

银杏酸的分离、鉴定 及对 5 种蔬菜病原真菌的抑制作用

林光荣, 林清洪*, 胡维冀, 陈淳, 刘鸿洲

(福建省亚热带植物研究所, 福建 厦门 361006)

摘要: 银杏外种皮采用体积分数为 70% 乙醇回流提取得到含活性成分银杏酸的粗提物, 用乙醚、质量分数为 5% Na_2CO_3 、质量分数为 5% 的 NaOH 萃取分离, 经硅胶柱层析纯化得银杏酸同系物; 采用 HPLC 进行定量、纯度测定, 用 LC/MS 对其中的银杏酸进行定性鉴定。实验测得银杏外种皮中银杏酸含量为 3.12%; 银杏酸同系物纯度为 86.7%; 平均回收率为 97.3%, RSD 为 1.3% ($n=5$)。HPLC 和 LC/MS 图谱表明该方法获得的银杏酸同系物无其他杂质峰, 纯度高。银杏酸对甘蓝黑斑病菌抑制作用较强, EC_{50} 为 24.80 mg/mL。

关键词: 银杏酸; 萃取分离; 鉴定; 抑制作用

中图分类号: Q946.889 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)03-0498-06

Extraction, Identification of Ginkgolic Acids and Their Inhibition of Pathogenic Fungi in Five Kinds of Vegetable

L N Guang-rong, L N Qing-hong*, HU Wei-ji, CHEN Chun, L U Hong-zhou

(Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361006, China)

Abstract: The crude extract of active ginkgolic acids in sarcotesta of ginkgo biloba was gained with 70% alcohol circumfluence distillation, then it was extracted with ether, 5% Na_2CO_3 , 5% NaOH ; the homologue of ginkgolic acids was purified by silica gel column chromatography. In this study, the quantity and purity of ginkgolic acids were determined by HPLC, identified by LC/MS. The results showed that the content of ginkgolic acids in sarcotesta of ginkgo biloba was 3.12%; the average recovery was 97.3%, RSD was 1.3% ($n=5$); the purity of ginkgolic acids was 86.7%. HPLC and LC/MS patterns showed that the ginkgolic acids obtained with this method had no impurity peak, their purity were high. Bioassay to the ginkgolic acids for the tested fungi showed that the ginkgolic acids were effective to *Alternaria brassicae*, in which the EC_{50} was 24.80 mg/mL.

Key words: ginkgolic acids; extraction; identification; inhibition activities

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 系银杏科植物, 为我国特有珍贵树种, 是地球残存的最古老的子遗植物之一, 被称为活化石, 也叫白果树, 被列为国家一级保护树种^[1]。福建省尤溪、顺昌、德化、政和等地有大片天然林, 其中尤溪县古银杏群落全省面积最大, 据考证, 尤溪县古银杏群树龄已达 700 多年, 银杏酸 (Ginkgolic Acids, 简称 Gas) 是银杏中除了黄酮和内酯外的另一具有重要生理活性的组分, 存在于银杏的叶、果和外种皮中, 以外种皮中含量最高^[2]。银杏酸为水杨酸的 6-烷基或 6-烯基衍生物, 其苯环六

收稿日期: 2010-03-03 修回日期: 2010-05-04

基金项目: 福建省农业科技重点项目资助 (2006N0014)

作者简介: 林光荣 (1964-), 男, 助理研究员, 主要从事植物资源化学及应用研究; *通讯作者: 林清洪, 研究员, E-mail: linqinghong2006@sina.com。

位上的侧链碳原子数可从 13 至 19,侧链双键数可从 0 至 3,为 5 种同系物所组成的混物。常见银杏酸的结构见图 1。研究^[2-5]表明,银杏酸具有抗菌、抗炎、抗肿胀等作用。近年来,福建省长汀、宁化等地人工栽培几千公顷,开发银杏果仁制剂的同时,把新鲜外种皮弃于山沟或河里,不仅毒死鱼类,且气味难闻,造成严重的环境污染,浪费了银杏资源。有关银杏酸活性研究国内江苏、湖北等省做了少量对大田作物真菌病害及动物病原细菌的抑菌研究^[6-8],本文在对银杏外种皮中银杏酸的提取分离、测定和定性鉴定研究的基础上,经过萃取和柱层析获得银杏酸对 5 种蔬菜病原真菌室内抑菌作用,为开发环保型银杏酸植物源杀菌剂提供科学依据。

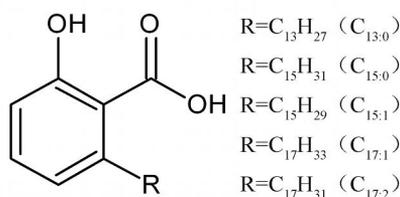


图 1 银杏酸结构图

Fig 1 Structure of Ginkgolic Acids

1 材料与方法

1.1 供试材料

银杏外种皮(采自福建省长汀银杏基地)。

1.2 银杏酸对照品

上海融禾医药有限公司提供,为 5 种同系物混合物,银杏酸的组成和含量($C_{13:0}$, 9.30%; $C_{15:1}$, 48.33%; $C_{17:2}$, 1.54%; $C_{15:0}$, 3.42%; $C_{17:1}$, 37.32%),纯度 99% 以上,并用 HPLC-ESI-MS 对该标准进行了鉴定^[9]。

1.3 供试病原菌

甘蓝黑斑病菌 (*Alternaria brassicae*)、白菜炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*)、茄子立枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、茄子白绢病菌 (*Pellicularia rolfsii*) 等由福建农林大学植物保护学院提供、黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、由福建省亚热带植物研究所分离纯化。

1.4 仪器

ZF-Ⅱ型三用紫外分析仪;日立 L-7100 高效液相色谱仪;Waters 液相色谱-质谱联用仪,型号为 Acquity-Quattro-Premier XE。

1.5 方法

1.5.1 标准品的制备 准确称取银杏酸对照品,用无水甲醇溶解,定容后,用 0.45 μm 针头滤器过滤,得银杏酸标准溶液。

1.5.2 银杏酸的提取分离 称取干燥粉碎的银杏外种皮 200 g,按 1:3 的比例加入 600 mL 体积分数为 70% 乙醇加热回流浸提,重复浸提 3 次,合并粗提取物,粗提取物分 3 次用旋转浓缩仪浓缩至膏状,合并膏状物,用蒸馏水稀释至 500 mL,平均分在 4 个分液漏斗中,每个漏斗中均加 70 mL 乙醚萃取,醚层用质量分数为 5% Na_2CO_3 萃取,弃去 Na_2CO_3 层,醚层再用质量分数为 5% NaOH 萃取,NaOH 层用体积分数为 20% HCl 酸化后再用乙醚萃取,合并乙醚层,浓缩回收乙醚得红褐色物质即为银杏酸。

1.5.3 银杏酸的纯化 分离获得的红褐色银杏酸用石油醚溶解加样于硅胶柱上(硅胶 100 g,硅胶柱内径为 32 mm × 400 mm 的玻璃柱,湿法装柱),先用少量石油醚洗涤,再用 $V(\text{石油醚}) : V(\text{乙醚}) : V(\text{甲酸}) (89 : 11 : 1)$ 洗脱,收集银杏酸组分,浓缩至干,得纯化的银杏酸同系物。

1.5.4 高效液相色谱分析条件 色谱柱为 Diamonsil C18 (250 mm × 4.6 mm),流动相为 $V(\text{甲醇}) : V(3\% \text{乙酸溶液}) (90 : 10)$,流速为 2 mL/min,柱温为常温,紫外检测波长为 254 nm,检测器为 HPLC UV-VIS Detector-7420。

1.5.5 标准曲线的测定 分别吸取不同体积的标准溶液进样,每个进样量平行测定 3 次,求其峰面积的平均值,得外标曲线。

1.5.6 银杏酸含量和纯度的测定 准确称取干燥粉碎的银杏外种皮 2.0 g,用体积分数为 70% 乙醇重复提取 3 次,浓缩至膏状,余下步骤同 1.5.2 和 1.5.3,获得纯化的银杏酸同系物。称取一定量银杏酸同系物,用无水甲醇溶解,置于 10 mL 容量瓶中定容,进样 10 μL,计算各银杏酸峰的面积,根外标曲线

求出银杏酸的总含量。平行测定 3 次,求其平均值。

1. 5. 7 银杏酸回收率的测定 准确加入一定量的自制银杏酸于银杏外种皮中,经过提取分离和纯化后,余下步骤同 1. 5. 6。平行测定 5 次,计算加标回收率和相对标准偏差。

1. 5. 8 银杏酸的定性鉴定 银杏酸在 254 nm 处显强蓝紫色荧光。于 254 nm 处观察有无荧光,即可判断有无银杏酸。根据样品和标准品的 HPLC 峰的保留时间和 LC/MS 的母离子/子离子特征峰来定性鉴定各银杏酸的峰。

1. 5. 9 银杏酸抑制病原菌菌丝生长的毒力测定 银杏酸系列浓度为 6. 25, 12. 5, 25, 50, 100 mg/mL, 以同量无水乙醇的 PDA 培养基为对照,测定 5 种蔬菜真菌病害病菌菌丝生长抑制率,每处理 5 次重复,求出毒力回归方程及相关系数 R 、 $EC_{50}^{[10-13]}$ 银杏酸对 5 种病原真菌菌丝生长的毒力作用。

2 结果与分析

2. 1 标准曲线

按 1. 5. 5 测定方法,以峰面积为横坐标,银杏酸进样量为纵坐标作图,得标准曲线,其线性回归方程为 $y = 2. 29 \times 10^{-5} x + 0. 167$,相关系数为 0. 999 8,线性检测范围为 0. 53 ~ 15. 3 μ g,按 3 倍基噪音计算得检测限为 5. 6 ng。

2. 2 银杏外种皮中银杏酸的含量与银杏酸的纯度

根据 1. 5. 6 测定方法平行测定 3 次,得各组分的相对含量(银杏酸的某成相对含量 = 某种银杏酸峰的面积 / 5 种银杏酸的峰面积总和),银杏外种皮中银杏酸平均含量为 3. 12%;其中以 C_{15} 含量最高,其次是 C_{13} 和 C_{17} ,这 3 种银杏酸占了总银杏酸的 90% 以上。根据 1. 5. 6 测定方法平行测定 3 次,银杏酸平均纯度测定结果为 86. 7%。

2. 3 银杏酸的回收率

根据 1. 5. 7 测定方法平行测定 5 次,银杏酸平均回收率为 96. 9%,相对标准偏差 $RSD = 1. 3\%$ ($n = 5$),说明该法的准确度和精密度较好。

2. 4 银杏酸的定性鉴定

银杏酸在 254 nm 处显强蓝紫色荧光,TLC 的检测限可达 5 μ g。本文用 TLC 薄板定性检测时,在检测限点可观察到明显的蓝紫色荧光,说明样品中有银杏酸。采用 HPLC 对银杏酸标准品和样品进行测定,以保留时间来判断样品中银杏酸同系物组成情况,银杏酸标准品和样品的 HPLC 谱图如图 2、图 3。

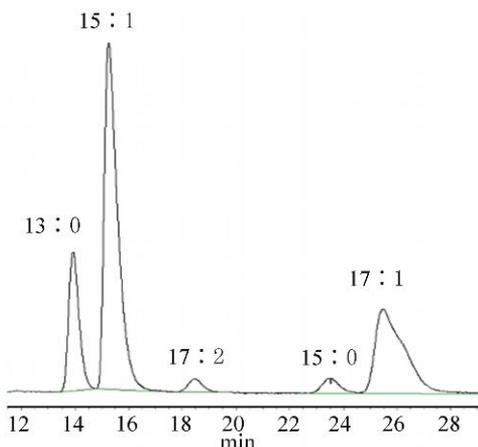


图 2 银杏酸标准品 HPLC 谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of standard of ginkgolic acids

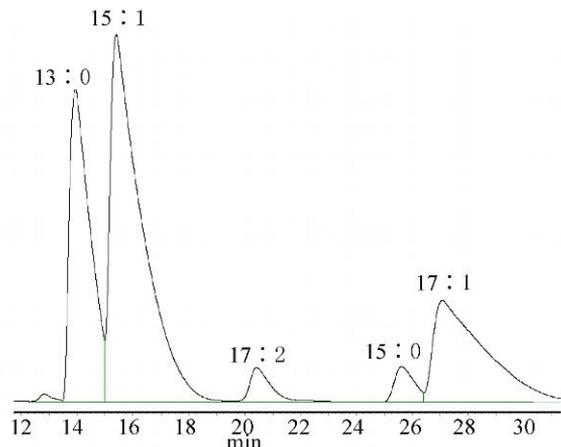
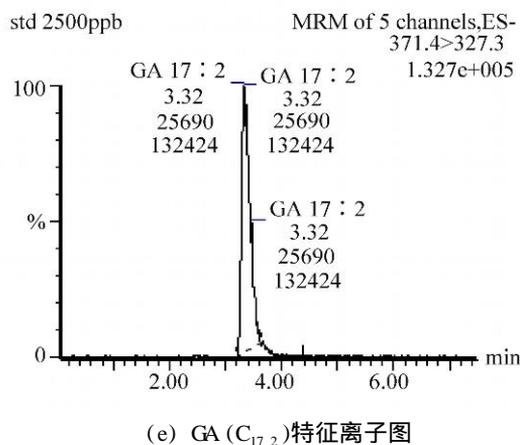
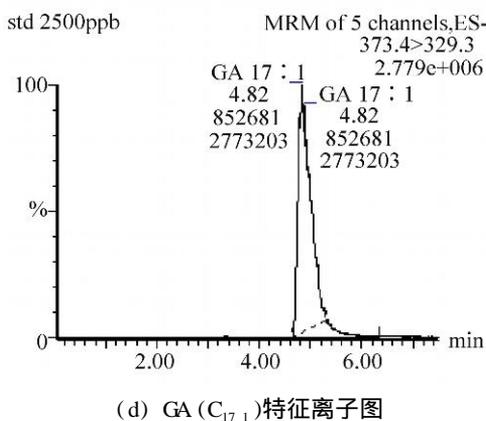
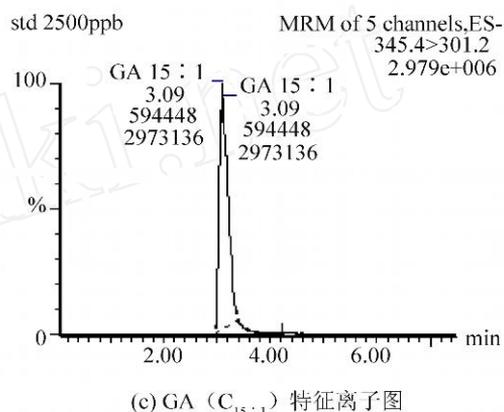
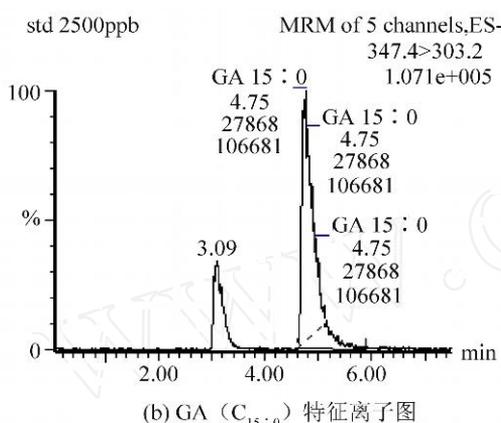
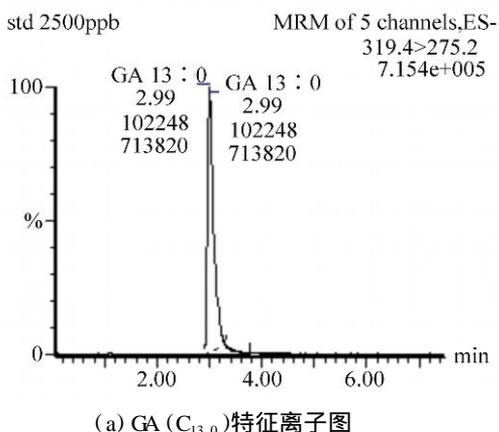


图 3 银杏外种皮中的银杏酸 HPLC 谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of ginkgolic acids in sarcotesta of ginkgo bibba

图 3 样品谱图与图 2 标准品谱图相比,样品中 5 种银杏酸同系物色谱峰的保留时间与标准品中 5 种银杏酸同系物色谱峰的保留时间基本相同,且无杂峰出现,说明样品纯度高,和标准品一样也含有 5 种

银杏酸同系物。同时作了 LC/MS 的母离子 / 子离子特征峰质谱图, 5 种银杏酸同系物母离子 / 子离子特征峰为 GA (C₁₃₀): 母离子 (分子量) / 子离子 (丰度最高的子离子) 即 319. 4/275. 2 特征子离子图; GA (C₁₅₀): 母离子 (分子量) / 子离子 (丰度最高的子离子) 即 347. 4/303. 2 特征子离子图; GA (C₁₅₁): 母离子 (分子量) / 子离子 (丰度最高的子离子) 即 345. 4/301. 2 特征子离子图; GA (C₁₇₁): 母离子 (分子量) / 子离子 (丰度最高的子离子) 即 373. 4/329. 3 特征子离子图; GA (C₁₇₂): 母



(a) GA (C₁₃₀) MS characteristic daughter ion chromatogram; (b) GA (C₁₅₀) MS characteristic daughter ion chromatogram; (c) GA (C₁₅₁) MS characteristic daughter ion chromatogram; (d) GA (C₁₇₁) MS characteristic daughter ion chromatogram; (e) GA (C₁₇₂) MS characteristic daughter ion chromatogram.

图 4 银杏外种皮中的银杏酸质谱图

Fig 4 MS characteristic daughter ion chromatogram of ginkgolic acids in ginkgo biloba extract

离子 (分子量) / 子离子 (丰度最高的子离子) 即 371. 4/327. 3 特征子离子图。由谱图可知, 样品谱图的保留时间、母离子 / 子离子特征子离子图与标准品完全一致, 由此可进一步鉴定样品即为 5 种银杏酸同系物。

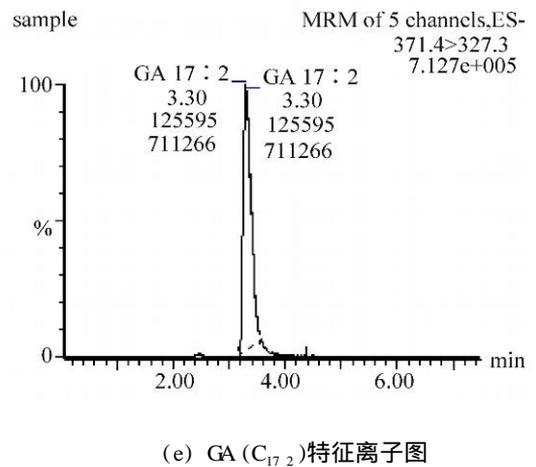
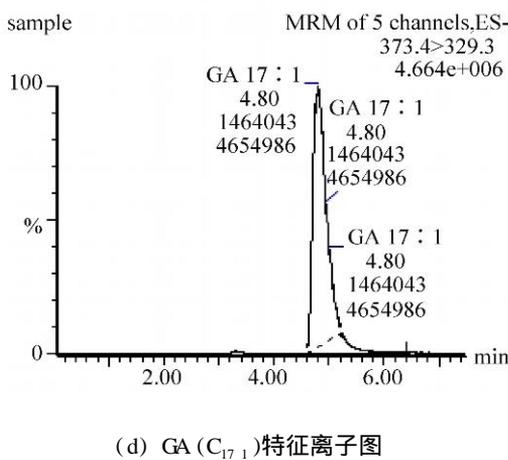
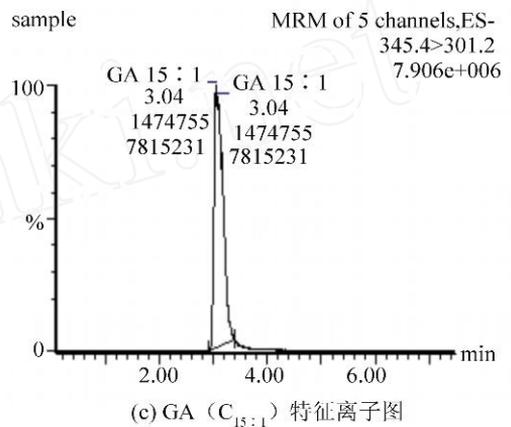
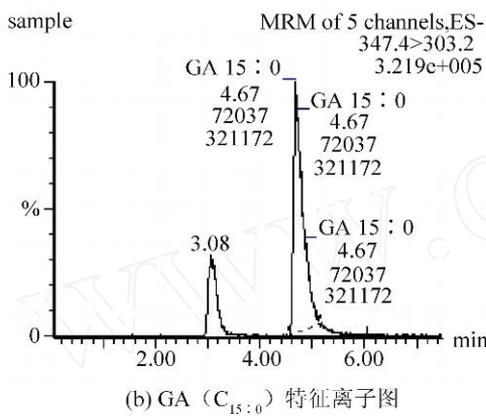
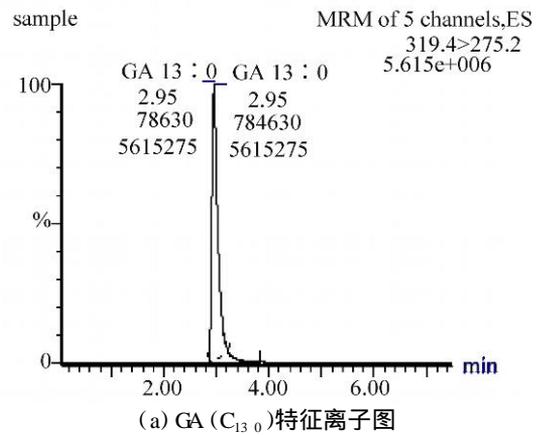
2.5 银杏酸对 5 种病原真菌菌丝生长的毒力作用

对病原真菌菌丝生长的毒力测定结果 (表 1) 表明, 银杏酸对 5 种病原真菌菌丝生长的毒力强弱依次为甘蓝黑斑病菌、茄子立枯病菌、茄子白绢病菌、白菜炭疽病菌、黄瓜枯萎病菌, 其中对甘蓝黑斑病菌的毒力最强, EC₅₀ 为 24. 80 mg/mL。

3 结论与讨论

(1) 本实验通过提取分离、纯化得到银杏外种皮的提取物, 经过 LC/MS 鉴定为 5 种银杏酸同系物; 用 HPLC 测定银杏酸含量、纯度, 实验测得银杏外种皮中银杏酸含量为 3.12%, 纯度为 86.7%, 回收率为 96.9%, *RSD* 为 1.3% ($n=5$)。结果表明该方法获得的银杏酸快速、简便且纯度高, 为下阶段开发环保型银杏酸植物源杀菌剂所需高纯度活性成分银杏酸提供分离、纯化的方法。

(2) 杨小明等^[8]直接把银杏粗提取物进行柱



(a) GA (C_{13:0}) MS characteristic daughter ion chromatogram; (b) GA (C_{15:0}) MS characteristic daughter ion chromatogram; (c) GA (C_{15:1}) MS characteristic daughter ion chromatogram; (d) GA (C_{17:1}) MS characteristic daughter ion chromatogram; (e) GA (C_{17:2}) MS characteristic daughter ion chromatogram.

图 5 银杏酸标准品质谱图

Fig 5 MS characteristic daughter ion chromatogram of standard of ginkgolic acids

层析分离、纯化, 但由于杂质多, 柱效不佳; 本研究在其基础上采用萃取分离去掉其中大部分杂质后, 再经柱层析纯化, 大大提高柱层析分离、纯化效果。银杏酸纯度还不够理想, 有待下一步继续研究改进分离、纯化工艺。

(3) 银杏酸对 5 种病原菌物菌丝生长的毒力强弱依次为甘蓝黑斑病菌、茄子立枯病菌、茄子白绢病菌、白菜炭疽病菌、黄瓜枯萎病菌, 其中对甘蓝黑斑病菌的毒力最强, *EC*₅₀ 为 24.80 mg/mL, 这有利于银杏酸植物源杀菌剂的开发及有效指导防治 5 种蔬菜真菌病害提供依据。

表 1 银杏酸对 5 种病原真菌菌丝生长的毒力

Tab 1 Toxicity of the Ginkgo Acid to the tested fungicides

供试病菌 Pathogenic fungi	浓度 / (mg · mL ⁻¹) Concentration	菌落直径 /cm Colony diameter	抑制率 /% Inhibition rate	毒力回归方程 Virulence linear regression equation	相关系数 Correlation coefficient	EC ₅₀ / (mg · mL ⁻¹)
甘蓝黑斑病菌 <i>Alternaria brassicae</i>	6.25	3.5	27.1			
	12.5	3.0	37.5			
	25	2.7	43.8	$y = 1.166x + 3.374$	0.9727	24.80
	50	2.01	60.0			
	100	1.0	80.4			
茄子立枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	6.25	5.3	24.3			
	12.5	4.2	40.0			
	25	4.0	42.8	$y = 0.9833x + 3.5314$	0.9537	31.15
	50	3.5	50.4			
	100	1.8	74.3			
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> <i>f. sp. cucumerinum</i>	6.25	4.9	15.5			
	12.5	4.5	22.4			
	25	4.0	31.0	$y = 1.2457x + 2.8725$	0.972	51.04
	50	3.43	43.6			
	100	1.7	70.7			
白菜炭疽病菌 <i>Colletotrichum</i> <i>higginsianum</i>	6.25	4.9	14.3			
	12.5	4.3	23.2			
	25	3.8	32.1	$y = 1.3088x + 2.8243$	0.9904	45.96
	50	3.08	49.8			
	100	1.8	70.5			
茄子白绢病菌 <i>Pellicularia rolfsii</i>	6.25	4.6	20.7			
	12.5	4.2	27.6			
	25	4.0	33.3	$y = 1.0663x + 3.2333$	0.9685	45.38
	50	3.0	47.8			
	100	1.8	70.0			

参考文献:

- [1] 阮志沪, 蔡其武. 银杏 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001.
- [2] Jaggy H, Koch E. Chemistry and biology of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. [J]. Pharmazie, 1997, 52(10): 735 - 738.
- [3] Itokawa H, Totsuks N, Nakahara K, et al. Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35(7): 3016.
- [4] 赵成林. 银杏外种皮中酸性成分的提取与药用探讨 [J]. 中草药, 1997, 28(4): 250.
- [5] 宫霞, 姚淑敏, 卢元芳. 银杏叶提取物抑菌作用的研究 [J]. 食品科学, 1999, 20(9): 54 - 56.
- [6] 吴向阳, 仰榴青, 陈钧, 等. 银杏外种皮中银杏酸抗植物病原真菌活性研究 [J]. 江苏大学学报, 2003, 13(5): 389 - 393.
- [7] 倪学文, 杨志坚, 吴谋成. 银杏外种皮中银杏酚酸的分离和抑菌试验 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(6): 30 - 32.
- [8] 杨小明, 陈钧. 银杏酸抑菌效果的初步研究 [J]. 中药材, 2002, 25(9): 651 - 653.
- [9] Yang L Q, Wu X Y, Chen J. Determination of ginkgolic acids by high performance liquid chromatography [J]. Acta Pharm Sin, 2002, 37(7): 555 - 558.
- [10] 何衍彪, 詹儒林. 20种植物提取物对芒果炭疽菌的抑制作用 [J]. 热带作物学报, 2005, 26(3): 86 - 90.
- [11] 李敏权, 杨宝生. 四种杀菌剂对首和根颈腐烂病菌室内毒力测定 [J]. 草地学报, 2002, 10(1): 270 - 273.
- [12] 赵杰, 周超英, 顾振芳. 几种杀菌剂对甜瓜枯萎病菌的室内毒力测定 [J]. 上海交通大学学报, 2006, 24(4): 386 - 388.
- [13] 齐永霞, 陈方新, 李欠欠. 几种杀菌剂对草莓灰霉病菌的室内毒力测定 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(1): 169 - 171.