

从银杏叶中制备聚戊烯乙酸酯

杨小明¹,陈 钧^{2*}

(1. 镇江医学院 江苏 镇江 212001; 2. 江苏理工大学生物与环境工程学院,江苏 镇江 212013)

摘要:目的 研究银杏聚戊烯乙酸酯的制备技术. 方法 以石油醚为提取溶剂,获得的石油醚浸膏经硅胶吸附能除去大部分极性较大的杂质;再经制备 TLC分离、脱蜡、制备 TLC纯化得到聚戊烯乙酸酯同系物的混合物. 结果 经 HPLC外标法测定其同系物的纯度为 84%. 结论 该方法简便易行,大大降低了工作量.

关键词: 银杏;聚戊烯乙酸酯;制备

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)05-0392-03

Preparation of polyprenyl acetates from leaves of *Ginkgo biloba*

YANG Xiao-ming¹, CHEN Jun²

(1. Zhenjiang Medical College, Zhenjiang Jiangsu 212001, China; 2. Bio-environment College, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu 212013, China)

Abstract Object To develop a method for the separation and purification of polyprenyl acetates from the leaves of *Ginkgo biloba* L. **Methods** Lipids, including polyprenyl acetates were extracted by petroleum ether, and adsorbed by silica gel to remove most of the polar impurities. After removing wax from the partially purified extract, it was further purified with silica gel chromatography. **Results** Finally, a mixture of homologues polyprenyl acetate was obtained. The purity of which as determined by HPLC external standard method was 84%. **Conclusion** This procedure is simple and relatively effective.

Key words *Ginkgo biloba* L.; polyprenyl acetates; preparation

银杏叶中的聚戊烯乙酸酯 (polyprenyl acetates)是具有 2 个反式-异戊烯基,若干个顺式-异戊烯基和 α -乙酰氧基所组成的线型长链化合物. 因该类化合物独特的结构,被认为是合成哺乳动物中具有重要生理功能的多萜醇 (dolichol)的合适中间体. 哺乳动物中的糖基化多萜醇磷酸酯可作为糖的供体,在寡糖合成中作为糖基转移酶的底物;多萜醇磷酸盐是 *N*-配糖体连接低聚糖链生物合成的专一中间体^[1,2]. 银杏聚戊烯乙酸酯是 Grignard 偶合法人工合成多萜醇的原料. 波兰科学院生物化学和生物物理研究所与日本 Curaray Co. Ltd. 对植物尤其是银杏中的聚戊烯类化合物的提取纯化和多萜醇的合成等方面做了大量工作,通过反复多次柱色谱分离已从银杏叶中提取出纯度达 99%的聚戊烯醇,并通过结构修饰转化成 (*S*)-多萜醇^[3]. 目前,已有关于银杏叶聚戊烯乙酸酯合成多萜醇药物的多项专利^[4-7].

我国目前对该聚戊烯类化合物的研究较少. 有关银杏叶中聚戊烯乙酸酯的提取分离仅有少量报

道^[8,9]. 本文在前人研究的基础上研究了银杏聚戊烯乙酸酯的提取方法,采用硅胶吸附法除去银杏叶石油醚浸膏中极性较大的杂质,较文献报道直接将石油醚浸膏进行柱色谱分离,大大降低了工作量.

1 实验部分

1.1 原料与试剂: 银杏叶采摘自江苏理工大学校园树龄 30 年以上的雄性银杏树,采摘后洗净、烘干、碾碎、加干燥剂密封保存. 银杏聚戊烯乙酸酯同系物混合物标准品由日本 Curaray Co. Ltd., T. Takigawa 博士赠送. 100~200 目柱层析用硅胶 (上海五四化学试剂厂生产),薄层层析用硅胶 G F₂₅₄ (中国医药集团上海试剂公司),所用试剂正己烷、石油醚 (沸程 60℃~90℃)、乙酸乙酯、丙酮和氢氧化钠为分析纯. 水为重蒸水. HPLC 流动相用正己烷、异丙醇 HPLC 级 (美国 Tedia 公司);甲醇 HPLC 级 (美国 Fisher 公司).

1.2 仪器分析及条件: 立式薄层层析缸 (长 12 cm × 高 12 cm × 宽 5 cm 玻璃缸);薄层硅胶板 60F₂₅₄, 层厚 0.2 mm (德国 Riedel Haen 公司); Wiretrol,

* 收稿日期: 2000-08-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 No. 29976018

作者简介: 杨小明,女,镇江医学院讲师,2000 年毕业于江苏理工大学获硕士学位. 研究方向: 天然产物有效成分的提取及活性.

Tel (0511) 8780196 Email shchen@jsust.edu.cn

10 μ L玻璃毛细点样管(美国 Drummono Scientific Company 公司);薄层层析以正己烷-乙酸乙酯(9:1)为展开剂,碘蒸气显色

JASCO 高效液相色谱仪配置如下: DG-980-50 三通道脱气器, LG-980-02三通道梯度器, PU-980 HPLC泵, TU-300分析柱恒温箱, UV IDEC-100-VI 紫外分光检测器(以上为日本分光株式会社); Inertsil ODS-3(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm)高效液相色谱分析及保护柱(日本 GL Sciences Inc. 公司); 10, 20 μ L进样器(MICROLITER[®]# 701美国); Rheodyne Model 7125进样阀(美国 Rheodyne 公司); 0.45 μ m微孔滤膜(浙江台州路桥四青生化材料厂); N2000型色谱工作站系统(浙江大学智能信息工程研究所)。流动相为异丙醇-甲醇-正己烷-水(22:11:45:8),流量 1.0 mL/min,炉温 38 $^{\circ}$ C, UV检测器,检测波长为 210 nm

1.3 样品制备:样品的制备流程见图 1



图 1 聚戊烯乙酸酯分离图

称取 50.0 g 20~40目的银杏碎叶浸泡于 250 mL石油醚中,于室温(10 $^{\circ}$ C~15 $^{\circ}$ C)间歇搅拌 7 d,减压过滤;滤渣浸入 250 mL石油醚,于室温搅拌 10 h后,分离提取液并再重复提取 1次。在滤渣中再加入石油醚搅拌后,作 TLC检测,以聚戊烯乙酸酯标准品为对照,发现经 3次提取银杏叶中的目的物已基本提净,合并、挥去滤液后得 3.4 g墨绿色浸膏。将该浸膏用少量正己烷溶解,以一定比例的柱层析用硅胶吸附。再以正己烷为洗脱液进行洗脱,洗脱液以 TLC检测,至无聚戊烯乙酸酯为止。挥去正己烷得红棕色膏状物。将该膏状物溶于少量正己烷中,在活化好的硅胶制备板上点样,以正己烷-乙酸乙酯(95:5)为展开剂上行展开。展开结束,捕吸 Rf值较大的第二条黄色条带,以乙酸乙酯洗脱后,作 TLC检测与标准聚戊烯乙酸酯对照,确认为含聚戊烯乙酸酯的混合物。将收集得到的该红棕色物质用 50倍的丙酮溶解后,置于 0 $^{\circ}$ C保存 10 h,蜡质呈白色絮状

析出,用 0.45 μ m滤膜迅速抽滤,除去大部分冷藏时析出的蜡质。除蜡后,降低展开剂的极性,再经制备薄层作进一步的纯化。用展开剂正己烷-乙酸乙酯(97:3)进行二次展开,分离出 Rf约为 0.5的黄色条带。洗脱后经 TLC检测显示 1个斑点,确定为聚戊烯乙酸酯。以 HPLC外标法进行纯度测定。

1.4 聚戊烯乙酸酯外标曲线的测定:聚戊烯乙酸酯的定量分析主要依靠 HPLC来完成。有关聚戊烯乙酸酯的反相 HPLC分析方法的报道并不多见,本文采用异丙醇-甲醇-正己烷-水(22:11:45:8)为流动相,以 ODS3分析柱成功地对聚戊烯乙酸酯的纯度进行了测定(分析条件见 1.2),在该分析条件下,聚戊烯乙酸酯各同系物获得良好的基线分离,由此建立了由外标法测定聚戊烯乙酸酯含量的方法。

准确称取 25.0 mg银杏叶聚戊烯乙酸酯标准品,配成 50.00 mL的正己烷溶液,取该溶液 2.0 mL稀释成 10.00 mL的正己烷溶液。配成的浓度为 0.100 mg/mL的聚戊烯乙酸酯标准溶液经针头过滤器过滤后,分别以 6.0, 10.0, 14.0, 16.0和 20.0 μ L进样,每个体积平行进样 3次,取平均值。将聚戊烯乙酸酯 5个主要同系物的峰看作一个组分进行处理,作出聚戊烯乙酸酯 5个主要峰面积之和与进样量(μ g)之间的对应关系曲线,可得聚戊烯乙酸酯的外标曲线回归方程为: $Y = 0.6375X - 0.0347$, $r = 0.9981$ 。检测下限参考其他研究者的处理方法^[10],按背景噪音的 3倍量估算为 0.12 μ g。因此该方法的检测线性范围为: 0.12~2.0 μ g

2 结果与讨论

2.1 硅胶吸附除杂的作用:聚戊烯乙酸酯处于银杏叶的强亲脂性部位,用石油醚多次提取可提取出绝大部分的聚戊烯乙酸酯。在银杏叶的脂溶性部位中除聚戊烯乙酸酯外,还有易溶于非极性有机溶剂的胡萝卜素、叶绿素、蜡质、脂肪酸等杂质。为了除去银杏叶石油醚提取物中极性较大的杂质,本试验中采用了硅胶吸附的方法。硅胶是一种极性吸附剂,能够吸附极性较强的成分,而对极性相对较弱的成分的吸附能力较差。银杏叶的石油醚提取物经硅胶吸附后,再用极性较弱的溶剂将弱极性成分洗脱,而极性较强的成分保留在硅胶上,从而达到除去杂质的目的。经硅胶吸附处理后,用正己烷洗脱得到的洗脱液为红褐色。提取液中的叶绿素、鞣质、有机酸等极性较大的组分被吸附在硅胶上。而蜡质、胡萝卜素、小分子萜类、聚戊烯乙酸酯等被洗脱。硅胶吸附处理能除去大部分极性较大的杂质,大大减轻了后续分离、

纯化步骤的工作量。

2.2 制备聚戊烯乙酸酯的纯度测定: 称取 14.9 mg 制备的聚戊烯乙酸酯配成 50.00 mL 正己烷溶液, 稀释成 0.1788 mg/mL 的正己烷溶液, 以 HPLC 外标法检测其纯度。聚戊烯乙酸酯同系物的峰型分布见图 2 经测定提取的聚戊烯乙酸酯纯度为 84%。所提取得到的聚戊烯乙酸酯各主要同系物的链长, 经与标准品(见图 3)对照可能为聚戊烯乙酸酯-16, -17, -18, -19和 -20(简称为 PA-17, PA-18, PA-19和 PA-20), 其准确链长有待通过液相色谱仪确定

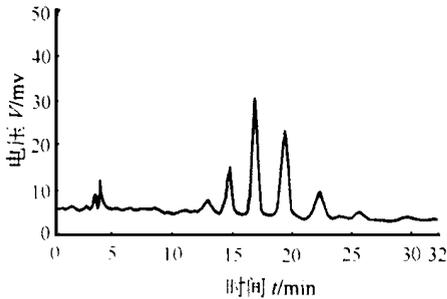


图 2 制备的聚戊烯乙酸酯的 HPLC 图

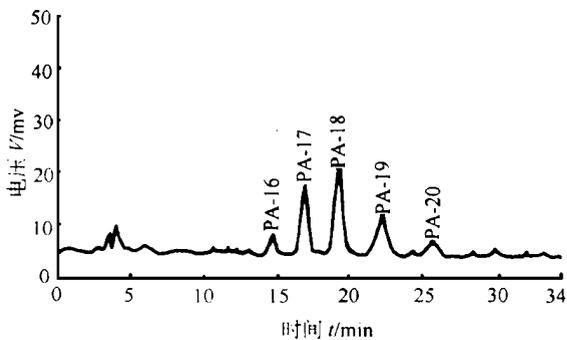


图 3 聚戊烯乙酸酯标准品的 HPLC 图

比较聚戊烯乙酸酯标准品和自制的聚戊烯乙酸酯的 HPLC 图可见, 二者都以聚戊烯乙酸酯-18 的峰高为最高, 而聚戊烯乙酸酯-17 和-19 的峰高则有所不同。标准品中聚戊烯乙酸酯-16, -17, -18, -19 和-20 各同系物的含量分布按其 HPLC 面积比约为

6.3: 27.32: 39: 19: 7.51; 而自制的聚戊烯乙酸酯各同系物的含量按其 HPLC 面积比约为 1.3: 17.4: 44.4: 22.5: 14.5 这种聚戊烯乙酸酯同系物分布的差异可能与植物生长的地域不同有关

3 结论

银杏叶石油醚提取物中除含有聚戊烯乙酸酯外, 还含有叶绿素、胡萝卜素、脂肪酸、蜡质、碳水化合物等。该提取物经过硅胶吸附除杂、制备薄层分离、脱蜡和制备薄层纯化后, 所得产物经 TLC 检测显示 1 个斑点, 确定为聚戊烯乙酸酯同系物的混合物。再经 HPLC 测定该聚戊烯乙酸酯同系物的混合物纯度为 84%, 其同系物主要链长可能为聚戊烯乙酸酯-16, -17, -18, -19 和-20

致谢: 本试验所用标准品由 T. Takigawa 博士赠送, 在此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] Sharon S, K. Break throughs and views the importance of being dolichol [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 243: 1-5.
- [2] Tadcusz Chojnacki, Gustav Dallner. The biological role of dolichol [J]. *Biochem J*, 1988, 251: 1-9.
- [3] Tetsuo Takigawa, Koichi Iyata, Masao Mizuno. Synthesis of mammalian dolichols from plant polyprenols [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1989, 51: 171-182.
- [4] 勘解由昭. 免疫增强剂 [P]. 日本专利: 昭 62-39521, 1987-02-20.
- [5] 勘解由昭, 中川直, 水田野夫, 等. 肝功能改善剂 [P]. 日本专利: 昭 62-29517, 1987-02-07.
- [6] Takak Fuminaro, Urabe Akio, Shimamura Michiya, Methods for enhancing differentiation and proliferation of hematopoietic progenitor cell [P]. United states patent, 4, 812, 433, 1989.
- [7] Yamatsa Isao, Suzuki Takeshi, Abe Shinya. Therapeutic and preventive agent containing dolichol [P]. United states patent 4, 791, 105, 1988.
- [8] 王成章, 沈兆邦, 陈祥. 银杏叶聚戊烯醇化学研究 [J]. *林产化学与工业*, 1992, 12: 279-286.
- [9] 王成章, 沈兆邦, 陈祥. 落叶松和水杉针叶的聚戊烯醇 [J]. *植物资源与环境*, 1996, 5(4): 21-25.
- [10] 虞杏英, 庄向平, 方涌强. 高效液相色谱法分析银杏叶中的银杏萜内酯 B [J]. *药物分析杂志*, 1993, 13(2): 85-87.

(上接第 387 页)

- [19] 李十中, 闫之果, 葛英. 超滤处理蜂乳精口服液的初步研究 [A]. 90 全国膜技术论文报告会论文预印集 [C]. 中国海水淡化与再利用学会反渗透专业委员会, 天津, 1990: 215-217.
- [20] 李莉, 俞加林. 超滤在中药制剂中的应用 用超滤法制备中药注射液 [J]. *黑龙江医药*, 1988, 3: 30-32.
- [21] 简惠. 超滤技术应用于中药口服液可行性研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 1994, 5(1): 44-45.
- [22] 杨张谓, 张善政, 邓丽仪, 等. 超滤工艺用于人参精口服液生产的实验 [J]. *中成药*, 1991, 13(2): 49-50.
- [23] 杨张谓, 张善政, 邓丽仪, 等. 人参精口服液采用超滤工艺的中试研究 [J]. *中成药*, 1994, 16(1): 46-48.
- [24] 周强. 超滤法在中药水提液分离的应用 [J]. *川药校刊*,

1992, 3: 56-58.

- [25] 李十中, 陈炜, 李振花. 不同制备工艺对中药标示有效成分的影响及药物成分分析方法探讨 [J]. *中草药*, 2000, 31(9): 668-669.
- [26] Bosset J F, Ginoux M, Triboulet J P, et al. Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of esophagus [J]. *New England Med*, 1997, 337: 161-167.
- [27] Iizuka N, Miyamoto K, Okita K, et al. Inhibitory effect of Coptidis Rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines [J]. *Cancer Letters*, 2000, 148(1): 19-25.