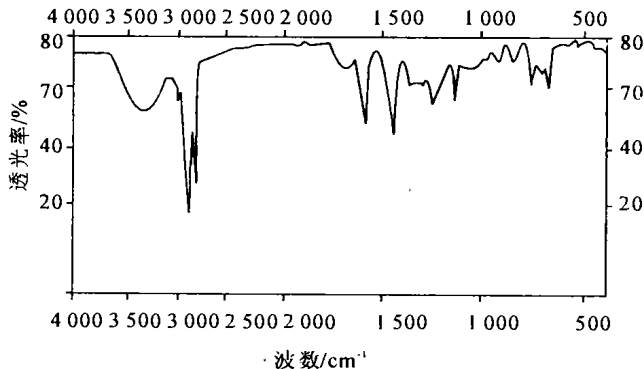


图4 白果酚提纯物红外光谱图

Fig. 4 Chromatogram IR of ginkgolic phenols

2.3 黄酮类物质的鉴定

由初提物 HPLC 分析图谱[见图2(1)]可看出,在0~10min明显有杂峰出现,经与芦丁、槲皮素保留时间对比应为黄酮类物质。将黄酮粉末用甲醇定容,在滤纸上点样,喷5%AlCl₃乙醇溶液后,紫外灯下观察为阳性反应,说明该类物质为黄酮类物质。

2.4 生物测定结果

将银杏外种皮初提物对5种常见供试菌类在0.01g/mL(外种皮)浓度下采用生长速率法进行离体杀菌试验,结果为:对玉米大斑菌抑制率80%以

上;对黄瓜灰霉菌、番茄灰霉菌、苹果炭疽菌的抑制率60%以上。在0.03g/mL(外种皮)浓度下经过对4种常规的供试昆虫采用点滴法、浸叶法、小叶碟添加法进行胃毒、触杀及拒食测试,结果对红蜘蛛杀虫率80%以上,对桃蚜虫杀虫率70%以上。纯化物活性测定中发现:黄酮类物质对菌丝成长具有较强的抑制作用,在低浓度下对小麦赤霉、苹果炭疽、番茄大霉菌的抑制率均超过70%;氢化白果酸在0.05mg/mL(外种皮)浓度时,对小麦白粉菌治疗和保护作用可分别大于80%,具有进一步研究开发的价值。

3 结 论

1) 研究出了一条以银杏外种皮为原料经有机溶剂制备初提液,初提液通过乙醚萃取、碳酸钠及氢氧化钠酸碱反应、铅盐沉淀法提取高纯度白果酸、白果酚以及银杏黄酮的新工艺路线。

2) 在对活性成分的定性及定量测定中采用了薄层层析色谱法、分光光度法及高效液相色谱法,试验证明分析方法可靠、准确。

3) 以银杏外种皮为原料制备的初提液进行生物测定实验表明:对4种农作物菌、3种虫具有良好的药效。

4) 以银杏外种皮为原料得到的纯化物的研究成功,不但对进一步进行生物测定,加快以外种皮为原料制备生物农药打下了良好的基础,而且可应用于医药等领域。

参考文献:

- [1] 廖 亮. 银杏叶总黄酮提取方法研究[J]. 食品科学, 1994, (8): 33-35.
- [2] 李兆龙, 胡季强, 卢耀强. 银杏叶的开发利用[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995. 143-230.
- [3] 唐于平, 楼凤昌, 王 欢, 等. 银杏外种皮的化学成分和药理作用[J]. 药学进展, 2000, 24(3): 152-155.
- [4] 居国保. 银杏外种皮的化学成分和用途[J]. 中国野生植物资源, 1995, (1): 17-18.
- [5] 藏 丽, 郑 荣. 银杏外种皮中银杏酸的分离方法[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(2): 32-35.
- [6] 王 杰, 余碧玉. 银杏外种皮化学成分的分离与鉴定[J]. 中草药, 1995, 26(5): 123-126.

(编 辑 陈懿文)

A study on the technical process for extracting and identifying active compounds from the testa of *Ginkgo biloba* L

WANG Feng¹, LI Wen-hong¹, LI Duo-wei², MAO Xiu-guang², GAO Li-ya¹

(1. Institutes for Chemical Engineering, Northwest University; 2. Institutes for Biological Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: A new technical process for extracting active compounds of *Ginkgolic phenols*, acids and flavone from the testa of *Ginkgo biloba* L through solvent distilling aether and lye extraction as well as acid reductive was introduced. Thin-layer chromatography (TLC), High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and Infra-red (IR) for qualitative and quantitative determination has been adopted to test the products. The application results on biologic activity of initial extractions showed that the ratio of sterilizations is 60~80 percent and of killing insects is 70~80 percent. The application results on the activity of pure outcomes showed that flavones have the ratio of sterilizations over 70 percent and the treatment and protection of ginkgolic acid to several bacteriums are over 80 percent respectively.

Key words: testa of *Ginkgo biloba* L; active compounds; extraction; biologic activity mensuration

· 学术动态 ·

著名数学家辛周平校友受聘我校

世界著名数学家辛周平教授于近日受聘我校。辛周平系我校数学系 1978 级本科生、1982 级硕士研究生, 现任香港中文大学讲座教授、首都师范大学教授, 长期致力于非线性偏微分方程、流体动力学方程、双曲守恒律以及数值分析等国际前沿科学领域的研究, 并做出许多重大贡献, 已跻身国际著名数学家的行列。自 1994 年以来, 他先后应邀赴美、日、英、法、意等多个国家参加学术交流活动。2002 年 8 月, 他还应邀在北京举行的国际数学家大会上作了 45 分钟的学术报告。其研究成果曾获“密西根大学优秀博士论文奖”、“美国总统奖”等多项褒奖, 在国际数学界产生了强烈反响, 并得到江泽民、李岚清等党和国家领导人的高度重视和好评。

辛周平及其在学术研究上取得的令人瞩目的成就, 为我校在国内外赢得了很高声誉。多年来, 他始终非常关心母校的建设和发展, 11 月 14 日, 在学校举行的“西北大学非线性科学研究中心”揭牌仪式暨学术研讨会上, 欣然应聘为我校特聘教授并出任我校“非线性科学研究中心”主任。

(薛 鲍)