银杏内酯 A B和白果内酯的分离与纯化△

天津大学化工学院 (300072) 韩金玉* 褚巧伟 常贺英 王 华 王海静

摘 要 以银杏叶浸膏 EGb_{761}为原料,通过预处理、制备色谱和重结晶过程,得到纯度达 98%以上的银杏内酯 A B和白果内酯纯品。建立了一种较简单的分离和纯化银杏内酯 A B和白果内酯的方法。

关键词 银杏内酯 白果内酯 制备色谱

Isolation and Purification of Ginkgolide A, B and Bilobalide

School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University (Tianjin 300072) Han Jinyu, Chu Qiaowei, Chang Heying, Wang Hua and Wang Haijing

Abstract A simple method for the isolation and purification of ginkgolide A, B and bilobalide (ginkgo terpene trialctone) was developed. A commercially available extract of leaves of *Ginkgo biloba* L. containing > 6% ginkgo terpene trilactone was used as the raw material. After partition in EtOAc, the enriched extract was separated to give individual terpenes by preparative liquid chromatography. Ginkgolide A, B and bilobalide could be isolated with high purity by recrystallizing in MeOH-H_2O.

Key words ginkgolide bilobalide preparative liquid chromatography

银杏 *Ginkgo biloba* L. 为我国的特产植物,国内外大量使用其叶子的标准提取物 EGb_{761}(主要有效成分为黄酮苷和内酯类化合物)治疗脑损伤后遗症及老年性大脑、心血管系统机能衰退等症[1]。EGb_{761}中的黄酮以山柰酚 (kaempferal)、槲皮素 (quercetin)、异鼠李素 (isohamnetin)的苷类化合物为主,内酯主要有二萜内酯和倍半萜内酯,二萜内酯有银杏内酯 (ginkgolides,主要有银杏内酯 A B C M和 J,简称 GA GB GC GM GJ)等,倍半萜内酯有白果内酯 (bilobalide) (简称 BB)。银杏内酯具有专属性的抗血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF)活性,是天然的 PAF拮抗剂,其中尤以 GB的活性最高。已引起了国际药学界的广泛关注,有望成为治疗休克、烧伤、过敏性哮喘、中风、移植排斥、血液透析等病症的一类新药[2],目前在法国、英国等国家已经分别进入II 和III期临床。而 BB则具有神经保护和抗水肿作用,有望成为治疗神经系统疾病、脑炎、脑水肿等病症的新药。

银杏内酯和白果内酯在银杏叶中的含量低,而许多其它伴生的代谢物的含量却很高,造成最有药用前景的 GB和 BB的分离和纯化非常困难。以往只能通过多次萃取、结晶或反复的柱色谱过程才能分离[3],存在着步骤多、过程复杂和生产成本高等问题。从创制我国银杏内酯类新药及产品质量控制等考虑,必须建立比较简便有效的 GB与 BB的生产工艺。为此本文进行了制备色谱法分离纯化 GA GB和 BB的研究工作。

1 实验方法

1.1 主要原材料: 从质量控制及实际生产考虑,本文以市售 EGb_{761}浸膏为原料,天津市金业植物纯化制品厂生产。分析型 HPLC用试剂为色谱纯,其余试剂均为化学纯。制备色谱所用溶剂在使用前要蒸馏 1次。

1.2 实验装置: 中压制备色谱: 法国 Gilson公司自动制备仪, 306泵, 206型馏分收集器, Unipoint v1.65色谱工作站;制备柱: 硅胶 H, 10~ 40μm, 40 mm× 300 mm,天津市科器高新技术公司;流动相: 乙酸乙酯-石油醚= 8∶2

1.3 银杏内酯和白果内酯的 HPLC分析方法[4]: 美国 TSP公司 P4000色谱仪, ChromQuest色谱工作站; 色谱柱: 美国 MICRA Scientific公司 SynChropak RP-P(C_{18}), 250 mm× 4.6 mm, 5μm;流动相: 水-甲醇-四氢呋喃 (75∶20∶10);流速: 1.0 mL/min;进样量: 20μL;蒸发光散射检测器

* Address: Han Jinyu, College of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin
韩金玉 博士、副教授。现任《高校化学工程学报》编委,天津大学化工学院有机合成与高分子化工系主任,绿色化工技术中心主任。主讲"化学工艺学"、"化工设计"课程,指导硕士生多名。主要研究方向为化学工艺绿色化学技术、天然产物工程和制药工程。近几年主要研究项目有紫杉醇原料药高效制备技术,药理作用靶点法分离天然抗癌物质紫杉醇的研究,天然药物银杏内酯 B生产工艺研究等国家、省部级科研项目,发表学术论文 20余篇。

△天津市自然科学基金项目 (No. 993606911)

(ELSD): 美国 Alltech公司 500型,漂移管温度为 105℃,载气(高纯氮)流速为 2.75 L/min. GA GB和 BB对照品为 Sigma公司产品.

1.4 实验步骤

1.4.1 原料预处理: 通过不同实验方案的比较,我们确定了比较有效的预处理方案如下: 取一定量的浸膏 EGb_{761},溶解于石油醚中. 然后加入一定体积的水,混合均匀后静止分层,经过滤得到水相;再用石油醚和水重复萃取. 过滤所得的残余物两次并合并水相;然后用乙酸乙酯萃取水相. 乙酸乙酯层加入 1 mol/L的氯化钠溶液,不断搅拌,使其混合均匀后静止分层. 去掉水相. 然后加水洗涤使乙酸乙酯层呈中性后分相取乙酸乙酯层萃取液减压浓缩. 浓缩物用 MeOH-H_2O (6∶3)多次溶解,合并收集溶解液,放入冰箱中冷却过夜. 结晶,经过滤得内酯混合物.

1.4.2 制备色谱分离纯化过程: 将经过原料预处理后得到含 GA GB和 BB的内酯混合物结晶,用制备色谱进行分离. 为在制备过程中进行在线检测,本文采用一分流阀安装在色谱柱与收集器、检测器之间,通过调整分流阀使进入 ELSD检测器的流动相的流量为 1 mL/min. 进行在线检测时, ELSD检测器的参数设定与检测方法中的相同.

在制备柱进样之前对内酯混合物需做进一步的处理. 用流动相溶解含 GA GB和 BB的内酯混合物结晶,并进行过滤,将得到的澄清亮褐色溶液用进样器和 5 mL样品环进样,经制备柱进行分离. 流动相流速为 20 mL/min,通过 Unipoint v1.65色谱工作站设置收集器收集.

2 结果与讨论

2.1 原料预处理: 经过预处理后得到的内酯混合物结晶的分析检测结果如图 1所示,从图中可以看出,混合物的主要成分为 GA GB和 BB,已经去掉黄酮类物质,但其它内酯的含量也很少,达到了预处理的目的,为后续的分离减轻了负担.

2.2 制备色谱分离: 实验结果如图 2所示,银杏内酯混合物的一次进样量为 86.2 mg. 由图 2可见对 GB GA和 BB的分离都可达到基线分离,通过收集器可得到成分单一的 GA GB和 BB 3种产品. 由预处理和制备色谱的实验结果可知,此方法对 GA GB和 BB的选择性较好,所得产品中不含 GC GJ和 GM,这对于药物质量控制非常有利.

2.3 产品的纯化: 利用重结晶将制备色谱所得的成

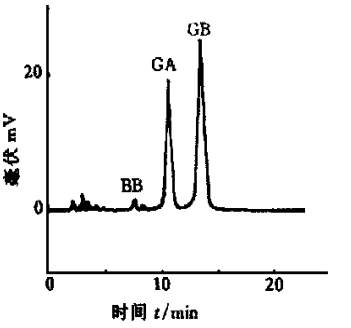

图 1 GA GB和 BB分析谱图

份单一的 GA GB和 BB进行最后纯化. GA GB分别用 MeOH-H_2O= 6∶4, MeOH-H_2O= 4∶6重结晶, BB用 MeOH-H_2O= 15∶85重结晶纯化. 最终得到纯度在 98%以上的 GA GB和 BB各 31.6, 42.8和 4.5 mg.

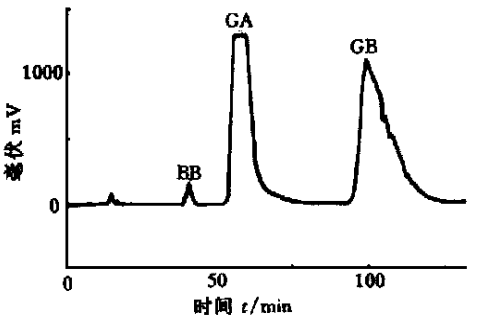

图 2 GA GB和 BB分离谱图

3 结论

以银杏叶浸膏 EGb_{761}为原料,采用预处理、制备色谱和重结晶过程进行银杏内酯 A B和白果内酯纯品分离纯化方法研究,得出以下结论:

1)本法可以制得纯度达 98%以上的银杏内酯 A B和白果内酯纯品,达到了药用纯度要求;

2)本法简便有效,对银杏内酯 A B和白果内酯的分离纯化具有较好的选择性;

3)由于采用以廉价的硅胶 H为固定相的制备色谱柱,因而具有较高的应用价值,为大规模制备银杏内酯 A B和白果内酯及开发相应的生产工艺奠定了良好的基础.

参 考 文 献

1 陈仲良. 中国药学杂志, 1996, 31(6): 326
2 Kaltai M, Hosford D, Guinnot P. Drugs, 1991, 42(2): 643
3 Camponovo F F, Wolfender J L, Maillard M P, *et al*. Phytochem Anal, 1995, 6: 141
4 田南卉,王 勤,历进忠. 药物分析杂志, 1997, 17(4): 282

(1999-11-02收稿)