

银杏中种皮化学成分分离及鉴定

周桂生¹, 姚鑫¹, 唐于平^{1,①}, 钱大玮¹, 秦勇², 段金厥¹

(1. 南京中医药大学江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏南京 210023; 2. 江苏神龙药业有限公司, 江苏盐城 224200)

Isolation and identification on chemical constituents in mesosperm of *Ginkgo biloba* seed ZHOU Guisheng¹, YAO Xin¹, TANG Yuping^{1,①}, QIAN Dawei¹, QIN Yong², DUAN Jin'ao¹ (1. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Shenlong Pharmaceutical Co., Ltd., Yancheng 224200, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2013, 22(4): 108-110

Abstract: Eighteen compounds in petroleum, ethyl acetate and *n*-butanol fractions of ethanol crude extracts from mesosperm of *Ginkgo biloba* Linn. seed were isolated and obtained, they are stearic acid (I), palmitic acid (II), ginnol (III), β -sitosterol (IV), *n*-dotriacontanol (V), *n*-docosanol (VI), hydroginkgolic acid (VII), ginkgolic acid (VIII), monobehenin (IX), glyceryl arachidate (X), 1-hexadecanoyl glyceride (XI), 1,3-dipalmitin (XII), 1,3-dilinolein (XIII), glycerol tristearate (XIV), glycerol tripalmitate (XV), ginkgolide B (XVI), ginkgolide C (XVII) and daucosterol (XVIII). In which, compounds V, VI, IX, X, XI, XII, XIII, XIV and XV are obtained firstly from *G. biloba*.

关键词: 银杏; 种子; 中种皮; 化学成分; 甘油酯类

Key words: *Ginkgo biloba* Linn.; seed; mesosperm; chemical constituent; glycerides

中图分类号: Q946.8; R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2013)04-0108-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2013.04.16

银杏(*Ginkgo biloba* Linn.)在中国种植广泛,其产量占全世界总产量的70%^[1]。中药白果仁是银杏种子去除肉质外种皮和骨质中种皮后得到的,具有敛肺定喘、止带缩尿的功效。目前,有关银杏种子的研究主要集中在具有药食同源的白果仁^[2]及具有潜在应用价值的外种皮^[3]上,鲜见对银杏种子中种皮的研究报道。生产中大量的银杏中种皮被废弃,因此,开展银杏中种皮的相关研究对于充分利用该类资源非常必要。鉴于此,作者对银杏中种皮的化学成分进行了系统分析,以期为其开发应用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试银杏中种皮于2010年11月采自江苏泰州银杏基地,由本校药用植物学教研室严辉鉴定,凭证标本保存于江苏省方剂研究重点实验室标本室,标本号BGZ-20101120。

主要仪器有Bruker Avance AV-500/300核磁共振仪(德国Bruker公司)、RE-852旋转蒸发器(南京金正教学仪器有限公司)和Waters 2695高效液相色谱仪(美国Waters公司)。银杏内酯B和银杏内酯C对照品均购自中国药品生物制品检定

所(批号分别为110863-201209和110863-201105); β -谷甾醇和胡萝卜苷对照品由本实验室自制,纯度均在98%以上。

1.2 方法

取干燥的银杏中种皮7.5 kg,粉碎后用75 L体积分数95%乙醇回流提取2 h,同法提取2次;合并提取液,过滤后减压浓缩至无醇味;用水混悬后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取6次,每次7.5 L;合并萃取液,回收溶剂后分别得到石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水萃取物25、30、50和200 g。

用硅胶柱对石油醚萃取物进行分离,用 $V:V=100:0\sim 1:1$ 的石油醚-乙酸乙酯混合液梯度洗脱,洗脱物经纯化后得到化合物I(30 mg)、II(55 mg)、III(40 mg)、IV(60 mg)、V(10 mg)、VI(20 mg)、VII(8 mg)、VIII(10 mg)和IX(10 mg)。

采用硅胶柱对乙酸乙酯萃取物进行分离,并使用 $V:V:V=10:1:0\sim 0:3:1$ 的石油醚-乙酸乙酯-甲醇混合液梯度洗脱,洗脱物经纯化后得到化合物IX(8 mg)、X(15 mg)、XI(12 mg)、XII(18 mg)、XIII(20 mg)、XIV(11 mg)、XV(15 mg)、XVI(8 mg)、XVII(22 mg)和XVIII(30 mg)。

采用硅胶柱反复对正丁醇萃取物进行分离,并使用 $V:V=50:1\sim 1:1$ 的乙酸乙酯-甲醇混合液进行梯度洗脱,洗脱物经纯化后得到化合物XVIII(100 mg)。

收稿日期: 2013-03-26

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI04B03); 南京中医药大学中药学一级学科开放课题资助项目(2011ZYX1-011); 国家教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-09-0163); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(yssk-2010)

作者简介: 周桂生(1987—),男,江苏淮安人,硕士研究生,主要从事中药活性物质基础的研究。

①通信作者 E-mail: yupingtang@njutcm.edu.cn

采用MS和NMR等方法并根据化合物的理化性质,结合相关文献,对化合物I~VIII进行结构鉴定。

2 结 果

化合物I:白色粉末,mp 54 °C ~ 55 °C,溴酚蓝反应显黄色。ESI-MS m/z 284 [M]⁺; m/z 256, 185, 129, 97, 83, 73; EI-MS 显示一系列递减-CH₂-的碎片峰,裂解符合脂肪酸裂解规律,分子式为C₁₈H₃₆O₂。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 0.87 (3H, t, $J=5.5$ Hz, H-18), 1.25 [28H, m, (-CH₂-)×16], 1.63 (2H, m, H-3), 2.34 (2H, t, $J=5.7$ Hz, H-2)。参考文献[4]鉴定其为十八烷酸,即硬脂酸(stearic acid)。

化合物II:白色粉末,mp 62.0 °C ~ 62.5 °C。ESI-MS m/z 257 [M+H]⁺。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 2.34 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-2), 1.64 (2H, m, H-3), 1.26 (24H, m, H-4 ~ 15), 0.88 (3H, t, $J=6.9$ Hz, H-16)。参考文献[5]鉴定其为十六烷酸,即棕榈酸(palmitic acid)。

化合物III:白色针晶,mp 79 °C ~ 80 °C。ESI-MS m/z 406 [M-H₂O]⁺, 297, 157, 139, 111, 97, 83。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 0.88 (6H, t, $J=6.5$ Hz, H-29), 1.25 ~ 1.50 (52H, m), 3.58 (1H, m)。参考文献[6]鉴定其为二十九烷-10-醇,即白果醇(ginnol)。

化合物IV:无色针晶,mp 136 °C ~ 137 °C, Liebermann-Burchard 反应呈阳性。薄层层析行为与β-谷甾醇对照品一致,且与β-谷甾醇对照品混合熔点不下降。鉴定其为β-谷甾醇(β-sitosterol)。

化合物V:白色粉末,mp 82 °C ~ 84 °C。ESI-MS m/z 430 [M-H₂O]⁺, 420, 364, 195, 139, 125, 111, 97。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 0.88 (3H, t, $J=6.5$ Hz, H-32), 1.25 ~ 1.50 (60H, m), 3.62 (2H, t, $J=6.5$ Hz, H-1)。参考文献[7]鉴定其为正三十二烷醇(*n*-dotriacontanol)。

化合物VI:无色片状结晶。ESI-MS 给出分子离子峰和典型的脂肪醇裂解碎片峰, m/z 308 [M-H₂O]⁺, 280, 252, 168, 111, 97, 83。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 0.88 (3H, t, $J=6.5$ Hz, H-22), 1.25 ~ 1.45 (40H, m), 3.61 (2H, t, $J=6.5$ Hz, H-1)。参考文献[8]鉴定其为正二十二烷醇(*n*-docosanol)。

化合物VII:白色针晶,mp 85 °C ~ 87 °C, FeCl₃反应呈紫色。ESI-MS m/z 348 [M]⁺。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ: 10.53 (2H, brs, -COOH, -OH), 7.16 (1H, t, 7.5 Hz, H-4), 6.72 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-5), 6.65 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-3), 2.71 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-1'), 1.59 (2H, q, $J=5.7$ Hz, H-2'), 1.25 [24H, br, (-CH₂-)×12], 0.86 (3H, t, $J=5.7$ Hz, H-15')。 ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ: 170.1 (-COOH), 156.3 (C-2), 141.5 (C-6), 130.2 (C-4), 120.0 (C-5), 118.9 (C-1), 113.5 (C-3), 36.5 (C-1'), 31.0 (C-13'), 30.8 (C-2'), 28.8 (C-4' ~ 12'), 28.6 (C-3'), 26.7

(C-14'), 13.6 (C-15')。参考文献[9-10]鉴定其为6-(十五烷基)-水杨酸,即氢化白果酸(hydroginkgolic acid)。

化合物VIII:白色粉末,mp 40 °C ~ 42 °C, FeCl₃反应呈紫色。ESI-MS m/z 346 [M]⁺。¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 10.97 (2H, brs, -COOH, -OH), 7.36 (1H, t, 7.5 Hz, H-4), 6.85 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-5), 6.76 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-3), 5.34 (2H, m, H-8', 9'), 2.98 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-1'), 2.01 (4H, m, H-7', 10'), 1.68 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-2'), 1.31 [16H, br, (-CH₂-)×8], 0.86 (3H, t, $J=5.7$ Hz, H-15')。 ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ: 176.1 (-COOH), 164.2 (C-2), 146.7 (C-6), 136.5 (C-4), 130.5 (C-8'), 129.9 (C-9'), 123.5 (C-5), 116.3 (C-1), 110.5 (C-3), 35.9 (C-1'), 32.0 (C-H-7', 10'), 30.4 (C-13'), 29.8 (C-2'), 29.6 (C-6', 11'), 29.3 (C-4', 5', 12'), 27.6 (C-3'), 22.2 (C-14'), 13.6 (15')。参考文献[9-11]鉴定其为6-(8-十五碳烯)-水杨酸,即白果酸(ginkgolic acid)。

化合物IX:白色粉末,mp 78 °C ~ 80 °C。ESI-MS m/z 415 [M+H]⁺, 398 [M-H₂O]⁺, 370, 342, 98。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 4.20 (1H, dd, $J=11.6, 4.6$ Hz, H-1a), 4.15 (1H, dd, $J=11.5, 6.5$ Hz, H-1b), 3.94 (1H, m, H-2), 3.70 (1H, dd, $J=11.5, 4.0$ Hz, H-3a), 3.61 (1H, dd, $J=11.5, 5.5$ Hz, H-3b), 2.35 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-2'), 1.62 (2H, m, H-3'), 1.29 (36H, m), 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-22')。参考文献[12]鉴定其为二十二烷酸-1-甘油酯(monobehenin)。

化合物X:白色粉末,mp 78 °C ~ 80 °C。ESI-MS m/z 368 [M-H₂O]⁺, 340, 322, 98。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 4.21 (1H, dd, $J=11.6, 4.6$ Hz, H-1a), 4.17 (1H, dd, $J=11.5, 6.5$ Hz, H-1b), 3.96 (1H, m, H-2), 3.70 (1H, dd, $J=11.5, 4.0$ Hz, H-3a), 3.60 (1H, dd, $J=11.5, 5.5$ Hz, H-3b), 2.35 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-2'), 1.61 (2H, m, H-3'), 1.31 (32H, m), 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-20')。参考文献[13]鉴定其为二十烷酸-1-甘油酯(glyceryl arachidate)。

化合物XI:白色无定形粉末,mp 72 °C ~ 74 °C。ESI-MS m/z 331 [M+H]⁺, 313 [M-H₂O+H]⁺。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 4.21 (1H, dd, $J=11.6, 4.6$ Hz, H-1a), 4.16 (1H, dd, $J=11.6, 6.1$ Hz, H-1b), 3.95 (1H, m, H-2), 3.69 (1H, dd, $J=11.6, 4.0$ Hz, H-3a), 3.60 (1H, dd, $J=11.6, 5.8$ Hz, H-3b), 2.35 (2H, t, $J=7.7$ Hz, H-2'), 1.62 (2H, m, H-3'), 1.29 (24H, m), 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-16')。参考文献[14]鉴定其为十六烷酸-1-甘油酯(1-hexadecanoyl glyceride)。

化合物XII:白色无定形粉末。ESI-MS m/z 550 [M-H₂O]⁺, 特征性碎片离子 354, 331, 313, 299, 239, 171, 98。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 4.16 (5H, m, H-1, 2, 3), 2.35 (4H, t, $J=7.7$ Hz, H-2', 2''), 1.62 (4H, m, H-3', 3''), 1.29

(48H, m), 0.88(3H, t, $J=7.0$ Hz, H-16', 16''). 参考文献[15]鉴定其为1,3-二棕榈酸甘油酯(1,3-dipalmitin)。

化合物XIII:无色油状物。ESI-MS m/z 616[M]⁺, 特征性碎片离子575, 313, 279, 262, 239, 135, 109, 95。¹H-NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ :5.34(8H, m, H-9', 9'', 10', 10'', 12', 12'', 13', 13''), 4.23(5H, m, H-1, 2, 3), 2.75(4H, dd, $J=6.0$ Hz, H-11', 11''), 2.29(4H, t, $J=7.5$ Hz, H-2', 2''), 2.03(8H, dt, $J=6.5, 7.5$ Hz, H-8', 8'', 14', 14''), 1.60(4H, m, H-3', 3''), 1.25~1.29(28H, m), 0.87(6H, t, $J=7.5$ Hz, H-18', 18'')。参考文献[16]鉴定其为1,3-二亚油酸甘油酯(1,3-dilinolein)。

化合物XIV:白色无定形粉末, mp 74 °C ~ 75 °C。ESI-MS m/z 890[M]⁺, 特征性碎片离子283, 267, 256, 239, 155, 137, 99, 89, 85, 71。¹H-NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ :5.41(1H, m, H-2), 4.35(2H, dd, $J=7.5, 2.5$ Hz, H-3), 4.30(2H, dd, $J=7.5, 2.5$ Hz, H-1), 2.31(6H, m, H-2', 2'', 2'''), 1.58(4H, m, H-3'', 3'''), 1.51(2H, m, H-3'), 1.25~1.29(78H, m), 0.88(9H, t, $J=7.5$ Hz, H-18', 18'', 18''')。参考文献[17]鉴定其为甘油三硬脂酸酯(glycerol tristearate)。

化合物XV:白色无定形粉末, mp 60 °C ~ 62 °C。ESI-MS m/z 806[M]⁺, 特征性碎片离子313, 299, 239, 171, 98。与甘油三棕榈酸酯对照品的薄层层析Rf值及显色行为一致。¹H-NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ : 5.28(1H, m, H-2), 4.30(2H, dd, $J=7.5, 2.5$ Hz, H-3), 4.16(2H, dd, $J=7.5, 2.5$ Hz, H-1), 2.31(6H, m, H-2', 2'', 2'''), 1.60(4H, m, H-3'', 3'''), 1.52(2H, m, H-3'), 1.25~1.29(66H, m), 0.88(9H, t, $J=7.5$ Hz, H-16', 16'', 16''')。参考文献[18]鉴定其为甘油三棕榈酸酯(glycerol tripalmitate)。

化合物XVI:白色针晶, mp 300 °C以上;易溶于丙酮和乙酸乙酯, 难溶于水, 硫酸不显色, 碘显黄色(在空气中放置渐变为白色);与银杏内酯B对照品薄层层析的Rf值及显色行为一致;与银杏内酯B对照品HPLC的保留时间均一致。鉴定其为银杏内酯B(ginkgolide B)。

化合物XVII:白色针晶, mp 300 °C以上;易溶于丙酮和乙酸乙酯, 难溶于水, 硫酸不显色, 碘显黄色(在空气中放置渐变为白色);与银杏内酯A对照品薄层层析的Rf值及显色行为一致;与银杏内酯C对照品HPLC的保留时间均一致, 鉴定其为银杏内酯C(ginkgolide C)。

化合物XVIII:白色粉末, mp 272 °C ~ 274 °C, 硫酸-乙醇加热显紫红色斑点, Liebermann-Burchard反应呈阳性, Molish反应呈阳性, 与文献[19]报道的结果一致;与胡萝卜苷对照品薄层层析的Rf值及显色行为一致;与胡萝卜苷对照品混合熔点不下降。故鉴定其为胡萝卜苷(daucosterol)。

从银杏中种皮中共分离得到18个化合物, 化合物V、VI和IX~XV为首次从银杏中获得, 所有化合物均为首次从银杏中种皮中获得。甘油酯类在制皂业中有重要作用, 从银杏中种

皮中获得7个甘油酯类成分, 为银杏中种皮的深度开发提供了一定空间。银杏中种皮中还含有银杏内酯, 可通过优化工艺富集此类成分, 使银杏中种皮资源得到充分开发利用。

参考文献:

- [1] 周桂生, 姚鑫, 唐于平, 等. 白果仁化学成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(17): 1362-1365.
- [2] DENG Q C, WANG L, WEI F, et al. Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from *Ginkgo biloba* seeds[J]. Food Chemistry, 2011, 124(4): 1458-1465.
- [3] ZHOU G S, YAO X, TANG Y P, et al. Two new nonacosanetriols from *Ginkgo biloba* sarcotesta[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2012, 165(7): 731-736.
- [4] 刘睿, 顾谦群, 崔承彬, 等. 密脉鹅掌柴的化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 中草药, 2005, 36(3): 328-332.
- [5] 罗永明, 刘爱华, 余邦伟, 等. 中药珊瑚瑚的化学成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(17): 1296-1298.
- [6] 贾晓东, 赵兴增, 王鸣, 等. 灰毡毛忍冬化学成分研究[J]. 中药材, 2008, 31(7): 988-990.
- [7] 刘安, 徐丽珍, 邹忠梅, 等. 对叶豆黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 861-863.
- [8] 杨爱梅, 杜静, 苗钟环, 等. 藏药短尾铁线莲化学成分研究[J]. 中药材, 2009, 32(10): 1534-1537.
- [9] VAN BEEK T A, WINTERMANS M S. Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba*[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 930(1/2): 109-117.
- [10] 王杰, 余碧玉, 刘向龙, 等. 银杏外种皮化学成分分离和鉴定[J]. 中草药, 1995, 26(6): 290-292, 328.
- [11] 谭卫红, 沈兆邦, 王成章, 等. 银杏叶中烷基酚化合物的分离与鉴定[J]. 林产化学与工业, 2001, 21(4): 1-6.
- [12] 赵贵钧, 张崇禧, 吴志军, 等. 肿柄菊乙酸乙酯部位的化学成分[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(2): 189-192.
- [13] 王刚, 林彬彬, 刘劲松, 等. 黄药子化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(13): 1679-1682.
- [14] 李洪娟, 罗应刚, 何志恒, 等. 钮子瓜化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(3): 411-414.
- [15] 邓美彩, 焦威, 董玮玮, 等. 蹄叶橐吾根的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(5): 776-778, 836.
- [16] 周跃, 刘振岭, 卢光洲, 等. 卵叶三脉紫菀化学成分的研究[J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(2): 125-127.
- [17] 牟明月, 张前军, 康文艺, 等. 长毛香科科化学成分及生物活性研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(17): 2189-2193.
- [18] 陶冉, 潘扬, 蒋亚萍, 等. 莲心非酚性生物碱和非生物碱类成分的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(3): 173-175.
- [19] 张莉, 杨杰, 陈筱清, 等. 翻白草的化学成分[J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(2): 94-96.