

高速逆流色谱法分离纯化银杏叶中白果内酯和银杏内酯A、B、C

苏 静, 谈 锋*, 李连强, 谢 峻, 冯 巍, 陈 斌

(西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715)

摘 要:目的 从银杏叶中分离纯化白果内酯和银杏内酯A、B、C。方法 银杏叶提取液经醋酸乙酯萃取、D-101 大孔吸附树脂柱和 Al_2O_3 柱纯化后得到总内酯提取物, 提取物再经两次高速逆流色谱分离制备4种内酯单体。结果 25%乙醇热提取、醋酸乙酯萃取、D-101 柱、pH 4.0 的 Al_2O_3 柱对总内酯的提纯最终使总内酯质量分数达到44.98%。经高速逆流色谱制备得到的白果内酯和银杏内酯A、B、C最高质量分数分别为98.3%、98.9%、98.8%、98.4%。结论 本法简便快速、回收率高, 为银杏叶中内酯单体的制备提供了一种新方法

关键词:银杏叶; 白果内酯; 银杏内酯A; 银杏内酯B; 银杏内酯C; 高速逆流色谱

中图分类号:R286.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)11-1644-05

Separation and purification of bilobalide and ginkgolides A, B, and C from *Ginkgo biloba* leaves by high-speed counter-current chromatography

SU Jing, TAN Feng, LI Lian-qiang, XIE Jun, FENG Wei, CHEN Bin

(Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education),

Key Laboratory of Plant Ecology and Resources in Three Gorges Reservoir Region,

School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: **Objective** To separate and purify bilobalide and ginkgolide A, B, and C from *Ginkgo biloba* leaves. **Methods** Firstly the extract of *G. biloba* leaves was purified by extraction of acetic ether, D-101 macroporous resin, and Al_2O_3 (pH 4) to obtain the crude extract of lactones. Then the crude extract was further purified by high-speed counter-current chromatography (HSCCC) to prepare the monomer of bilobalide and ginkgolide A, B, and C. **Results** The crude extract of lactones with the purity of 44.98% was obtained by extraction with 25% alcohol, acetic ether, D-101 macroporous resin, and Al_2O_3 (pH 4). When the crude extract was further purified by HSCCC, the different purity of bilobalide and ginkgolide A, B, and C was got. The maximal purity of bilobalide and ginkgolide A, B, and C was 98.3%, 98.9%, 98.8%, and 98.4%. **Conclusion** This method, which is simple and rapid, provides a new way to separate and purify the lactones from *G. biloba* leaves.

Key words: *Ginkgo biloba* L. leaves; bilobalide; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgolide C; high speed counter current chromatography (HSCCC)

银杏内酯为银杏叶提取物中主要的药效成分之一, 主要包括银杏内酯A、B、C和白果内酯。银杏内酯是天然的血小板活化因子拮抗剂, 其中以银杏内酯B的活性最高, 有望成为治疗休克、过敏性哮喘、中风、移植排斥、血液透析等症的一类新药。但4种内酯的量低且结构相似, 不易分离得到单体。韩金玉等^[1]利用萃取、中压制备色谱和重结晶技术分离得到质量分数98%以上的银杏内酯A、B和白果内酯, 但没有得到较难制备的银杏内酯C。高速逆流色谱

(HSCCC)是近十几年来发展起来的新型高效液—液分配技术, 具有回收率高、制备量大、操作简便等优点, 国内外已有将其应用于天然产物的分离纯化的报道, 取得了满意的效果^[2]。本实验在D-101大孔吸附树脂和氧化铝富集银杏叶中内酯的基础上, 采用HSCCC法分离得到其中质量分数较高的银杏内酯A、B、C和白果内酯, 为从银杏叶中制备银杏内酯单体提供了一种新方法。

1 材料与仪器

收稿日期: 2008-03-20

基金项目: 三峡库区生态环境教育部重点实验室科学研究基金项目资助

作者简介: 苏 静(1985—), 女, 山东济南人, 在读硕士研究生, 研究方向为药用植物生物技术与生化工程。

Tel: (023)68367091 E-mail: sujing07@swu.edu.cn

* 通讯作者 谈 锋 Tel: (023)68367091 E-mail: tanfeng@swu.edu.cn

银杏叶于2006年10月下旬采集于西南大学校园,经本校刘玉成教授鉴定为银杏 *Ginkgo biloba* L. 的叶。银杏内酯A、B、C和白果内酯对照品(质量分数 $\geq 98\%$,上海同田生化技术有限公司),中性氧化铝(100~200目,广西平果贵成科技公司),D-101大孔吸附树脂(天津农药厂),SEP-PAK C_{18} 柱(美国Waters公司,1 mg),高效液相色谱用试剂为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

TBE-300A型高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司),Waters1525-2487型高效液相色谱仪(美国Waters公司,蒸发光散射检测器),梅特勒-托利多电子天平(精度0.01 mg)。

2 方法与结果

2.1 银杏内酯的HPLC-ELSD法测定^[3]

2.1.1 色谱条件:Phenomenex Luna C_{18} 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-水(35:65);体积流量:1 mL/min;蒸发光散射检测器(ELSD);漂移管温度:80 $^{\circ}$ C;载气压力:1.7 $\times 10^5$ Pa;进样量:20 μ L。

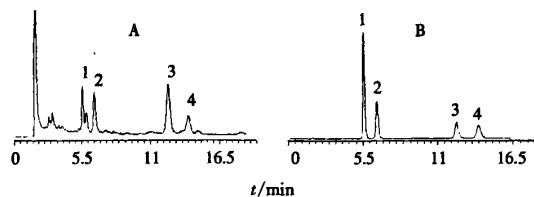
2.1.2 标准曲线的制备:各称取银杏内酯A、B、C和白果内酯对照品适量,甲醇溶解,得1 mg/mL母液。依次稀释成10、20、40、80、160 μ g/mL系列对照品溶液,进样20 μ L,按上述色谱条件检测。以峰面积的自然对数(Y)为横坐标,质量浓度的自然对数(X)为纵坐标进行线性回归,得各种内酯的回归方程。白果内酯: $Y=0.7766X-5.5628$, $R^2=0.9999$;银杏内酯C: $Y=0.7893X-5.6275$, $R^2=0.9997$;银杏内酯A: $Y=0.8092X-5.8222$, $R^2=0.9997$;银杏内酯B: $Y=0.7742X-5.2325$, $R^2=0.9994$ 。

2.1.3 供试品溶液的制备:所得产品用40%甲醇溶解并定容,取200 μ L上SEP-PAK C_{18} 柱,水、10%甲醇各洗1 mL除杂,然后用40%甲醇洗脱5 mL,收集洗脱液浓缩干后以甲醇定容,过0.22 μ m微孔滤膜,即得。

2.1.4 外标法定量:将乙醇热提取、醋酸乙酯萃取、D-101大孔吸附树脂纯化、氧化铝纯化各处理方法中得到的产品,分别制备成供试品溶液。用银杏内酯A、B、C和白果内酯对照品配制对照品溶液,在完全相同的条件下,准确进样与对照品溶液相同体积的供试品溶液,根据待测组分的信号,用回归方程计算样品中各内酯的质量浓度。

2.2 银杏叶中内酯的测定:银杏鲜叶于60 $^{\circ}$ C烘干、粉碎、过50目筛网后,称取银杏叶干粉5 g,用25%乙醇在70 $^{\circ}$ C热提取,2 h/次,至提取液无色,合并提取

液,浓缩烘干得提取物A,将其溶于适量的蒸馏水中,按100 mL溶液加入3 g NaOAc比例加入,醋酸乙酯等体积萃取2次,有机相浓缩烘干,所得产品制备成供试品溶液,进样测定各内酯的量,计算银杏叶中各内酯的质量分数。结果银杏叶中白果内酯、银杏内酯C、A、B和总内酯的质量分数分别为0.038%、0.028%、0.042%、0.040%、0.15%。色谱图见图1。



1-白果内酯 2-银杏内酯C 3-银杏内酯A 4-银杏内酯B
1-bilobalide 2-ginkgolide C 3-ginkgolide A 4-ginkgolide B

图1 银杏叶(A)和对照品(B)的HPLC图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of *G. biloba* leaves sample (A) and reference substances (B)

2.3 银杏叶提取物中内酯的测定^[4]:银杏叶干粉按固液比1:10加入25%乙醇在70 $^{\circ}$ C热提取两次,2 h/次,提取液浓缩烘干得提取物B。取一定量提取物B溶于蒸馏水中,按100 mL溶液加入3 g NaOAc比例加入,以醋酸乙酯溶液等体积萃取2次,有机相浓缩烘干,所得产品制备成供试品溶液,测定各内酯的量,计算提取物B中各内酯的质量分数。结果提取物中白果内酯、银杏内酯C、A、B和总内酯的质量分数分别为0.09%、0.10%、0.16%、0.11%、0.46%。

2.4 银杏叶萃取物中内酯的测定^[4]:将提取物溶于蒸馏水中,按100 mL溶液加入3 g NaOAc比例加入,以醋酸乙酯溶液等体积萃取2次,有机相浓缩烘干,称定质量,所得产品制备成供试品溶液,测定质量浓度,计算各内酯的质量分数。结果萃取物中白果内酯、银杏内酯C、A、B和总内酯的质量分数分别为1.09%、1.22%、2.42%、1.52%、6.25%。

2.5 银杏叶D-101大孔吸附树脂纯化产物中内酯的测定^[5]:取萃取物用60%乙醇溶解,上D-101大孔吸附树脂柱,依次用水,30%、40%、50%、60%、70%、80%乙醇洗脱,各收集一个柱床体积的洗脱液,浓缩干后以甲醇定容,测定各内酯的质量,结果见图2。可以看出各内酯在30%乙醇洗脱时都不能被洗脱下来,白果内酯、银杏内酯C在40%乙醇洗脱时达到最大洗脱量,银杏内酯A、B分别在50%、60%乙醇洗脱时达到最大洗脱量。为了满足4种内酯都能被最大量洗脱下来,选择先用水和30%乙醇洗除杂质,再用60%乙醇洗脱。

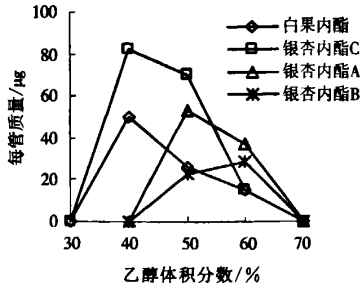


图2 不同体积分数乙醇洗脱时各种内酯的变化
Fig. 2 Changes of lactones contents eluted by different concentration of alcohol

取萃取物用60%乙醇溶解,上D-101大孔吸附树脂柱(15 cm×1 cm),先用水、30%乙醇各洗一个柱床体积(11 mL),再用60%乙醇洗脱,每5 mL收集一管,每管浓缩干后以甲醇定容,测定各管中内酯的质量浓度,计算质量,结果见图3。可以看出35 mL(大约3个柱床)可将4种内酯洗脱完全。合并各管,浓缩烘干,称定质量,所得产品制备成供试品溶液,测定质量浓度,计算各内酯的质量分数。结果树脂纯化产物中白果内酯、银杏内酯C、A、B和总内酯的质量分数分别为2.49%、3.65%、5.39%、4.27%、15.80%。

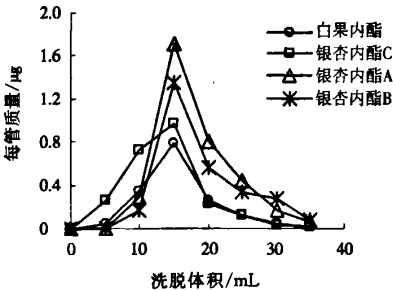


图3 60%乙醇洗脱时各种内酯的变化
Fig. 3 Variation of terpene lactones' contents in different eluting volumes of 60% alcohol

2.6 优化氧化铝纯化银杏内酯的条件: Al_2O_3 是银杏黄酮的优良吸附剂,经 Al_2O_3 纯化后可有效地去除银杏黄酮成分。但市售酸性 Al_2O_3 的 pH 值不是一定值(一般为4~4.5),而且厂家不同 pH 值也有所不同,本实验则具体考察了 Al_2O_3 的 pH 值对各内酯的质量分数和回收率的影响。

称取3份市售的中性氧化铝,按固液比1:2用1% HCl 浸泡24 h,多次振荡。浸泡后的氧化铝1份用蒸馏水洗至 pH 4.0;另一份用蒸馏水洗至 pH 5.1;最后1份不水洗,其 pH 值为3.2。处理后在105℃烘干4 h,180℃活化3 h后装柱。称取等量的树脂纯化产物3份,用甲醇溶解,上不同 pH 值的氧化铝柱,甲

醇洗脱1个柱床体积,洗脱液浓缩烘干,称定质量,所得产品制备成供试品溶液,测定质量浓度,计算各内酯的质量分数,见表1。实验表明氧化铝 pH 值的变化对白果内酯的回收率影响较大,银杏内酯B次之,对银杏内酯A的影响最小。氧化铝 pH 3.2时每种内酯的回收率都较大,但质量分数很低;pH 5.1时质量分数较高,但回收率较低。综合质量分数和回收率考虑,pH 4.0时结果比较理想。本实验选择 pH 4.0 的氧化铝纯化银杏内酯。

表1 不同 pH 值的 Al_2O_3 纯化得到的银杏内酯质量分数
Table 1 Contents of lactones purified by Al_2O_3 in different pH values

Al_2O_3 pH 值	质量分数/%				
	白果内酯	银杏内酯C	银杏内酯A	银杏内酯B	总内酯
3.2	2.45	4.78	7.95	4.74	19.92
4.0	5.25	10.41	18.75	10.57	44.98
5.1	5.91	12.42	23.29	12.09	53.71

银杏叶经25%乙醇热提取、醋酸乙酯萃取、D-101大孔吸附树脂柱和 pH 4.0 Al_2O_3 柱纯化后使总内酯质量分数达到44.98%。

2.7 HSCCC 分离制备银杏内酯

2.7.1 溶剂系统的选择:HSCCC 进行样品分离的关键是样品在溶剂系统中具有合适的分配比(K),K 定义为溶质在固定相中的质量浓度(C_s)同溶质在流动相中的质量浓度(C_m)之比。根据银杏内酯的极性初步选定正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水为两相溶剂系统,上相为固定相,下相为流动相,按不同比例混合,总体积为20 mL,先各取2 mL 下相溶解适量的经氧化铝纯化后的样品,HPLC 法测定,再加入2 mL 上相,振荡分层后,再采用HPLC 法测定。上相中有效成分的质量浓度为两者之差,计算出 K 值,见表2。

表2 各种内酯在不同溶剂系统中的 K 值
Table 2 K Value of lactones in different solvent system

溶剂系统	K 值			
	正己烷-醋酸乙酯- 甲醇-水	银杏内酯C	白果内酯	银杏内酯B 银杏内酯A
3:5:3:5	0.41	2.02	1.96	1.17
3.5:5:3.5:5	0.19	1.11	0.97	0.66
4:5:4:5	0.16	0.66	0.64	0.47
4:5:3:5	0.21	1.32	1.14	0.74
4:5:2.5:5	0.35	1.99	1.95	1.19

样品在溶剂系统中理想的分配比(K)应在0.67~1.5。 $K \ll 0.5$ 会导致峰分离度的下降,而 $K \ll 2$, 会使保留时间太长。根据测定的 K 值,并比较了

分离效果,4:5:3:5的溶剂系统对白果内酯、银杏内酯B、A有较好的分离效果。但银杏内酯C的K值太小,出峰很早,不能与杂质达到很好的分离,所以合并第1次HSCCC中含银杏内酯C的各管,进行第2次HSCCC。银杏内酯C在不同溶剂体系中的K值见表3。可见体积比为2:5:2:5的体系虽K值合适,但由于流动相中甲醇比例较少,在用流动相溶解样品上样时样品不易溶解,使上样量减少。在其余溶剂系统中,体积比2:6:3:5的溶剂体系对银杏内酯C的分离效果最好,作为第2次HSCCC的溶剂系统。

表3 银杏内酯C在不同溶剂体系中的K值

Table 3 K Value of ginkgolide C in different solvent systems

溶剂系统	银杏内酯C的K值
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水	
3:5:3:5	0.41
2:5:2:5	1.06
2:5:3:5	0.52
2:6:3:5	0.87
2:7:3:5	0.96

2.7.2 样品溶液的制备:将制备的120 mg Al_2O_3 纯化产物用10 mL 正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(4:5:3:5)的下相溶解,作为第1次HSCCC上样液。第1次HSCCC不能使银杏内酯C与杂质分开,收集含银杏内酯C的各管,浓缩干后用10 mL 正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(2:6:3:5)的下相溶解,进行第2次HSCCC制备。

2.7.3 HSCCC 操作过程:先以9 mL/min的流速泵入固定相,待固定相充满管道后,打开主机调整转速为800 r/min,主机正转,当达到设定转速时,以2 mL/min的流速泵入流动相,主机温度控制在25℃,当流动相从主机出口流出时,进样,检测波长280 nm,开始出峰后4 mL收集一管。收集的各管溶液直接向HPLC仪进样,测定各内酯的质量浓度。适量接收液转入称量瓶中,烘干,称定质量,计算目标产物的质量。

由于制备时4 mL收集一管,得到了不同质量分数的内酯。第1次HSCCC的色谱图中3种内酯的质量分数和质量变化见图4。银杏内酯A、银杏内酯B、白果内酯的最高质量分数分别为98.9%、98.8%、98.3%,其中第29~31管中银杏内酯A的质量分数在97.5%以上,三管的合并回收率为54.33%;第37~39管中银杏内酯B的质量分数在97.3%以上,合并回收率为45.06%;第46~48管中白果内酯的

质量分数在97.5%以上,合并回收率为39.39%。第2次HSCCC的色谱图中银杏内酯C的质量分数和质量变化见图5。银杏内酯C的最高质量分数为98.4%,其中第27~28管中银杏内酯C的质量分数在97.3%以上,两管的合并回收率为34.24%。可根据需要收集不同的管项,得到不同质量分数的4种内酯。

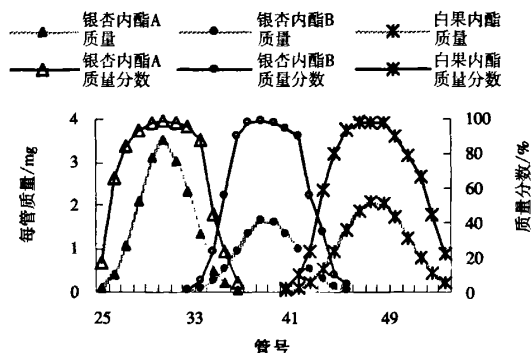


图4 第1次HSCCC图谱相应位置上内酯质量分数与质量的变化

Fig. 4 Variation of purity and content of three lactones on corresponding site of first HSCCC chromatogram

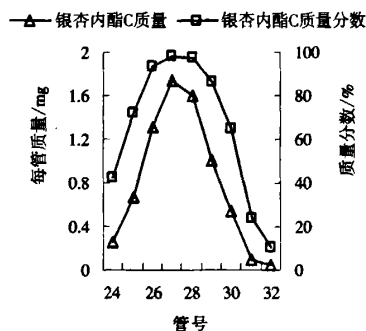


图5 第2次HSCCC图谱相应位置上GC质量分数与质量的变化

Fig. 5 Variation of purity and content of GC on corresponding site of second HSCCC chromatogram

3 讨论

HSCCC为液-液色谱系统,流动相和固定相均为液体,无需载体,消除了气-液和固-液色谱中因使用载体而带来的吸附现象,样品可全部回收,回收率高,而且分离纯化与制备可同步完成,特别适于制备性分离。与HPLC法相比,HSCCC法进样量较大,最多可达数克;与常压、低压色谱法相比,HSCCC具有分辨率高、分离时间短、操作简便、节约溶剂、回收率高的优势,是制备银杏内酯单体的理想方法。

参考文献:

[1] 韩金玉,褚巧伟,常贺英,等.银杏内酯A、B和白果内酯的分

- 离与纯化[J]. 中草药, 2000, 31(9): 652-653.
- [2] 祝顺琴, 谈 锋. 高速逆流色谱在天然产物分离中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(12): 788-791.
- [3] 单鸣秋, 张 丽, 曹雨延. HPLC-ELSD 法测定银杏叶提取物中内酯的含量[J]. 中草药, 2004, 35(12): 1366-1368.
- [4] 王成章, 郁 青, 谭卫红, 等. 溶剂萃取银杏萜内酯的因子研究[J]. 天然产物研究与开发, 1998, 11(2): 53-56.
- [5] 张 健, 刘明登, 苏小建. 银杏萜内酯的提取工艺[J]. 资源开发与市场, 1998, 14(3): 100-101.

挤出滚圆法制备芍药甘草方微丸的处方工艺研究

陈丽华^{1,2}, 冯 怡^{1*}, 徐德生¹, 汪益涵¹, 李俊松¹

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 现代中药制剂教育部重点实验室 江西中医学院, 江西 南昌 330004)

摘 要:目的 应用挤出滚圆法制备芍药甘草方微丸。方法 在考察提取物的物理性质的基础上, 用挤出滚圆造粒机分别制备芍药、甘草微丸; 采用单因素试验优化制剂处方及工艺条件; 评价了微丸的粉体学性质、收率和体外溶出度。结果 用挤出滚圆法制备的芍药、甘草微丸在 30 min 内体外溶出均达 90% 以上, 且圆整度好, 收率高。结论 挤出滚圆法制备芍药甘草方微丸工艺简便易行, 制得的微丸质量好, 收率高, 体外释药迅速。

关键词: 芍药甘草方微丸; 挤出滚圆法; 芍药; 甘草

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)11-1648-05

Process of Shaoyao Gancao formulation pellet by extrusion-spheronization method

CHEN Li-hua^{1,2}, FENG Yi¹, XU De-sheng¹, WANG Yi-han¹, LI Jun-song¹

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Key Laboratory for Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: **Objective** To study the formulation and process of Shaoyao Gancao formulation pellet by extrusion-spheronization. **Methods** Based on the physical characters of active parts, the pellets with Shaoyao (*Radix Paeoniae Alba*) and Gancao (*Radix Glycyrrhizae*) were prepared separately by extrusion-spheronization. The formulation and process were studied by direct comparison. Then their characters were evaluated. **Results** The active components could release more than 90% in 30 min and the pellets presented a perfect sphericity. **Conclusion** Shaoyao Gancao formulation pellet could be prepared by extrusion-spheronization machine and the pellets show a perfect sphericity. *In vitro* dissolution is satisfactory with high quality and yield.

Key words: Shaoyao Gancao formulation pellet; extrusion-spheronization; *Radix Paeoniae Alba*; *Radix Glycyrrhizae*

芍药甘草汤源于张仲景的《伤寒论》, 由白芍、甘草组成, 具有明显的解痉镇痛作用。其组方严谨, 疗效确切。目前中药微丸的制备主要采用传统的泛丸法, 该方法操作复杂, 影响因素多, 质量不易控制, 收率较低。挤出滚圆法具有生产能力大、操作方便、产品收率高、工艺重现性好、微丸大小均匀, 分布更集中、圆整度好、载药量大、易于进一步包衣等优点^[1]。本实验在已制定芍药甘草方提取物标准的基础上, 根据提取物不同的物理性质及粉体学性质, 采用挤

出滚圆法分别制备芍药甘草方微丸, 考察关键工艺参数对制剂的影响, 为中药微丸的适宜性研究提供借鉴。

1 仪器与材料

挤出滚圆造粒机(上海华东理工大学化工机械研究所); RC-806 型智能药物溶出仪(天津大学无线电厂); Agilent 1100 高效液相色谱仪; FA 2104N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); BP211D Sartorius 电子天平; CJY-300 B 型片剂脆碎度测

收稿日期: 2007-12-19

基金项目: 上海市重点学科建设项目(T0301); 上海市科委项目(04DZ19841); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20060268009)

作者简介: 陈丽华(1972-), 女, 江西崇仁人, 副研究员, 博士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。

Tel: (0791)7119011 E-mail: chly98@163.com

* 通讯作者 冯 怡 Tel: (021)51322493 E-mail: fyi@vip.sina.com