

## 银杏酸单体制备及其抗菌活性\*



吴向阳, 仰榴青, 陈 钧, 袁新华, 夏国华

(江苏大学 化学化工学院, 江苏 镇江 212013)

WU X Y

**摘 要:** 以银杏外种皮为原料, 石油醚回流提取得粗提物, 经硅胶柱色谱分离、纯化得银杏酸(GA)混合物, 再经制备色谱柱多次分离, 反复制备得到 6 种单体: 银杏酸 C<sub>13</sub>、C<sub>15</sub>、C<sub>17</sub>、C<sub>19</sub>、C<sub>21</sub>和一种未知新化合物, 各单体纯度都达 95% 以上, 可作为银杏产品中有毒成分银杏酸定量分析的对照品, 初步鉴定该未知物是一种新的银杏酸。测定了粗提物、银杏酸混合物及 3 种不同单体对 17 种植物病原菌的抗菌活性。结果表明, 银杏酸是银杏外种皮中抗菌活性成分之一, 不同银杏酸单体的抗菌活性存在差异, C<sub>13</sub>的抗菌活性显著高于 C<sub>15</sub>和 C<sub>17</sub>的活性, C<sub>15</sub>的活性高于 C<sub>17</sub>, 银杏酸的抗菌活性与其化学结构中苯环上第六位取代基团有关。

**关键词:** 银杏外种皮; 银杏酸; 单体; 抗菌活性

中图分类号: S792.95; R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2417(2003)04-0017-05

## PREPARATION OF GINKGOLIC ACID MONOMERS AND THEIR ANTIFUNGAL ACTIVITY

WU Xiang-yang, YANG Liu-qing, CHEN Jun, YUAN Xin-hua, XIA Guo-hua

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** Crude extract was obtained by light petroleum reflux extraction from exotesta of *Ginkgo biloba* L., separated by silica gel column chromatography, and the mixture of ginkgolic acids(GA) could be obtained. Then the GA mixture was separated by repeated preparative chromatography, and six monomers could be obtained, namely: C<sub>13</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>21</sub> and a novel compound. The purity of monomers reached more than 95%, and GA monomers could be used as reference samples for toxic GA analysis in *G. biloba* products. Tentative result showed that the new compound was a new ginkgolic acid. Antifungal activities of the crude extracts, the mixture GA and three monomers on seventeen kinds of pathogenic fungi and bacteria were studied. Ginkgolic acid is one of the antifungal active components in *G. biloba* exotesta. The antifungal activity of C<sub>13</sub> monomer is higher than those of C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub> markedly, the inhibitory effect of C<sub>15</sub> monomer is higher than that of C<sub>17</sub>. Antifungal activity of ginkgolic acid is structurally related to the sixth alkyl chains in benzene ring.

**Key words:** *Ginkgo biloba* exotesta; ginkgolic acids; monomer; antifungal activity

银杏是世界上珍贵的药用植物资源, 银杏叶、白果及其外种皮都具有药用开发价值, 目前银杏叶和

\* 收稿日期: 2003-04-18

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(01KJD350001)

作者简介: 吴向阳(1965-), 男, 江苏丹阳人, 副教授, 博士生, 从事天然产物的研究与开发工作。

白果的开发利用已很多,但银杏外种皮的利用率低。研究发现外种皮中含有较多的银杏酸(GA)<sup>[1]</sup>,而且银杏酸是一种重要的生物活性物质,具有致敏性、细胞毒性和免疫毒性等作用<sup>[2]</sup>,是银杏产品中的有毒成分。文献[2~5]还报道银杏酸对多种真菌和细菌具有抑制作用。至今,国内对银杏酸化学成分及单体制备的研究报道较少<sup>[6~7]</sup>,有关银杏外种皮中银杏酸单体制备研究不够深入,一般只得到1~2种单体。在对植物病原菌的抗菌活性研究方面,国外未见文献报道,国内虽有研究<sup>[8~9]</sup>,但未报道所试验银杏酸提取物中银杏酸的含量,对于高纯度银杏酸的抗菌活性研究报道甚少,未见银杏酸不同单体的抗菌活性报道。

本试验以银杏外种皮为原料,研究银杏酸单体的制备方法及其对植物病原菌的抗菌活性,为银杏产品中银杏酸的定量分析提供单体对照品,为银杏外种皮的开发利用提供基础。

## 1 实验

### 1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器 LG-1500 高效液相色谱仪(日本 JASCO 公司);ZF-I 型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂);R-200 型旋转薄膜蒸发器(Büchi 公司);1810B 型自动双重纯水蒸馏器(上海申立玻璃仪器有限公司)。

1.1.2 原料及试剂 对照品 I:德国 Schwabe 公司 Dr. Jaggy H 赠送,总银杏酸含量达 99%,银杏酸的组成为 C<sub>13</sub>、C<sub>15</sub>、C<sub>17</sub>、C<sub>19</sub>和 C<sub>21</sub>;对照品 II:中国药科大学提供, C<sub>13</sub> 单体纯度为 95%;柱层析用硅胶 G(100~140 目)(上海五四化学试剂有限公司);石油醚、乙醚、甲酸等所有试剂均为分析纯;银杏外种皮:2001 年 9 月采集于江苏大学校园,树龄 30~40 a,于太阳下暴晒至干,存于密封容器中备用。

1.1.3 供试病菌 供试病菌包括 15 种植物病原真菌和 2 种植物病原细菌。真菌:小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、玉米纹枯病菌(*Rhizoctonia zeae*)、玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum nigrum*)、花生网斑病菌(*Phoma arachidicola*)、花生黑斑病菌(*Cercospora personata*)、大蒜菌核病菌(*Sclerotinia allii*)、草坪纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、水稻恶苗病菌(*Gibberella fujikuroi*)、水稻稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、番茄叶霉病菌(*Fulvia fulvum*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*);细菌:黄瓜细菌性角斑病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *curbitae*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)。

1.1.4 病菌培养基 马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)用于真菌培养和样品的抗菌活性测定<sup>[10]</sup>。NA 培养基:酵母浸膏 1 g、牛肉浸膏 3 g、蛋白胨粉 5 g、蔗糖 15 g、蒸馏水 1 000 mL,用 1 mol/L 氢氧化钠调 pH 值为 7.0,用于细菌的培养和样品的抗菌活性测定。

### 1.2 实验方法

1.2.1 色谱分析条件及制备色谱分离条件 色谱分析流动相组成为甲醇 3% HAc 溶液(928, 体积比),色谱柱为 Inertsil ODS-2(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),紫外检测波长 310 nm,流速 1.0 mL/min,柱温 40 °C。制备色谱流动相组成为甲醇 3% HAc 溶液(9010, 体积比),色谱柱为 HiQ Sil C<sub>18</sub>(250 mm × 21.2 mm, 15 μm),紫外检测波长 280 nm,流速 3.0 mL/min,柱温 40 °C。色谱数据处理系统为 N2000 型色谱工作站,浙江大学智能信息研究所研制。

1.2.2 银杏外种皮粗提物、银杏酸混合物及单体的制备 晒干的银杏外种皮粉碎后,加入石油醚于 85 °C 回流提取,提取液经减压浓缩得粗提物样品;粗提物用少量石油醚溶解加样于硅胶柱上(硅胶 90 g,硅胶柱为 φ25 mm × 500 mm 的玻璃柱,湿法装柱),用石油醚-乙醚-甲酸(89111, 体积比)洗脱,收集银杏酸组分,浓缩至干,得银杏酸混合物样品;银杏酸混合物经制备色谱柱多次分离,收集各种银杏酸组分,经减压浓缩、5% NaHCO<sub>3</sub> 中和、石油醚萃取、水洗、干燥,浓缩至干得各银杏酸单体。

1.2.3 外标曲线的测定 准确称取银杏酸对照品 II,用无水甲醇溶解、定容后,用 0.45 μm Whatman 一次性针头过滤器过滤,得银杏酸标准溶液。分别吸取不同体积进样,每个进样量平行测定 3 次,求其

峰面积的平均值, 得外标曲线, 线性回归方程  $y = -0.0121 + 3.59 \times 10^{-6}x$ , 相关系数  $R = 0.9999$ , 线性检测范围为  $0.572 \sim 10.30 \mu\text{g}$ 。

1.2.4 银杏酸含量测定 准确称取一定量粗提物或银杏酸混合物或单体样品, 用无水甲醇溶解, 置于容量瓶中定容, HPLC 测定, 计算银杏酸峰的总面积, 根据外标曲线求出银杏酸的含量。平行测定 3 次, 求其平均值。

1.2.5 抗菌活性测定 样品对植物病原真菌的抗菌活性采用菌落生长直径测定法测定<sup>[10]</sup>, 抑制率 (%) =  $[(\text{对照的菌落增长直径} - \text{处理的菌落增长直径}) / (\text{对照的菌落增长直径})] \times 100$ ; 对植物病原细菌的抗菌活性采用抑菌圈法测定。每处理样重复 4 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 粗提物和银杏酸混合物中银杏酸的 HPLC 分析结果

经 HPLC 分析, 银杏外种皮粗提物和银杏酸混合物中都含有 5 种银杏酸 ( $C_{13:0}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $C_{15:1}$ 、 $C_{17:1}$  和  $C_{17:2}$ ), 其含量分别为 58.6% 和 86.3%。银杏酸混合物和对照品 I 的 HPLC 色谱图见图 1, 可见其成分与对照品 I 一致。

### 2.2 单体制备及纯度测定

2.2.1 流动相比例和流速的确定 根据分析色谱流动相的组成来调节制备色谱流动相的组成。适当增加流动相中水的比例, 可提高各色谱峰的分度, 但水量过多, 制备时间会较长。综合考虑流动相比例和流速的关系, 本实验选择流动相甲醇-3% HAc 溶液体积比为 90:10, 流速  $3.0 \text{ mL/min}$ , 整个制备分离在 200 min 内完成。

#### 2.2.2 紫外检测波长选择

为了提高制备的效率, 制备色谱一般是加载过量。为了使各色谱峰不溢出, 宜选择吸收较弱处的检测波长。由于银杏酸在 310 nm 处吸收较强, 本试验选择 280 nm 作检测波长, 纯银杏酸混合物 1 次进样量最多可达 250 mg。

2.2.3 单体纯度测定 银杏酸混合物经制备色谱柱多次分离后, 得到 6 种单体: 银杏酸  $C_{13:0}$ 、 $C_{15:1}$ 、 $C_{17:2}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $C_{17:1}$  和一种未知化合物, 色谱图见图 2, 各单体纯度分别为: 97.5%、96.4%、96.0%、95.0%、95.8% 和 98.5%。可见, 6 种单体的纯度都达 95% 以上。

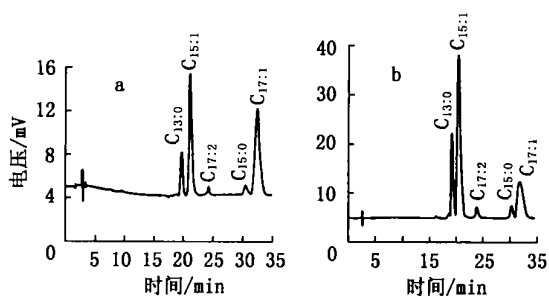


图 1 银杏酸的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC spectra of ginkgolic acids

(a) 对照品 I control I ;

(b) 银杏酸混合物 mixture of ginkgolic acids

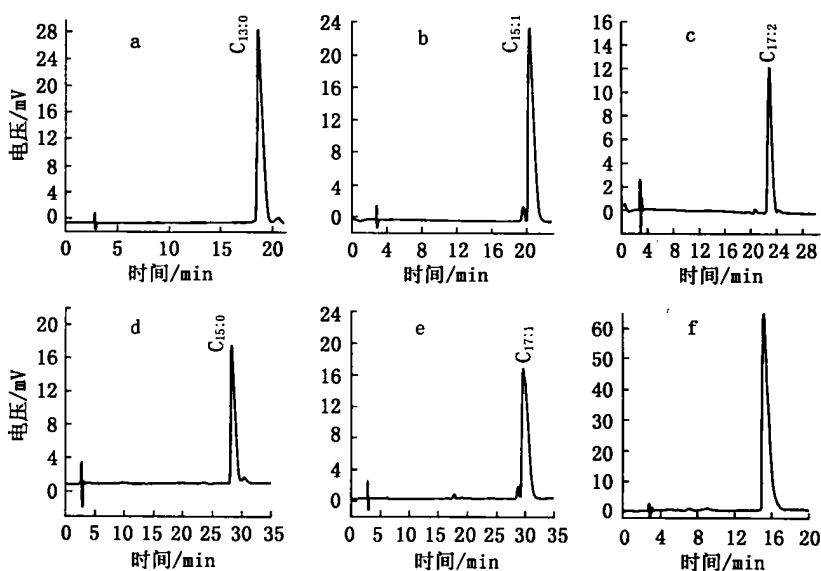


图 2 银杏酸单体的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC spectra of monomers of ginkgolic acids

a.  $C_{13:0}$ ; b.  $C_{15:1}$ ; c.  $C_{17:2}$ ; d.  $C_{15:0}$ ; e.  $C_{17:1}$ ; f. 未知化合物 unknown compound

2.2.4 未知物的初步鉴定 除已发现的5种银杏酸以外,在制备色谱时,发现在已知银杏酸峰之前有一小峰,对这一小峰流出物进行了收集,经TLC薄层色谱测定,发现在GF<sub>254</sub>板上该化合物于254 nm处显紫色荧光,用展开剂石油醚-乙醚-甲酸(7B1)展开后,其R<sub>f</sub>值与银杏酸对照品II一致。该化合物甲醇溶液经紫外扫描,得到的紫外吸收光谱特征峰与银杏酸对照品II一致,也有3个最大吸收<sup>[1]</sup>。由此可初步推断此物质可能为一新化合物,且是一种银杏酸。该新化合物的结构有待进一步鉴定。

### 2.3 粗提物在不同溶剂下的抗菌活性比较

分别测定了用N,N-二甲基甲酰胺、乙醇、丙酮作溶剂时银杏外种皮粗提物对小麦赤霉病菌、番茄叶霉病菌、花生黑斑病菌在400、200 μg/mL浓度下的生长抑制率,结果见表1。从表1可见,在400和200 μg/mL浓度下,用乙醇溶解粗提物的效果最好,N,N-二甲基甲酰胺次之,丙酮最差。表明乙醇对粗提物中抗菌有效成分的溶解性最好。因此在以下研究中均采用乙醇作为有机溶剂。

表1 粗提物在不同有机溶剂下对病菌生长的抑制率

Table 1 Inhibitory rate of the crude extracts on fungi in different solvents

溶剂 solvents	粗提物浓度/(μg mL <sup>-1</sup> ) concn. of crude extracts	抑制率 inhibitory rate/%		
		小麦赤霉病菌 <i>Gibberella zae</i>	番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulvum</i>	花生黑斑病菌 <i>Cercospora personata</i>
二甲基甲酰胺 DMF	400	22.9	30.6	26.5
二甲基甲酰胺 DMF	200	18.3	24.0	18.2
乙醇 ethyl alcohol	400	42.1	37.1	42.4
乙醇 ethyl alcohol	200	24.0	33.3	28.5
丙酮 acetone	400	12.0	35.5	16.5
丙酮 acetone	200	6.0	11.2	8.8

### 2.4 粗提物和银杏酸混合物对植物病原真菌的抗菌活性

共测定了粗提物和银杏酸混合物对15种植物病原真菌和2种细菌的活性(见表2)。结果表明粗提物和银杏酸混合物的抗菌性相似,对高等真菌番茄灰霉病菌和水稻恶苗病菌、低等真菌辣椒疫霉病菌和两种细菌病害无效。从表2可见,在相同浓度下,粗提物和银杏酸混合物对同一种病原菌的抑制效果无明显差异,这表明银杏酸是外种皮中抗菌活性成分之一,还存在其他活性成分。

表2 粗提物和银杏酸混合物对17种植物病原菌的生长抑制率

Table 2 Inhibitory rate of crude extracts and GA mixture on 17 kinds of pathogenic fungi and bacteria

病菌 pathogens	粗提物的抑制率/% inhibitory rate of crude extracts			混合物的抑制率/% inhibitory rate of mixture		
	400 <sup>1)</sup>	200	100	400	200	100
小麦赤霉病菌 <i>Gibberella zae</i>	42.1	24.0	13.0	35.1	17.3	6.7
大蒜菌核病菌 <i>Sclerotinia allii</i>	6.5	3.7	2.4	15.3	12.7	10.4
玉米纹枯病菌 <i>Rhizoctonia zeae</i>	43.1	31.9	17.7	39.3	30.9	18.1
辣椒炭疽病菌 <i>Colletotrichum nigrum</i>	31.9	21.5	15.8	22.6	21.5	16.8
西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	13.6	11.8	6.4	9.5	7.5	3.5
番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulvum</i>	37.1	33.3	27.7	39.2	36.2	28.6
花生网斑病菌 <i>Phoma arachidicola</i>	55.0	50.3	35.2	57.0	48.6	40.2
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	37.5	23.5	17.8	42.4	38.6	26.0
花生黑斑病菌 <i>Cercospora personata</i>	42.4	28.5	11.6	44.9	27.9	18.9
玉米小斑病菌 <i>Bipolaris maydis</i>	48.6	38.4	28.0	46.8	39.6	17.5
水稻稻瘟病菌 <i>Pyricularia oryzae</i>	24.6	10.6	4.3	30.3	23.9	16.4
草坪纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	22.4	19.0	3.4	25.3	20.5	8.4
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	0	0	0	0	0	0
水稻恶苗病菌 <i>Gibberella fujikuroi</i>	0	0	0	0	0	0
辣椒疫霉病菌 <i>Phytophthora capsici</i>	0	0	0	0	0	0
黄瓜细菌性角斑病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>	0	0	0	0	0	0
水稻白叶枯病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	0	0	0	0	0	0

1) 400、200、100 分别为粗提物和混合物的质量浓度,单位为μg/mL

### 2.5 银杏酸不同单体对植物病原菌的抗菌活性比较

从表 3 可以看出, 银杏酸单体  $C_{130}$  在  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下对 5 种病原菌的活性显著高于其他单体在  $400 \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下的抗菌效果,  $C_{151}$  的活性又高于  $C_{171}$  的活性; 与表 2 比较可知, 在  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度时, 银杏酸单体  $C_{130}$  对 5 种病原菌的抗菌活性大大高于粗提物和银杏酸混合物的活性, 表明单体  $C_{130}$  是银杏酸混合物中的主要活性成分, 银杏酸的抗菌活性与其化学结构中苯环上第六位取代基团有关。

表 3 银杏酸不同单体对几种植物病原真菌的生长抑制率

Table 3 Inhibitory rate of different GA monomers on fungi

病菌 pathogens	$C_{130}$ 的抑制率 / % inhibitory rate			$C_{171}$ 的抑制率 / % inhibitory rate			$C_{151}$ 的抑制率 / % inhibitory rate		
	100 <sup>1)</sup>	50	25	400	200	100	400	200	100
玉米纹枯病菌 <i>Rhizoctonia zeae</i>	35.8	34.5	6.9	24.6	9.6	7.5	34.0	20.9	13.4
小麦赤霉病菌 <i>Gibberella zeae</i>	27.0	23.3	6.8	8.6	2.1	1.9	13.6	9.5	3.2
番茄叶霉病菌 <i>Euclia fulvum</i>	40.4	24.3	11.7	25.4	9.1	6.1	43.4	37.5	31.5
花生网斑病菌 <i>Phoma arachidicola</i>	44.2	40.3	14.4	14.2	10.1	8.9	46.1	43.8	36.7
la 番茄早疫病病菌 <i>Alternaria solani</i>	45.7	23.6	12.1	31.0	28.3	14.7	32.2	30.8	26.3

1) 100、50、25 以及 400、200、100 等, 分别为  $C_{130}$  和  $C_{171}$  以及  $C_{151}$  的质量浓度, 单位为  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$

### 3 结论

3.1 以银杏外种皮为原料, 通过石油醚回流提取得到粗提物, 用硅胶柱色谱分离得纯度为 86.3% 的银杏酸混合物, 再用 HPLC 制备色谱反复分离制备得到 6 种单体: 银杏酸  $C_{130}$ ,  $C_{151}$ ,  $C_{172}$ ,  $C_{150}$ ,  $C_{171}$  和一种未知化合物, 单体纯度均在 95% 以上, 可作为银杏酸对照品, 用于银杏产品中银杏酸含量的分析, 未知化合物经初步鉴定是一种新银杏酸, 其结构有待进一步鉴定。

3.2 银杏外种皮粗提物和银杏酸混合物对多种植物病原真菌都有抗菌活性, 并具有相同的抗菌谱。银杏酸是粗提物中的抗菌活性成分之一, 除此之外还存在其他抗菌活性物质, 有待进一步研究; 银杏酸不同单体的抗菌活性存在差异,  $C_{130}$  单体的活性大大高于  $C_{151}$  和  $C_{171}$ ,  $C_{151}$  的抗菌活性高于  $C_{171}$ ,  $C_{130}$  单体是银杏酸混合物中的主要活性成分, 表明银杏酸的抗菌能力与其化学结构中苯环上第 6 位烷或烯基侧链的长短和双键有关。

#### 参考文献:

- [1] 仰榴青, 吴向阳, 陈 钧, 等. 高效液相色谱法测定银杏外种皮中银杏酸的含量[J]. 分析化学, 2002, 30(8): 901-905.
- [2] JAGGY H, KOCH E. Chemistry and biology of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. [J]. Pharmazie, 1997, 52(10): 735-738.
- [3] MUROI H, et al. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. J Applied Bacteriology, 1996, 80: 387-394.
- [4] MUROI H, et al. Bactericidal effects of anacardic acid and totarol on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(10): 1925-1926.
- [5] KUBO I, et al. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 1016-1019.
- [6] 仰榴青, 吴向阳, 陈 钧, 等. 银杏酸的高效液相色谱法测定 [J]. 药学学报, 2002, 37(7): 555-558.
- [7] 谭卫红, 沈兆邦, 王成章, 等. 银杏叶中烷基酚化合物的分离与鉴定 [J]. 林产化学与工业, 2001, 21(4): 1-6.
- [8] 王 杰, 王连荣, 祝树德, 等. 氢化白果酸对果树病原菌的抑制效果 [J]. 江苏农业研究, 2000, 21(4): 48-50.
- [9] 倪学文, 杨志坚, 吴谋成. 银杏外种皮中酚酸的分离和抑制菌实验 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(6): 30-32.
- [10] 方中达. 植病研究法 (3 版) [M]. 北京: 中国农业出版社. 1998. 46-95.