

银杏叶中活性成分的提取工艺、测定及其进展

中国科学院生态环境研究中心(北京 100085) 姚渭溪*

摘要 概述银杏叶内活性成分(黄酮类和萜内酯)的提取工艺:水蒸汽蒸馏、溶剂索氏提取和超临界流体萃取,测定方法:分光比色法、衍生化—气相色谱法、萃取—高效液相色谱法和水解—高效液相色谱法。目前,融合提取法测定方法为一体的超临界流体萃取/超临界流体色谱—质谱(SFE/SFC—MS)的联用技术,它将是今后发展方向之一。

近10多年来,国内外特别是德国、日本、美国和法国等国家银杏叶中的化学成分及其分离方法、药理试验和临床应用进行了大量的研究工作^[1~15],结果表明:银杏叶中存在两类重要生理活性物质——黄酮类化合物(flavonoides)和萜内酯(ginkgolides and bilobalide)。它们具有捕获游离基、抑制血小板活化因子(PAF)促进血液循环及脑代谢等功能。用于治疗冠心病、心绞痛、增强记忆功能、治疗老年痴呆症和防治皮肤病、脱发等多种疾病,同时还可用于研制营养口服液、保健食品和化妆品等,其应用范围日益广泛。在新药产品不断出现的情况下,德国率先提出了银杏制剂含量的质量标准:黄酮醇糖甙 $\geq 24\%$ 、萜内酯 $\geq 6\%$ 和白果酸 $> 2 \times 10^{-6}$,现该标准已成为世界许多国家进出口银杏叶和制剂的检验标准。为了使银杏叶产品能出口创汇,参加国际市场的大循环、不断探索新的提取工艺、研究新的测定方法已成为大家共同关注的问题。

1 提取工艺

银杏叶中黄酮类化合物和萜内酯的提取工艺,大致可分为3种类型。

1.1 水蒸汽蒸馏法: 将银杏叶干燥、粉碎后, 100~120℃水蒸汽蒸馏, 蒸馏液冷却后, 用非极性大孔树脂 (或其他吸附剂) 吸附、浓缩, 然后用乙醇洗脱, 蒸干即得粉状结晶。该方法设备简单, 但提取率较低, 现已很少采用。

1.2 有机溶剂萃取法：这是目前国内外使用最广泛的方法^[1~9]，其提取工艺的专利也较多，可归纳为两种形式：一种是制备银杏叶粗提物，这类方法是把银杏叶干燥、粉碎后用有机溶剂（例如乙醇或丙酮、石油醚等）浸泡、萃取、过滤，滤液中的溶剂用减压蒸馏除去后，得银杏浸膏。这种方法的制备设备简单，产品得率高（约12%~14%），但产品中杂质含量较高，通常呈棕黑色。其活性成分黄酮化合物含量约7%~10%，萜内脂约0.6%~1%。另一种是制备银杏叶精提物：这类方法通常在粗提物制备基础上，进一步精制，常用精制方法有：液-液萃取

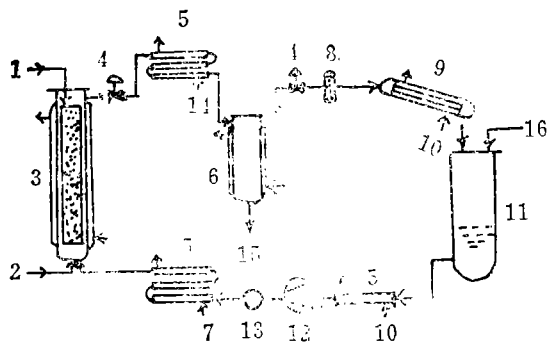


图1 600L的SFE装置简图

- | | | | |
|--------|--------|---------|----------------------|
| 1-原料 | 2-极性剂 | 3-萃取罐 | 4-减压阀 |
| 5-热交换器 | 6-分离罐 | 7-温水 | 8-过滤器 |
| 9-冷凝器 | 10-冷冻液 | 11-贮槽 | 12-高压泵 |
| 13-流量计 | 14-蒸汽 | 15-提纯产物 | 16-补充CO ₂ |

*Address, Yao Weixi, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing

(例如用二氯甲烷、氯仿或苯脱脂),沉淀法(用 NH_4OH 或 PbAc 等沉淀剂),和吸附-洗脱法(用大孔树脂、硅藻土或硅胶等吸附剂)。再通过无水 Na_2SO_4 干燥、过滤、减压蒸馏除去溶剂后,即可得精提取物。一般为黄褐色粉末,得率约1.0%~3.0%,其中黄酮类含量约达20%~26%,萜内酯达6%左右。

1.3 超临界流体提取法

近10年来,随着超临界流体提取(SFE)技术的迅速发展^[16],用该技术提取天然植物中的药用有效成分也越来越广泛,它和上述提取工艺相比较,具有提取效率高,无溶剂残留毒性、天然植物中活性成分和热不稳定成分不易被分解破坏而保持其天然的特征等优点,同时还可以通过控制临界温度和压力的变化,来达到选择性提取和分离纯化的目的,其基本装置如图1。

因此,在当今人们渴望回归大自然(Back to nature)的潮流中,该提取方法倍受青睐。用超临界二氧化碳提取银杏叶中药用成分的方法,已受到人们的关注,现欧州已有专利^[11],近年来我们和有关单位合作,用超临界二氧化碳提取银杏叶中黄酮类化合物,得到黄绿色精提物,得率为4.1%,其中黄酮占35%以上。该方法回收率为87%,相对标准偏差为5.4%($n=4$)。我们在进行扩大实验,为我国超临界提取银杏叶中药用成分的工业生产提供条件。

2 测定方法

银杏叶及其制剂中黄酮类化合物和萜内酯含量的测定,由于两者物化性质上的差别,往往分别进行。

2.1 黄酮类化合物的测定

2.1.1 前几年,国内使用较广的是“络合-分光光度法”^[10,14],其测定过程是把被测样品用70%乙醇溶解,经 NaNO_2 , $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 络合后,以芦丁为标准溶液,在UV510nm处作紫外分光的比色测定。此法的测试设备价廉,操作简便易学,但因样品未经过分离纯化,受杂质干扰,定量测定误差较大。

2.1.2 利用“衍生化-气相色谱法”^[3]。因为多数黄酮类化合物的沸点比较高,难于气化,要先把样品用衍生化试剂(例如双三甲基硅烷基三氟乙酰氨),制成黄酮衍生物,然后经气相色谱分离测定,该法由于装置较贵、操作繁琐,应用也不普遍。

2.1.3 目前使用较多方法是“高效液相色谱法”^[8,15,17,18],由于黄酮类化合物能溶解在有机溶剂中,样品不需经过衍生化反应,而直接经液相色谱进行分离测定,若以槲皮素为标准,用归一化方法即可以简便测出样品中总黄酮含量,虽这方法比“络合-分光光度法”简便,但仍含一定的误差,若将每一种黄酮化合物分离后,各自定量进行加和,得到总黄酮含量,这样误差较小,但这必须有各个黄酮化合物的标准样品才能做到。图2左是用该方法分离的色谱图。较好的方法是使用水解法先将黄酮甙水解为黄酮元后,用高效液相色谱测定其元含量,再通过计算得出黄酮甙的含量^[2,15,17,18]。高效液相色谱法还可以用来制备高纯的黄酮化合物,但高效液相色谱装置的价格较贵,操作也较分光光度法复杂些。

2.1.4 超临界流体色谱法(SFC)是一种新的分离技术,它综合了气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC)的优点,所以近年来国际上发展很快,1992年Hah用SFC测定了银杏叶中聚异戊烯醇(polyprenols)^[12]。

2.2 萜内酯的测定方法:目前已发现在银杏叶中的萜内酯包括有银杏内酯(ginkgolide A、B、C、J和M)以及白果内酯(bilobalide),它们在银杏叶中含量很低,比黄酮含量

约低一个数量级(约0.1%~0.3%),而且它们常温下在有机溶剂中溶解度比较小,因此测定之前往往要经过多步的分离、浓缩、纯化等前处理。然后再用高效液相色谱分离和紫外或差示折光检测器测定。由于萜内酯含量低,紫外检测时杂质干扰较大,最好使用差示折光检测器检测。该方法准确度较高,平均回收率为95.8%,其相对标准偏差(RSD)为4.3%^[4]。图2右是用该法分离广西银杏叶中萜内酯的HPLC色谱图。

3 展望

随着银杏制品应用范围的不断扩大,对提取工艺和测定方法的要求也不断提高,不仅要有高的提取率、好的产品质量,而且测定方法还要求准确简便、省时省力。由于超临界流体提取(SFE)比常规方法的提取率高,能保持产品的天然特征,而且产品中无有机溶剂的残留毒性,特别适合制作药品和食品,因此超临界流体提取技术将是生产银杏制品的主要发展方向之一。同时超临界色谱(SFC)也比常规气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)更适合天然产物成分分析。

近年来,超临界流体提取及其色谱和质谱或紫外、红外和核磁共振波谱的联用技术发展很快^[13]。它把提取和分离测定合为一体,准确、快速、简便,特别适合产品质量现场监控,其基本装置如图3。

这种联用技术目前在我国尚属空白,我们正在开展超临界流体提取/色谱-紫外(SF E/SFC-UV)联用技术,研究银杏叶中生理活性成分的工作。

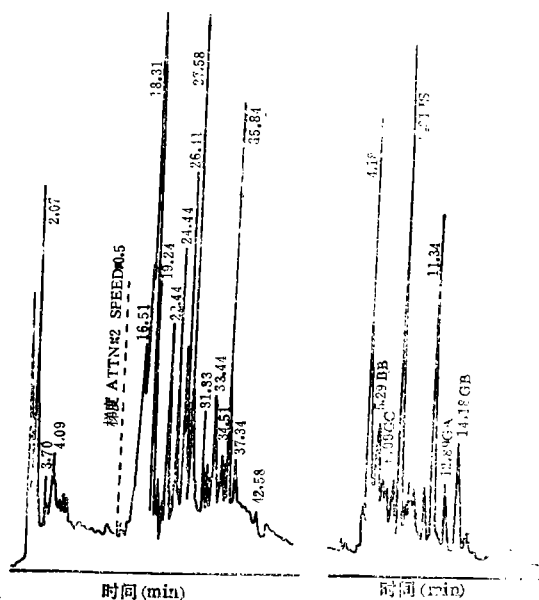


图2 银杏叶中活性成分的HPLC色谱图

左-黄酮化合物 右-萜内酯

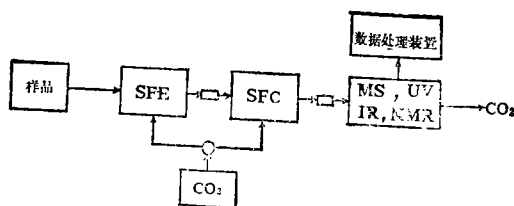


图3 超临界流体联用装置方框图

参考文献

- 1 高根 芳春. JP平3-98592
- 2 陈惠芳. 国外医药—植物药分册, 1993, 8(4): 159
- 3 庄林根. 国外医药—植物药分册, 1993, 8(6): 251
- 4 Beek T A V. J Chromatogr, 1991, 543: 375
- 5 Jong K W. EP0402925(1990)
- 6 李兆龙. 中成药, 1992, 14(6): 5
- 7 刘桂霞, 等. 国外医药—植物药分册, 1994, 9(1): 10
- 8 Hasler A, et al. J Chromatogr, 1992, 605(1): 41
- 9 虞杏英, 等. 药物分析杂志, 1993, 13(2): 85
- 10 刘重芳, 等. 中成药, 1992, 14(7): 7
- 11 Akiyoshi M, et al. EP 0308675(1988)
- 12 Huh H, et al. J Chromatogr, 1992, 600, 364
- 13 Jinno K. Hyphenated Techniques in Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. Netherlands, Elsevier Science Publishers 1992.25, 275
- 14 庄向平. 中草药, 1992(3): 122
- 15 姚渭溪, 等. 超临界萃取和高效液相色谱测定银杏叶中黄酮. 第四届全国中药和天然药物学术会议. 北京, 1994-04
- 16 Lee M L, et al. Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, Chromatographic Conferences, Inc Provo U T, 1990. 437
- 17 张晓琦, 等. 色谱, 1994, 12(4): 302
- 18 谢大年, 等. 色谱, 1994, 12(5): 384

(1994-09-20收稿)