

文章编号: 1006-2858(2008)04-0290-04

应用圆二色谱法验证银杏内酯的绝对构型及银杏提取物的化学成分

侯迪, 宋爽, 宋明, 张怡轩, 李铄, 王金辉

(沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 验证银杏内酯 A、B 的绝对构型, 并对银杏提取物的化学成分进行研究。方法 应用圆二色谱法并依据 Klyne 内酯八区-扇形区律对银杏内酯 A、B 的绝对构型进行分析讨论; 采用反复硅胶柱色谱、聚酰胺柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、高效液相色谱、重结晶等方法分离化学成分, $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 等方法进行结构鉴定。结果 从银杏提取物中分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为: 芫花素 (genkwanin, 1)、异鼠李素 (isorhamnetin, 2)、山奈酚 (kaempferol, 3)、槲皮素 (quercetin, 4)、白果内酯 (bilobalide, 5)、银杏内酯 A (ginkgolide A, 6)、银杏内酯 B (ginkgolide B, 7)、银杏内酯 C (ginkgolide C, 8)、芦丁 (rutin, 9)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol, 10)、胡萝卜苷 (daucosterol, 11)。结论 银杏内酯 A、B 的绝对构型与文献报道相符。

关键词: 圆二色谱; 银杏内酯; 绝对构型; 银杏提取物; 化学成分

中图分类号: R 932

文献标志码: A

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 为银杏科银杏属植物, 是我国特产植物, 为古代子遗植物之一, 基本保持了 1.5 亿年前的生态特征。其顽强的生命力, 引起了人们的关注。20 世纪 60 年代以来, 国内外学者对银杏的化学成分、药理作用进行了大量的研究。据报道, 仅从银杏叶中就已发现了 100 多种化合物^[1]。本文作者在对银杏提取物的化学成分进行研究的同时, 应用圆二色谱法对银杏内酯的绝对构型进行了研究确证。

1 仪器与材料

Bruker Avance AV-300 型、Bruker Avance AV-600 型核磁共振仪 (TMS 为内标物, 瑞士 Bruker 公司), Yanaco MP-S3 显微熔点测定仪 (日本芝山制作所), Softa Model 200es ELSD 检测器 (天津市沃尔孚科技发展有限公司), LabAlliance Series 高效液相仪 (美国 SSI/LabAlliance 公司), LabAlliance Model 500 紫外检测器 (美国 SSI/LabAlliance 公司), JASCO pu-2080 高效液相仪 (日本 Jasco 公司), JASCO CD-2095 圆二色谱检测器 (日本 Jasco 公司), Agilent Venusil XBP-C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 反相色谱柱 (美国 Agilent 公司)。

柱色谱硅胶、薄层硅胶 GF254 (青岛海洋化工厂), 柱色谱聚酰胺 (中国医药集团上海化学试剂公司), Sephadex LH-20 (美国 Pharmacia 公司)。

2 圆二色谱法验证银杏内酯绝对构型

2.1 Klyne 内酯八区-扇形区律

以“Klyne 内酯八区-扇形区律”为原理对银杏内酯 A、B 的绝对构型进行分析。分析结果与实际测量的圆二色谱结果相符, 证明它们的绝对构型与文献报道确实相符。以下以银杏内酯 A 为例, 说明具体分析过程。

羧基功能团, 包括羧基、酯基、内酯基和酰胺基等, 在 210 ~ 220 nm 波长范围内有 1 个弱吸收带, 这导致 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁。因此, 对非对称的羧基和酯等的 ORD 曲线常在 225 nm 附近给出 Cotton 效应的最大绝对值, 即谱线的峰或谷。一般的羧酸和酯等的羧基具有自由旋转的能力, 所以很难对它的光学活性与结构的关系进行研究。而内酯具有比较稳定的构象, 因而变成便于研究的对象了。W. Klyne 等人研究了大量饱和的多环内酯化合物的旋光谱与结构的关系, 在 1964 年提出 1 个半经验的内酯扇形区律-Klyne 内酯八区-扇形

收稿日期: 2007-04-30

作者简介: 侯迪 (1980-), 男 (汉族), 辽宁沈阳人, 硕士研究生; 王金辉 (1972-), 男 (汉族), 吉林通化人, 教授, 主要从事天然药物化学和中药研究, Tel. 024-23986478, E-mail wjh.1972@yahoo.com.cn。

区律。根据该区律,可将内酯基 $\begin{array}{c} \text{C} \\ \diagup \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array}$ 的几个原子大致的看成是处于同一平面上。从 $\text{O}=\text{C}-\text{O}$ 键角平分线的正前方(如图 1 箭头方向)观察内酯分子的各个部分在“八区”中的分布情况。如图 1 所示, $\text{O}=\text{C}-\text{O}$ 处在水平面上,处在图中所示 2 个灰色区域中的基团则会分别产生正 Cotton 效应(E 区)和负 Cotton 效应(B 区)。

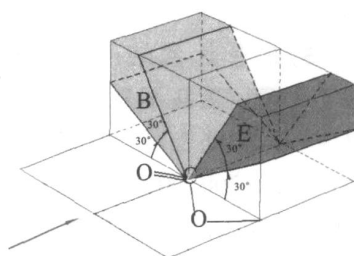


Fig. 1 Klyne lactone eight district

2.2 银杏内酯 A 的结构与 Cotton 效应

银杏内酯 A 共有 3 个内酯基团,分别在环 C、E、F 上。通过 Woodward 规则计算,它们的紫外吸收带都在 235 nm 附近。应用 Klyne 内酯八区-扇形区律分别对这些结构进行分析如下:

以 F 环上的内酯基团为对象进行分析,视觉效果(如图 2),在 E 区存在 1 个完整的羟基,而在 B 区却只有一部分甲基,甲基与羟基对 $\Delta\epsilon$ 的贡献基本相同^[2],因此应该显正性 Cotton 效应。

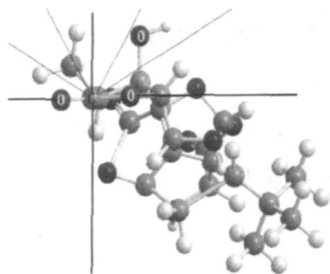


Fig. 2 F collar 'actone group of ginkgolide A

以环 E 上的内酯基团为对象进行分析(如图 3),显然在 E 区的基团远远多于在 B 区中的,因此显正性 Cotton 效应。

以环 C 上的内酯基团为对象进行分析(如图 4),在 B 区没有基团存在,而在 E 区有部分基团,因此显正性 Cotton 效应。

综上所述,3 个部位的 Cotton 效应均为正性,与实际测得的结果相符。这证明了银杏内酯 A 的结构(如图 5)与报道相符,从而排除了银杏内酯 A 的对映异构体的情况(如图 6)。

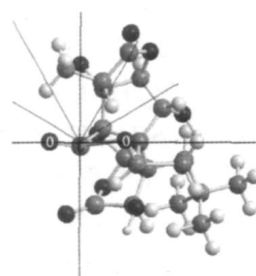


Fig. 3 E collar 'lactone group of ginkgolide A

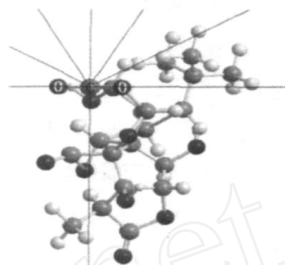


Fig. 4 C collar 'lactone group of ginkgolide A

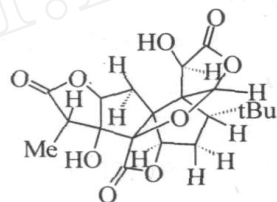


Fig. 5 Structure of ginkgolide A

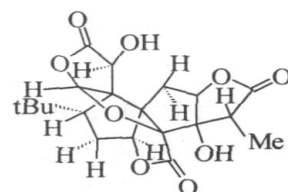


Fig. 6 Structure of ginkgolide A' enantiomer

3 银杏提取物化学成分的提取与分离

取银杏提取物 40 g,以体积分数为 95 %乙醇溶液回流提取 3 次,减压回收溶剂得到浸膏 23 g,经反复硅胶柱色谱、聚酰胺柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、高效液相色谱、重结晶等方法等手段,得到化合物 1 (25 mg)、2 (75 mg)、3 (35 mg)、4 (45 mg)、5 (120 mg)、8 (5 mg)、9 (15 mg)、10 (15 mg)、11 (68 mg)。

4 结构鉴定

化合物 1:黄色不定型粉末, mp 285 ~ 286 ,三氯化铁-铁氰化钾反应阳性,示有酚羟基存在,盐酸-镁粉反应阳性,推测为黄酮类化合

物。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 谱中给出 2 个活泼质子信号 δ : 12.97 (1H, s, 5'-OH)、10.38 (1H, s, 4'-OH), δ : 7.97 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-3', 5') 为 B 环 4' 羟基取代所形成的 AA'BB' 系统中 2', 6' 和 3', 5' 质子信号; δ : 6.86 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.78 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6) 为 A 环 8 位和 6 位质子信号; δ : 3.88 (3H, s) 为甲氧基质子信号。综合以上理化性质和波谱数据, 并与文献[3]进行对照, 鉴定化合物 1 为芫花素。

化合物 2: 黄色粉末, mp > 300, 紫外灯下显黄色荧光, 三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, 示有酚羟基存在, 盐酸镁粉反应阳性, 示为一黄酮类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 谱中给出 4 个活泼质子信号 δ : 12.45 (1H, s, 5'-OH)、11.24 (1H, s, 7'-OH)、10.38 (1H, s, 4'-OH)、9.65 (1H, s, 3'-OH), δ : 6.94 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 7.68 (1H, dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, H-6'), 7.76 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2') 为 B 环上 5', 6', 2' 组成的 ABX 偶合系统质子信号; δ : 6.47 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6) 为 A 环 8 位和 6 位质子信号; δ : 3.84 (3H, s) 为甲氧基质子信号。综合以上理化性质和波谱数据, 并与文献[4-5]进行对照, 鉴定化合物 2 为异鼠李素。

化合物 3: 黄色针晶 (甲醇), mp 274 ~ 276。盐酸镁粉反应阳性, 三氯化铝反应阳性, 三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, 示为黄酮类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 谱中给出 4 个活泼质子信号 δ : 12.47 (1H, s, 5'-OH)、10.73 (1H, s, 7'-OH)、10.07 (1H, s, 4'-OH)、9.33 (1H, s, 3'-OH), δ : 8.04 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', 5') 为 B 环 4 羟基取代所形成的 AA'BB' 系统中 2', 6' 和 3', 5' 质子信号; δ : 6.44 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6) 为 A 环 8 位和 6 位质子信号; δ : 3.88 (3H, s) 为甲氧基质子信号。综合以上理化性质和波谱数据, 并与文献[6]进行对照, 鉴定化合物 3 为山奈酚。

化合物 4: 黄色粉末 (甲醇), mp > 300。盐酸-镁粉反应阳性, 三氯化铝反应阳性, 三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, SrCl_2 反应阳性, 提示为一含有邻二酚羟基的黄酮类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 谱中给出 5 个活泼质子信

号 δ : 12.48 (1H, s, 5'-OH)、10.74 (1H, s, 7'-OH)、9.54 (1H, s, 4'-OH)、9.60 (1H, s, 3'-OH)、9.30 (1H, s, 3'-OH), δ : 6.88 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5'), 7.54 (1H, dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz, H-6'), 7.67 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2') 为 B 环上 5', 6', 2 组成的 ABX 偶合系统质子信号; δ : 6.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6) 为 A 环 8 位和 6 位质子信号, 综合以上理化性质和波谱数据, 并与文献[7]进行对照, 鉴定化合物 4 为槲皮素。

化合物 5: 白色针状结晶 (甲醇), mp > 300。溶于甲醇。硫酸不显色, 碘熏显黄色。经 HPLC-UV-ELSD 法检测与白果内酯出峰时间相同。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 给出以下信号 δ : 1.04 (9H, s, t-Bu), 2.78 (1H, d, $J = 18.1$ Hz, 1'- β H), 2.88 (1H, d, $J = 18.1$ Hz, 1'- α H), 4.92 (1H, t, $J = 6.9$ Hz, 6'-H), 2.08 (1H, dd, $J_1 = 13.2$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, 7'- β H), 2.56 (1H, dd, $J_1 = 13.2$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, 7'- α H), 6.27 (1H, s, 12'-H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 数据见表 1。综合以上理化性质和波谱数据, 并与文献[8-9]进行对照, 鉴定化合物 5 为白果内酯。

化合物 6: 白色晶体 (甲醇), mp > 300, 溶于甲醇, 硫酸不显色。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Pyridine- d_5) 信号归属见表 1。综合理化性质和波谱数据, 并与文献[10]进行对照, 鉴定化合物 6 为银杏内酯 A。

化合物 7: 白色晶体 (甲醇), mp > 300, 溶于甲醇, 硫酸不显色。 $^{13}\text{C-NMR}$ (Pyridine- d_5) 信号归属见表 1。综合理化性质和波谱数据, 并与文献[10]进行对照, 鉴定化合物 7 为银杏内酯 B。

化合物 8: 白色针状结晶 (甲醇), mp > 300。溶于甲醇, 硫酸不显色, 碘熏显黄色, 经 HPLC-UV-ELSD 法检测与银杏内酯 C 出峰时间相同。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 给出以下信号 δ : 4.99 (1H, dd, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 3.8$ Hz, 1'- β H), 4.07 (1H, dd, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 3.8$ Hz, 7 α -H), 4.62 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-2), 4.97 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Pyridine- d_5) 信号归属见表 1。综合理化性质和波谱数据, 并与文献[11]进行对照, 鉴定化合物 8 为银杏内酯 C。

Table 1 The ^{13}C NMR data of bilobalide, ginkgolide A, B and C

Position	Bilobalide	Ginkgolide A	Ginkgolide B	Ginkgolide C
C - 1	41.6	37.0	75.2	73.7
C - 2	173.0	86.7	93.5	92.0
C - 3	173.5	69.4	84.7	83.0
C - 4	57.7	101.7	99.9	98.2
C - 5	68.2	86.7	73.1	66.4
C - 6	37.1	89.1	79.8	79.1
C - 7	85.6	37.9	37.7	74.0
C - 8	65.3	49.8	49.8	49.0
C - 9	82.8	68.1	68.6	63.8
C - 10	177.3	69.8	70.1	69.0
C - 11	99.3	175.5	175.1	174.0
C - 12		111.0	111.2	109.5
C - 13		172.9	171.7	170.7
C - 14		42.0	43.2	41.6
C - 15		177.5	177.3	176.5
C - 16		9.3	9.0	8.8
C - 17		32.6	32.6	32.0
C - 18, 19, 20		29.1	29.1	29.0
C(CH ₃) ₃	38.7			
C(CH ₃) ₃	26.5			

化合物 **9**: 黄色粉末, mp 176 ~ 178 , 盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应阳性, 示为一黄酮苷类化合物, 质量分数为 2 % 的硫酸溶液水解, 薄层检识出葡萄糖和鼠李糖。ESI⁻ MS 测得其分子质量为 610。 ^1H -NMR R (300 MHz, DMSO- d_6) 谱中给出 4 个活泼质子信号 δ : 12.60 (1H, s, 5⁻ OH)、10.80 (1H, s, 7⁻ OH)、9.62 (1H, s, 4⁺ OH)、9.18 (1H, s, 3⁺ OH), δ : 6.86 (1H, d, J = 8.6 Hz, H⁻ 5)、7.55 (1H, dd, J_1 = 8.6 Hz, J_2 = 2.0 Hz, H⁻ 6)、7.57 (1H, d, J = 2.0 Hz, H⁻ 2) 为 B 环上 5', 6', 2 组成的 ABX 偶合系统质子信号; δ : 6.40 (1H, d, J = 2.0 Hz, H⁻ 8)、6.21 (1H, d, J = 2.0 Hz, H⁻ 6) 为 A 环 8 位和 6 位质子信号; 糖区给出 2 个端基质子信号 δ : 5.36 (1H, d, J = 6.3 Hz)、 δ 5.25 (1H, br s)。 ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) 谱中黄酮母核上 15 个碳信号与槲皮素数据比较, 发现 C-3 位向高场位移 δ 133.4, 同时 C-2、C-4 分别向低场位移至 δ : 148.5、177.4, 提示 C-3 位酚羟基成苷。糖区共给出 12 个碳信号, 根据其数据并结合端基质子偶合常数, 推测其

为芸香糖基片段。综合理化性质和波谱数据, 并与文献[12]进行对照, 鉴定化合物 **9** 为芦丁。

化合物 **10**: 白色针晶 (石油醚), mp 136.0 ~ 137.0 , Liebermann-Burchard 反应呈阳性, 体积分数为 10 % 的硫酸乙醇溶液显紫色。与已知标准品 β -谷甾醇共薄层, R_f 值一致, 与 β -谷甾醇混合后的熔点不下降, 故鉴定化合物 **10** 为 β -谷甾醇。

化合物 **11**: 白色粉末, mp > 300 , Liebermann-Burchard 反应呈阳性, 体积分数为 10 % 的硫酸乙醇溶液显紫色。在 3 种溶剂系统中与胡萝卜苷对照品共薄层, R_f 值一致, 故鉴定化合物 **11** 为胡萝卜苷 (daucosterol)。

参考文献:

- [1] 柳闽生, 陈晔, 徐常龙. 银杏叶有效成分的研究与资源的开发利用[J]. 江西林业科技, 2006, (2): 28 - 31.
- [2] 吴立军. 旋光谱和圆二色谱在有机化学中的应用[J]. 沈阳药学院学报, 1989, 6(3): 225 - 231.
- [3] 周珊, 林茂, 王映红, 等. 山杨的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5): 43 - 45.
- [4] 许婧, 李锐, 张鹏, 等. 金刚藤的黄酮类化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(6): 424 - 425.
- [5] HARBORNE J B, MABRY T J. The flavonoids: advances in research[M]. London: Chapman and Hall, 1982: 72.
- [6] 丘鹰昆, 吉川雅之, 李育浩, 等. 仙人掌肉质茎成分的分离与结构鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(4): 267 - 268.
- [7] 陈封政, 何永华, 丁立生, 等. 绢毛蔷薇果实的化学成分[J]. 药学学报, 1999, 34(6): 454 - 456.
- [8] 楼凤昌, 凌娅, 唐于平, 等. 银杏萜内酯的分离、纯化和结构鉴定[J]. 中国天然药物, 2004, 2(1): 12 - 15.
- [9] 杜安全, 王先荣, 周正华, 等. 银杏叶提取物中银杏内酯 A、B、C 和白果内酯的提取、分离和结构鉴定[J]. 江苏药学与临床研究, 2001, 9(3): 1 - 3.
- [10] 楼凤昌, 王国艳, 郭寅龙. 银杏外种皮化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 1998, 29(4): 316 - 318.
- [11] 游松, 姚新生, 崔承彬, 等. 银杏叶中银杏内酯的分离与结构鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 1995, 5(4): 258 - 265.
- [12] 唐于平, 王颖, 楼凤昌, 等. 银杏叶中的黄酮醇苷类成分[J]. 药学学报, 2000, 35(5): 363 - 366.

(下转至第 320 页)

[7] 徐威. 微生物学实验[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:99.

A rapid plate method for screening antifungal substance-producing bacteria

CAI Si-lan, LIU Ting-ting, YAN Hao-lin, LIANG Li-li

(School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : Objective To study the method for screening antifungal substance-producing bacteria, and lay the foundations of screening antifungal antibiotics. **Methods** Combined with the advances of cup-plate method and differential step cultivation method, the improved screening method from Kekessy was used to screen the antifungal substance-producing bacteria from 3685 strains. **Results** Twenty-eight strains with anti *Candida albicans* 312 activity were screened from 3685 strains. **Conclusions** By using the improved screening method, the antifungal substance-producing bacteria could be screened efficiently and rapidly. The method is adapted to be used in laboratory.

Key words : antifungal activity; bacteria; screening method

(上接第 293 页)

Verification of the bilobalide's absolute configuration using CD spectrum and chemical constituents of the extract from *Ginkgo biloba*

HOU Di, SONG Shuang, SONG Ming, ZHANG Yi-xuan, LI Xian, WANG Jin-hui

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : Objective To verify the absolute configuration, and study the chemical constituents of the extract from *Ginkgo biloba*. **Methods** The absolute configuration of ginkgolide was analyzed by adopting both the method of circular dichroism spectra and the theory of Klyne's lactone sector rule; the constituents were isolated by silica gel column chromatography, polyamide column chromatography, sephadex LH-20 and HPLC. The $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopic analysis were employed for the structural elucidation. **Results** Eleven compounds were isolated and their structures were identified as: genkwanin (1), isorhamnetin (2), kaempferol (3), quercetin (4), bilobalide (5), ginkgolide A (6), ginkgolide B (7), ginkgolide C (8), rutin (9), β -sitosterol (10), daucosterol (11), respectively. **Conclusions** The absolute configuration of ginkgolide matches that reported in references very well.

Key words : CD spectrum; bilobalide; absolute configuration; *Ginkgo biloba* extract; chemical constituents