

银杏叶提取物中染料木素的分离纯化及结构鉴定

王凤芹¹, 蒋可志², 李祖光¹

(1. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310014 ;

2. 杭州师范大学 有机硅化学及材料技术教育部重点实验室, 浙江 杭州 310012)

摘要 对银杏叶提取物进行酸水解, 然后利用正相硅胶柱色谱及重结晶法从银杏叶水解物中分离出染料木素, 经紫外光谱(UV)、质谱(MSⁿ)、核磁共振(¹H NMR、¹³C NMR)等波谱学方法鉴定证实了其结构。高效液相色谱分析表明, 所提纯的染料木素纯度达到了 98% 以上。

关键词 银杏叶提取物 ; 水解产物 ; 柱色谱 ; 重结晶 ; 染料木素

中图分类号 : O658 文献标识码 : A 文章编号 : 1000-8713(2007)04-0509-05 栏目类别 : 研究论文

Purification and Identification of Genistein in *Ginkgo biloba* Leaf Extract

WANG Fengqin¹, JIANG Kezhi², LI Zuguang¹

(1. College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou

310014, China ; 2. Key Laboratory of Organosilicon Chemistry and Material Technology of

Ministry of Education, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310012, China)

Abstract : The *Ginkgo biloba* leaf extract was hydrolyzed under acidic conditions and neutralized with 5% aqueous NaOH. The hydrolysate was extracted with a mixture of ethyl acetate and tetrahydrofuran (7 : 3, v/v), and was concentrated by the vacuum evaporation of organic solvent. Genistein was isolated from the hydrolysate using silica gel column chromatography with a gradient elution of dichloromethane and acetic ether and further recrystallized in dichloromethane. The whole process was monitored using high performance liquid chromatograph, equipped with photodiode array detector and electrospray ionization mass spectrometer/mass spectrometer (HPLC-PDA-ESI-MS/MS). The HPLC chromatogram with UV at 260 nm showed that the purity of genistein was higher than 98%. The structure of genistein was identified using UV absorption curves, nuclear magnetic resonance (¹H NMR, ¹³C NMR) spectra, ESI-MS in negative mode and tandem MS spectra. The fragmentation mechanism for genistein was also discussed in detail : collision induced dissociation (CID) of the [M - H]⁻ ion (*m/z* 269) showed that the quasi-molecular ions [M - H]⁻ were prone to process rearrangement in the skeleton and lose neutrals, such as C₃O₂, CO₂, CO. The Retro-Diels-Alder fragmentation was another characteristic decomposition of the ions.

Key words : *Ginkgo biloba* leaf extract ; hydrolysate ; column chromatography ; recrystallization ; genistein

银杏(*Ginkgo biloba*)为银杏科(Ginkgoaceae)银杏属植物, 因其树叶提取物中含有多种化学成分, 并且具有药用价值, 自 20 世纪 60 年代以来, 国内外学者对其化学成分、药理作用及临床应用作了大量的研究^[1,2]。一般认为银杏提取物(EGB)及

其制剂中的黄酮糖苷及萜烯内酯类化合物能有效地防治心脑血管疾病, 拮抗血小板活化因子(PAF), 对与自由基有关的疾病有明显的改善作用。也有报道^[3,4]认为银杏提取物具有异黄酮的药理作用, 即抗氧化及抗癌作用。但由于异黄酮在银杏叶中的含

收稿日期 2007-01-19

第一作者 : 王凤芹, 女, 硕士研究生, E-mail : iamwangfengqin@163.com.

通讯联系人 : 李祖光, 男, 教授, Tel (0571)88320306, E-mail : lzg@zjut.edu.cn.

基金项目 : 国家自然科学基金资助项目(No. 30500339)和浙江省高校青年教师资助计划项目(2005 年).

量较低,而且主要是以糖苷的形式存在,故对银杏叶提取物中的异黄酮苷元(如染料木素)的研究鲜有报道。

染料木素(genistein)为异黄酮的一种,结构见图 1。它具有弱雌激素活性、抗癌、预防心血管疾病等功能,此外,还具有抗氧化、抗衰老、抗真菌、抑制真菌活性及酪氨酸蛋白激酶活性的功能^[5]。染料木素和其他异黄酮成分主要存在于大豆中,在大豆中的含量约为 0.1%~0.5%^[6]。对异黄酮的分离纯化技术主要有反相高效液相色谱法^[7]、经典柱色谱法、高速逆流色谱法、固相萃取、膜分离技术等^[8]。其中,传统柱色谱法比起其他纯化技术,虽然存在不可逆吸附的问题,但其可操作性强,在天然产物的分离纯化中广泛应用。目前,异黄酮的纯化大多数需要反复的柱色谱分离^[9]。

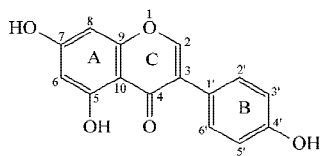


图 1 染料木素的结构式
Fig. 1 Structure of genistein

本文通过对银杏叶提取物进行酸水解,将提取物中的异黄酮从糖苷形式转化成苷元形式,再使用硅胶柱色谱结合重结晶技术对水解物进行分离和提纯,得到纯度高达 98% 的染料木素。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

Surveyor 液相色谱仪(包括自动进样器、四元梯度泵和二极阵列(PDA)检测器),LCQ 离子阱质谱仪(美国,Thermo 公司);RE-2000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器厂);Avance 400 MHz 核磁共振仪(德国,Bruker 公司);玻璃色谱柱,柱直径 50 mm,有效长度 450 mm(杭州凯弗克斯实验室设备有限公司)。

二氯甲烷、乙酸、四氢呋喃、乙酸乙酯、盐酸、氢氧化钠均为国药试剂公司生产的分析纯试剂;硅胶(200 目~300 目,青岛海洋化工有限公司)。水为二次重蒸水;色谱纯甲醇(德国,Merck 公司);银杏叶提取物(经乙醇提取、大孔树脂吸附而得,总黄酮含量 $\geq 24\%$,银杏内酯含量 $\geq 6\%$),购于杭州博大生物技术有限公司。

1.2 银杏叶提取物的水解及纯化

称取 10 g 银杏叶提取物于 250 mL 烧瓶中,加入 200 mL 甲醇、50 mL 25% (质量分数)的盐酸,在磁力搅拌的情况下加热回流 5 h(约 90 °C)。待水解物冷却后,用 5% (质量分数)的氢氧化钠水溶液中和。使用旋转蒸发仪(温度设置为 55 °C)将水解物中的甲醇除去,剩余的水相使用乙酸乙酯和四氢呋喃(体积比为 7:3)的混合液进行萃取,重复萃取 2 次,合并有机相,减压浓缩,得到 6 g 深褐色水解物。

使用柱色谱技术分离水解物中的异黄酮,考虑到硅胶中的 Fe 离子对黄酮类化合物的吸附比较严重^[10],在装柱之前对硅胶作了酸化处理,以除去硅胶中微量的 Fe 离子。采用预吸附技术上样,即先用少量的甲醇溶解 6 g 样品再和 4 g 硅胶混匀,然后将混有样品的硅胶干燥,粉碎成细粉,均匀地铺在色谱柱的顶部。

使用二氯甲烷、乙酸乙酯混合液进行梯度淋洗,100% CH_2Cl_2 (2 800 mL)→80% CH_2Cl_2 (3 700 mL)→50% CH_2Cl_2 (7 500 mL)→20% CH_2Cl_2 (2 300 mL),得到 5 份色带明显不同的洗脱液,液相色谱分析结果见图 2。第一部分(Part I)为未知物,将做进一步研究,第二部分(Part II)主要为染料木素,第三部分(Part III)为槲皮素、异鼠李素和山奈酚的混合物,第四部分(Part IV)主要为槲皮素及少量的山奈酚,第五部分(Part V)为槲皮素及未水解的糖苷的混合物。将第二部分浓缩后,得到约 20 mg 粗流分固体。将这 20 mg 粗流分用二氯甲烷在室温下进行重结晶纯化,得到淡黄色晶体约 15 mg。

1.3 色谱及质谱分析条件

HPLC 分析条件:色谱柱为 Kromasil 100 C_{18} 柱(150 mm×4.6 mm 5 μm),柱温 30 °C;进样量 10 μL ;样品用甲醇溶解;以甲醇-水体系为流动相:A 相为甲醇,B 相为 0.01 mol/L 的乙酸水溶液,采用等度洗脱($V_A:V_B=4:6$),流速为 0.8 mL/min;PDA 检测器的波长扫描范围设为 220~600 nm,选择波长设为 260 nm。

质谱分析采用电喷雾负离子模式,喷雾头电压(Ion Spray Voltage)5 kV,喷雾气(Sheath Gas)和辅助气(Aux/Sweep Gas)都使用高纯氮,其压力分别采用 3 MPa 和 0.5 MPa;加热毛细钢管温度(Capillary Temp)250 °C,电压 35 V;高纯氦气作为多级质谱测试的碰撞气,归一化碰撞能量设在 45%;全扫描质荷比(m/z)范围为 70~400。

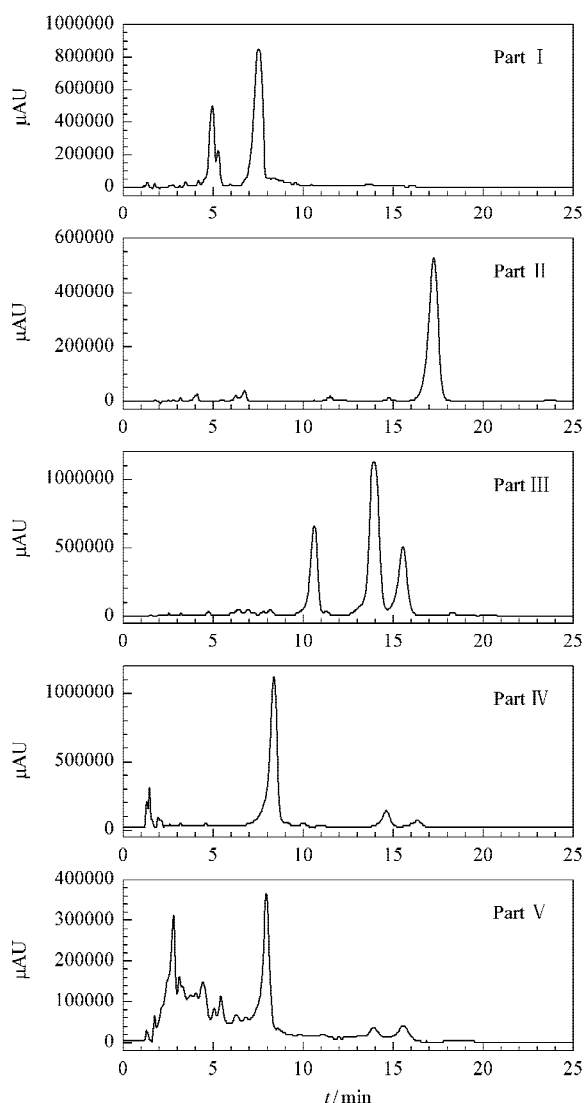


图 2 五种粗流分的液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of 5 crude fractions obtained from silica column

2 结果与讨论

2.1 重结晶技术的纯化作用

使用柱色谱分离得到的固体中还含有少量杂质(见图 3-a),仍需进一步纯化。

本实验采用重结晶技术对其进一步纯化。由于甲醇对杂质和染料木素都有较大的溶解度,难以获得较高的产率,而水对杂质和染料木素的溶解度均较差,纯化效果较差。考虑到二氯甲烷对分离提取物及其杂质有一定的溶解性,并具有良好的挥发性,本实验中选择二氯甲烷作溶剂进行重结晶,使用大量的二氯甲烷溶解粗流分,然后蒸发溶剂使染料木素结晶析出,待剩少量的液体时移去这部分液体,即可得到纯度较高的染料木素。

图 3-b 为将粗流分重结晶后的液相色谱图,图中 15.78 min 峰左右两侧组分的紫外谱图具有非常

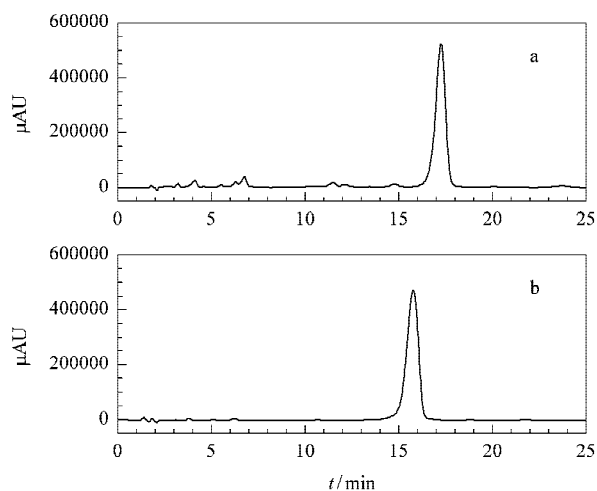


图 3 (a)染料木素粗流分和(b)重结晶物的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of genistein (a) before and (b) after recrystallization

相近的吸收轮廓图(见图 4),说明该峰为一种组分。比较图 3-a, b 两图,发现提取物中的杂质峰强度经重结晶后明显降低。对 PDA 检测器的液相色谱图进行峰面积归一化计算发现,经过重结晶纯化提取物的纯度由 87% 提高到 98% 以上。

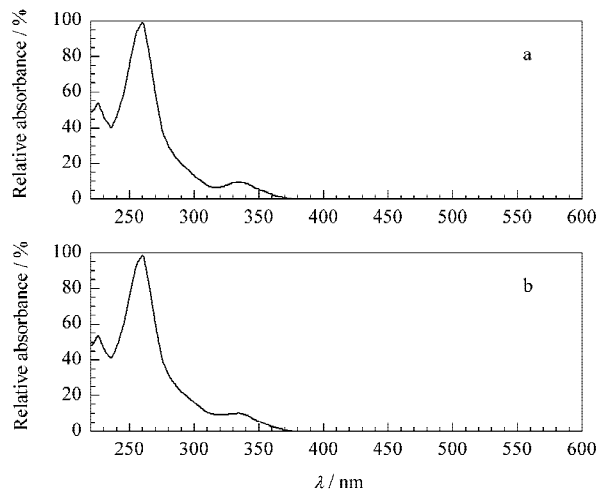


图 4 染料木素的紫外吸收曲线

Fig. 4 UV absorption of purified genistein

a. UV absorption curve of left side of the peak ($t_R = 15.78$ min, in Fig. 3-b); b. UV absorption curve of right side of the peak.

以该纯化的组分为标样,按“1.3”节的液相色谱分析条件对水解物进行分析测试(UV 检测波长为 260 nm),单点校正法测得该组分(染料木素,其结构鉴定见“2.2”节)的质量分数为 0.77%,因此在原来的提取物中其苷元的质量分数约为 0.46%。

2.2 结构鉴定

2.2.1 提取物的紫外与核磁谱图解析

经重结晶得到的化合物的紫外吸收谱图见图 4,在 260 nm 处有特征吸收峰,并在 335 nm 处有肩

峰,这符合异黄酮类化合物的紫外吸收曲线特征^[10,11]。

提取物的核磁共振氢图、碳谱分别见图 5 和图 6,结合这两图数据,发现除图 5 中共振峰 δ 3.34(水峰)和 δ 2.5(二甲基亚砜(DMSO)上未氘代的质子吸收峰)外,该提取物的核磁共振峰都处在较低场,说明化合物中的碳都以双键或芳环的形式存在。通过综合分析该提取物的紫外吸收图、氢谱、碳谱和质谱,以及参考文献[12,13],可以确定该化合物是染料木素,其核磁共振谱图解析如下。

^1H NMR(DMSO- d_6) δ : 12.97($\text{C}_5\text{-OH}$), 10.91($\text{C}_7\text{-OH}$), 9.61($\text{C}_4\text{-OH}$), 8.33(s, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$), 7.38(d, 2H, $\text{C}_{2',6'}\text{-H}$), 6.82(d, 2H, $\text{C}_{3',5'}\text{-H}$), 6.39(s, 1H, $\text{C}_8\text{-H}$), 6.23(s, 1H, $\text{C}_6\text{-H}$)。

^{13}C NMR(DMSO- d_6) δ : 93.554(C-8), 98.849(C-6), 104.343(C-10), 114.939(C-3' , $5'$), 121.083(C-3), 122.153(C-1'), 130.058(C-2' , $6'$), 153.906(C-2), 157.303(C-9), 157.470(C-4'), 161.882(C-5), 164.161(C-7), 180.104(C-4)。

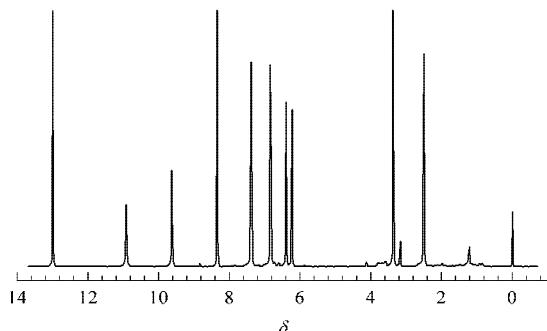


图 5 染料木素的 ^1H NMR

Fig. 5 ^1H NMR of genistein obtained

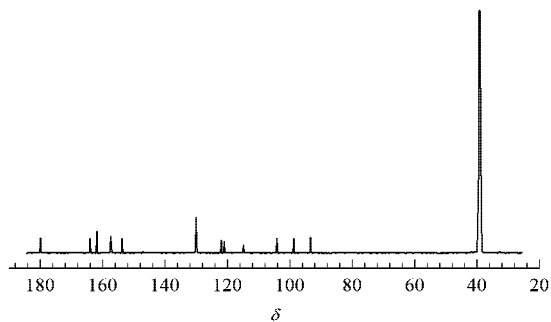


图 6 染料木素的 ^{13}C NMR

Fig. 6 ^{13}C NMR of genistein obtained

2.2.2 提取物的质谱解析

由于染料木素在结构上含有多个酚羟基,具有一定的酸性,因此在电喷雾负电离模式下,容易丢失质子,得到 m/z 269 的分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (见图 7-a)。

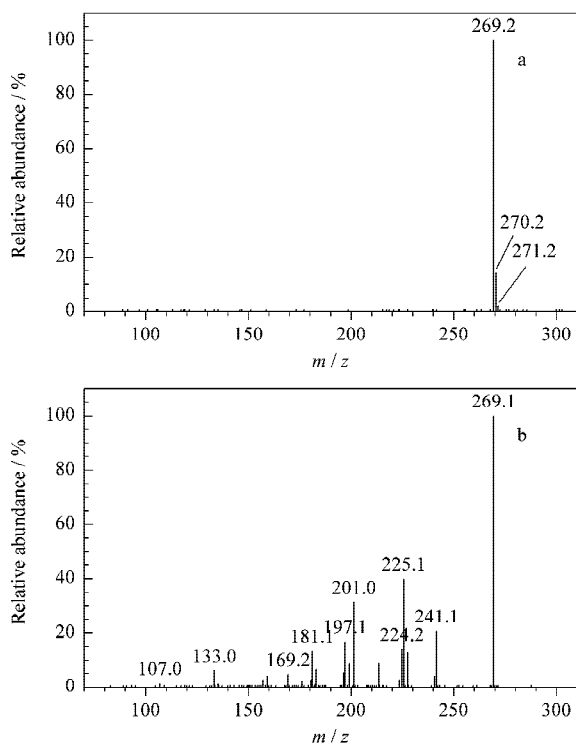


图 7 染料木素的(a)MS 及(b)MS/MS 谱图

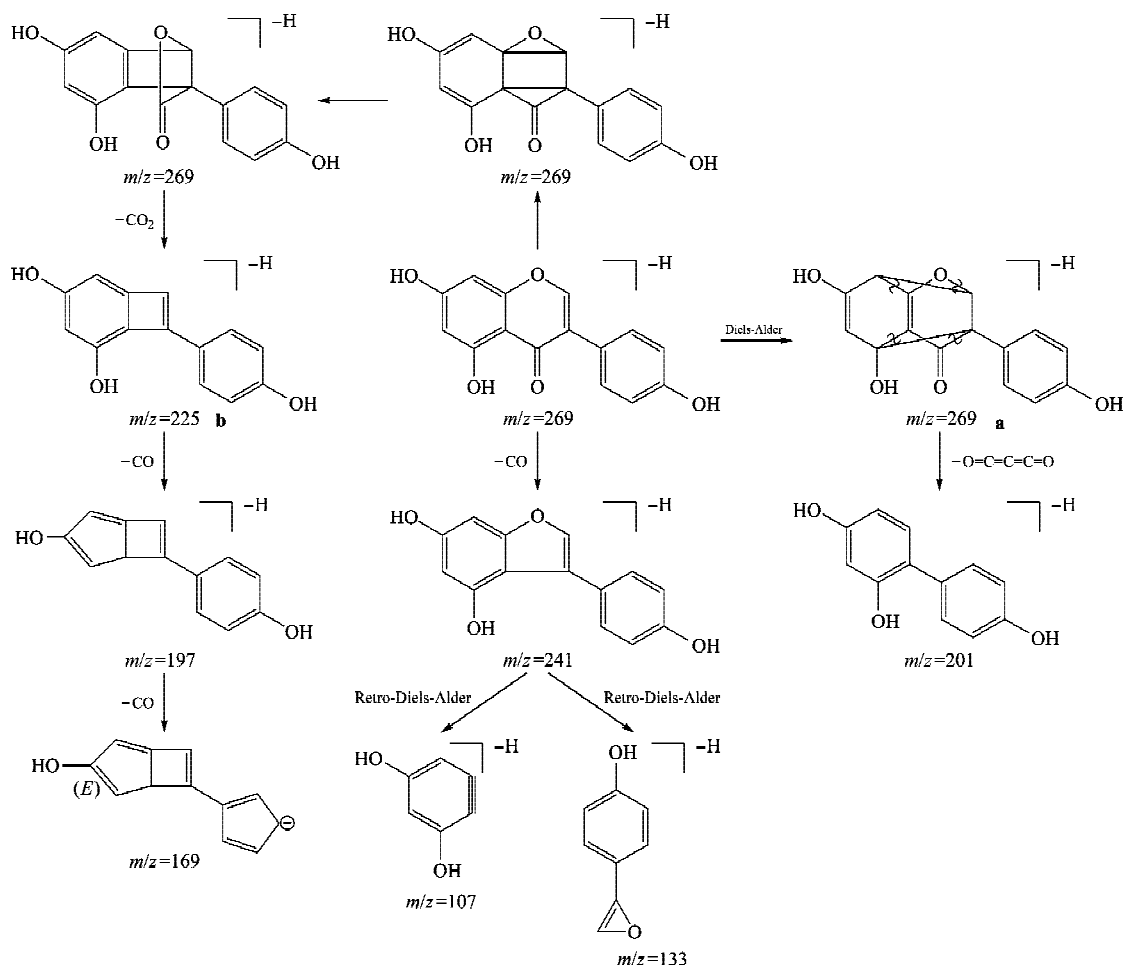
Fig. 7 (a) MS and (b) MS/MS spectra of genistein obtained

以该离子作为母离子进行二级质谱裂解(图 7-b),主要产生如下 8 个特征离子: m/z 107, m/z 133, m/z 169, m/z 181, m/z 197, m/z 201, m/z 225 和 m/z 241,与文献[14,15]吻合。本文对其裂解过程解析如下(见图 8)。

分子离子 m/z 269 经过 A 环与 C 环(见图 1)双键发生 Diels-Alder 反应,产生一个中间体结构(见图 8-a),并继续进行骨架重排丢失一个 C_3O_2 中性碎片,得到联酚负离子 m/z 201。

分子离子 m/z 269 也可以进行 C 环重排,变成四元环的内酯结构,然后丢失一个 CO_2 中性碎片产生碎片离子 m/z 225(见图 8-b),其详细的裂解机理可能为:首先是 C 环上两个对位的双键相互成键,使该环增加氧化乙烯和环丙酮这两个三元环和一个环丁烷四元环结构单元,然后在 A 环产生芳香化作用,两个三元环发生重排形成四元环的内酯结构单元;由于四元环内酯的不稳定性,可以进行骨架重排丢失 CO_2 。在此基础上,含多个酚羟基碎片结构的离子 m/z 225 可以发生重排依次丢失 2 个 CO 碎片,得到 m/z 197 离子和 m/z 169 的离子。

分子离子 m/z 269 还可以在 C 环上发生丢失酮羰基的反应,形成呋喃结构的碎片离子 m/z 241,并继续发生 Retro-Diels-Alder 反应,生成碎片离子 m/z 107 或碎片离子 m/z 133。

图 8 染料木素 $[M-H]^-$ 离子可能的碰撞诱导解离 (CID) 质谱裂解途径Fig. 8 Proposed fragmentation mechanism of the $[M-H]^-$ anion of genistein

3 结论

本文用常规的一次硅胶柱色谱及重结晶技术,从银杏叶提取物的水解物中提纯出染料木素,并经 UV、MSⁿ、¹H NMR、¹³C NMR 等多种波谱学方法鉴定证实了其结构。同时,还对 MS² 具体的裂解过程做了深入的解析。HPLC 分析表明,所制备的化合物纯度达到 98% 以上。本方法的优势在于避免了反复进行柱色谱分离造成的样品损失及大量时间的浪费,且所用的分离设备十分简单。

参考文献:

- [1] van Beek T A. J Chromatogr A, 2002, 967 : 21
- [2] Zhang D Q, He Z F. Chemical Research of *Ginkgo biloba* Leaves. Beijing: China Light Industry Press (张迪清,何照范. 银杏叶资源化学研究. 北京:中国轻工业出版社), 1999
- [3] Jiang A L, Guo Q H. China Food Additives (姜爱莉,郭清华. 中国食品添加剂), 2001(5): 17
- [4] Sha H, Chen G X, Ma L. China Pharmacy (沙怀,陈桂先,马莉. 中国药房), 1995, 6(5): 13
- [5] Xing J, Li Y G, Xie L Q. Journal of Xinjiang University: Natural Science Edition (邢军,李友广,谢丽琼. 新疆大学学报:自然科学版), 2006, 23(2): 207
- [6] Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wähälä K, Adlercreutz H. J Nutr, 1998, 128(10): 1710
- [7] Yang X D, Deng Z C, Wang J, Ding M Y. Chinese Journal of Chromatography (杨学东,邓志成,王晶,丁明玉. 色谱), 2006, 24(4): 363
- [8] Qu L P, Mi H M, Fan G R. The Journal of Pharmaceutical Practice (曲丽萍,宓鹤鸣,范国荣. 药学实践杂志), 2006, 24(2): 69
- [9] Yao K, Jia D Y, He Q, Lü Y P. Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition (姚开,贾冬英,何强,吕远平. 四川大学学报:工程科学版), 2004, 36(3): 77
- [10] Markham K R. Techniques of Flavonoid Identification. Zhang B C, et al, transl. Beijing: Science Press (黄酮类化合物结构鉴定技术. 张宝琛,等,译. 北京:科学出版社), 1990: 44
- [11] Klejdus B, Sterbova D, Stratil P, Kuban V. Chem Listy, 2003, 97: 530
- [12] Wang J H, Wang Y L, Lou F C. Journal of China Pharmaceutical University (王景华,王亚琳,楼凤昌. 中国药科大学学报), 2001, 32(6): 471
- [13] Huang S Y, Tu P F. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis (黄胜阳,屠鹏飞. 北京大学学报:自然科学版), 2004, 40(4): 544
- [14] Morandi S, Locati D, Ferrario F, Chiesa G, Arnoldi A. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19: 153
- [15] Locati D, Morandi S, Cupisti A, Ghiadoni L, Arnoldi A. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19: 3473