

银杏外种皮中活性成分分离纯化

李稳宏 王 锋 李多伟[#] 韩 枫 金 汤[#]

(西北大学化工学院 西安 710069 [#]西北大学 生命科学学院 西安 710069)

摘 要 研究了一种由银杏外种皮中分离提纯氢化白果酸、白果酚、银杏黄酮类物质的工艺方法。该方法利用溶剂萃取进行活性成分分离纯化,通过薄层层析、高效液相色谱、红外波谱对产品进行定性定量测定和结构分析。同时采用生物测定应用实验进行活性研究。得到一条从外种皮中分离提纯氢化白果酸、白果酚、银杏黄酮类物质的工艺路线,所得到的酸、酚及黄酮类物质有明显的杀虫、杀菌作用。

关键词 银杏外种皮 分离 工艺条件 分析方法

The Separation and Purification of Active Components from the Testa of Ginkgo Biloba L

Li Wenhong, Wang Feng, Han Feng[#], Li Duowei, Jin Tang[#]

(Chemical Engineering College, Northwest University, [#]Institutes for Biological Sciences, Northwest University, Xi'an 710069)

Abstract The separation and purification of ginkgolic flavonoids, acids and phenols from the Testa of Ginkgo Biloba L was investigated. The testa extracted liquid was extracted by ether, the product was reacted with Na_2CO_3 and NaOH , then it was deposited by $\text{Pb}(\text{Ac})_2$. High pure ginkgolic phenols, acids and flavonoids were obtained. The products were analyzed by TLC and HPLC and their biological activity were proved.

Key words Testa of ginkgo biloba L, Extractive technology, Optimum technological conditions, Analytical method

目前,国内外银杏资源的开发主要以银杏白果和银杏叶为主^[1,2],对于其废弃物银杏外种皮的研究开发相对较少^[3]。由于银杏外种皮长期得不到合理处置和有效利用,其中的有毒成分已严重地危及到种植和加工地域各类水生物、农作物的生存及人畜的正常生活。为此本研究以银杏外种皮为原料,对有机溶剂提取活性成分工艺及其杀虫、杀菌活性进行了一系列的探索,取得了理想的效果。现重点报道在已有的研究基础上,对有机溶剂初提液中各活性组分进一步进行分离、纯化工艺以及分析方法的研究结果。

1 实验部分

1.1 主要材料与仪器

银杏外种皮由江苏省泰兴市胡庄镇提供;无水乙醇为分析纯;芸香叶苷(纯度 $\geq 95\%$),上海

李稳宏 男,52岁,教授,主要从事有机化工、精细化工领域的教学、科研和开发。

陕西省教育厅重大产业化培育项目,项目编号 02-JC3。

2002-10-23 收稿,2003-01-20 修回

试剂二厂；白果酸标准品(>90%)由贵州大学生生化中试基地提供。高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；CS-930 薄层色谱扫描仪，日本岛津；UV-265 分光光度计，日本岛津。

1.2 分析方法

1.2.1 氢化白果酸的测定 (1) 薄层色谱法 经对白果酸标准品和样品的对应薄层斑点作光谱扫描，确定以 310nm 为测定波长，灵敏度 $\times 1$ ，狭缝宽 $2.00\text{cm} \times 2.00\text{mm}$ ，线性化 $SX=3$ ，作反射法锯齿扫描。经白果酸标准品制得的标准曲线图可知，浓度在 $1 \sim 5\mu\text{g}$ 点的范围内呈线性关系，线性回归相关系数 $r=0.9963$ ，斑点面积值在 4h 内稳定。利用斑点面积和进样量的正比关系可以求得待测样品中白果酸的含量。

(2) 高效液相色谱法(HPLC) 色谱条件及行为：Symmetry C_{18} 柱($5\mu\text{m}$ $4.6 \times 150\text{mm}$)；流动相：甲醇与 5%乙酸溶液体积比为 9:1；流速 $1.0\text{mL}/\text{min}$ ；柱温 $30 \pm 3^\circ\text{C}$ ；灵敏度 2.000AUFS。经白果酸标准品制得的峰面积(A)与进样量(V)标准曲线回归方程： $A=663521.61765V \sim 91623.38235$ ，方程线性范围为： $1 \sim 10\mu\text{L}$ ，相关系数 $r=0.99286$ 。在波长 310nm 处检测样品，由标准曲线可求得含量。

对最终产品进行了红外光谱结构分析和熔点测定。

1.2.2 黄酮类化合物的测定 (1) 分光光度法^[6]：采用芸香叶苷(Rutin)测定提取液中黄酮类物质含量，具体操作方法同文献[6]，制得的标准曲线方程： $C=9.79808A-0.0062$ ，相关系数 $r=0.9999$ 。用同样的预处理方法处理样品，在波长 510nm 处测定吸收度，由标准曲线可查得黄酮类物质含量。

(2) 高效液相色谱法：色谱工作条件同 1.2.1，用芸香叶苷对照品制得的峰面积(A)与进样量(V)回归方程： $A=1.10337 \times 10^6 V + 41498.84091$ ，线性范围为： $1 \sim 10\mu\text{L}$ ，相关系数 $r=0.99869$ 。在 254nm 紫外检测黄酮类物质，由标准曲线可查得其含量。

1.2.3 白果酚、醇的鉴定 由于目前国内外尚无市售白果酚、醇标准品，研究中以制备型薄层层析对白果酚富积物进行纯化，白果醇没有紫外吸收，故白果酚、醇通过红外光谱分析进行结构鉴定。

1.3 提取工艺过程

前期研究中分别采用水以及乙醇、石油醚等有机溶剂对初提液提取过程进行了系统地试验，本次研究以上述的初提液为原料，对其中活性成分分离、纯化工艺路线选择及工艺条件的优化进行了系统探索，经多次试验确定的工艺路线如图 1 所示。

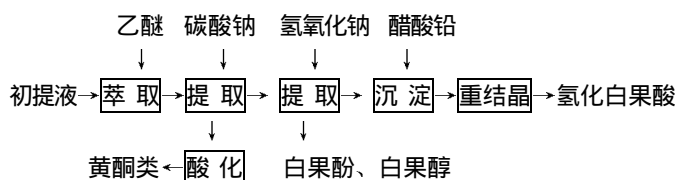


图 1 外种皮初提液活性成分分离纯化工艺流程

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

操作步骤如下：精确量取定容的初提液，浓缩至原体积的 $1/4$ ，乙醚萃取。上层萃取液经碳

酸钠、氢氧化钠溶液萃取, 分别得到黄酮类物质、白果酚、白果醇和氢化白果酸富集液。氢化白果酸富集液经饱和醋酸铅溶液沉淀处理、盐酸还原和甲醇重结晶, 得到高纯度的氢化白果酸结晶, 试验结果分别见表 1~5。

2 结果与讨论

2.1 分离纯化工艺过程

2.1.1 乙醚萃取 改变乙醚和初提液的配比, 进行乙醚萃取, 通过分析萃余液中酸、酚、总黄酮的含量以探索提取效果, 结果见表 1。由表 1 可知当乙醚用量大于 8.073 mL 时酸的剩余量已经基本趋于平稳。当乙醚用量大于 6.055 mL 时萃余液中酚的剩余量已经为 0。萃余液中的黄酮的剩余量在乙醚用量大于 6.055 mL 后就已经基本不再改变。故确定乙醚用量 8.073 mL 为最佳用量。

表 1 乙醚萃余液中酸、酚、总黄酮含量的测定结果

Tab.1 Content of ginkgolic acids, phenols and flavoniods in the remains after extracting by aether

乙醚用量/(mL/g 外种皮)	2.018	4.037	6.055	8.073	10.092	12.110
酸含量/mg	108.59	64.94	39.12	11.60	10.74	9.80
酚含量/mg	12.46a	0.04a	0	0	0	0
总黄酮含量/mg	20.5	15.3	9.21	9.12	9.10	9.02

因目前国内尚没有白果酚标准品的出售, 试验中采用自制标准品, 将其定义为 *a* 用于试验对比基准

2.1.2 碳酸钠溶液萃取 在乙醚萃取液中加入碳酸钠溶液可将其中的黄酮与其它成分分开, 结果见表 2。

表 2 碳酸钠溶液萃取液中总黄酮及酸、酚含量的测定结果

Tab.2 Content of ginkgolic acids, phenols and flavoniods in the Na_2CO_3 solvent

Na_2CO_3 用量/(mL/g 外种皮)	1.80	3.60	5.42	7.20	9.04	10.84
酸含量/mg	0.779	1.521	2.463	5.014	12.89	13.76
总黄酮含量/mg	67.5	120	810	2050	2145	2511

样品在紫外检测仪下无法看到样品中白果酚的黄绿色荧光,因而证明萃取液已基本无酚

由表 2 可知在碳酸钠萃取液中黄酮类物质含量最高, 同时还含有少量的酸, 在碳酸钠加入量大于 7.20 mL 时萃取液中黄酮的含量已基本稳定。故碳酸钠溶液适宜加入量为 7.20 mL。

2.1.3 氢氧化钠溶液萃取 利用氢氧化钠溶液可将上步中萃余液中的酸和酚、醇分离, 结果见表 3。由表可知在氢氧化钠用量为 1.093 mL 时酸的含量基本不变, 所以氢氧化钠的适宜用量为 1.093 mL。

表 3 氢氧化钠提取液中白果酸含量的测定结果

Tab.3 Content of ginkgolic acids in the NaOH solvent

NaOH 溶液/(mL/g 外种皮)	0.364	0.729	1.093	1.821	2.168	2.550
酸含量/(mg/mL)	617.61	631.22	648.21	649.52	650.21	653.08

2.1.4 铅盐沉淀 氢氧化钠萃取液经调酸、有机溶剂萃取、醋酸铅沉淀后可得沉淀白果酸, 结果见表 4。由表可知醋酸铅用量大于 1.5 mL 时白果酸沉淀量基本不变。故选取 1.5 mL 为醋酸铅的最佳用量。

表 4 沉淀量与配料比的关系

Tab.4 Effect of different material ratio on content of deposition

醋酸铅用量 (mL/g 外种皮)	0.188	0.375	0.938	1.500	2.060	3.000
沉淀白果酸 (g)	1.6852	3.4937	4.1343	4.5915	4.6350	4.7426

2.1.5 盐酸还原 将沉淀白果酸用盐酸还原, 从而得到纯化的白果酸。结果见表 5, 由表可知适宜盐酸用量为 1.48 mL。

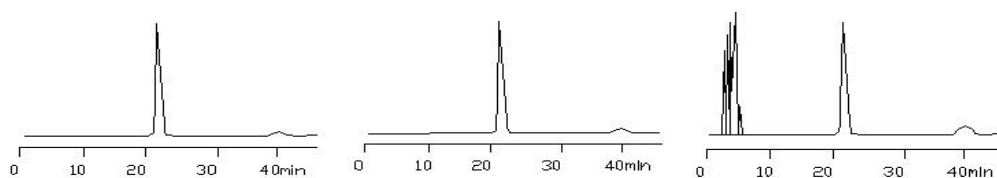
表 5 盐酸用量与纯化白果酸含量的关系

Tab.5 Effect of different content of the HCl solvent on content of ginkgolic acids

盐酸用量 (mL/g 外种皮)	0.11	0.21	0.32	0.42	0.53	0.64	0.74	0.85	0.95	1.06	1.16	1.27	1.38	1.48	2
纯化白果酸/g	0.65	0.78	0.93	1.03	1.18	1.25	1.29	1.34	1.37	1.4	1.43	1.47	1.5	1.52	1.52

2.2 样品分析

(1) 氢化白果酸、银杏黄酮 对白果酸标准溶液和样品溶液的薄层斑点的对应点在 200~400nm 范围内经 TLC 进行光谱扫描, 在 310nm 处均有最大吸收峰, 峰形相同, 分析表明: 氢化白果酸、白果酚已被完全分离; 利用 HPLC 对样品在 310nm 紫外检测进行定量分析, 结果见图 2 中(1)、(2), 由图可知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%。初提物 HPLC 分析图谱见图 2 中(3), 在 0~10min 明显有杂峰出现, 经和芦丁、槲皮素保留时间对比应为黄酮类物质。氢化白果酸产品的熔点测定值为 85°C~89°C, 红外检测结果见图 5, 上述结果均与文献文献[5]的报道相符。



(1) 氢化白果酸标准品的 HPLC 图谱 (2) 氢化白果酸提纯物的 HPLC 图谱 (3) 初提物的 HPLC 图谱

图 2 银杏酸的 HPLC 图谱

Fig.2 Chromatogram of HPLC on Ginkgolic Acids

(2) 白果酚、白果醇 对白果酚、白果醇进行红外分析, 结果见图 3 和图 4。其图谱显示结果与文献[5]所报道的白果酚、白果醇相应的结构吻合。

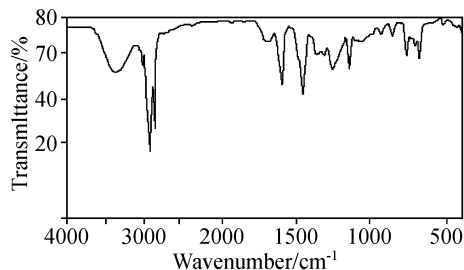


图 3 白果酚提纯物的红外光谱图

Fig.3 Chromatogram IR of ginkgolic phenols

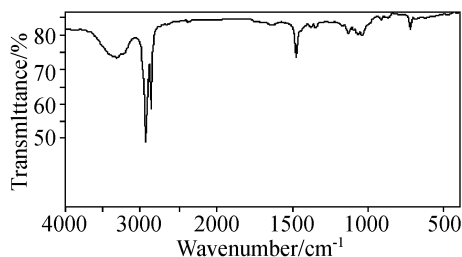


图 4 白果醇提纯物的红外光谱图

Fig.4 Chromatogram IR of ginkgolic alcohol

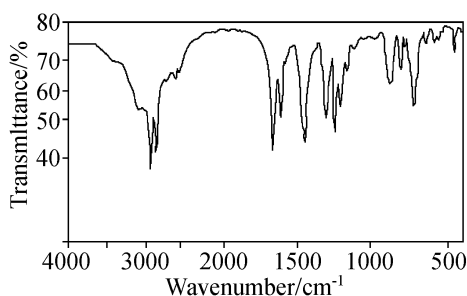


图 5 氢化白果酸提纯物的红外光谱图

Fig.5 Chromatogram of IR of ginkgolic acids

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。通过单因素以及正交试验等方法, 得到了该工艺过程优化的工艺条件。

(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) 对纯化物经生物测定结果如下: 黄酮类物质对小麦赤霉、苹果炭疽、番茄灰霉菌类的抑制率分别达到 60.18%、73.21%和 87.75%; 氢化白果酸对小麦赤霉、苹果炭疽菌类的抑制率分别为 64.84%和 76.16%, 对红蜘蛛、桃蚜虫和菜青虫(5 岁)的 24h 死亡率分别为 98.3%、76.40%和 80.23%; 白果酚对小麦白粉病的防治效果、保护和治疗作用分别达到 51.97%和 78.69%, 对红蜘蛛和桃蚜虫的 24h 死亡率分别为 91.09%和 67.40%。分离纯化物不但在生物农药方面开发前景广阔, 而且在医药等领域亦有良好的开发前景。

参考文献

- [1] 称学森, 张艳敏, 林 群. 山东农业大学学报, 2000, 31(1): 101~104.
- [2] 许 沧, 张成英, 罗 涛. 四川省卫生管理干部学院学报, 2001, 20(1): 8~9.
- [3] A HasLer, O sticher, B Meier. J. Chromatogr., 1992, 605: 41.
- [4] 庄向平, 虞杏英, 杨更生. 中草药, 1922, 23(8): 122~124.
- [5] 王 杰, 余碧玉. 中草药, 1995, 26(5): 123~126.
- [6] 吴红菱, 龚 坚, 刘先林 等. 中草药, 1997, 28(9): 539~540.