

DA201型大孔吸附树脂分离银杏叶提取物中银杏内酯A、B、C和白果内酯的研究

何 瑒¹, 何照范¹, 张勇民², Pierre Sinay^{2*}

(1. 贵州大学生化营养研究所, 贵州 贵阳 550025; 2. 巴黎高等师范学院, 法国 巴黎 75231)

银杏萜内酯主要包括银杏内酯A、B、C和白果内酯。银杏内酯B是一种很有应用前景的特异性血小板激活因子(PAF)受体拮抗剂,其专一性高,而银杏内酯A也是一种重要的昆虫拒食素,白果内酯对老年痴呆症和神经系统疾病具有一定疗效^[1]。目前,银杏萜内酯对心脑血管及外周血管疾病的有效疗效已使他成为药品及保健食品的原料。但目前银杏叶仍是提取银杏萜内酯化合物的主要工业生产来源。银杏萜内酯的提取分离方法报道较多。由于银杏叶中这类化合物含量很低,且具有特定结构,因此,提取分离步骤烦琐,费时且得率低。目前,日本专利及欧洲报道一般采用有机溶剂多级萃取与硅胶吸附-洗脱或活性炭吸附-洗脱与醋酸铅沉淀法相结合的提取方法,但得率低,工艺繁锁^[1,2]。近几年国内银杏萜内酯的提取分离也有报道,主要采用高效液相制备色谱柱进行分离。

本实验以银杏叶提取物为原料,采用大孔树脂柱分离,乙醇水溶液梯度洗脱,乙醇水重结晶得到萜内酯4种单体,其纯度达到95%以上。并且此工艺不采用有毒的有机溶剂,所得产品安全性更高,更适用于生产口服液、片剂、针剂及食品等。

1 仪器与试剂

银杏叶提取物(贵州大学中试基地生产,批号:021024,萜内酯含量>6%),白果内酯、银杏内酯A、B、C对照品(Sigma公司,纯度>95%),DA201型大孔吸附树脂(天津农药总厂),试剂均为分析纯,水为重蒸水。

Shimadzu LC-3A型高效液相色谱仪,SPD-1型紫外检测器,3390A型色谱数据处理机(美国Hewlett Packard),PB-85型高级恒温器(日本Shimadzu),CTO-2A柱温箱(日本Shimadzu)。

2 方法与结果

2.1 树脂的处理:取2 kg DA201树脂,加水浸泡

48 h,用分样筛在过微孔膜的自来水的冲洗下筛选出60~80目的树脂。取500 g树脂用蒸馏水反复清洗干净后,加入4 mol/L NaOH 600 mL浸泡4 h,滤过,滤后树脂用蒸馏水洗至近中性。加入4 mol/L HCl 600 mL,浸泡4 h,滤过后蒸馏水洗至近中性。加入95%乙醇500 mL,浸泡12 h后,用蒸馏水反复清洗至无乙醇味,装入玻璃色谱柱(150 cm×8 cm)。

2.2 分离纯化:称取银杏叶提取物525 g,加乙醇1 000 mL溶解,再加入水2 000 mL,旋转蒸发浓缩至无乙醇味,体积约1 000 mL,冷却滤过。滤液上DA201柱(柱体积为2 000 mL),过柱流速应控制在2~3滴/s,至棕色液离柱下出口约15 cm,用水洗至流出液清亮为止。分别用2 000 mL 5%、10%、30%、35%乙醇水溶液梯度洗脱,分别收集其单一内酯组份洗脱液,收集过程采用硅胶薄板监测(硅胶GF254;石油醚-醋酸乙酯为1-1)。洗脱液经真空薄膜蒸发器回收乙醇,浓缩至约200 mL,浓缩液放置结晶。

2.3 重结晶分离:分别将浓缩液放置结晶,晶体采用真空抽滤,粗晶用乙醇溶解,再加入水配结晶母液为70%乙醇溶液(固液比1:10),室温放置结晶,分别得4种白色晶体。5%洗脱液所结晶体为银杏内酯C;10%洗脱液所结晶体为白果内酯晶体;30%洗脱液所结晶体为银杏内酯A;35%洗脱液所结晶体为银杏内酯B。

将银杏内酯A和银杏内酯B粗晶体用80%乙醇2次重结晶,得银杏内酯A和银杏内酯B无色针状晶体,而白果内酯和银杏内酯C粗晶用30%乙醇水2次重结晶,得白果内酯白色粒状晶体和银杏内酯C无色方晶。晶体纯度采用高效液相色谱^[2]测定,外标法测得4种晶体纯度均大于95%。

2.4 树脂的再生:用80%乙醇2 000 mL洗柱至棕色变白色,80%洗脱液浓缩至干,得银杏黄酮(含量大于24%)。再用4 000 mL水洗至无乙醇味,分离

* 收稿日期:2004-02-23

基金项目:国家教委春晖计划资助项目;中法先进研究计划项目(PRA BT00-06);贵州大学2001年校基金资助

作者简介:何 瑒(1974—),女,贵州人,讲师,在职研究生,主要从事中药活性成分分离提纯研究工作。

柱即可重复使用。

2.5 结果及得率: 银杏叶提取物 525 g, 银杏萜内酯 6.15% (白果内酯 3.44%, 银杏内酯 C 2.09%, 银杏内酯 A 0.5%, 银杏内酯 B 0.12%), 采用乙醇水梯度洗脱, 大孔吸附树脂柱连续分离银杏叶提取物中萜内酯组份, 真空浓缩后结晶, 粗品用乙醇水溶液重结晶, 其 4 种萜内酯单体纯度和得率见表 1。

表 1 产品纯度和得率

Table 1 Purity and yield of products

组 份	质量/g	得率/%	提取率/%
白果内酯	12.65	2.41	70.01
银杏内酯 C	8.18	1.46	75.45
银杏内酯 A	1.63	0.31	62.28
银杏内酯 B	0.43	0.08	69.84

采用本工艺将总萜内酯质量分数 6.15% 的 525 g 原料经纯化可得纯度为 95% 的白果内酯 12.65 g, 银杏内酯 C 8.18 g, 银杏内酯 A 1.63 g, 银杏内酯 B

0.43 g, 总萜内酯为 22.89 g。总得率为 4.26%, 平均提取率为 69.27%。晶体及原料采用 HPLC 法测定, 与对照品的 HPLC 图谱相同, 没有干扰峰。

3 讨论

本法只采用一次柱分离, 结晶纯化即可连续制得纯度达 95% 以上的白果内酯, 银杏内酯 A、B、C 单体。本工艺操作中只采用无毒试剂水和乙醇, 对产品药用提供了安全保障。由于采用的是可重复使用的大孔树脂, 使生产成本降低至约 5 万元/kg。本工艺简便, 采用有机试剂少。因此适用于中试及工业生产, 为大规模开发银杏萜内酯药品奠定了良好基础。

References

- [1] Li Z L. *Exploitation and Exertion of Ginkgo Leaves* (银杏开发与利用) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1996.
- [2] Zhang D Q, He Z F. *Research in the Chemical Ingredients in Leaves of Ginkgo biloba* (银杏叶资源化学研究) [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999.

超临界萃取结合水煎煮法提取丹参中有效成分的研究

张 虹¹, 柳正良², 王洪泉¹, 杨 莺^{3*}

(1. 同济大学附属同济医院, 上海 200065; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 利群医院, 上海 200333)

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 味苦, 性微寒, 祛瘀止痛, 活血通经, 清心除烦。丹参主要含有结晶性菲醌类化合物, 如丹参酮 I (tanshinone I)、丹参酮 II_A、II_B (tanshinone II_A、II_B)、隐丹参酮 (cryptotanshinone)、二氢丹参酮 (dihydrotanshinone); 水溶性有效成分为丹参素 (danshensu) 及酚酸类成分原儿茶醛 (protocatechualdehyde)、咖啡酸 (caffeic acid)、迷迭酸甲酯 (methyl rosmarinate) 等, 以及棕罗汉松酚 (ferruginol) 等其他成分。脂溶性有效成分丹参酮 II_A 经研究表明具有抑制血栓形成等药理作用; 水溶性有效成分丹参素能抗心肌缺血并对冠状动脉有较好作用, 原儿茶醛能显著增加冠状动脉流量, 对抗 ADP 诱导的血小板积聚, 并有广谱抗菌作用。本实验对脂溶性有效成分以丹参酮 II_A 为指标, 水溶性有效成分以丹参素、原儿茶醛为指标对丹参进行提取研究, 并作为制剂的一组质控指标。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪: 日本岛津 LC-9A, 配有 SPD-6A 紫外可变波长检测器; CR-4A 数据处理器; 超临界萃取设备: SFX₂-10 型超临界流体萃取器 (美国 Isco 公司); Branson 1200 型超声波清洗器。

丹参酮 II_A (批号: 0766-200011)、原儿茶醛 (批号: 0810-9402) 购自中国药品生物制品检定所; 丹参素 (纯度大于 99%) 购自复旦大学药学院天然药物化学教研室。丹参药材购于上海市药材公司, 经第二军医大学宓鹤鸣教授鉴定。本品经自然晾干后, 60℃干燥 12 h, 粉碎, 过三号筛。甲醇为 HPLC 或 AR 纯, 蒸馏水为双蒸水 (自制)。

2 有效成分的测定

2.1 脂溶性成分丹参酮 II_A 的测定

2.1.1 色谱条件: 色谱柱: Diamonsil™ C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (迪马公司); 流动相: 甲醇-水

* 收稿日期: 2004-03-12

作者简介: 张 虹 (1967—), 女, 浙江海宁人, 副主任药师, 1990 年毕业于上海医科大学药学院, 获理学学士学位, 2001 年毕业于第二军医大学药物分析专业, 获医学硕士学位, 主要从事药物分析及临床药学研究, 发表论文 10 余篇。
Tel: (021) 56051080-3203 E-mail: zkzhu@yahoo.com.cn