

正相高效液相色谱法制备银杏内酯 A 和银杏内酯 B

王 华, 韩金玉, 李 岩, 常贺英

(天津大学化工学院绿色合成与转化教育部重点实验室, 天津 300072)

摘要: 以实验室自制的银杏浸膏精制物为原料, 采用正相高效液相色谱法分离制备得到银杏内酯 A、银杏内酯 B 单体. 采用 $\phi 40\text{ mm} \times 300\text{ mm}$ 正相色谱柱、蒸发光散射检测器等组成的制备色谱系统, 以乙酸乙酯、石油醚和甲醇混合溶剂作为流动相, 通过考察流动相中溶剂配比、流速和上样量等因素对分离效果的影响, 确定了适宜的色谱条件: 流动相中乙酸乙酯、石油醚和甲醇的体积比为 55:40:5、流速 26 mL/min、上样量 120 mg. 经过一次分离即可得到银杏内酯 A、B 单体, 纯度可达 99.7% 和 98.4%, 收率分别为 73.8% 和 74.2%. 采用 IR、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^1\text{H-NMR}$ 及质谱进行结构鉴定, 结构数据与文献值相符.

关键词: 高效液相制备色谱; 银杏内酯 A; 银杏内酯 B

中图分类号: TQ028.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 0493-2137(2005)11-0955-05

Preparation of Ginkgolides A and B by Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography

WANG Hua, HAN Jin-yu, LI Yan, CHANG He-ying

(Key Laboratory for Green Chemical Technology of Ministry of Education,

School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: This research explores methods to separate individual ginkgolides A and B from the enriched ginkgo biloba extract (GBE, EGb 761) by means of normal-phase high-performance liquid chromatography (NP-HPLC). The chromatographic system consisted mainly of a $\phi 40\text{ mm} \times 300\text{ mm}$ column packed with silica gel and an evaporative light scattering detector. The influence of factors, such as the solvent composition, the flow rate of mobile phase and the sample load, on separation efficiency was studied to determine the suitable eluting condition. The results were as follows: the mobile phase was the mixed solvent of ethyl acetate-petroleum ether-methanol with volumetric ratio of 55:40:5. 120 mg sample was eluted at the flow rate of 26 mL/min. With one separation process ginkgolides A and B monomer with the purity of 99.7% and 98.4% and yields of 73.8% and 74.2% were obtained respectively. The structure identification results by IR, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$ and MS showed good agreement with those in literature.

Keywords: preparative high-performance liquid chromatography; ginkgolide A; ginkgolide B

银杏内酯(ginkgolide)是银杏叶提取物中的一类重要活性成分,即二萜内酯化合物,包括银杏内酯 A、B、C、J 和 M(简称 GA、GB、GC、GJ 和 GM)等. 药理研究^[1]表明银杏内酯为强血小板活化因子拮抗剂(PAF)和抗氧化剂,具有扩张血管、增加血流量、改善微循环

及清除自由基的作用,其中 GB 的生理活性最强,具有更高的药用价值. 目前国外已经制得以银杏内酯单体为主要成分的药剂,如 BN52021(银杏内酯 B)和 BN52063(银杏内酯 A、B 和 C 的混合物,摩尔比为 2:2:1),它们已经进入临床 III 期实验^[2]. 但由于技术

收稿日期:2004-06-08; 修回日期:2004-10-13.

基金项目:天津市自然科学基金资助项目(993606911)

作者简介:王 华(1973—),女,博士研究生,tdhgwanhua@163.com.

保密和经济竞争等因素,关于制备银杏内酯单体的文献报道较少.目前采用的制备方法有反复柱色谱法^[3]、反相高效液相色谱法^[4]及梯度洗脱中压液相色谱法^[5],这些方法存在操作程序繁琐或设备昂贵等缺陷;余佳红等人^[6]采用高效的高速逆流色谱法,但只分离得到白果内酯单体,未制备出银杏内酯 A、B 单体;正相高效液相色谱法是纯化难分离混合物的主要手段之一,载体填料价格便宜.研究和开发经济、高效的银杏内酯单体制备工艺是充分利用我国银杏资源,获得更高经济效益和社会效益的有效途径^[7].

笔者采用的原料是将市售的银杏浸膏(EGb₇₆₁,总内酯含量 $\geq 6\%$)经预处理^[8]和活性炭脱色得到的银杏内酯精制物(总内酯含量 $\geq 90\%$),以降低杂质对制备色谱分离过程的负荷及对色谱柱使用寿命的不利影响.制备型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)具有高效、分离条件温和的特点,成为植物有效活性成分分离纯化的必要手段.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器包括 Gilson Lab-pre 制备型高效液相色谱仪(Gilson 306 型泵, Gilson 206 型馏分收集器, Rheodyne 5 mL 定量进样环, Unipoint 1.65 工作站)、Spectra SYSTEM 分析型高效液相色谱仪(P 4000 四元梯度泵, Rheodyne 25 μL 定量进样环, ChromQuest 2.1 工作站)、Alltech 500 ELSD 蒸发光散射检测器、SZ-93 自动双重纯水蒸馏器、Heidolph 4000 旋转薄膜蒸发器、BRUKER AC-P 200 MHz 核磁仪、Varian Unity-TLUS 400 Hz 核磁仪、VGZAB-HS 型质谱仪和 Nicolet-560 型红外色谱仪.

试剂有青岛海洋化工厂生产的 H 型薄层层析硅胶(10~40 μm)、河北兴科化工有限公司生产的色谱纯甲醇、天津市三达生物医学有限公司生产的色谱纯四氢呋喃、天津市化学试剂三厂生产的分析纯石油醚、乙酸乙酯和甲醇.

1.2 色谱条件

制备型的 HPLC: $\phi 40\text{ mm} \times 300\text{ mm}$ 硅胶制备色谱柱,流动相为甲醇、乙酸乙酯和石油醚混合溶液,流速为 13~30 mL/min,蒸发光散射检测器漂移管温度 100 $^{\circ}\text{C}$,载气流速为 2.69 L/min,进样体积为 5 mL,柱温为室温.

分析型的 HPLC: SynChropak RP-P C18 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相为水、甲醇和四氢呋喃

混合溶液(体积比为 75:20:10),流速 1 mL/min,蒸发光散射检测器漂移管温度 105 $^{\circ}\text{C}$,载气流速为 2.69 L/min.进样体积为 20 μL ,柱温为室温.

1.3 实验方法

实验室自制的银杏浸膏精制物中总内酯含量为 96.5%,其中 GA、GB 和 GC 的含量分别为 12.25%、44.35% 和 39.9%.

取一定量银杏浸膏精制物用甲醇、乙酸乙酯和石油醚混合溶液超声溶解,经 0.45 μm 滤膜抽滤后进样,进行高效液相制备色谱分离.按制备型色谱条件洗脱,根据蒸发光散射检测器的检测信号在线收集产品流出液,各流出液经旋转薄膜蒸发器浓缩去除溶剂后,将固体粉末进行重结晶. GA、GB 和 GC 分别用体积比为 6:4、4:6、7:3 的甲醇/水溶液进行重结晶纯化.最终得到的产品采用分析型 HPLC 按色谱条件进行纯度检测(面积归一化含量).

实验中改变流动相各组分的配比,使得相邻两组分间的分离度 R 增加,优化色谱柱的分离效果.通过色谱泵调节流动相流速在 13~30 mL/min 范围内,以寻求最佳的洗脱液流速,保证较高的分离效率以及较快的操作周期.改变上样量寻求最佳的处理能力.

2 结果与讨论

2.1 流动相组成对分离效果的影响

在上样量为 105 mg,流动相流速为 18 mL/min 的条件下,在硅胶柱层析实验的基础上^[4],将流动相确定为乙酸乙酯、石油醚和甲醇的混合溶剂,其比例分别取为 70:25:5、65:30:5 和 55:40:5.实验结果表明,随着乙酸乙酯比例的减小和石油醚比例的加大,流动相极性减小,GB 和 GA 的分离度加大,由无法分开到基本上实现了基线分离,并且两峰之间的拖尾现象也有所改善.因此,选择体积比为 55:40:5 的乙酸乙酯、石油醚和甲醇的混合溶剂作为流动相,其在线检测色谱图如图 1 所示.

2.2 流动相流速对分离效果的影响

以乙酸乙酯、石油醚和甲醇的混合溶剂(体积比为 55:40:5)作为流动相,保持上样量为 105 mg/5 mL,分别在流动相流速为 30 mL/min 和 26 mL/min 条件下进行实验.实验结果表明,流速过高导致 GA 和 GB 分离度下降,两组分的分离峰出现重叠,影响产品纯度;流速过大造成峰型拖尾,并且基线漂移,影响分离效率,在线检测色谱如图 2 所示.由此可见,采用流速为 26 mL/min 作为最佳的操作流速,既保证了分离效率

又使分离周期较合理,在线检测色谱图如图 3 所示.

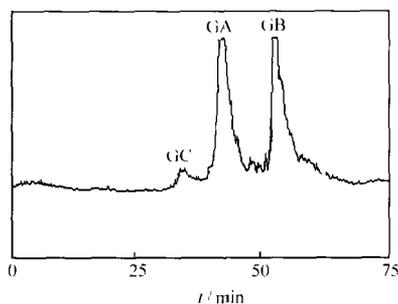


图 1 最佳流动相组成条件下银杏内酯的制备色谱图

Fig. 1 Chromatogram of isolating ginkgolides using suitable eluent

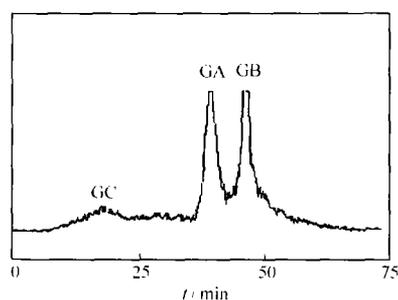


图 2 高流动相流速条件下银杏内酯的制备色谱图

Fig. 2 Chromatogram of isolating ginkgolides with high flow rate of eluent

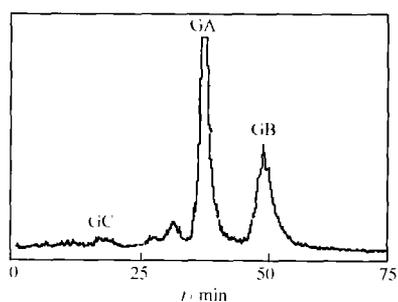


图 3 最佳流动相流速条件下银杏内酯的制备色谱图

Fig. 3 Chromatogram of isolating ginkgolides with suitable flow rate of eluent

2.3 上样量对分离效果的影响

为了保证一定的生产能力,制备色谱通常在超载条件下进行分离,样品各组分在流动相和固定相中的浓度呈非线性关系,样品中的一个或多个峰的保留时间变小,分离度变坏.为了确定适宜的上样量,在确定了流动相的最佳组成及流速的条件下,将上样量提高为 120 mg、140 mg 和 160 mg.实验结果表明,上样量为

120 mg 时,各物质对之间基本上实现了完全分离(在线检测色谱图如图 4 所示);而当上样量大于此值时,由于 GA 和 GB 两峰之间出现重叠,会影响产品的纯度(在线检测色谱图如图 5 所示).因此上样量为 120 mg 是适宜的,既提高了处理能力,又保证了产品的纯度.

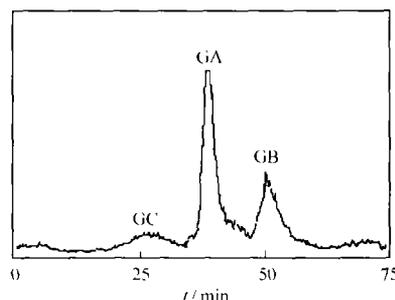


图 4 适宜上样量时银杏内酯的制备色谱图

Fig. 4 Chromatogram of isolating ginkgolides with suitable sample load

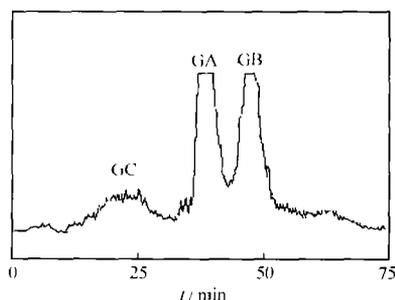


图 5 上样量为 140 mg 时银杏内酯的制备色谱图

Fig. 5 Chromatogram of isolating ginkgolides with 140 sample load

过高或过低的上样量对于内酯总收率都有不利影响,只有上样量等于或略大于制备柱的线性容量时,才能使色谱柱的分离效率保持较高的水平,得到较好的结果.本研究中上样量为 120 mg 时,银杏内酯的总收率达到 74.4%.

由实验确定了适宜的制备色谱操作条件,即流动相中乙酸乙酯、石油醚和甲醇的体积比为 55:40:5,流速为 26 mL/min,上样量为 120 mg.在此条件下得到了纯度分别达 99.7% 和 98.4% 的银杏内酯 A 和银杏内酯 B,收率分别为 73.8% 和 74.2%.

2.4 银杏内酯 A 和银杏内酯 B 结构鉴定

2.4.1 有机核磁共振谱图测定

对分离出的单体 GA 和 GB 进行核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$)、核磁共振碳谱 ($^{13}\text{C-NMR}$) 和 DEPT 135 测定.银杏内酯 A 与银杏内酯 B 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 信号归属如

表 1 所示, ¹H-NMR 信号归属如表 2 所示.

表 1 银杏内酯 A 和 B 的 ¹³C-NMR 数据
Tab. 1 ¹³C-NMR data for ginkgolides A and B

C 序号	δ		C 序号	δ	
	GA	GB		GA	GB
1	35.968	73.808	10	68.757	69.097
2	85.234	91.847	11	174.271	174.001
3	68.138	82.946	12	109.550	109.658
4	100.338	98.493	13	170.799	170.338
5	86.106	71.735	14	40.468	41.567
6	87.732	78.648	15	176.596	176.448
7	36.352	36.342	16	8.215	7.897
8	48.665	48.580	t-Bu	28.916	28.903
9	66.887	67.468			

表 2 银杏内酯 A 和 B 的 ¹H-NMR 数据
Tab. 2 ¹H-NMR data for ginkgolides A and B

质子位置	δ		质子位置	质子偶合常数 J/Hz	
	GA	GB		GA	GB
1α	1.825		1α-1β	-15.4	
1β	2.765	4.048	2-1α	8.4	
2	4.826	4.910	2-1β	7.2	8.0
6	4.924	5.308	6-7α	2.8	4.0
7α	2.057	1.938	6-7β	2.6	0
7β	2.057	2.151	7α-7β		-13.8
8	1.701	1.712	7α-8	11.2	14.8
10α	4.924	5.026	7β-8	8.0	4.0
12	6.010	6.072	14-16	7.3	7.2
14α	2.949	2.835			
t-Bu	1.010	1.029			
Me	1.140	1.117			
OH3	6.376	6.469			
OH10β	6.813	7.458			
OH1α		4.918			
OH7α					

样品 GA 和 GB 的 ¹³C-NMR 和 ¹H-NMR 数据与文献值¹⁹一致. GA 的 DEPT135 的谱图中化学位移为 36 处有两个反向峰, 表明 GA 的分子结构中有两个仲碳存在; GB 的 DEPT135 的谱图中在化学位移为 42 的地方有 1 个反向峰, 表明在 GB 的分子结构中有 1 个仲碳存在. 结果均与 GA 与 GB 的分子结构一致.

2.4.2 红外光谱分析

纯化样品 GA 在红外光谱 (KBr) 中 3 494 cm⁻¹ 处的峰显示有 -OH 的伸缩振动; 1 060 ~ 1 230 cm⁻¹ 处的峰显示有 C—O 的伸缩振动; 在 1 760 ~ 1 800 cm⁻¹ 处的峰显示有五元内酯环及 -COOC 的存在; 1 454 cm⁻¹ 处有中等强度的吸收峰显示有 t-Bu 官能团存在.

纯化样品 GB 在红外光谱 (KBr) 中 3 511 cm⁻¹ 处的峰显示有 -OH 的伸缩振动; 1 040 ~ 1 100 cm⁻¹ 处的峰显示有 C—O 的伸缩振动; 在 1 780 cm⁻¹ 处有强吸收峰, 显示有五元内酯环及 -COOC 的存在; 在 1 357 cm⁻¹ 左右有峰显示 16 位碳上存在甲基; 在 1 357 cm⁻¹ 处有中等强度的吸收峰, 显示有 t-Bu 官能团存在.

2.4.3 银杏内酯 A 与 B 的质谱谱图的波谱分析

采用电子轰击电离质谱测定 GA, 快速原子轰击质谱测定 GB.

纯化样品 GA 在 EI-MS 测定谱图中有 408.2、406 等峰, 基峰 57 显示分子中有 t-Bu. 结合 408.2 的分子离子峰 M⁺, 可知化合物的分子式为 C₂₀H₂₄O₉, 与 GA 的相对分子质量的文献值 408.4 一致¹⁹.

纯化样品 GB 在 FAB 测定谱图中有 424.4 和 139.1 等峰, 基峰 61 显示分子中有 t-Bu. 结合 424.4 的分子离子峰 M⁺, 可知化合物的分子式为 C₂₀H₂₄O₁₀, 与 GB 的相对分子质量的文献值 424.4 一致¹⁹.

结合有机波谱分析表明, 色谱分离出的单一内酯组分即为银杏内酯 A 与银杏内酯 B 单体.

3 结 论

(1) 采用 φ 40 mm × 300 mm 正相色谱柱, 由银杏浸膏精制物制备银杏内酯单体 A、B 的适宜条件: 流动相为乙酸乙酯、石油醚和甲醇的混合溶剂 (体积比为 55:40:5), 流速为 26 mL/min, 上样量为 120 mg.

(2) 本方法制得的银杏内酯单体 A 和 B 经 IR、¹³C-NMR、¹H-NMR 及质谱进行结构鉴定, 结构数据与文献值一致.

参考文献:

[1] 卢定强, 陈 钧. 银杏内酯的药理作用[J]. 江苏理工大学学报, 2001, 22(3): 5—9.
Lu Dingqiang, Chen Jun. Pharmacological activities of ginkgolides[J]. Journal of Jiangsu University of Science and Technology, 2001, 22(3): 5—9 (in Chinese).
[2] 丁 雁, 杨义芳. 银杏叶的药理作用及其机制的研究进展[J]. 中国现代应用药学杂志, 2001, 18(1): 1—3
Wang Yan, Yang Yifang. Recent advances in the research of pharmacological activities and mechanism of ginkgo leaves [J]. The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2001, 18(1): 1—3 (in Chinese).
[3] Kwak W J, Park H K, Oh K B. Method of Isolating Ginkgolides from the Leaves of Ginkgo Tree and Purifying

- Them [P]. U S: 5089636, 1992-02-18.
- [4] Tang Y, Lou F C. Separation and isolation of terpene lactones from ginkgo biloba leaves by direct high performance liquid chromatography [J]. *J Liq Chrom and Rel Technol*, 2000, 23(18): 2 897—2 900.
- [5] van Beek T A, Lelyveld G P. Preparative isolation and separation procedure for ginkgolide A, B, C and J and bilobalide [J]. *J Nat Prod*, 1997, 60: 735—738.
- [6] 余佳红, 柳正良, 蔡定国. 高效逆流色谱分离制备白果内酯 [J]. 中国新药杂志, 2000, 9(6): 392—394.
Yu Jiahong, Liu Zhengliang, Cai Dingguo. Preparative isolation for bilobalide by high-speed countercurrent chromatography [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2000, 9(6): 392—394 (in Chinese).
- [7] 石启田. 银杏叶的研究及其开发利用综述 [J]. 江苏林业科技, 2001, 28(2): 49—51.
Shi Qitian. Development and research of ginkgo leaves [J]. *Journal of Jiangsu Forestry Science and Technology*, 2001, 28(2): 49—51 (in Chinese).
- [8] Han Jinyu, Wang Hua, Chang Heying. Isolation and preparative purification for ginkgolide A and B [J]. *J Chem Ind and Eng*, 2003, 11(2): 125—129.
- [9] Braquet P. The ginkgolides potent platelet-activating factor antagonists isolated from ginkgo biloba leaves: Chemistry, pharmacology and clinical applications [J]. *Drug of the Future*, 1998, 12(7): 663—670.

《天津大学学报》被评为第三届国家 期刊奖百种重点期刊

《天津大学学报》(即天津大学学报自然科学版)2004 年硕果累累:

在 2004 年天津市期刊评估评优工作中,《天津大学学报》被评为一级期刊,并获得天津市优秀期刊奖;

在 2004 年我国北方八省市期刊评比活动中,《天津大学学报》荣获中国北方八省市优秀期刊奖;

在 2004 年教育部组织的科技期刊评比中,《天津大学学报》荣获全国 A 类高校优秀科技期刊二等奖;

在 2004 年国家科技部和新闻出版总署组织的第三届国家期刊奖评比活动中,《天津大学学报》被评为第三届国家期刊奖百种重点期刊.