

银杏叶提取物的树脂柱色谱脱酸工艺研究

毕艳艳^{1,2}, 刘健^{1,2}, 聂宗恒^{1,2}, 王立友^{1,2}, 周娜³, 郭田甜^{1,2}, 蒋金星¹, 郝大伟^{1,2*}

1. 鲁南厚普制药有限公司, 山东 临沂 276006

2. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276006

3. 临沂大学, 山东 临沂 276005

摘要: **目的** 优化树脂柱色谱法脱除银杏叶提取物中总银杏酸的最佳工艺。**方法** 通过单因素和响应面法实验, 以体积流量、洗脱剂乙醇体积分数、洗脱液接收体积为考察因素, 以银杏叶提取物中总银杏酸去除率、总黄酮转移率和提取物收率的综合评分为指标, 优化树脂柱色谱法脱除总银杏酸最佳工艺。**结果** 最佳工艺参数为体积流量 1.2 BV/h, 洗脱剂乙醇体积分数 70%, 洗脱液接收体积 3 BV。**结论** 本工艺稳定、可行、重复性好, 可作为银杏叶提取物树脂柱色谱脱酸工艺。

关键词: 银杏叶提取物; 总银杏酸去除率; 总黄酮转移率; 提取物收率; 柱色谱法; 脱酸工艺; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2023)08-1929-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.08.016

Deacidification process of *Ginkgo biloba* extract by resin column chromatography

BI Yan-yan^{1,2}, LIU Jian^{1,2}, NIE Zong-heng^{1,2}, WANG Li-you^{1,2}, ZHOU Na³, GUO Tian-tian^{1,2}, JIANG Jin-xing¹, HAO Da-wei^{1,2}

1. Lunan Hope Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 276006, China

2. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Linyi 276006, China

3. Linyi University, Linyi 276006, China

Abstract: **Objective** To optimize process for removing total ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* extract by resin column chromatography. **Methods** Single factor and response surface method experiment was used, the flow rate, ethanol concentration of eluent, and collection volume of eluent was as factors, and the removal rate of total ginkgolic acids, transfer rate of total flavonoids, and yield of *Ginkgo biloba* extract were comprehensively evaluated. The process of removing total ginkgolic acids by resin column chromatography was optimized. **Results** The optimal process parameters were the flow rate of 1.2 BV/h, the ethanol concentration of eluent of 70%, and the eluent collection volume of 3 BV. **Conclusion** The process is stable, feasible, and has good repeatability, and can be used as resin column chromatography deacidification process for *Ginkgo biloba* extract.

Key words: *Ginkgo biloba* extract; removal rate of total ginkgolic acids; transfer rate of total flavonoids; yield; column chromatography; deacidification process; response surface method

银杏叶提取物中成分复杂, 含总黄酮醇苷类、萜类内酯、总银杏酸和多糖等^[1], 具有舒张血管、降低血糖血脂、防止血栓形成、抗氧化等作用^[2-3]。但总银杏酸含量过高会引起人体不良反应, 有致敏性、致突变、神经毒性、细胞毒性等不良反应^[4-5]。因此, 银杏叶提取物的安全性已引起人们的高度重视。《中国药典》2020年版一部中银杏叶提取物质量标准规定总银杏酸必须小于 5 mg/kg^[6], 但按照药

典规定采用稀乙醇进行提取, 易引起总银杏酸过量。因此需要对银杏叶提取物进行脱酸处理。常用脱酸的方法有微波辅助提取法^[7]、超声-溶剂萃取法^[8]、配位法^[9]、大孔树脂吸附法^[10]和超临界二氧化碳脱除法^[11], 其中大孔树脂吸附脱酸具有易放大生产、生产成本低、对环境污染小、安全等优点, 应用更为广泛。本研究采用单因素、响应面法对银杏叶提取物中总银杏酸进行大孔树脂吸附脱酸工

收稿日期: 2023-05-04

基金项目: 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2021CXGC010508)

作者简介: 毕艳艳(1982—), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为中药新药研究与工艺优化。E-mail: 280377223@qq.com

*通信作者: 郝大伟(1982—), 男, 工程师, 本科, 研究方向为中药新药研究与工艺优化。E-mail: 28199827@qq.com

艺优化,为银杏叶提取物综合开发利用提供依据。

1 仪器与材料

e2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); R-300 型旋转蒸发器 (瑞士 Buchi 公司); Alpha 2-4 LSCbasic 型冷冻干燥机 (德国 Christ 公司); XS204 型电子分析天平 (Mettler Toledo); 100 mL 恒流反应器泵+DAC50 动态轴向压缩柱 (上海赛梵科分离技术有限公司)。

银杏叶产地为山东临沂郯城,批号 200301,经鲁南厚普制药有限公司范建伟高级工程师鉴定为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶。总银杏酸 (其中总银杏酸 A 批号 111594-201605,总银杏酸 B 批号 111690-201905)、白果新酸 (批号 111594-201605; 质量分数 99.70%)、槲皮素 (批号 100081-201610; 质量分数 99.10%) 对照品均购自于中国食品药品检定研究院。LXD-200、D101 大孔树脂 (西安蓝晓科技新材料股份有限公司); LK-02 大孔树脂 (山东鲁抗立科药业有限公司); HPD5000 大孔树脂 (北京瑞达恒辉科技发展有限公司); 乙醇 (费县大成酒业有限公司); 高效液相色谱仪用试剂均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 银杏叶粗提物的制备

称取银杏叶药材,加入适量稀乙醇提取回流,浓缩回流液,加水冷沉,取上清液,经预处理 LX-158 大孔树脂吸附,70%乙醇洗脱,收集适量洗脱液,干燥,得银杏叶粗提物。其中总黄酮的质量分数为 33.45%,总银杏酸的质量分数为 0.1948%。

2.2 脱酸工艺

银杏叶粗提物用 70%乙醇溶解,以适当体积流量通过预处理大孔树脂柱 (柱体积 1 500 mL 为 1 BV,径高比 1:15) 进行上样吸附,吸附完全后用适当体积分数乙醇溶液以适当体积流量洗脱,收集适量体积洗脱液,浓缩,冻干,即得银杏叶提取物。

2.3 总银杏酸去除率、总黄酮转移率和提取物收率的测定

2.3.1 总银杏酸测定 参考《中国药典》2020 年版一部银杏叶提取物中总银杏酸的 HPLC 法测定^[6]。

色谱条件: Sepax-HP-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1%三氟乙酸的乙腈-0.1%三氟乙酸的水,梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 310 nm; 进样量 50 μL。理论塔板数按照白果新酸峰计算大于 4 000。

按照《中国药典》2020 年版一部规定配制供试品溶液、白果新酸和总银杏酸对照品溶液。精密吸取供试品溶液、白果新酸和总银杏酸对照品溶液各 50 μL 注入高效液相色谱仪,计算供试品溶液与总银杏酸对照品相应色谱峰的总峰面积,以白果新酸对照品外标法计算总银杏酸,即得。

2.3.2 总黄酮测定 参考《中国药典》2020 年版一部银杏叶提取物中总黄酮醇苷的 HPLC 法测定^[6]。

色谱条件: Agilent 20RBAX EXtend-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.4%磷酸 (50:50); 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 45 ℃; 检测波长 360 nm; 进样量 10 μL。理论塔板数按照槲皮素峰计算大于 5 000。

按照《中国药典》2020 年版一部配制供试品溶液、槲皮素对照品溶液。精密吸取供试品溶液和槲皮素对照品溶液各 10 μL 进样测定。以槲皮素对照品峰面积作为对照,按照《中国药典》2020 年版一部中校正因子计算槲皮素、异鼠李素和山柰酚的质量分数,按照总黄酮= (槲皮素质量分数+异鼠李素质量分数+山柰酚质量分数)×2.51 计算总黄酮。

2.3.3 总银杏酸去除率、总黄酮转移率和提取物收率的计算 按照以下公式计算 3 个指标。

$$R_1 = (C_a \times M_a - C_b \times M_b) / (C_a \times M_a)$$

$$R_2 = (C_d \times M_b) / (C_e \times M_a)$$

$$R_3 = M_b / M_a$$

R_1 为总银杏酸去除率, R_2 为总黄酮转移率, R_3 为提取物收率, C_a 为银杏叶粗提物中总银杏酸质量分数, M_a 为银杏叶粗提物质量, C_b 为银杏叶提取物中总银杏酸质量分数, M_b 为银杏叶提取物质量, C_d 为银杏叶提取物中总黄酮质量分数, C_e 为银杏叶粗提物中总黄酮质量分数

2.4 脱酸大孔树脂的筛选

参考文献报道^[12-13],选取经过预处理 HDP5000、LK-02、LXD-200、D101 大孔树脂进行静态吸附和解吸实验。考虑在实际生产中,在脱除总银杏酸的同时应尽可能降低有效成分银杏总黄酮的损失,本研究从 4 种大孔树脂对总银杏酸、总黄酮吸附率以及 95%乙醇对总银杏酸解吸率综合考察筛选脱酸大孔树脂的类型。

2.4.1 静态吸附实验 称取 HPD5000、LK-02、LXD-200、D101 4 种大孔树脂各 10.00 g,置于 100 mL 锥形瓶中,分别加入 20.0 mL 银杏叶粗提物乙醇溶液,室温震荡吸附 24 h,使大孔树脂吸附完全,滤过,取出大孔树脂备用,取未吸附滤液测定总银

杏酸、总黄酮，计算不同类型大孔树脂的吸附率，结果见表 1。

$$I=(C_1\times V_1-C_2\times V_2)/(C_1\times V_1)$$

I 为吸附率，C₁ 为上样液中总银杏酸或总黄酮质量浓度，V₁ 为上样液体积，C₂ 为未吸附滤液中总银杏酸或总黄酮质量浓度，V₂ 为滤液体积

表 1 不同大孔树脂的吸附率和解吸率
Table 1 Adsorption and desorption rate of different resins

树脂类型	总银杏酸吸附率/%	总黄酮吸附率/%	总银杏酸解吸率/%
D101	64.27	42.09	78.63
HPD5000	70.69	10.54	85.30
LXD-200	88.13	14.87	90.45
LK-02	81.52	20.21	82.00

2.4.2 静态解吸实验 将滤过后的大孔树脂置于 100 mL 锥形瓶内，用蒸馏水冲洗除杂，加入 95% 乙醇 50.0 mL，室温震荡洗脱 24 h 后，滤过，得洗脱液，测定总银杏酸，计算不同类型大孔树脂的解吸率，结果见表 1。

$$J=(C_3\times V_3)/(C_1\times V_1-C_2\times V_2)$$

J 为解吸率，C₁ 为上样液中总银杏酸质量浓度，V₁ 为上样液体积，C₂ 为未吸附滤液中总银杏酸质量浓度，V₂ 为滤液体积，C₃ 为洗脱液中总银杏酸含质量浓度，V₃ 为洗脱液体积

可见 LXD-200 对总银杏酸的吸附率较高，HPD5000 对总黄酮的吸附率较低，总黄酮损失少；而 LXD-200 对总银杏酸的解吸率较高，说明大孔树脂再生能力强，效果较好。综合考虑，选取大孔树脂 LXD-200 用于后续脱酸工艺优化实验。

2.5 单因素实验

2.5.1 层次分析法确定权重系数 根据《中国药典》2020 年版一部的规定，将总银杏酸去除率、总黄酮转移率、提取物收率作为响应面法综合考察指标，分为 3 个层次，优先顺序为总银杏酸去除率>总黄酮转移率>提取物收率，构建指标成对比较的优先矩阵，见表 2。对表 2 中数据采用 AHP 法进行计算，结果总银杏酸去除率、总黄酮转移率、提取物收率的权重系数分别为 0.56、0.33、0.11，一致性比例因子小于 0.1，故指标优先比较判断矩阵具有满意的一致性，权重系数有效，将用于后续单因素实验、响应面法实验中，并计算综合评分。

$$R_{综}=(R_1\times 0.56+R_2\times 0.33+R_3\times 0.11)\times 100$$

R_综 为综合评分，R₁ 为银杏酸去除率，R₂ 为总黄酮转移率，R₃ 为提取物收率

表 2 指标成对比较的优先矩阵
Table 2 Priority matrix for paired comparison of indicator

权重指标	总银杏酸去除率	总黄酮转移率	提取物收率
总银杏酸去除率	1	5/3	5
总黄酮转移率	3/5	1	3
提取物收率	1/5	1/3	1

2.5.2 体积分数的考察 按照 2.2 项下的工艺，洗脱剂乙醇体积分数为 70%，洗脱液接收体积为 3 BV，考察体积分流量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 BV/h 对柱色谱脱酸综合评分的影响，结果见表 3。随着体积分流量增加，综合评分先增加后降低，当体积分流量为 1 BV/h，综合评分最高。综合考虑确定体积分流量 0.5~1.5 BV/h 进行响应面法优化脱酸实验。

表 3 体积分流量对综合评分的影响
Table 3 Effect of flow rate on comprehensive score

体积分流量/(BV·h ⁻¹)	综合评分
0.5	92.10
1.0	94.81
1.5	93.27
2.0	90.00
2.5	87.34

2.5.3 洗脱剂乙醇体积分数的考察 按照 2.2 项下的工艺，体积分流量为 1.0 BV/h，洗脱液接收体积为 3 BV，考察洗脱剂乙醇不同体积分数为 60%、65%、70%、75%、80%对柱色谱脱酸综合评分的影响，结果见表 4。随着乙醇体积分数增加，综合评分增加后降低，当乙醇体积分数为 70%，综合评分最高 95.45。综合实际考虑，确定乙醇体积分数为 65%~75%进行响应面法优化脱酸实验。

表 4 乙醇体积分数对综合评分的影响
Table 4 Effect of ethanol concentration on comprehensive score

乙醇体积分数/%	综合评分
60	90.36
65	94.71
70	95.45
75	92.28
80	86.93

2.5.4 洗脱液接收体积考察 按照 2.2 项下的工艺, 体积流量为 1.0 BV/h, 洗脱剂乙醇体积分数为 70%, 考察洗脱液接收不同体积 1、2、3、4、5 BV 对柱色谱脱酸综合评分的影响, 结果见表 5。随着洗脱液接收体积增加, 综合评分先增加后降低, 当接收体积为 3 BV 时, 综合评分最高 95.87。综合实际考虑, 确定接收体积 2~4 BV 进行响应面法优化脱酸实验。

表 5 接收体积对综合评分的影响
Table 5 Effect of received volume on comprehensive score

接收体积/BV	综合评分
1	74.76
2	91.82
3	95.87
4	93.99
5	88.43

2.6 响应面实验

2.6.1 因素与水平 根据响应面法的设计原理, 以体积流量 (A)、洗脱剂乙醇体积分数 (B)、洗脱液接收体积 (C) 为考察因素, 总银杏酸去除率、总黄酮转移率、提取物收率的综合评分为响应值, 进行三因素三水平的响应面分析实验, 筛选各因素的最优条件^[13-15]。脱酸工艺因素水平见表 6。

表 6 因素水平
Table 6 Factors and levels

水平	因素		
	A/(BV·h ⁻¹)	B/%	C/BV
-1	0.5	65	2
0	1.0	70	3
1	1.5	75	4

2.6.2 设计方案和结果 利用响应面优化法设计柱色谱脱酸工艺实验方案, 方案和结果见表 7, 模型方差分析结果见表 8。

利用 Design-Expert v8.0.6 软件对表 7 数据进行二次多元回归分析, 建立响应值与各因素的回归拟合方程 $Y = -1\ 139.72 + 12.72 X_A + 33.79 X_B + 38.43 X_C + 0.38 X_A X_B - 1.39 X_A X_C - 0.23 X_B X_C - 13.75 X_A^2 - 0.24 X_B^2 - 3.40 X_C^2$, $R^2 = 0.988\ 5$ 。

由表 8 方差分析结果可得模型 $F = 67.07$, $P < 0.000\ 1$, 说明脱酸工艺模型回归极其显著; 失拟项 $P = 0.558\ 7 > 0.05$, 说明失拟性结果不显著, 非实验

表 7 设计方案和结果
Table 7 Design plan and results

序号	A/(BV·h ⁻¹)	B/%	C/BV	综合评分
1	0.5	65	3	84.54
2	1.0	70	3	95.78
3	1.0	75	2	83.09
4	1.5	70	4	91.97
5	1.5	65	3	90.05
6	1.0	70	3	94.72
7	1.0	65	4	89.64
8	1.5	70	2	91.12
9	1.0	70	3	93.54
10	1.0	70	3	94.11
11	1.5	75	3	87.73
12	1.0	70	3	95.36
13	0.5	70	2	82.37
14	1.0	65	2	86.48
15	0.5	75	3	78.46
16	0.5	70	4	85.99
17	1.0	75	4	81.72

表 8 回归模型方差分析
Table 8 Variance analysis of quadratic regression equation

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	452.97	50.33	67.07	<0.000 1
A	1	108.86	108.86	145.07	<0.000 1
B	1	48.56	48.56	64.71	<0.000 1
C	1	4.90	4.90	6.53	0.037 8
AB	1	3.53	3.53	4.71	0.066 6
AC	1	1.92	1.92	2.56	0.153 9
BC	1	5.13	5.13	6.84	0.034 7
A ²	1	49.78	49.78	66.34	<0.000 1
B ²	1	155.06	155.06	206.64	<0.000 1
C ²	1	48.70	48.70	64.9	<0.000 1
残差	7	5.25	0.75		
失拟项	3	1.96	0.65	0.79	0.558 7
纯误差	4	3.30	0.82		
总差	16	458.22			

因素对实验结果影响不大。以上数据说明回归模型拟合度高, 模型成立, 可用于对脱酸工艺综合评分的预测和分析。因素 A、B、A²、B²、C² 的 $P < 0.01$, 因素 C、交互项 BC 的 $P < 0.05$, 说明其对脱酸工艺综合评分影响具有统计学意义。

2.6.3 等高线图及响应面图分析 利用 Design-Expert v8.0.6 软件对表 7 数据处理, 绘制得到体积流量、洗脱剂乙醇体积分数、洗脱液接收体积交互作用的等高线图和响应面图, 见图 1。

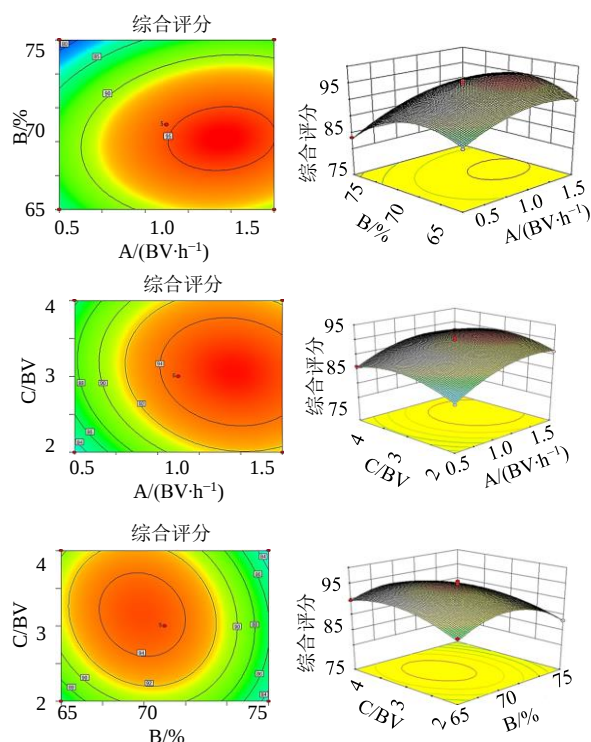


图 1 各因素对综合评分的影响

Fig. 1 Effect of factors on comprehensive score

可见当洗脱剂乙醇体积分数一定时, 综合评分随着体积流量的增大先逐渐升高, 当体积流量超过 1.25 BV/h 时, 综合评分逐渐降低; 当体积流量一定时, 综合评分随着乙醇体积分数的增大先逐渐升高, 当乙醇体积分数超过 69.14% 时, 综合评分逐渐降低。当洗脱液接收体积一定时, 综合评分随着体积流量的增大先逐渐升高, 当体积流量超过 1.25 BV/h, 综合评分逐渐降低; 当体积流量一定时, 综合评分随着洗脱液接收体积的增大先逐渐升高, 当接收体积超过 3.09 BV 时, 综合评分逐渐降低。当接收体积一定时, 综合评分随着乙醇体积分数增大先逐渐升高, 当乙醇体积分数超过 69.14% 时, 综合评分逐渐降低; 当乙醇体积分数一定时, 综合评分随着接收体积的增大先逐渐升高, 当接收体积超过 3.09 BV 时, 综合评分逐渐降低。

由响应面图可见, 洗脱剂乙醇体积分数的曲面坡度较陡峭, 对综合评分影响显著, 其次是体积流量和洗脱液接收体积。且交互项乙醇体积分数与洗

脱液接收体积的交互作用较强, 对综合评分的影响显著。

利用 Design-Expert 8.0.6 软件优化得到银杏叶提取物最佳柱色谱脱酸工艺, 即体积流量为 1.25 BV/h, 洗脱剂乙醇体积分数为 69.14%, 洗脱液接收体积为 3.09 BV。

2.7 验证实验

结合成本、实际生产需要, 将工艺调整为体积流量为 1.2 BV/h, 洗脱剂乙醇体积分数为 70%, 洗脱液接收体积为 3 BV。按照上述调整的优化工艺进行 3 批验证实验, 结果见表 9。可见该工艺稳定、可行、重复性好, 可作为银杏叶提取物树脂柱色谱脱酸工艺。

表 9 验证实验

Table 9 Validation experiment

批 次	总银杏酸 去除率/%	总黄酮转 移率/%	提取物 收率/%	综合 评分
1	99.91	89.83	86.72	95.13
2	99.84	90.25	83.30	94.87
3	99.95	91.87	85.94	95.74

3 讨论

为尽可能去除银杏叶提取物及其制剂中的总银杏酸, 减小其不良反应, 本研究考察发现大孔树脂 LXD-200 对总银杏酸具有较好的吸附效果, 能很好地脱除银杏叶提取物中的总银杏酸。通过单因素和响应面法实验, 优化得到大孔树脂 LXD-200 吸附脱除总银杏酸的最佳工艺。在此最佳工艺条件下, 进行验证实验得到的工艺稳定、可行。因此本研究可为后续脱酸工艺放大生产提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨慧萍, 高睿. 银杏药用成分及药理作用研究进展 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(8): 96-99.
- [2] 徐芳, 李杰, 毛宇, 等. 银杏叶提取物的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34(16): 124-127.
- [3] 张鹏飞, 廖丽君, 邓祯, 等. 银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(2): 426-428.
- [4] 张思珏. 银杏酸的药理毒理作用及脱酸方法研究进展 [J]. 中国社区医师, 2019, 35(8): 16-17.
- [5] 邵泽艳, 姜艳秋. 银杏酸的药理作用及银杏叶提取物脱酸方法研究进展 [J]. 乡村科技, 2018(11): 111-113.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 329-330.

- [7] 潘芸, 肖朝耿, 程珂伟. 超声波辅助去除白果中银杏酸的工艺优化 [J]. 浙江农业科学, 2018, 59(11): 2072-2073.
- [8] 刘茜倩, 刘伶文, 王晓军. 超声-溶剂萃取去除银杏叶提取物中的银杏酸 [J]. 纺织高校基础科学学报, 2021, 34(1): 108-113.
- [9] 杨世龙, 黄春丽, 唐颖. 配位法对银杏叶初提物脱除银杏酚酸的效果 [J]. 林产加工与利用, 2015, 29(2): 66-69.
- [10] 朱斌, 刘芬, 严兆华. 银杏提取物中脱除银杏酚酸的工艺研究 [J]. 北方药学, 2014, 11(4): 62-63.
- [11] 吴向阳, 仰榴青, 陈钧. 超临界 CO₂ 脱除银杏叶中银杏酸的研究 [J]. 食品科学, 2003, 24(10): 85-88.
- [12] 唐仕荣, 宋洁, 顾绍辉. 银杏外种皮银杏酸的大孔树脂及高速逆流色谱联合分离 [J]. 食品科技, 2020, 45(1): 280-293.
- [13] 秦俊哲, 高存秀. 不同大孔树脂对银杏酸的吸附分离特性研究 [J]. 中国酿造, 2010(10): 142-145.
- [14] 安晓东, 王沙沙, 杨丽微. 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): 102-106.
- [15] 唐霖, 徐冰婉, 范冰舵. 超临界 CO₂ 流体萃取脱除银杏叶提取物中银杏酸工艺的优化 [J]. 中成药, 2018, 40(6): 1392-1395.

【责任编辑 解学星】