

溶剂萃取法脱除银杏酸工艺研究

徐 京¹, 吴元锋^{1,2}, 徐超奕¹, 程 勇^{3,4}, 管成林^{3,4}, 姚慧敏^{3,4}

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心, 杭州 310023;
3. 浙江天草生物科技股份有限公司, 浙江 安吉 313300; 4. 杭州天草科技有限公司, 杭州 310013)

摘 要: 通过溶剂萃取法脱除银杏叶提取物中的有害成分银杏酸, 以银杏黄酮、银杏内酯和银杏酸的分配比为指标, 考察了水相 pH 值、乙醇体积分数、有机相等对分配比的影响, 优化了溶剂萃取法脱除银杏酸的工艺参数。结果表明, 以 pH 值 2.0、体积分数 40% 的乙醇为下相, 正己烷为上相时, 可有效脱除银杏叶提取物中的银杏酸, 并且最大限度保留银杏黄酮和银杏内酯等活性成分。

关键词: 溶剂萃取; 银杏叶提取物; 银杏酸; 脱除

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-8798(2018)05-0370-05

Research on removal of ginkgolic acids through solvent extraction

XU Jing¹, WU Yuanfeng^{1,2}, XU Chaoyi¹, CHENG Yong^{3,4}, GUAN Chenglin^{3,4}, YAO Huimin^{3,4}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agricultural Biological Resources Biochemical Manufacturing, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 3. Zhejiang Skyherb Biotechnology Inc., Anji 313300, Zhejiang, China; 4. Hangzhou Skyherb Technologies Co., Ltd., Hangzhou 310013, Zhejiang, China)

Abstract: In this paper, ginkgolic acids in the ginkgo biloba extract were removed by means of solvent extraction. Using the partition ratio of ginkgo flavonoids, ginkgolides and ginkgolic acids as index, the process parameters of ginkgolic acid removal were optimized by investigating the effects of pH value of aqueous phase, ethanol volume fraction and organic phase on the partition ratio. The results showed that when 40% ethanol solution at pH 2.0 being as the lower phase, and *n*-hexane being as the upper phase, the ginkgolic acids in ginkgo biloba extract could be removed effectively, while the ginkgo flavonoids and ginkgolides could be maximally preserved.

Keywords: solvent extraction; ginkgo biloba extract; ginkgolic acids; removal

收稿日期: 2018-02-12

基金项目: 杭州市科技发展计划项目(20150432B31)

通信作者: 吴元锋(1976—), 男, 浙江省杭州人, 教授, 博士, 主要从事天然活性物的制备和功能研究。E-mail: wuyuanfeng@zust.edu.cn。

银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)主要含有银杏黄酮(如槲皮素、山奈酚、异鼠李素)、银杏内酯(A、B、C)等活性成分,具有清除自由基、抗氧化、抗炎症、抗细胞凋亡、调节血脂、防治动脉粥样硬化等作用,因此广泛用于防治心脑血管疾病^[1-3]。银杏叶提取物中还含有银杏酸,包括 C13 : 0(R=C₁₃H₂₇)、C15 : 0(R=C₁₅H₃₁)、C15 : 1(R=C₁₅H₂₉)、C17 : 1(R=C₁₇H₃₃)、C17 : 2(R=C₁₇H₃₁)等,这类化合物具有致敏性、胚胎毒性、细胞毒性、免疫毒性,因此银杏叶提取物必须脱除银杏酸^[4]。德国限定 GBE 中银杏酸含量应在 5 mg/kg 以下,中国药典也限定 GBE 中银杏酸含量应在 10 mg/kg 以下^[5-7]。

目前已有多种银杏酸脱除方法的报道。通过大孔吸附树脂纯化,能使银杏酸的含量控制在 5 ppm 以下^[8-9]。吴向阳^[10]等研究了超临界 CO₂ 脱除银杏酸工艺,脱除率为 79.1%。除此之外,还有发酵法^[11-12]、中药配伍减毒法^[13]等也可以降低银杏叶产品中的银杏酸含量。为了获得更好的脱除效果,本研究采用有机溶剂萃取法,在保留银杏黄酮和银杏内酯的情况下研究银杏酸脱除工艺。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪,配有 2424 蒸发光散射检测器和 2998 紫外检测器,Thermo Biofuge Primo R 高速冷冻离心机,RE-52 旋转蒸发器,SB-5200DT 数控超声波清洗机,XMTD-204 数显式电热恒温水锅。

1.1.2 材料与试剂

原料:5 种银杏叶样品于 2017 年 3 月购自山东、河南、河北、湖北及云南的中药房,分别命名为 YP1、YP2、YP3、YP4、YP5,用中草药粉碎机将银杏叶研磨成粉,干燥储存备用。

标准品:银杏酸标准品(C13 : 0、C17 : 1)、银杏内酯标准品(银杏内酯 A、B、C)、银杏黄酮标准品(山奈酚标、槲皮素标、异鼠李素标),均购自上海长哲生物科技有限公司。

主要试剂:磷酸、乙醇、磷酸氢二钠、三氟乙酸等为分析纯,甲醇和乙腈为色谱纯,均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 银杏叶提取物制备

银杏叶提取物按照文献^[14]方法制备:银杏叶用中草药粉碎机粉碎,称取 70 g 粉末于圆底烧瓶中,加入 500 mL 体积分数为 70% 的乙醇溶液,回流提取 2 h,抽滤,残渣再用 500 mL 体积分数为 70% 的乙醇溶液回流提取 2 h。合并提取液,静置 24 h,上清液旋转蒸发浓缩,浓缩液在 -20 °C 冰箱中保存。

1.2.2 最适 pH 条件

配制 5 份体积分数为 60% 的乙醇溶液,分别用盐酸溶液调节 pH 值至 2、3、4、5 和 6。分别量取 20 mL 正己烷、20 mL 不同 pH 值的乙醇溶液、2 mL 银杏提取浓缩液加入分液漏斗,振荡萃取,待静置分层后,将上下相分别蒸干,体积分数为 50% 的甲醇溶液定容至 10 mL,分别用高效液相色谱测定上下相中的银杏酸、银杏内酯和银杏黄酮含量。

1.2.3 最适乙醇体积分数

在最适 pH 条件下配制体积分数为 0%、20%、40%、60%、80% 的乙醇溶液,取 20 mL 正己烷、20 mL 不同体积分数的乙醇溶液、2 mL 银杏提取浓缩液加入分液漏斗,萃取、浓缩后定容,分别用高效液相色谱测定上下相中的银杏酸、银杏内酯和银杏黄酮含量。

1.2.4 最适有机相

在最适 pH 条件和乙醇体积分数下,以正己烷、二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯分别作为有机相。取 20 mL 不同有机相,20 mL 最适 pH 和体积分数的乙醇溶液、2 mL 银杏提取浓缩液加入分液漏斗,萃取、浓缩后定容,分别用高效液相色谱测定上下相中的银杏酸、银杏内酯和银杏黄酮含量。

1.2.5 分析方法

本研究用银杏酸、银杏内酯和银杏黄酮的分析均采用欧洲药典方法^[5]进行。

1.2.5.1 银杏酸分析方法 色谱柱:WelchromC8(4.6 mm×250 mm,5 μm)反向色谱柱色谱柱,检测器为 2998 紫外光检测器。流速为 1 mL/min,流动相 A 为体积分数 0.01% 三氟乙酸水溶液,流动相 B 为体

积分数 0.01% 三氟乙酸乙腈溶液。梯度条件: 0~30 min, 25% A 变化到 10% A, 维持 5 min, 1 min 内变化到 25% A, 维持 9 min。柱温 25 ℃, 上样量 50 μ L, 波长 210 nm。

1.2.5.2 银杏黄酮分析方法 色谱柱: WondaCract ODS-2(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 反向色谱柱检测器, 2998 紫外光检测器。流速 1 mL/min, 流动相 A 为 0.3 g/L 磷酸水溶液, 流动相 B 为甲醇。梯度条件: 0~1 min, 60% A; 1~20 min, A 从 60% 变化到 45%; 20~21 min, A 从 45% 变化到 0%, 维持 4 min。柱温 25 ℃, 上样量 10 μ L, 波长 370 nm。

1.2.5.3 银杏内酯分析方法 色谱柱: WondaCract ODS-2(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 反向色谱柱, 2424 蒸发光散射检测器, 流速 1 mL/min, 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为水, 柱温 25 ℃, 上样量 10 μ L, 增益 500, 气体压力 40 psi(2.76 \times 10⁵ Pa), 动力级别 10, 漂移管温度 70 ℃。梯度条件见表 1。

1.2.5.4 分配比计算 上相和下相分别定容到 10 mL 后, 用液相法测定上相和下相中银杏内脂、银杏黄酮和银杏酸的质量浓度(mg/mL)。银杏内酯为银杏内酯 A、B 和 C 含量的总和; 银杏黄酮为槲皮素、山奈酚和异鼠李素含量的总和; 银杏酸为银杏酸 A 和银杏酸 B 含量的总和。两相的分配比按照下列公式计算:

分配比 = 水相中各活性成分质量浓度(mg/mL)/有机相中各活性成分质量浓度(mg/mL)。

2 结果与讨论

2.1 银杏内酯、银杏黄酮和银杏酸标准曲线

根据 1.2.5 分析方法, 配制系列浓度的银杏内酯、银杏黄酮和银杏酸标准液, HPLC 测定标准曲线, 结果见表 2。

表 2 银杏内酯、银杏黄酮和银杏酸标准曲线

Table 2 Standard curves of ginkgolides, ginkgo flavones and ginkgolic acids

标准品	标准曲线	R^2
银杏内酯 A	$y=166\ 796x-30.179$	0.999 2
银杏内酯 B	$y=33\ 300x+28.091$	0.997 8
银杏内酯 C	$y=54\ 133x+102.5$	0.991 8
槲皮素	$y=39\ 803x+129.27$	0.999 5
山奈酚	$y=22\ 374x+842.91$	0.991 4
异鼠李素	$y=41\ 429x+112.53$	0.999 5
银杏酸 C13 : 0	$y=58\ 861\ 616x$	1.000 0
银杏酸 C17 : 1	$y=12\ 174\ 000x+24\ 282$	0.997 5

2.2 不同产地银杏叶中活性物含量对比

通过 HPLC 法测定了不同产地银杏酸含量, 结果如图 1 所示, 表明银杏叶中总银杏酸含量具有一定的区域性, 该结果与文献[15]报道一致。为了研究脱酸效果, 本研究采用银杏酸含量最高的产自云南的银杏叶 YP5 为原料开展研究。经过溶剂萃取、干燥后得到银杏叶提取物, 银杏酸含量为 1.78 mg/g, 其含量远超中国药典要求。

2.3 水相 pH 值对分配比的影响

正己烷为有机相, 60% 乙醇为水相, 水相 pH 值分别为 2、3、4、5 和 6 时, 银杏叶提取物中各物质的上下相分配比如图 2 所示。

从图 2 中可知, 水相 pH 值对银杏叶提取物中各成分的分配比有较大的影响。银杏黄酮几乎不溶于正己烷, 全部分配于下相。银杏内酯也主要分配于下相, pH 值越低, 在下相分配越多。而银杏酸却刚好

表 1 银杏内酯液相分析洗脱梯度

Table 1 Elution gradient of ginkgolides analyzed by HPLC

时间/min	A/%	B/%
0~4	5~14	95~86
4~5.5	14~14	86~86
5.5~8	14~20	86~80
8~10	20~20	80~80
10~15	20~80	80~20
15~20	80~50	20~50
20~23	50~5	50~95
23~25	5~5	95~95

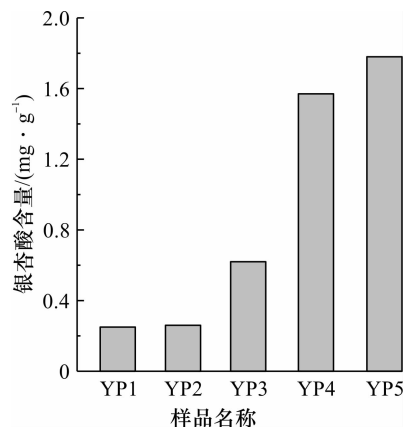


图 1 5 种银杏叶样品银杏酸含量

Fig. 1 Ginkgolic acid contents in 5 species of ginkgo sample leaves

相反。当 pH 值为 6 时,大部分银杏酸也分配在下相,当 pH 值为 2 时,分配比最少,表明在此 pH 值下,银杏酸更多地分配在上相。由此可知,pH 值为 2 时,银杏酸的脱除效果最好。

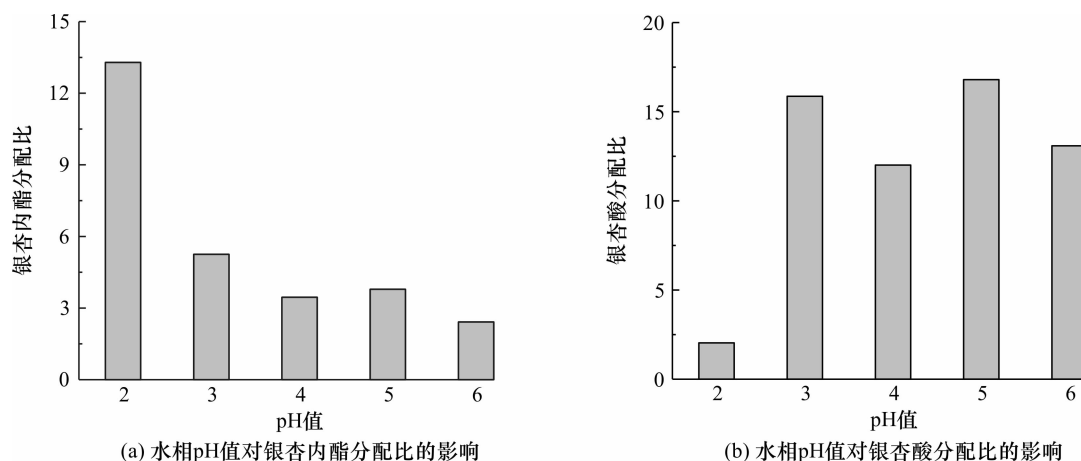


图2 水相 pH 值对银杏内酯和银杏酸分配比的影响

Fig. 2 Effects of pH value of aqueous phase on partition ratios of ginkgolide and ginkgolic acid

2.4 水相乙醇体积分数对分配比的影响

正己烷为有机相,水相 pH 值为 2,乙醇体积分数为 0%、20%、40%、60%和 80%时,银杏叶提取物中各物质的上下相分配比如图 3 所示。

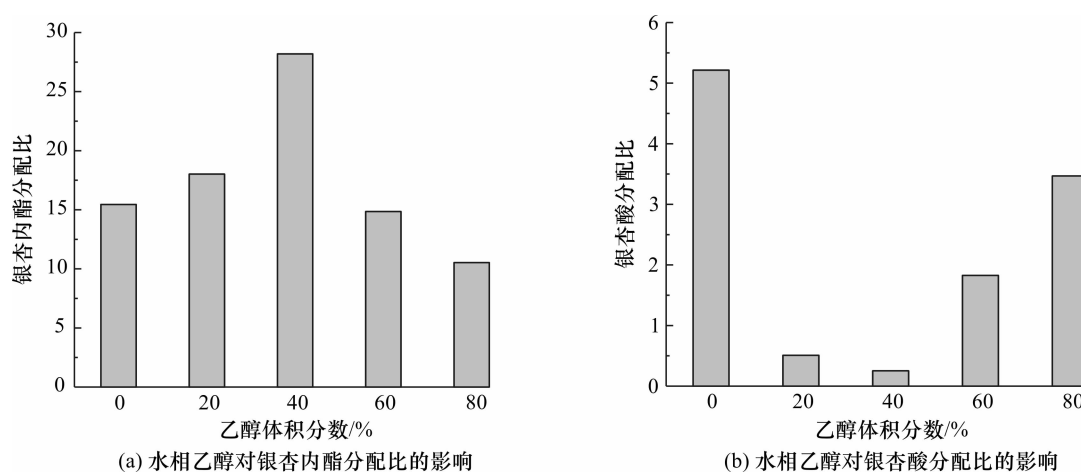


图3 水相乙醇体积分数对银杏内酯和银杏酸分配比的影响

Fig. 3 Effects of ethanol volume fraction of aqueous phase on partition ratios of ginkgolide and ginkgolic acid

在不同乙醇体积分数下,银杏黄酮全部分配在下相。由图 3 可知,乙醇体积分数对银杏内酯的分配也有一定的影响,乙醇体积分数越高,分配比越低,表明在乙醇含量较低时银杏内酯在下相的分配比越高。乙醇体积分数对银杏酸的影响较为复杂,在纯水、乙醇体积分数为 60%和 80%时,分配比较高,而在乙醇体积分数为 40%时,分配比最低,表明在该乙醇浓度下最适合脱除银杏酸。

2.5 有机相对分配比的影响

水相 pH 值为 2,乙醇体积分数为 40%时,分别以正己烷、二氯甲烷、三氯甲烷和乙酸乙酯为有机相,银杏叶提取物中各物质的上下相分配比如图 4 所示。

从图 4 可知,以正己烷为有机相时,银杏黄酮、银杏内酯都集中在水相,银杏酸则分配在有机相,表明正己烷为有机相时,脱除效果更好。然而用其他有机溶剂为有机相时,银杏黄酮在两相均有分布。二氯甲烷或三氯甲烷为有机相时,银杏内酯分配比较高,表明银杏内酯也基本分配在水相。从脱酸效果来看,正己烷和二氯甲烷的脱酸效果较好,但是二氯甲烷脱酸时银杏黄酮也有损耗,综上所述,正己烷为最适脱酸溶剂。

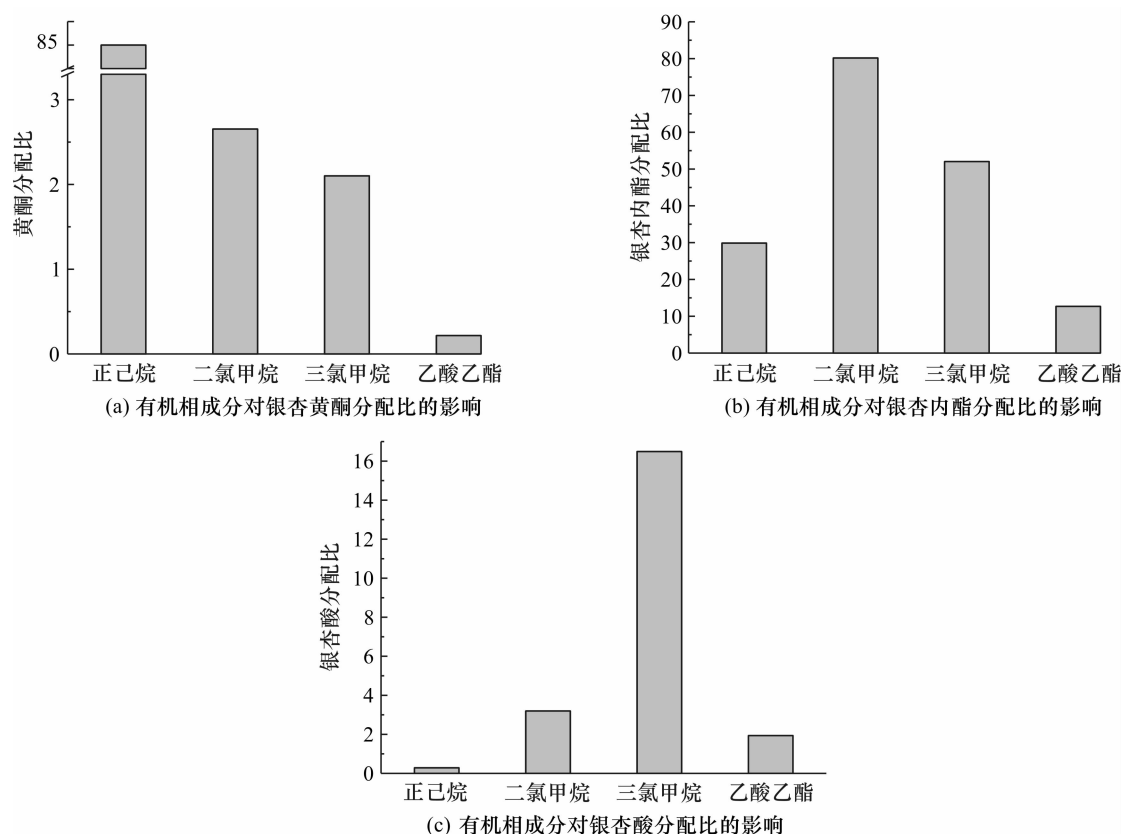


图 4 有机相成分对银杏黄酮、银杏内酯和银杏酸分配比的影响

Fig. 4 Effects of organic phase composition on partition ratios of ginkgo flavone, ginkgolide and ginkgolic acid

3 结 论

本文研究了脱除银杏酸的最佳萃取体系,结果表明:当下相为 pH 值 2.0、体积分数 40% 乙醇,上相为正己烷时,脱酸效果最好。若结合树脂吸附等脱酸技术,则有望进一步降低提取物中银杏酸含量。

参考文献:

- [1] 李淑琴,朱嘉宝,武宇洲. 银杏叶提取物防治心脑血管疾病的研究进展[J]. 中国新药杂志,2016,25(1):76.
- [2] 刘丽娜,何轶,李耀磊,等. 银杏叶提取物及其制剂补充检验方法的建立[J]. 药物分析杂志,2016,36(5):856.
- [3] 杨扬,周斌,赵文杰. 银杏叶史话:中药/植物药研究开发的典范[J]. 中草药,2016,47(15):2579.
- [4] 孙健,李丽敏,胡青,等. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱法测定银杏叶提取物及其制剂中银杏酸[J]. 色谱,2016,34(2):184.
- [5] 姚建标,方玲,王如伟,等. 中国药典和欧洲药典银杏叶提取物中银杏酸限度检测方法比较研究[J]. 药物分析杂志,2012,32(11):2055.
- [6] 王莽薇,谢媛媛,王义明,等. 银杏叶中银杏酚酸类成分含量测定方法研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(2):167.
- [7] 刘秀萍,臧恒昌,于洪利. 银杏叶提取物的研究进展与应用前景[J]. 药学研究,2014,33(12):721.
- [8] 朱斌,刘芬,严兆华. 银杏叶提取物中脱除银杏酚酸的工艺研究[J]. 北方药学,2014,11(4):62.
- [9] 安晓东,王沙沙,杨丽微,等. 大孔树脂脱除银杏叶提取物中银杏酸工艺的研究[J]. 中国食品添加剂,2017(10):102.
- [10] 吴向阳,仰榴青,陈钧,等. 超临界 CO₂ 脱除银杏叶中银杏酸的研究[J]. 食品科学,2003,24(10):85.
- [11] GELLERMAN J L, SCHLENK H. Methods for isolation and determination of anacardic acids[J]. Analytical Chemistry, 1968,40(4):918.

(下转第 385 页)