

银杏叶总黄酮纯化工艺研究

黄金龙, 殷之武, 何新华*, 钱笑芳, 曾曲梅

浙江尖峰药业有限公司, 浙江 金华 321000

摘要: 目的 对银杏叶总黄酮的纯化工艺进行优化研究。方法 通过 DM-130 树脂和 D-101 树脂 (比例为 1:1) 进行混合, 色谱纯化银杏叶总黄酮, 用 500 mL 混合树脂装柱, 上样质量浓度为 10 mg/mL, 洗脱体积流量为 2.0 BV/h, pH 值 6.0, 600 mL 75%乙醇一步洗脱, 真空浓缩至干。结果 通过上述工艺分离纯化银杏叶总黄酮, 可得质量分数大于 24%的精制银杏叶总黄酮。结论 DM-130 树脂与 D-101 树脂按 1:1 比例组成的混合树脂对银杏叶总黄酮的纯化效果较二者单独使用好, 可用于银杏叶总黄酮的纯化。

关键词: 银杏叶; 黄酮; 混合树脂; 柱色谱; 纯化工艺

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)05-0922-04

Research on purification technology of total flavonoids in leaves of *Ginkgo biloba*

HUANG Jin-long, YIN Zhi-wu, HE Xin-hua, QIAN Xiao-fang, ZENG Qu-mei

Zhejiang Jianfeng Pharmaceutical Limited Company, Jinhua 321000, China

Key words: leaves of *Ginkgo biloba* L.; flavonoid; mixed resin; column chromatography; purification technology

银杏叶提取物(*Ginkgo Leaves Extract of Ginkgo biloba* L.) 主要包含银杏叶总黄酮和银杏萜类内酯两大类活性成分^[1], 其中银杏叶总黄酮包括槲皮素、山柰素以及异鼠李素, 萜类内酯包括白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 以及银杏内酯 C^[2-3]。银杏叶提取物具有活血化瘀、通络止痛、化浊降脂、抗氧化等方面的作用^[2-5]。鉴于银杏叶总黄酮具有独特的药理作用、临床治疗和保健价值^[6-7], 使银杏叶提取物及其制剂成为国内外研究开发的热点产品之一^[8]。目前, 银杏叶中银杏叶总黄酮的得率低, 生产成本较高, 生产符合《中国药典》2010 年版要求的银杏叶提取物的量较少, 无法满足日益增加的市场需求。因此, 不断探索银杏叶中银杏叶总黄酮的纯化工艺, 提高得率、降低成本, 以满足市场需求, 具有很现实的意义。目前, 对银杏叶总黄酮纯化工艺文献报道主要有关于银杏叶总黄酮提取和精制工艺的研究^[9], 关于银杏叶提取物工艺研究^[10-12]均采用大孔树脂色谱柱进行分离纯化银杏叶总黄酮, 色谱柱的填料树脂分别为 D-101 大孔树脂和 DM-130 大孔树脂, 梯度洗脱, 分别浓缩干燥的方法, 无疑增加了

操作的复杂性, 减少了银杏叶总黄酮的收率。本实验旨在通过研究确定最佳的纯化工艺, 提高银杏叶总黄酮得率, 降低生产成本。结合相关研究报道, 在本实验中将 D-101 和 DM-130 大孔树脂按一定比例 (1:1) 混合, 对银杏叶粗提物进行色谱纯化, 考察了银杏叶粗提物上样质量浓度、洗脱体积流量和上样液 pH 值 3 个因素的影响, 结果从银杏叶粗提物分离银杏叶总黄酮取得较好的效果, 最终确定了最佳的银杏叶总黄酮色谱纯化工艺条件。

1 仪器和材料

岛津高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司)。

银杏叶 (批号 110801, 金华医药有限公司, 经刘丽珊中药师鉴定符合《中国药典》2010 年版银杏叶项下规定); 槲皮素 (批号 200907)、山柰素 (批号 200808)、异鼠李素 (批号 200608) 对照品均购于中国药品生物制品检定所; 乙醇 (AR 级)。

2 方法与结果

2.1 分析方法的建立^[2]

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent ODS C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-0.4%磷酸溶液

收稿日期: 2011-11-23

作者简介: 黄金龙 (1965—), 高级工程师。Tel: (0579)82308978

*通讯作者 何新华 Tel: (0579)82258293 E-mail: hexinhua79_0120@sina.com

(50:50)为流动相;检测波长360 nm,进样量10 μ L,体积流量1 mL/min,柱温30 $^{\circ}$ C。理论塔板数按槲皮素计算不低于2 500。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量,精密称定,加甲醇制成分别含30、30、20 μ g/mL的混合溶液,作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取银杏叶提取物干粉约35 mg,精密称定,加甲醇-25%盐酸溶液(4:1)25 mL,置水浴中加热回流30 min,迅速冷却至室温,转移至50 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取滤液,即得供试品溶液。

2.1.4 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μ L,注入液相色谱仪,测定,分别计算槲皮素、山柰素和异鼠李素的量,按下式换算成总黄酮苷的量。

$$\text{总黄酮苷} = (\text{槲皮素} + \text{山柰素} + \text{异鼠李素}) \times 2.51$$

2.2 银杏叶总黄酮纯化方法

将银杏叶提取液(按料液比为1:10、80%乙醇提取3次,提取时间分别为2、1、1 h)加热浓缩到一定质量浓度,调节浓缩液的pH值,经过大孔树脂柱色谱,用一定体积分数的乙醇洗脱色谱柱,分离精制银杏叶总黄酮,收集乙醇洗脱液,浓缩至无醇味,干燥,即得。

2.3 银杏叶总黄酮大孔树脂柱色谱参数的确定

2.3.1 树脂预处理方法 在树脂柱内加入高于树脂层10 cm的95%乙醇浸泡4 h,放出浸液,用纯化水清洗树脂柱,清洗至流出液澄清不浑浊,pH值为7,即可使用。

2.3.2 不同树脂对银杏叶总黄酮分离纯化的影响 为了选择较好的纯化银杏叶总黄酮的树脂,分别对D-101、DM-130、AB-8、ADS-8、HPD-417、D-201和聚酰胺树脂7种树脂进行对比试验。分别取800 mL银杏叶提取液(质量浓度10 mg/mL),树脂用量500 mL进行色谱纯化分离,7种树脂分别进行3次平行试验,结果总黄酮的质量分数分别为22.67%、24.43%、18.94%、17.25%、20.38%、14.56%、10.39%。D-101和DM-130树脂对分离纯化银杏叶总黄酮效果最好。

2.3.3 D-101和DM-130混合树脂对银杏叶总黄酮分离纯化的影响 由“2.3.1”项结果可知,D-101和DM-130两种型号的树脂用于分离纯化银杏叶总黄酮效果较好,但是单独进行色谱分离,不能很好地确保得到符合《中国药典》2010年版要求的银杏

叶总黄酮的质量标准(银杏叶总黄酮质量分数 $\geq$ 24%)^[2],因此对D-101和DM-130两种型号的树脂进行进一步研究,将两者按照不同比例混合进行色谱分离纯化银杏叶总黄酮。将D-101与DM-130按比例1:0、1:0.5、1:1、1:1.5、1:2、0:1进行混合。分别取800 mL银杏叶提取液(10 mg/mL),混合树脂用量500 mL进行色谱分离纯化银杏叶总黄酮,6种不同比例的混合树脂分别进行3次平行试验,结果总黄酮的质量分数分别为22.97%、25.43%、27.18%、26.02%、25.48%、24.79%。表明D-101与DM-130按1:1混合得到的混合树脂对分离纯化银杏叶总黄酮效果最好。

2.3.4 上样量对混合树脂吸附银杏叶总黄酮的影响 确定混合树脂用量为500 mL,上样液银杏叶总黄酮质量浓度为10 mg/mL,分别量取600、700、800、900、1 000 mL的上样液,控制上样体积流量为2 BV/h,收集并测量,计算树脂的吸附量。结果吸附量分别为6.0、7.0、8.0、8.1、8.1 g,当上样体积为800 mL,即上样量为8.0 g时,混合树脂对银杏叶总黄酮的吸附能力最佳。

2.3.5 上样体积对混合树脂吸附银杏叶总黄酮的影响 确定混合树脂用量为500 mL,上样液中含有银杏叶总黄酮为8 g,分别配制成600、700、800、900、1 000 mL不同体积进行上样,控制上样体积流量为2 BV/h,收集并测量,计算树脂的吸附量,结果吸附量分别为6.0、7.5、7.9、7.8、7.5 g。当上样液体积为800 mL时,混合树脂对银杏叶总黄酮的吸附能力最好。

2.3.6 上样液质量浓度对混合树脂吸附银杏叶总黄酮的影响 取一定量的原液(提取液浓缩到一定体积后的银杏叶提取液),分别稀释到质量浓度分别为6、7、8、9、10、11、12 mg/mL的不同上样液,确定上样体积为800 mL,控制上样体积流量为2 BV/h,收集流出液并测量,计算树脂的吸附量,结果吸附量分别为4.8、5.6、6.4、7.2、8.0、7.9、8.0 g。当药液质量浓度为10 mg/mL时,混合树脂对银杏叶总黄酮的吸附能力最大。

2.3.7 上样液pH值对混合树脂吸附银杏叶总黄酮的影响 控制75%乙醇吸附体积流量为2 BV/h,上样液质量浓度为10 mg/mL,上样体积为800 mL,分别调节pH值为3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5,收集流出液并测量,计算树脂的吸附量,结果吸附量分别为5.8、6.2、7.2、7.8、7.9、7.9、7.5 g。当

pH 值控制在 6.0 时, 树脂对银杏叶总黄酮的吸附能力最大。

2.3.8 不同体积分数乙醇对银杏叶总黄酮洗脱量的影响 准确量取上样液体积 800 mL, 上样液质量浓度为 10 mg/mL, 洗脱体积流量为 2 BV/h, 分别配制成 60%、65%、70%、75%、80%、85% 不同体积分数乙醇 600 mL, 洗脱树脂柱, 收集流出液并测量, 计算树脂的洗脱量, 结果洗脱量分别为 6.3、7.0、7.5、7.8、7.8、7.7 g。当采用 75%、80% 乙醇进行洗脱时, 银杏叶总黄酮洗脱较彻底, 综合考虑成本因素, 故选择 75% 乙醇为洗脱剂。

2.3.9 不同体积洗脱剂对银杏叶总黄酮洗脱量的影响 确定上样体积 800 mL, 上样液质量浓度为 10 mg/mL, 洗脱体积流量为 2 BV/h, 乙醇体积分数为 75%, 准确量取 450、500、550、600、650、700 mL 不同体积的乙醇溶液洗脱树脂柱, 收集流出液并测量, 计算树脂的洗脱量, 结果洗脱量分别为 6.2、7.1、7.6、7.8、7.9、7.8 g。当 75% 乙醇的体积为 600 mL

时, 对银杏叶总黄酮的洗脱较为彻底。

2.3.10 不同洗脱体积流量对银杏叶总黄酮洗脱量的影响 取质量浓度为 10 mg/mL, 体积为 800 mL 的上样液, 用 75% 乙醇解吸, 分别控制洗脱体积流量为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 BV/h 对大孔树脂柱进行洗脱, 收集流出液并测量, 计算树脂的洗脱量, 结果洗脱量分别为 3.1、4.5、6.8、7.8、7.8、7.9 g。当 75% 乙醇解吸体积流量控制在 2.0 BV/h 时, 树脂对银杏叶总黄酮的洗脱能力最大。

2.4 银杏叶总黄酮提取物最佳纯化工艺的确定

为了确定银杏叶总黄酮提取物的最佳提取工艺, 准确量取体积为 800 mL 的银杏叶提取液 (银杏叶总黄酮质量浓度 10 mg/mL), 75% 乙醇洗脱剂体积为 600 mL, 以上样液质量浓度 (A)、洗脱体积流量 (B)、上样液 pH 值 (C) 3 因素作为试验因子, 总黄酮收集量为指标进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。因素水平及银杏叶总黄酮正交试验结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 银杏叶总黄酮提取物 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test for total flavonoids extract in leaves of *G. biloba*

试验号	A / (mg·mL ⁻¹)	B / (BV·h ⁻¹)	C	D (误差)	收集量 / g
1	9 (1)	1.5 (1)	5.0 (1)	(1)	6.53
2	9 (1)	2.0 (2)	5.5 (2)	(2)	6.89
3	9 (1)	2.5 (3)	6.0 (3)	(3)	6.95
4	10 (2)	1.5 (1)	5.5 (2)	(3)	7.45
5	10 (2)	2.0 (2)	6.0 (3)	(1)	7.81
6	10 (2)	2.5 (3)	5.0 (1)	(2)	7.63
7	11 (3)	1.5 (1)	6.0 (3)	(2)	7.37
8	11 (3)	2.0 (2)	5.0 (1)	(3)	7.58
9	11 (3)	2.5 (3)	5.5 (2)	(1)	7.63
K_1	20.37	21.35	21.74	21.97	
K_2	22.89	22.28	21.97	21.89	
K_3	22.58	22.21	22.13	21.98	
R	2.52	0.93	0.39	0.09	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

误差来源	偏差	自由度	F 值	显著性
A	1.259	2	626.500	$P < 0.001$
B	0.179	2	89.500	$P < 0.05$
C	0.026	2	13.000	
D (误差)	0.002	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

由表 1 和 2 可知, R 值由大到小依次为上样液质量浓度 > 洗脱体积流量 > 上样液的 pH 值, 方差分析结果表明, 因素 A 具有极显著影响 ($P < 0.001$), 因素 B 具有显著影响 ($P < 0.05$)。上述 3 个因素对银杏叶总黄酮提取物纯化的影响程度为上样液质量浓度 > 洗脱体积流量 > pH 值, 其最佳试验方案为 $A_2B_2C_3$, 即用 DM-130 和 D-101 大孔树脂柱 (比例为 1:1) 混合树脂 500 mL 装柱, 600 mL 75% 乙醇

洗脱的前提下,洗脱体积流量为 2.0 BV/h, pH 值 6.0, 银杏叶总黄酮质量浓度为 10 mg/mL, 上柱体积为 800 mL。

2.5 验证试验

以 $A_2B_2C_3$ 作为优化银杏叶总黄酮纯化工艺条件,为了确定上述试验结果,需要按照 $A_2B_2C_3$ 的工艺条件重复试验 5 次,准确称取银杏叶 6 000 g (银杏叶总黄酮质量分数为 0.82%),按料液比为 1:10、75%乙醇提取 3 次,提取时间分别为 2、1、1 h,浓缩提取液到 500 mL,质量浓度为 88 mg/mL,检测其浓缩液中银杏黄酮质量分数为 8.53%,分别配制成 5 份满足工艺条件所需的上柱溶液,按最佳纯化工艺参数操作。结果银杏叶总黄酮收集量分别为 7.56、7.50、7.45、7.52、7.40 g,平均收集量为 7.48 g, RSD 为 1.7%,银杏叶总黄酮质量分数为 25.4%,平均得率为 93.5%。该工艺条件下重复性良好。

3 讨论

本实验研究了银杏叶黄酮提取物纯化工艺的优化条件,摸索了比较完整的适合工业化生产的银杏叶总黄酮提取物工艺条件。最佳工艺为在混合树脂 500 mL 装柱,600 mL 75%乙醇洗脱的前提下,洗脱体积流量为 2.0 BV/h, pH 值 6.0, 银杏叶总黄酮质量浓度为 10 mg/mL,过 DM-130 和 D-101 混合大孔树脂柱(比例为 1:1),避免了大孔树脂柱色谱时进行不同体积分数乙醇分步洗脱的过程,简化了生产操作的步骤,同时也降低了生产成本和生产周期,通过 75%乙醇一步洗脱混合大孔树脂柱,对树脂柱内的银杏叶黄酮进行解析,收集洗脱液,浓缩干燥即得银杏叶黄酮提取物,该银杏叶黄酮提取物

中所含的银杏叶黄酮大于 24%,符合《中国药典》2010 年版对银杏叶黄酮的规定。

参考文献

- [1] 何琦,及元乔,丁立生,等. D140 大孔吸附树脂银杏叶总黄酮提取纯化性能研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 56-59.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 刘心平,徐文弟. 银杏叶黄酮提取工艺及对 Hela 细胞 Bcl-2mRNA 表达的影响 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2005, 39(3): 250-252.
- [4] 徐艳芬,张丽娟,宋新波. 银杏叶提取物的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 452-456.
- [5] 金虹,黄毅,王继生,等. 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1339-1342.
- [6] 李宁,李楚. 银杏叶总黄酮提取工艺的正交设计研究 [J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2010, 30(1): 74-76.
- [7] Lichtblau D, Buality J M, Nakanishi K. Efficient extraction of ginkgolides and bilobalide from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(10): 1501-1504.
- [8] 马盼香,方成根,连渝平. 银杏叶制剂研究的现状与展望 [J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(22): 2486-2487.
- [9] 韩学哲,王东双,安晓东,等. 银杏叶总黄酮提取和精制工艺的研究 [J]. 化学工程师, 2011(4): 60-62.
- [10] 雷天乾,胡晓娟,高琳,等. 银杏叶提取工艺的研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(11): 536-538.
- [11] 齐丽霞,郑彦峰,谈锋. 银杏叶总黄酮提取方法的比较研究 [J]. 江西农业学报, 2007, 19(1): 80-83.
- [12] 欧少英,钟兆健. 正交试验优选银杏叶总黄酮提取工艺的研究 [J]. 广东药学, 2004, 14(3): 30-32.