

基于工业大生产探索银杏叶提取物的制备工艺

徐新华¹ 王峰¹ 殷智² 李泳锋³

1. 湖北恩施学院 湖北 恩施 445000

2. 湖北民族大学 湖北 恩施 445000

3. 湖北传创中药材科技有限公司 湖北 恩施 445000

摘要:目的:旨在针对工业化生产的特点,探索银杏叶有效成分提取工艺的最佳参数,优化提取过程,降低成本,以提高银杏叶提取物有效成分的转移率及含量。方法:采用单因素试验、正交试验对银杏叶提取物生产工艺进行改进和验证,并按照2020版中国药典方法检验。结果:银杏叶提取物工业化大生产最佳提取工艺为银杏叶粗粉加14倍80%乙醇回流提取8h,提取液过滤后用LX-158型大孔树脂吸附并解析,脱酸,干燥即得。其有效成分的综合转移率70.4%,总黄酮含量30.60%;萜类内酯含量9.67%。结论:该银杏叶提取物制备工艺所得有效成分转移率较高,有效成分含量远高于药典标准,可直接用于后期工业化制备。

关键词:银杏叶提取物;提取工艺;有效成分;转移率;含量

Study on the preparation technology of Ginkgo biloba extract based on industrial production

Xinhua Xu¹ Feng Wang¹ Zhi Yin² Yongfeng Li³

1.Hubei Enshi College, Hubei Enshi 445000

2.Ubei Minzu University, Hubei Enshi 445000

(3.Hubei chuanchuang traditional Chinese Medicine Technology Co., Ltd. Hubei Enshi 445000)

Abstract: Objective: The purpose is to explore the optimal parameters of the extraction process of the active components of Ginkgo biloba leaves, reduce costs, and improve the transfer rate and content of the active components of Ginkgo biloba extracts according to the characteristics of industrial production. Methods: The single factor test and orthogonal test were used to improve and verify the production process of Ginkgo biloba extract, and it was tested according to the 2020 version of the Chinese Pharmacopoeia. Results: The optimal extraction process of Ginkgo biloba extract was adding 14 times the amount of 80% ethanol to reflux extraction for 8 hours, and the extract was filtered with LX-158 macroporous Resin adsorption and analysis, deacidification, and drying. The comprehensive transfer rate of active ingredients was 70.4%, of which the content of total flavonol glycosides was 30.6%; The content of terpenoid lactones was 9.67%. Conclusion: The transfer rate of effective components obtained by the preparation process of Ginkgo biloba extract is high, and the content of effective components is much higher than the standard of pharmacopoeia, which can be directly used for later industrial preparation.

Key words: Ginkgo biloba extract; Extraction process; Active ingredients; Transfer rate; Content

银杏是我国二级保护植物,属裸子植物门银杏科落叶乔木,有着活化石的美称^[1]。银杏叶提取物为在秋季银杏叶片尚绿时采收,干燥后经一系列加工后制成的提取物,目前已经成为全球最畅销的植物提取物之一^[2]。其有效成分“总黄酮醇苷”和“萜类内酯”具有极高的药用价值,是制定银杏叶提取物和制剂质量标准的重要依据,现今通用的含量标准分别为不低于24%和6%^[3]。银杏叶提取物有抗脑缺血、抗血小板活化因子、降血脂、抗氧化、改善心脑血管循环、预防治疗老年痴呆等药理作用^[4]。经调查发现市场上银杏叶总黄酮醇苷和萜类内酯的含量普遍偏低,故进一步优化银杏叶提取工艺,摸索出适合工业化大生产的提取工艺并规范化、标准化至关重要。

1 仪器与材料

1.1 材料

银杏叶购自恩施,经笔者殷智鉴定为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶,完全符合2020版中国药典要求。槲皮素对照品、银杏叶总内酯对照提取物,购自中国食品药品检定研究院; CD-7K 大孔树脂吸附柱(沧州远成化工); LX-158、AH-8 大孔树脂吸附柱(西安蓝晓科技); LK-02B 大孔树脂脱酸柱(艾美科健(中国)生物医药有限公司); 色谱级正丙醇(017331)、甲醇(019318)购自 MREDA; 其它试剂均为分析纯,纯化水自制。

1.2 实验仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津); InertSustain C18 色谱柱(4.6*250mm, 岛津仪器(苏州)有限公司); XB-C18 色谱柱(4.6*250mm, 月旭科技(上海)股份有限公司); 101-3AB 电热鼓风干燥箱; ME204E 万分之一天平及 XSR105DU/A 十万分之一天平(梅特勒一

表1 不同大孔树脂筛选后有效成分含量及转移率

编号	树脂	总黄酮醇苷含量(%)	萜类内酯含量(%)	总黄酮醇苷转移率(%)	萜类内酯转移率(%)	综合转移率(%)
1	LX-158	30.20	8.6	81.1	45.3	63.2
2	CD-7K	29.80	7.5	77.3	38.2	57.8
3	AH-8	29.30	7.3	71.2	34.8	53.0

托利多仪器(上海)有限公司); MZG-48 脉冲真空干燥箱, WF-30B 粉碎机, EYH-3000L 二维运动混合机, ZS-600 振动筛(南京凯欧机械制造有限公司); SZ-Φ800-00 树脂柱, CG-1000-00 脱酸工序缓冲罐 CG-1000-001000L 解析液缓冲罐, 2000L 双效浓缩器(浙江温兄机械阀业有限公司); UPR-II-10J 优普系列超纯水机(四川优普超纯科技有限公司); YDL-1 层叠式精密过滤器; 2000L 球形浓缩罐等。

2 方法与结果

2.1 总黄酮醇苷和萜类内酯的含量测定

总黄酮醇苷和萜类内酯均依据 2020 年版《中华人民共和国药典》(一部)银杏叶提取物项下方法测定^[5], 计算转移率。

2.2 总黄酮醇苷和萜类内酯的计算

2.2.1 总黄酮醇苷的含量计算

按药典法测定样品后, 记录异鼠李素、槲皮素、山柰酚的峰面积, 并按外标法计算银杏叶提取物中三者的含量(%), 再换算成总黄酮醇苷的含量。

总黄酮醇苷含量 = (鼠李素含量 + 槲皮素含量 + 山柰酚含量) × 2.51

2.2.2 萜类内酯的含量计算

萜类内酯的计算: 按药典法进样对照品和样品测定后, 记录峰面积, 绘制标准曲线, 计算线性方程, 并按外标两点法对数方程分别计算银杏叶提取物中银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的含量(%).

萜类内酯含量 = (银杏内酯 C 含量 + 白果内酯含量 + 银杏内酯 A 含量 + 银杏内酯 B 含量) 供试品溶液两次测定的含量平均值。

2.3 综合转移率评价

本试验为了衡量总黄酮醇苷和萜类内酯的贡献, 引入了综合转移率, 借鉴姚建标^[6]等的研究, 综合转移率(%) = 总黄酮醇苷 × 50% + 萜类内酯转移率 × 50%

2.4 银杏叶提取物的制备工艺研究

结合实际工业化大生产, 一般提取 3 次, 若想进一步提高银杏叶的利用率, 还可将最后一次提取液套入下一轮新叶的浸提。

银杏叶乙醇回流提取物的制备: 银杏叶去杂质, 经粉碎混合制备成粗粉后随机取样 400 g 进行试验。称取 400 g 银杏叶粗粉, 将其置于 5000 mL 的圆底烧瓶中, 加入乙醇加热回流提取, 合并提取液, 过滤, 解析, 80% 乙醇作为洗脱剂, 脱酸, 回收乙醇, 干燥, 即得银杏叶提取物干燥品。采用 HPLC 法测定提取物中总黄酮

醇苷和萜类内酯的含量, 计算两者的转移率和综合转移率。计算公式如下:

$$\text{总黄酮醇苷转移率} = \frac{\text{银杏叶提取物中总黄酮醇苷的含量}}{\text{银杏叶总黄酮醇苷的含量}} \times 100\%$$

$$\text{萜类内酯转移率} = \frac{\text{银杏叶提取物中萜类内酯的含量}}{\text{银杏叶萜类内酯的含量}} \times 100\%$$

2.4.1 银杏叶提取物树脂类型的选择

取三份银杏叶粗粉, 每份 400 g, 采用 60% 乙醇, 第一次加 5 倍量乙醇提取, 第二次加 4 倍量提取, 第三次加 4 倍量提取, 合并提取液, 经浓缩、水沉、吸附(采用不同树脂型号)、洗脱、再浓缩、干燥, 将得到的银杏叶提取物用 HPLC 法测定有效成分含量, 平行操作 3 次, 其检测结果作为大孔树脂的筛选试验。

本试验涉及的大孔树脂有 CD-7K、LX-158、AH-8, 结果见表 1, 其中 LX-158 型大孔树脂得到的有效成分含量和转移率最高, 故选。

2.4.2 不同提取溶剂乙醇浓度的选择

称取 400 g 银杏叶粗粉, 分别加入浓度为 20%、40%、60%、80% 的乙醇溶液加热回流提取 3 次, 第一次加 5 倍量乙醇提取, 第二次加 4 倍量提取, 第三次加 4 倍量提取。制备提取物干燥品的操作、含量测定方法和转移率计算方法同 2.4 项下, 考察银杏叶提取物中有效成分转移率的影响因子乙醇浓度。结果表明, 总黄酮醇苷和萜类内酯的转移率和综合转移率皆随乙醇浓度的升高而升高, 到达一定程度后趋于稳定。对于总黄酮醇苷, 当乙醇浓度升至 60% 之后, 其转移率升至 81.5%, 并且转移率趋于稳定, 当乙醇浓度升至 80%, 转移率为 82.0%。而萜类内酯也是在乙醇浓度为 60% 时转移率逐渐趋于平稳, 结果见图 1。因此将选择乙醇浓度为 60%, 70%, 80% 进行正交试验。

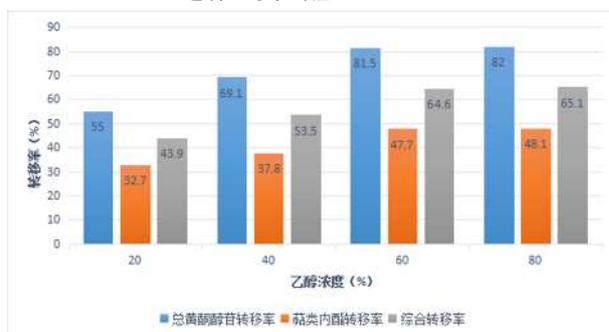


图1 乙醇浓度对总黄酮醇苷和萜类内酯转移率的影响

2.4.3 不同溶剂用量的选择

取银杏叶粗粉 400 g, 分别加溶剂总倍数分别为 10 倍、12 倍、14 倍的 60% 乙醇水溶液分别进行回流提取合计 7 h。制备提取物干燥品的操作、含量测定方法和转移率计算方法同 2.4 项下, 考察不同溶剂用量乙醇对提取物有效成分转移率的影响。结果显示, 当溶剂用量从 12 倍增大到 14 倍时, 总黄酮醇苷的转移率从 57.6% 增大到 68.1%。而在同等的用量范围内萜类内酯的转移率从 32.7% 提升至 45.9%, 显而易见, 在提取乙醇用量在 12 倍之后两者转移率变化不大, 结果见图 2。

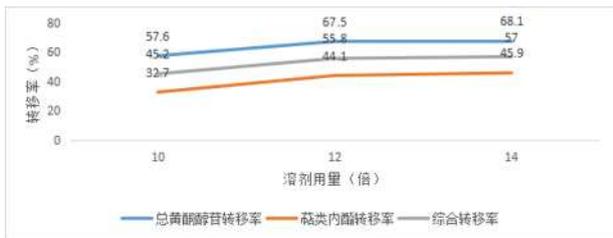


图 2 不同溶剂用量倍数

对总黄酮醇苷和萜类内酯转移率的影响

2.4.4 不同提取时间的选择

取银杏叶粗粉 400 g, 分别加 12 倍量的 60% 乙醇溶液回流提取时间为 4 h、6 h、8 h, 平行操作三次, 操作同 2.4.3 项下, 考察提取时间对转移率的影响。结果显示, 当提取时间从 6 h 增加到 8 h 的时候, 总黄酮醇苷转移率从 59.1% 到 70.6%, 萜类内酯的转移率从 37.9% 升至 41.1%, 由图 3 可看出, 在提取时间为 6h 时, 两者的转移率趋于稳定。故选择提取时间为 6 h、7 h、8 h 进行正交试验。

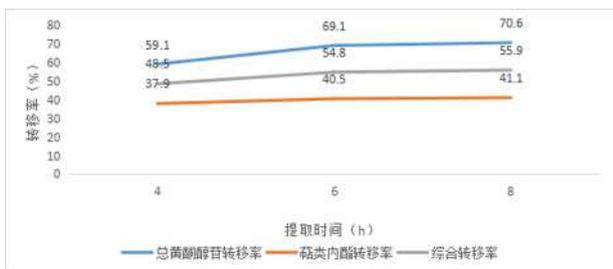


图 3 不同提取时间

对总黄酮醇苷和萜类内酯转移率的影响

2.4.5 正交试验设计及结果分析

本试验在单因素结果的基础上, 对银杏叶的提取工艺进一步优化, 具体提取操作同 2.4。设计正交试验选用 L9(34) 正交表安排试验, 因素水平 A 乙醇浓度 (%): 60、70、80, B 乙醇体积 (倍): 12、13、14, C 提取时间 (h): 6、7、8。

总黄酮醇苷与综合转移率正交试验结果见表 2。利用方差分析相关提取条件对于总黄酮醇苷转移率的影响关系, 于总黄酮醇苷转移率而言, 各因素的影响大小顺序为 A > C > B (方差分析 F 值分别为: A 组 136.404, B 组 13.766, C 组 24.401), 其中 A 因素呈

现出显著影响, C 因素次之 (方差分析 P < 0.05)。

表 2 总黄酮醇苷正交实验设计表及结果

试验号	A 组	B 组	C 组	D 组 (空白)	总黄酮醇苷转移率 (%)	综合转移率 (%)
1	1	1	1	1	69.6	51.4
2	1	2	2	2	73.2	54.7
3	1	3	3	3	79	60.8
4	2	1	2	3	77.5	57.3
5	2	2	3	1	82.5	62
6	2	3	1	2	80.7	62.6
7	3	1	3	2	87.4	68.6
8	3	2	1	3	84.3	65.6
9	3	3	2	1	86.3	69.1
K1	73.93	78.17	78.2	79.47		
总黄酮醇苷转移率	K2	80.23	80	79	80.43	
	K3	86	82	82.97	80.27	
	R	12.07	3.83	4.77	0.97	
综合转移率	K1	55.63	59.1	59.87	60.83	
	K2	60.63	60.77	60.37	61.97	
	K3	67.77	64.17	63.8	61.23	
	R	12.13	5.07	3.93	1.13	

对于综合转移率, 影响顺序为 A > B > C (方差分析 F 值分别为: A 组 112.552, B 组 20.184, C 组 13.878), 可看出 A 的显著性最强, B 因素次之 (方差分析 P < 0.05)。

总的来说, 乙醇浓度、乙醇体积及提取时间三个因素都对银杏叶提取物转移率有一定的影响。又由极差分析可知, 最佳提取工艺条件为 A3B3C3, 即加入 14 倍量的 80% 乙醇加热回流提取 8 h, 操作时回流提取分 3 次进行, 第 1 次提取, 5 倍量加热回流提取 4 h; 后 2 次分别 5、4 倍量加热回流提取 2 h, 在此工艺下经树脂纯化后总黄酮醇苷转移率为 87.7%, 萜类内酯转移率为 52.6%, 综合转移率为 70.2%。

2.4.6 小试验验证试验

按照正交试验得到的最佳工艺参数, 另取 3 份银杏叶粗粉 800 g, 平行操作三次, 计算转移率。结果显示总黄酮醇苷转移率 88.4 ± 0.93、萜类内酯转移率 51.7 ± 0.20、综合转移率 70.1 ± 1.11, 与正交优选出的最佳工艺 A3B3C3 相近, 说明正交优选出的工艺合理且比较稳定。

2.4.7 同法多批次批量生产验证试验

同上述第 2.4.6 项下方法, 另分别取三批样品, 进行 HPLC 测定, 记录峰面积值, 计算总黄酮醇苷和萜

类内酯的含量、转移率。经计算三批样品中总黄酮醇含量分别为 30.50%、31.30%、30.00%；萜类内酯含量分别为 10.30%、9.10%、9.60%；综合转移率为 69.2%、70.6%、70.8%，结果与最佳工艺相近，进一步证明最佳工艺合理可行，可应用于工业化批量生产。

3 讨论

本试验摸索适合工业化生产银杏叶提取物的制备工艺，经过一系列试验，确定了银杏叶提取物的最佳提取工艺为：取药材粗粉，采用 80% 乙醇回流提取 3 次，后同 2.4.6 项下实验提取工艺最优结果。小试实验结果表明，第三份的银杏叶提取物中总黄酮醇苷和萜类内酯的转移率和综合转移率最高，总黄酮醇苷含量相对最低，是因为解析液前段主要为极性大的水溶性杂质成分，在解析时提前开始收集解析液，但银杏叶提取物收得率有所提高。第二份的银杏叶提取物的含量最高，但产量最低，属于在解析时晚开始收集解析液。固应该选择适当的时间进行回收，以保证其产量和含量提高的同时，降低杂质和减少水洗液量。中试结果与小试结果类似，故未进行单独描述。生产验证结果转移率与小试结果相近，且有效成分和产量都比较高，说明该工艺可用于工业化生产。

本试验是基于工业化大生产为提高银杏叶提取物

有效成分转移率和含量而进行的工艺研究试验。药典在银杏叶提取物标准中规定提取溶剂为稀乙醇，从工业化实际来看，若用稀乙醇提取的话，一些高极性成分溶出增加，不仅增加了后期纯化的难度，这也是市场上银杏叶提取物含量偏低的原因，由此也带来了提取物制备工艺的五花八门。但是，将银杏叶提取物提取的溶剂换成高浓度乙醇，又为工业化生产中预防乙醇泄漏安全操作方面增加了难度，同时增加了成本，但含量的升高和转化率的提高又将为企业带来经济利益，下一步将在银杏叶提取物品质、提取成本和最终经济效应作出一个最有利的平衡。

我国银杏资源占世界银杏资源的 70% 以上，是世界上最大的银杏生产国和出口国，但在银杏叶的研究开发利用上落后于一些发达国家，较长时间停留在原料叶的出口水平上，近些年才开始了叶中间体和终端产品的研究，但收率低，产品质量也不高，造成国有资源的浪费。通过市场和厂家调研，临床上使用以银杏叶提取物为原料的制剂产品要求其原料的总黄酮类化合物含量大于 29%，而国标要求的 24% 远远不能满足市场的需求，因此本研究对于银杏叶黄酮类和内酯类成分的分离纯化提供了很好的思路，可更好地开发利用银杏叶。

参考文献：

- [1] 任佳伟, 宋玉. 银杏叶有效成分抗血小板聚集和清除 DPPH 自由基的量效关系和协同作用 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(11): 2367-2372.
- [2] 魏攀凤, 程晶. 银杏叶有效成分的提取及对糖尿病大鼠体重的影响 [J]. 化工设计通讯, 2020, 46(09): 160-161.
- [3] 宋唯唯, 刘芬芬, 刘彩虹. 高效液相色谱法测定银杏叶提取物中总黄酮醇苷含量 [J]. 泰山医学院学

报, 2016, 37(01): 33-35.

- [4] 王兆华, 纪义波, 张大军. 不同提取溶剂对银杏叶药材中多种成分含量的影响 [J]. 山东化工, 2016, 45(02): 22-24+27.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1088.

- [6] 姚建标, 王建方, 吴旭明, 等. 银杏叶提取工艺正交试验研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(08): 78-80.

项目基金：恩施州科技计划项目（JCY2021000034）；湖北省教育厅科研项目（B2016493）；风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室第二期开放基金项目（01R15007）

作者简介：徐新华（1986 年 - ），女，土家族，硕士，讲师，研究方向：中药有效成分的提取与药理研究。